

Vrijednosti serumskih proteina u ekstrahepatičnoj kolestazi štakora

Aleksandar Včev, Ivan Čandrlić,
Stjepan Gamulin i Dubravko Božić

Izvorni znanstveni rad
UDK 616.36-008.6:612.398
Prispjelo: 25. prosinca 1988.

Klinika za unutarnje bolesti Opće bolnice Osijek i Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

U ovom istraživanju učinjena je potpuna opstrukcija duktus koledokusa u štakora, te je promatran utjecaj ekstrahepatične kolestaze na koncentracije serumskih proteina.

Uočeno je da ekstrahepatična kolestaza izaziva kontinuirani pad koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu. Pad ukupnih proteina u serumu nije statistički značajan u odnosu na kontrolnu koncentraciju, dok je pad albumina statistički značajan ($P < 0,01$) već od sedmog dana trajanja kolestaze.

Kolestaza dovodi do promjena vrijednosti elektroforetskih frakcija serumskih proteina. Uočava se kontinuirani, statistički značajan pad ($P < 0,01$) od sedmog dana, pad albuminske frakcije, što odgovara padu apsolutne koncentracije albumina u serumu. Osim ove promjene, dolazi do kontinuiranog i statistički značajnog ($P < 0,01$) porasta beta frakcije od sedmog dana poslije operacije. Tridesetog dana dolazi do spajanja beta i gama globulinske frakcije u jednu.

Kolestaza dovodi do višestrukog porasta aktivnosti ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, gama GT, SGOT i SGPT u serumu. Ukupni bilirubin, alkalna fosfataza i gama GT kontinuirano rastu do 14. dana trajanja kolestaze, kada su zabilježene i najviše koncentracije. Nakon toga dolazi do pada koncentracija ovih parametara. Uočene su i statistički značajne ($P < 0,05$) linearne korelacije između koncentracije ukupnih proteina i trajanja kolestaze (negativna), između koncentracije ukupnog bilirubina i trajanja kolestaze od 3. do 14. dana, te između koncentracija ukupnih proteina i albumina u serumu.

Postoje i statistički značajne kvadratne korelacije između: koncentracija ukupnih proteina i trajanja kolestaze ($P < 0,01$), albumina i trajanja kolestaze ($P < 0,01$), alkalne fosfataze i trajanja kolestaze ($P < 0,05$), te između gama GT u serumu i trajanja kolestaze ($P < 0,01$).

Gljučne riječi: ekstrahepatična kolestaza štakora, serumski proteini

Kolestaza je poremećaj lučenja ili zastoj žuči, uz povišenje koncentracije žučnih sastojaka u plazmi. Kolestaza može biti intrahepatična ili ekstrahepatična. Ekstrahepatična kolestaza je posljedica mehaničke zapreke tijeku žuči kroz duktus hepaticus, koledokus ili papilu Vateri. To je tipična zastojna ili opstruktivna žutica.⁶

U literaturi postoje različita mišljenja o utjecaju ekstrahepatične kolestaze na biosintezu proteina u jetri.

Proučavana je ugradnja (radioaktivnog leucina) aminokiselina u jetrene proteine tijekom kolestaze u štakora. Uočeno je da jetreno tkivo kolestatskih životinja ugrađuje leucin u proteine in vitro u znatno višem stupnju u odnosu na jetreno tkivo neoperiranih životinja.¹² U radu¹² se navodi da je u jednom drugom istraživanju uočena povišena ugradnja aminokiselina u jetrene odsječke od pacijenata s opstruktivnim ikterusom.

Sljedeća studija pokazuje da je stimulacija sinteze proteina relativno nespecifična, tj. većina proteina bila je obilježena u većem stupnju u kolestatskom tkivu.¹⁰

U narednom istraživanju rezultati upućuju na povišen promet proteina u kolestatskoj jetri, ali i na diskrepanciju između malih učinaka kolestaze na metabolizam jetrenih proteina in vivo i znatnih alteracija in vitro.¹¹

Istraživan je i utjecaj mehaničkog ikterusa na cijeljenje abdominalnih rana. Cijeljenje rana u kolestazi bilo je usporeno. U tom radu evidentna je razlika u vrijednostima proteina u serumu operiranih u odnosu na kontrolne štakore. Te vrijednosti su niže 5, 15. i 30. postoperativnog dana, ali razlike nisu statistički značajne.¹

Nasuprot tome stoje podaci da ligiranje i presijecanje duktus koledokusa dovodi ne samo do žutice nego i do signifikantnog poremećenja jetrenog metabolizma s anemijom i hipoalbuminijom.⁷

Proučavan je i utjecaj ekstrahepatične kolestaze na poliribosomski sustav u hepatocitu, jer se, istražujući poliribosomske strukture, može dobiti uvid u patogenetski mehanizam otklona u biosintezi proteina. Nađeno je da ekstrahepatična kolestaza izaziva porast monomerne frakcije na račun poliribosoma, što bi govorilo u prilog smanjene sinteze proteina u jetri.^{3, 4}

Cilj istraživanja je u tome da se ustanovi utjecaj ekstrahepatične kolestaze na vrijednosti (sintezu) serumskih proteina, ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, gama GT, SGOT-a i SGPT-a. Istraživanje ima za cilj da uoči promjene koje su vezane uz proces adaptacije na stanje potpune opstrukcije glavnog žučnog voda u štakora.

MATERIJAL I METODE

Za pokus je korišteno 10 štakora, plus 5 štakora koji su bili kontrolna grupa. U 10 štakora izazivali smo opstruktivni ikterus podvezivanjem duktus koledokusa. U određenim vremenskim intervalima (nakon 0, 3, 7, 14 i 30 dana od operacije) vadena je krv operiranim i neoperiranim štakorima i određene su koncentracije serumskih proteina, ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, gama GT, SGOT i SGPT.

Osim toga, rađena je i elektroforeza serumskih proteina. Pokusi su rađeni na albino štakorima, mužjacima, koji su bili stari oko 2 mjeseca, a teški 190 do 240 grama. Hranjeni su kompletnom krmnom smjesom za štakore »Sljeme« ad libitum i imali su obilje vode.

Štakori su operirani pod eter narkozom, uz mjere asepse i antiseptike.

Koža abdominalne stijenke je ošišana, zatim izbrijana, te dezinficirana prvo alkoholom, a potom otopinom joda. Zatim je učinjena gornja medijalna laparotomija. Pri tom

se učini rez na koži u medijalnoj liniji, te se otpreparira koža jednim dijelom od muskulature. Rez na muskulaturi učini se 1 do 2 mm lateralno od lineae albe da bi bolje zarastao i da se izbjegne postoperativna hernija. Prethodno propisno kirurški opranim rukama, ovlaženim sterilnom fiziološkom otopinom, pristupi se želucu u području pilorusa, lagano se odigne duodenum u cilju da se prikaže glavni žučovod. U malom području oko 1 cm distalno od spajanja žučovoda postavi se prva ligatura, a druga oko 0,7 cm distalnije u odnosu na prvu ligaturu. Ligature su postavljene od dakrona 2-0. Anestezija s operacijom je trajala oko 10 minuta, s tim što se vodilo računa da utroba bude vlažna (po potrebi je dodavana sterilna fiziološka otopina u abdominalnu šupljinu vlažnim tupferom). Nakon repozicije duodenuma, stijenka trbušne šupljine se zatvori produžnim šavom peritoneuma i muskulature, a u drugom sloju kože. Eterska anestezija je tako dozirana da se pri postavljanju zadnjeg šava štakor počinje buditi.

Uzimanje uzoraka krvi za određivanje ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, ukupnih serumskih proteina, albumina, gama GT, SGOT-a, SGPT-a i elektroforezu serumskih proteina vršeno je iz vene jugularis nakon anestezije štakora pomoću Nesdonala (6 mg/kg tjelesne težine). Uzimano je 3-3,5 ml krvi. Centrifugiranjem (Tehtnica ŽELEZNIKI LC-320, na 3000 okretaja u minuti kroz 10 minuta) odvojen je serum i pohranjen u hladnjak (temp. +4 °C). Unutar 24 sata određene su koncentracije ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, gama GT-a, SGOT-a i SGPT-a u automatskom analizatoru seruma Greiner GSA II. Kao reagensi korišteni su Boehringer reagensi specifični za određene pretrage. Određivanje ukupnih proteina u serumu izvršeno je Biuret metodom koristeći Wachselbaumov reagens, a kao fotometar korišten je Photometer 1101 M. Za elektroforezu serumskih proteina cellogel tehnikom korišteni su: voltmetar (0-500 V, 0-150 mA), semimikroaplikatori (30-50 μl), elektroforetska kada i mostovi firme CHEMETRON - Milano. Super cellomatic CGA denzitometar korišten je za denzitometrijsko očitavanje cellogel traka na kojima je rađena elektroforeza serumskih proteina.

Statistička obrada podataka rađena je prema postupcima opisanim u udžbenicima: Osnovne statističke metode za nematematičare.¹⁵ Značajnost razlika između dvije aritmetičke sredine računata je pomoću Student-T-testa. Jednadžbe pravaca i parabola regresije, te njihovi korelacijski koeficijenti izračunati su metodom najmanjih kvadrata.

REZULTATI

Vidljive promjene na životinjama

Dva dana nakon operacije mogla se uočiti žutica, a trećeg dana bila je jasno izražena na uskama. Idući prema tridesetom postoperativnom danu, životinje su bile tromije, a primjećivalo se povećanje trbuha. Kroz kožu je bilo mougće uočiti enormno dilatirani duktus koledokus. Tridesetog postoperativnog dana, nakon laparotomije, bilo je lako uočiti jako dilatirane žučne vodove proksimalno od mjesta ligature i između proksimalne i distalne ligature proširen duktus koledokus. Žuč u proksimalnom dijelu duktusa koledokusa iznad prve ligature bila je pod tlakom, koji je najvjerojatnije doveo do popuštanja prve ligature. Jetreno tkivo bilo je znatnije promijenjeno u odnosu na jetreno tkivo kontrolnih štakora. Jetra je bila makroskopski grublje, a iz rezne plohe manje je krvarila (prilikom odsijecanja režnja).

Kretanje koncentracije ukupnih proteina u serumu

Koncentracija ukupnih proteina u serumu u kontrolnoj grupi životinja iznosila je $74,3 \pm 2,6$ g/l ($\bar{x} \pm s$). Najveća koncentracija ukupnih proteina u serumu operiranih životinja bila je nakon tri dana i iznosila je $73,4 \pm 2,9$ g/l ($\bar{x} \pm s$). Poslije toga slijedi pad koncentracije ukupnih proteina u serumu. Ovaj pad je kontinuiran. Nakon sedam dana trajanja kolestaze, koncentracija ukupnih proteina u serumu bila je $73,2 \pm 3,2$ g/l ($\bar{x} \pm s$), a poslije 14. dana iznosila je $72,2 \pm 3,5$

g/l ($\bar{x} \pm s$). Tridesetog postoperativnog dana koncentracija ukupnih proteina u serumu bila je najniža i iznosila je $71,9 \pm 2,8$ g/l ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije albumina u serumu

Koncentracija albumina u serumu životinja kontrolne grupe bila je $29,3 \pm 1,3$ g/l ($\bar{x} \pm s$). Nakon tri dana trajanja kolestaze koncentracija albumina u serumu bila je $28,4 \pm 3,5$ g/l ($\bar{x} \pm s$), a poslije sedam dana iznosila je $24,8 \pm 1,9$ g/l ($\bar{x} \pm s$), da bi 14. dana bila zabilježena koncentracija od $23,8 \pm 1,6$ g/l ($\bar{x} \pm s$). Nakon trideset dana kontinuirani pad albumina zaustavio se na koncentraciji od $22,3 \pm 1,5$ g/l ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije ukupnog bilirubina u serumu

Koncentracija ukupnog bilirubina u serumu u kontrolnoj grupi iznosila je $4,04 \pm 1,6$ umol/l ($\bar{x} \pm s$). Koncentracija ukupnog bilirubina u serumu nakon tri dana trajanja kolestaze bila je $171 \pm 50,7$ umol/l ($\bar{x} \pm s$), a poslije sedam dana iznosila je $180,4 \pm 29,8$ umol/l ($\bar{x} \pm s$), da bi nakon četrnaest dana bila $196,6 \pm 43,3$ umol/l ($\bar{x} \pm s$), što je bila i maksimalna koncentracija ukupnog bilirubina u serumu tijekom kolestaze. Tridesetog dana koncentracija ukupnog bilirubina pala je na $161 \pm 27,1$ umol/l ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije alkalne fosfataze u serumu

Koncentracija alkalne fosfataze od $225,2 \pm 33,7$ i. j. ($\bar{x} \pm s$) nalazila se u serumu životinja kontrolne grupe. Nakon tri dana trajanja kolestaze aktivnost alkalne fosfataze bila je $698,4 \pm 128,5$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), a poslije sedam dana iznosila je $881,6 \pm 251,6$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), da bi četrnaestog dana dostigla maksimum od $974,3 \pm 223,6$ i. j. ($\bar{x} \pm s$). Tridesetog postoperativnog dana koncentracija alkalne fosfataze u serumu bila je $659 \pm 122,4$ i. j. ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije SGOT u serumu

Aktivnost SGOT-a u serumu štakora kontrolne grupe iznosila je $42,8 \pm 5,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$). Nakon trećeg postoperativnog dana aktivnost SGOT-a u serumu bila je $294,6 \pm 106,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), a poslije sedam dana pala je na $217,4 \pm 65,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), da bi četrnaestog dana iznosila $287,4 \pm 105,8$ i. j. ($\bar{x} \pm s$). Najveća aktivnost bila je tridesetog postoperativnog dana $395 \pm 141,8$ i. j. ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije SGPT-a u serumu

$24,6 \pm 5,7$ i. j. ($\bar{x} \pm s$) bila je koncentracija SGPT-a u serumu štakora kontrolne grupe. Nakon tri dana trajanja kolestaze SGPT je dostigao najvišu aktivnost od $176,3 \pm 65,8$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), a poslije sedam dana pada na $54,1 \pm 20,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), da bi četrnaestog dana aktivnost SGPT-a porasla na $56,7 \pm 22,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$). Tridesetog postoperativnog dana koncentracija SGPT-a iznosila je $83,7 \pm 28,2$ i. j. ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije gama-GT u serumu

Koncentracija gama-GT u serumu štakora kontrolne grupe iznosila je $0,9 \pm 0,5$ i. j. ($\bar{x} \pm s$). Nakon tri dana trajanja kolestaze aktivnost gama-GT u serumu bila je $4,4 \pm 3,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), a nakon sedmog dana iznosila je $5,9 \pm 2,9$ i. j. ($\bar{x} \pm s$), da bi četrnaestog postoperativnog dana dostigla maksimalnu koncentraciju od $10,3 \pm 3,6$ ($\bar{x} \pm s$). Tridesetog dana aktivnost gama-GT u serumu bila je $9,7 \pm 4$ i. j. ($\bar{x} \pm s$).

Kretanje koncentracije elektroforetskih frakcija serumskih proteina

U kontrolne grupe štakora relativne koncentracije elektroforetskih frakcija serumskih proteina bile su: albuminska frakcija $39,4 \pm 1,2\%$, alfa 1 frakcija $12,4 \pm 0,7\%$, alfa 2 frakcija $8,6 \pm 0,8\%$, beta-globulinska frakcija $20,1 \pm 0,7\%$, gama-globulinska frakcija $19,4 \pm 0,8\%$.

U operiranih štakora relativne koncentracije elektroforetskih frakcija serumskih proteina tijekom kolestaze izno-

sile su: 3. dana kolestaze albuminska frakcija $38,7 \pm 7,5\%$, alfa 1 $12,4 \pm 1,3\%$, alfa 2 $8,3 \pm 1,2\%$, beta-globulinska $21,2 \pm 0,9\%$, gama-globulinska $19,4 \pm 1,1\%$. Sedmog dana trajanja kolestaze dobili smo ove koncentracije: albuminska $33,9 \pm 6,8\%$, alfa 1 $12,8 \pm 1,4\%$, alfa 2 $8,8 \pm 1,1\%$, beta $25,2 \pm 1,2\%$, gama $19,2 \pm 1\%$, a četrnaestog dana imali smo slijedeće vrijednosti: albuminska $33 \pm 6,5\%$, alfa 1 $12,9 \pm 1,2\%$, alfa 2 $8,1 \pm 1\%$, beta $26,6 \pm 1,1\%$, gama $19,2 \pm 0,9\%$. Tridesetog dana došlo je do spajanja beta i gama globulinske frakcije ($47,7 \pm 6,4\%$), a ostale su iznosile: albuminska $30,9 \pm 6,8\%$, alfa 1 $12,9 \pm 1,3\%$, alfa 2 $8,4 \pm 0,9\%$.

Korelacije između različitih parametara

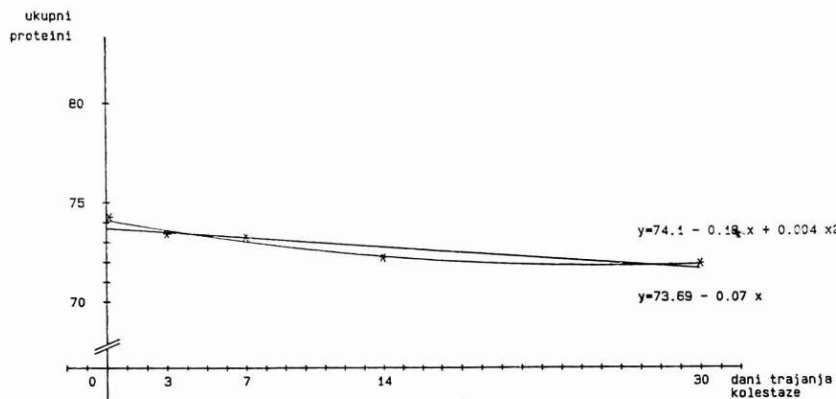
Tablica 1. prikazuje korelacije između različitih parametara, koeficijenta korelacija, razine značajnosti koeficijenta korelacije i jednadžbe pravca regresije i parabola regresije.

Statistički značajne linearne i/ili kvadratne korelacije između određenih parametara prikazane su na slikama 1, 2, 3, 4. i 5.

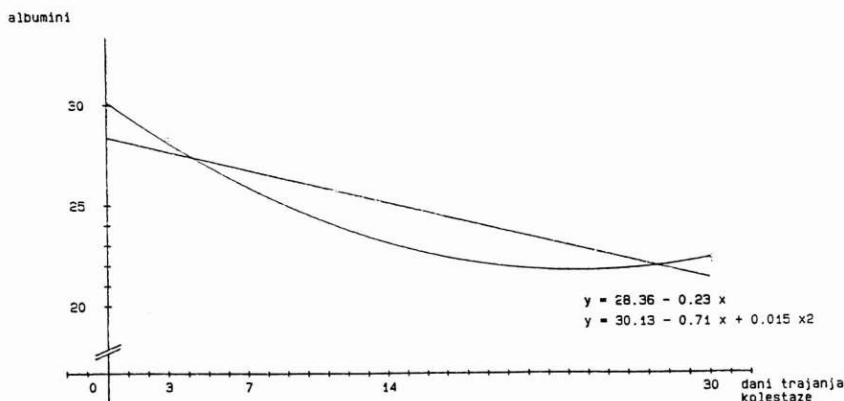
TABLICA 1.
Korlacija različitih parametara, koeficijenti korelacija, nivoi značajnosti koeficijenata korelacija i jednadžbe pravca i parabola regresije

KORELACIJA	KOEFICIJENT KORELACIJE	NIVO ZNAČ. KOEF. KOREL.	JEDNADŽBA PRAVCA REGRESIJE
Ukupni proteini-trajanje kolestaze	$r = -0,913$	$P < 0,05$	$Y = 73,69 + (-0,07)X$
Albumini-trajanje kolestaze	$r = -0,873$	$P > 0,05$	
Ukupni bilirubin-traj. kol.	$r = 0,412$	$P > 0,05$	
Ukup. bil.-traj. kol. od 3. do 14. dana	$r = 0,999$	$P < 0,05$	$Y = 179,7 + 0,4X$
Alkalna fosfataza-traj. kol.	$r = 0,305$	$P > 0,05$	
SGOT-trajanje kolestaze	$r = 0,710$	$P > 0,05$	
SGPT-trajanje kolestaze	$r = 0,041$	$P > 0,05$	
Gama GT-trajanje kolestaze	$r = 0,808$	$P > 0,05$	
Ukup. proteini-albumini	$r = 0,955$	$P < 0,05$	$Y = -245,5 + 3,72X$
Ukup. protei.-ukup. bilir.	$r = -0,795$	$P > 0,05$	
Ukupni bilirubin-albumini	$r = -0,687$	$P > 0,05$	

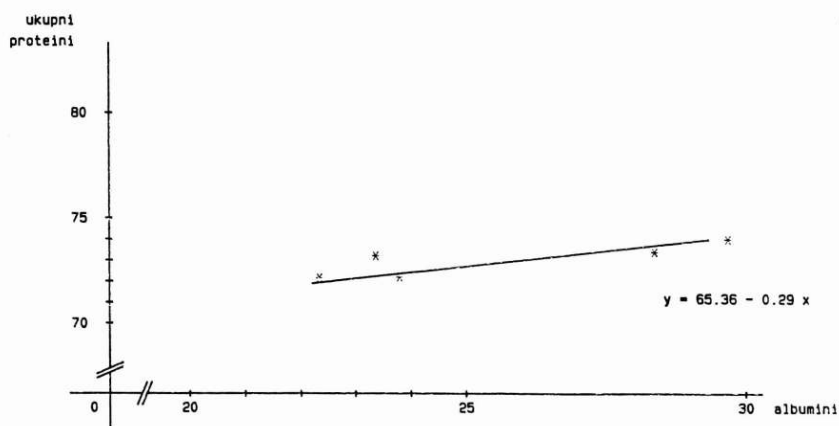
KORELACIJA	KOEFICIJENT KORELACIJE	NIVO ZNAČAJNOSTI KOEFICIJENTA KORELACIJE	JEDNADŽBA PARABOLE REGRESIJE
Ukup. proteini-traj. kol.	$r = 0,986$	$P < 0,01$	$Y = 74,1 + (-0,18)X + 0,004X^2$
Albumini-trajanje kol.	$r = 0,967$	$P < 0,01$	$Y = 30,13 + (-0,71)X + 0,02X^2$
Ukup. bil.-traj. kol.	$r = 0,782$	$P > 0,05$	
Alkalna fosf.-traj. kol.	$r = 0,905$	$P < 0,05$	$Y = 282,18 + 94,11X(-2,73)X^2$
SGOT-trajanje kolestaze	$r = 0,761$	$P > 0,05$	
SGPT-trajanje kolestaze	$r = 0,144$	$P > 0,05$	
Gama GT-trajanje kol.	$r = 0,984$	$P < 0,01$	$Y = 0,43 + 1,03X + (-0,02)X^2$



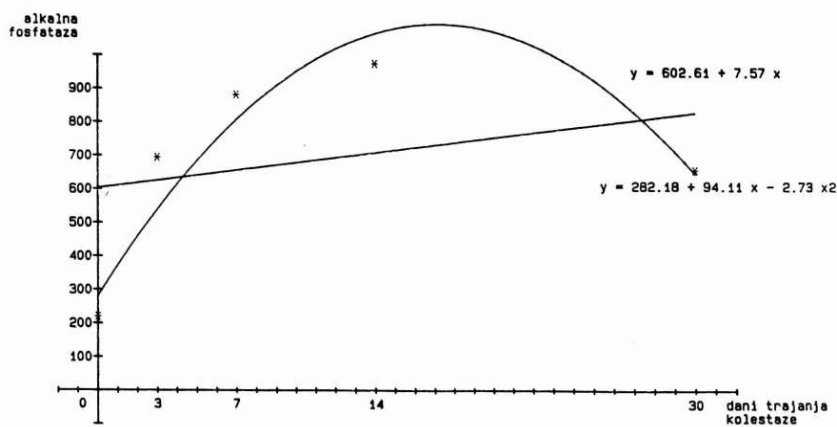
SLIKA 1.
Korelacije između vrijednosti ukupnih proteina i trajanja kolestaze



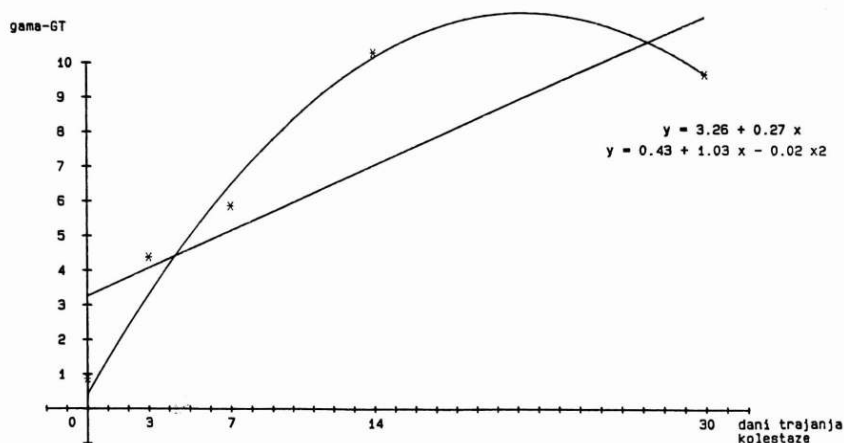
SLIKA 2.
Korelacije između vrijednosti albumina i trajanja kolestaze



SLIKA 3.
Korelacija između vrijednosti ukupnih proteina i albumina



SLIKA 4.
Korelacije između vrijednosti alkalne fosfataze i trajanja kolestaze



SLIKA 5.
Korelacije između vrijednosti gama-GT i trajanja kolestaze

RASPRAVA

Nakon totalne opstrukcije duktus koledokusa, dolazi do naglog porasta koncentracije ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, SGOT-a, SGPT-a i gama-GT. Koncentracija bilirubina trećeg dana nakon podvezivanja glavnog žučovoda bila je 42 puta veća u odnosu na kontrolnu koncentraciju ($171.4 \mu\text{mol/l}$), da bi četrnaestog postoperativnog dana dostigao maksimalnu koncentraciju koja je 49 puta veća od kontrolne ($196.64 \mu\text{mol/l}$). Tridesetog postoperativnog dana ukupni bilirubin u serumu pao je na koncentraciju od $161 \pm 27.1 \mu\text{mol/l}$ ($\bar{x} \pm s$). Uočena je i statistički značajna pozitivna linearna korelacija ($P < 0,05$) između koncentracije ukupnog bilirubina u serumu i trajanja kolestaze od trećeg do četrnaestog dana.

Naprotiv, u radu Arnauda¹ uočen je progresivni porast bilirubina od petog pa sve do tridesetog dana nakon podvezivanja duktus koledokusa. Koncentracija bilirubina operiranih štakora u njihovoj eksperimentalnoj grupi bila je oko tri puta veća tek tridesetog postoperativnog dana, što može biti zbog znatno distalnije postavljene ligature na koledokusu ili slabije postavljene ligature uz resekciju koledokusa.

U radu M. Čolaka³ koncentracija ukupnog bilirubina u serumu tijekom kolestaze pokazuje najveći porast trećeg dana nakon operacije (29 puta veći u odnosu na kontrolnu koncentraciju). Poslije toga dolazi do kontinuiranog pada koncentracije ukupnog bilirubina sve do tridesetog postoperativnog dana, kada je zabilježena najniža koncentracija. Ovo bi se, možda, moglo protumačiti popuštanjem postavljene ligature uslijed povećanog pritiska žuči iznad mjesta liganja duktus koledokusa.

Greaney i suradnici⁷ su dobili značajan porast ukupnog bilirubina u serumu nakon sedmog dana od podvezivanja koledokusa ($P < 0,01$). Bilirubin je i dalje rastao, da bi četrnaestog postoperativnog dana imao najvišu koncentraciju, nakon čega dolazi do pada koncentracije. Ovo kretanje ukupnog bilirubina u serumu tijekom kolestaze slično je kretanju bilirubina u našem eksperimentu, s tom razlikom što je koncentracija bilirubina nakon mjesec dana veća u odnosu na sedmi postoperativni dan, dok je u našem radu koncentracija tridesetog postoperativnog dana niža od vrijednosti sedmog dana.

Mogućnost adaptacije na povišenu koncentraciju bilirubina i njegovu smanjenje postaje razumljivije ako se u obzir uzmu rezultati Denka i suradnika⁵, koji su pronašli da u ekstrahepatolnoj kolestazi kod štakora aktivnost mikrosomalne UDP-glukuronil transferaze (po mg mikrosomalnih proteina) ostaje nepromijenjen, što znači da joj ukupna aktivnost u jetri raste proporcionalno porastu ukupnih mikrosomalnih proteina. Osim toga, Denk i suradnici proučavali su utjecaj kolestaze na endoplazmatski retikulum stanica jetre štakora. U ovoj korelacionoj, biokemijskoj, ultrastrukturno-morfometrijskoj studiji ustanovili su da kolestaza u trajanju od šest dana dovodi do porasta endoplazmatskog retikuluma jetre u skladu s porastom mase jetre. Masa jetre iznosila je ($5,7-0,6\%$) izražene u % ukupne tjelesne mase nakon šestodnevnog kolestaze u odnosu na kontrolu koja je iznosila $3,5-0,3\%$. U našem radu aktivnosti alkalne fosfataze i gama-GT u serumu progresivno su rasle do četrnaestog postoperativnog dana. Tog dana aktivnost alkalne fosfataze bila je četiri puta veća u odnosu na kontrolnu aktivnost, a aktivnost gama-GT deset puta veća u odnosu na kontrolnu aktivnost. Nakon toga dolazi do pada aktivnosti oba enzima. Tridesetog postoperativnog dana aktivnost alkalne fosfataze bila je nešto niža od aktivnosti zabilježene trećeg dana, dok je aktivnost gama-GT bila nešto niža od maksimalne aktivnosti četrnaestog dana trajanja kolestaze. Uočene su i statistički značajne ($P < 0,05$ i $P < 0,01$) kvadratne korelacije između aktivnosti alkalne fosfataze i trajanja kolestaze, te između aktivnosti gama GT i trajanja kolestaze.

Nasuprot tome, u radu Arnauda¹ zabilježen je progresivan rast alkalne fosfataze u serumu od petog do tridesetog postoperativnog dana. U radu Greaney⁷ povišene koncentracije

alkalne fosfataze se ne mijenjaju značajno od sedmog do dvadesetsedmog postoperativnog dana. Tek tridesetog dana dolazi do značajnijeg porasta u odnosu na sedmi postoperativni dan.

Ako uzmemo u obzir naše rezultate kretanja ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze i gama-GT u serumu, možemo doći do pretpostavke da pad koncentracije ova tri parametra nakon četrnaest dana može biti posljedica popuštanja ligature koledokusa zbog pritiska žuči iznad opstrukcije i/ili da mladi štakori uspijevaju pronaći dodatne mehanizme kojima mogu sniziti nivo ova tri parametra karakteristična za kolestazu.

U našem eksperimentu aktivnost SGOT-a u serumu trećeg postoperativnog dana bila je šest puta veća u odnosu na kontrolu aktivnost. Sedmog dana SGOT ima najnižu aktivnost, a od tada raste, da bi tridesetog dana dostigao najvišu aktivnost koja je osam puta veća od kontrolne aktivnosti. SGPT u serumu je najvišu aktivnost imao trećeg postoperativnog dana (sedam puta veća od kontrolne aktivnosti). Najniža aktivnost bila je također sedmog dana, a nakon toga raste, da bi tridesetog dana aktivnost SGPT-a u serumu operiranih štakora bila oko tri puta veća u odnosu na kontrolnu aktivnost.

Nasuprot tome, u radu Greaney⁷ aktivnost SGPT-a u serumu operiranih raste do dvadesetprvog dana, nakon čega se smanjuje, da bi tridesetog dana dosegla najvišu aktivnost.

U više eksperimentalnih radova pokazano je da u kolestazi kod štakora dolazi do progresivnog porasta mase jetre.^{2, 4, 9} I u našem eksperimentu uočen je statistički značajan porast mase jetre.

Povećana masa jetre mora biti odraz povećane biosinteze strukturalnih proteina jetre u situaciji ekstrahepatolne kolestaze. Radovi Lundborga i suradnika^{10, 11, 12} pokazali su da je u kolestazi izmijenjena (povećana) ugradnja radioaktivno označenog leucina, te da je povišen promet proteina u kolestatskoj jetri.

U radu M. Čolaka³ proučavan je utjecaj ekstrahepatolne kolestaze na poliribosomski sustav u hepatocitu. Budući da se brze promjene u sintezi proteina kod eukarionata reguliraju na translacijskom nivou, nije iznenađujuće da je već trećeg postoperativnog dana došlo do statističkog značajnog skretanja poliribosoma prema monoribosomima. Osobit pad udjela poliribosoma s više ribosoma u svom sastavu zabilježen je tridesetog postoperativnog dana.

Za pretpostaviti je da je porast monomerne frakcije na račun poliribosoma posljedica povećanog udjela neprogramiranih ribosoma ili je posljedica smanjenog udjela poliribosoma s većim brojem ribosoma na sebi (npr. smanjen udio poliribosoma koji produciraju albumin, a povećan udio poliribosoma koji sintetiziraju polipeptide s kraćim lancem, a koji su ujedno strukturalni proteini).

Ovo je prihvatljivo i s obzirom na dokazano povećanje mase jetre u kolestazi, a i na hipoalbuminemiju koja se javlja kasnije. Procesi biosinteze proteina usko su povezani s energetske metabolizmom. Opisano je da manjak glukoze i inhibicija oksidativne fosforilacije dovode do sniženja koncentracije ATP-a u retikulocitima i dovode do pojave inhibitora translacije, slično kao i kod nedostatka hema.

Smanjena količina aminokiselina u stanicama u rastu također dovodi do inhibicije sinteze proteina, možda i zbog smanjenja ATP-a ili GTP-a.

ATP je uključen u proces aktivacije aminokiselina i njihovog vezivanja za tRNA molekule. Da bi se nesmetano odvijao proces translacije, neophodno je prisustvo dovoljne količine GTP-a koji sudjeluje i u procesu inicijacije, i u procesu elongacije, kao i u procesu terminacije biosinteze proteina. Pri ovim procesima veoma je bitan i odnos koncentracije GTP-a prema koncentraciji GDP-a. GTP je neophodan za formiranje ternarnog kompleksa (u procesu vezivanja aminoacil-tRNA molekule za EF₁) odnosno za otpuštanje elongacijskog faktora — EF₁ u procesu elongacije, a i bitna je prisutnost GTP-a u procesu terminacije prilikom oslobađanja RF s ribosoma. N. van Husen i suradnici¹⁸ su

proučavali utjecaj ekstrahepatalne kolestaze (opstrukcije) kod štakora na morfologiju i metabolizam mitohondrija. Aktivnost glutamat-dehidrogenaze (GLDH) u serumu je bila povišena, a uočeno je i bubrenje jetrenih mitohondrija u ultrastrukturnalnoj morfometrijskoj analizi. Morfometrijske alteracije su bile paralelne serološkim biokemijskim analizama. Autori su izračunali i signifikantnu korelaciju između bubrenja mitohondrija i aktivnosti GLDH-a u serumu.

Od ranije je poznato da se u hipoenorgozama javlja bubrenje mitohondrija, te bi na osnovu navedenog rada mogli pretpostaviti da je u ekstrahepatalnoj kolestazi u jetri štakora evidentna hipoenorgoza. Očito da hipoenorgoza ima određene učinke na biosintezu proteina i na profil poliribosoma. Opisano je da i hipotermija,¹⁴ u kojoj je inače smanjen energetski naboj stanice, rezultira smanjenom biosintezom proteina koja je popraćena disagregacijom poliribosoma i nagomilavanjem neprogramiranih ribosoma.

Ekstrahepatalna kolestaza, nadalje, izaziva promjene i na ribosomskim proteinima. Grassner⁸ je kao odgovor na podvezivanje duktus koledokusa uočio porast u fosforilaciji proteina S 6, koji pripada maloj ribosomskoj podjedinici u jetri štakora. Ovu istu promjenu je uočio primjenjujući hepatotoksin (tetraklorugljik — CCl₄) koji je stimulirao fosforilaciju samo jednog proteina (S 6) u 40 S podjedinici. Imajući to u vidu, može se pretpostaviti da i promjene u strukturi ovog proteina mogu utjecati na strukturu — konformaciju — male ribosomske podjedinice, te može utjecati na redistribuciju ribosomskih podjedinica i može voditi ka uspostavljanju nove ravnoteže u funkcionalnoj distribuciji poliribosoma.

Smatare se da bilirubin utječe na prekid oksidativne fosforilacije,^{16, 17} te se i to može imati u vidu prilikom analize rezultata. Zbog svega navedenog, vrijedno je bilo ispitati kretanje serumskih proteina tijekom kolestaze, budući da se glavnina sintetizira upravo u jetri.

U našem radu koncentracije ukupnih proteina u serumu operiranih štakora kontinuirano padaju od trećeg do tridesetog postoperativnog dana u odnosu na kontrolne koncentracije. Međutim, razlika nije statistički značajna. Postoji statistički značajna negativna linearna korelacija ($P < 0,05$) između koncentracije ukupnih proteina u serumu i trajanja kolestaze, a pozitivna ($P < 0,05$) između koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu. Osim toga, utvrđena je i statistički značajna ($P < 0,01$) kvadratna korelacija između koncentracije ukupnih proteina u serumu i trajanja kolestaze. Nasuprot tome, u radu Arnauda¹ evidentna je razlika u koncentracijama ukupnih proteina u serumu operiranih štakora u odnosu na kontrolne štakore. Te su koncentracije niže petog, petnaestog i tridesetog postoperativnog dana, ali razlika nije statistički značajna. Ukupni proteini u serumu samo su sedmog postoperativnog dana bili veći u operiranih životinja.

U radu Greaney⁷ imamo kontinuirani pad koncentracije albumina u serumu operiranih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajan pad serumskih albumina bio je dva tjedna nakon operacije kojom je povezan duktus koledokus.

Sličnu krivulju kretanja serumskih albumina kod operiranih štakora dobili smo i u našem radu. U nas je statistički značajan ($P < 0,01$) pad serumskih albumina bio sedmog postoperativnog dana. Postoji i statistički značajna kvadratna korelacija ($P < 0,01$) između koncentracije albumina u serumu i trajanja kolestaze.

Analizirajući rezultate elektroforeze serumskih proteina tijekom kolestaze po eksperimentalnim grupama, uočili smo da se relativne koncentracije albumina kontinuirano smanjuju u operiranih životinja tijekom kolestaze. Statistički značajan pad albumina ($P < 0,01$) bio je sedmog, četrnaestog i tridesetog postoperativnog dana. Osim ove promjene u albuminskoj frakciji, uočen je i kontinuiran porast beta-globulinske frakcije koji je statistički značajan od sedmog postoperativnog dana ($P < 0,01$).

Tridesetog postoperativnog dana dobili smo spajanje beta i gama globulinske frakcije u jednu. To je indirektno govorilo o razvitku bilijarne ciroze.

ZAKLJUČCI

Ekstrahepatalna kolestaza izazvana podvezivanjem duktus koledokusa u štakora dovodi do promjene u koncentracijama serumskih proteina. Dolazi do kontinuiranog pada koncentracije albumina i ukupnih proteina u serumu. Pad ukupnih proteina u serumu nije statistički značajan u odnosu na kontrolne koncentracije, dok je pad vrijednosti albumina u serumu statistički značajan ($P < 0,01$) već od sedmog postoperativnog dana.

U ekstrahepatalnoj kolestazi, izazvanoj potpunom opstrukcijom glavnog žučovoda štakora, dolazi do promjena relativnih koncentracija elektroforetskih frakcija serumskih proteina. Uočava se kontinuirani pad albuminske frakcije, što odgovara padu apsolutne vrijednosti albumina u serumu. Osim ove promjene, dolazi i do porasta beta-globulinske frakcije. Porast je kontinuiran i statistički značajan ($P < 0,01$) od sedmog postoperativnog dana. Tridesetog postoperativnog dana pojavljuju se spojene beta i gama — globulinske frakcije u jednu frakciju.

Ekstrahepatalna kolestaza izazvana podvezivanjem glavnog žučovoda u štakora dovodi do višestrukog porasta koncentracije ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, gama-GT, SGOT-a i SGPT-a u serumu. Koncentracije ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze i gama-GT rastu sve do četrnaestog postoperativnog dana kada dostižu maksimalne koncentracije, da bi nakon toga došlo do njihova pada. Nakon postignute maksimalne aktivnosti trećeg postoperativnog dana, aktivnost SGPT-a postaje minimalna sedmog postoperativnog dana. Nakon toga dolazi do kontinuiranog porasta, koji je, međutim, tridesetog postoperativnog dana nešto manji od polovine aktivnosti zabilježene trećeg dana. Nakon višestrukog povećanja aktivnosti u serumu trećeg dana kolestaze, dolazi do pada SGOT-a sedmog dana kolestaze, a zatim do porasta koji traje do tridesetog postoperativnog dana, kada je zabilježena i najveća aktivnost SGOT-a u serumu.

Postoje statistički značajne kvadratne korelacije između koncentracije ukupnih proteina i trajanja kolestaze ($P < 0,01$), albumina i trajanja kolestaze ($P < 0,01$), alkalne fosfataze i trajanja kolestaze ($P < 0,05$), te između aktivnosti gama-GT i trajanja kolestaze ($P < 0,01$).

Utvrdene su i statistički značajne linearne korelacije ($P < 0,05$) između ukupnih proteina i trajanja kolestaze (negativna), te između koncentracije ukupnog bilirubina i trajanja kolestaze od nultog do četrnaestog postoperativnog dana (pozitivna).

Utvrdena je i statistički značajna pozitivna linearna korelacija ($P < 0,05$) između koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu.

LITERATURA

1. Arnaud JP, Humbert W, Eloy MR, Adloff M. Effect of obstructive jaundice on wound healing. *Am J Surg* 1981; 141:593–6.
2. Bellentani S, Ferrari A, Villa E, Maneti F. Study of the long-term effects of selective biliary obstruction (SBO). *Res Exper Med (Berlin)* 1981; 178:229–35.
3. Čolak M. Utjecaj ekstrahepatalne kolestaze na strukturu poliribosoma jetre štakora. Magistrski rad. Postdiplomski studij prirodnih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, 1985.
4. Čolak M, Gamulin S. Struktura poliribosoma jetre u kolestazi. U: Zbornik radova XVII stručnog sastanka internista Slavonije. Zbor liječnika Hrvatske, Internistička sekcija Osijek. Osijek, 1986; 99–106.
5. Denk D, Eckerstorfer R, Rohr HP. The endoplasmic reticulum of rat liver cell in experimental mechanical cholestasis. Correlated biochemical and ultrastructural-morphometric studies on structure and enzym composition. *Exp. Mol. Pathol* 1977; 26:193–203.
6. Gamulin S. i suradnici. Patofiziologija. JUMENA Zagreb, 1988; 55–62, 148–51, 1004–7.
7. Greaney MG, Van Noort R, Smythe A, Irvin TT. Does obstructive jaundice adversely affect wound healing. *Br J Surg* 1979; 66:478–81.
8. Gressner AM. Ribosomal protein modifications in liver injury. Effect of carbon tetrachloride and extrahepatic cholestasis on protein phosphorylation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18:111–6.
9. Kinugasa T, Uchida K, Kadowaki M, Takase H, Nomura J, Saito Y. Effect of bile duct ligation on bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res* 1981; 22:201–7.
10. Lundborg H, Blonstrand C, Hamburger A. Acrylamide gel electrophoresis of liver protein during extrahepatic cholestasis in the rat. *Europ Surg Res* 1974; 6:168–75.
11. Lundborg H, Hamberger A. Synthesis and turnover of liver proteins during extrahepatic cholestasis in the rat. *Eur Surg Res* 1974; 6:219–32.
12. Lundborg H, Hamberger A. Aminoacid incorporation into liver proteins during extrahepatic cholestasis in the rat. *Europ Surg Res* 1980; 6:95–109.

13. Marinković D, Tucić N, Kekić V. Genetika. Naučna knjiga, Beograd, 1985; 161 – 223.
14. Narancsik P. Funkcionalna distribucija ribosoma u jetri hipotermiziranih miševa. Disertacija. Medicinski fakultet u Zagrebu, 1980.
15. Petz B. Osnovne statističke metode za nematematičare. Sveučilišna naklada Liber (SNL), Zagreb, 1985; 9–355.

16. Schmid R. Bilirubin metabolism in man. *New Engl J Med* 1980; 287:703–9.
17. Unterberger P. Prevalencija, incidencija i uzroci hiperbilirubinemija u populaciji. Magistarski rad. Medicinski fakultet u Zagrebu, 1979.
18. Van Husen N, Gerlach U, Roessner A, Uchida Y. Mitochondrienmorphologie und Stoffwechsel bei extrahepatischer Obstruction. *Klin Wschr* 1976; 54:1107–8.

Abstract

VALUES OF THE SERUM PROTEINS IN THE EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS IN RATS

Aleksandar Včev, Ivan Čandrlić, Stjepan Gamulin and Dubravko Božić

Clinic of Internal Diseases, General Hospital Osijek and Clinic of Internal Diseases, Medical Faculty University of Zagreb

In this research the complete obstruction of bile duct in rats has been achieved, in order to observe the influence of extrahepatic cholestasis on the concentration of serum proteins. It has been noted that the extrahepatic cholestasis provokes a continuous fall in the concentrations of total proteins and albumin in serum. The fall of the total proteins in serum is not statistically significant compared to the control concentrations, whereas the fall in albumin becomes statistically significant ($P < 0.01$) from the seventh day of the cholestasis.

The cholestasis has induced changes in the concentration of electrophoretic fractions of serum proteins. A continuous and statistically significant ($P < 0.01$) fall in albumin fraction has been noted from the seventh day on, which responds to the fall in the absolute albumin concentration in serum. Besides that, a continuous and statistically significant

($P < 0.01$) increase of beta fraction has been observed from the seventh postoperative day. On the thirtieth day beta and gama globulin fraction merged. The cholestasis has induced manifold increase in the activity of total bilirubin, alkaline phosphatase, gama GT, SGOT and SGPT in serum. Total bilirubin, alkaline phosphatase and gama GT have been rising continuously up to the fourteenth postoperative day, when they have reached the highest concentrations. From that day on, the fall in the concentrations of all three parameters has been noted.

Statistically significant ($P < 0.05$) linear correlations have been found between the concentration of total proteins and the duration of cholestasis (negative), between the total bilirubin concentration and the duration of cholestasis from the third to the fourteenth day as well as between the total protein and albumin concentration in serum.

Statistically significant quadratic correlations have also been observed between the duration of cholestasis and total protein concentrations ($P < 0.01$), albumin ($P < 0.01$), alkaline phosphatase ($P < 0.05$) and gama GT in serum ($P < 0.01$), respectively.

Key words: extrahepatic cholestasis in rats, serum proteins

Received: December 25th, 1988