

# Stanicama posredovana imunost i jetrena reakcija akutne faze nakon laparoskopske i klasične kolecistektomije

---

Grbas, Harry

Doctoral thesis / Disertacija

2004

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:092776>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)





SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Harry Grbas

**STANICAMA POSREDOVANA IMUNOST I JETRENA  
REAKCIJA AKUTNE FAZE NAKON LAPAROSKOPSKE  
I KLASIČNE KOLECISTEKTOMIJE**

Doktorska disertacija

Rijeka, 2004.

**Mentori rada:** Prof. dr. Biserka Radošević-Stašić

Prof. dr. Arsen Depolo

Doktorska disertacija je obranjena dana.....na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

4.

5.

Rad ima 139 listova

UDK klasifikacija

*Najsrdacnije se zahvaljujem mojim mentorima prof. dr sc. Biserki Radošević-Stašić, koja mi je pružila stručnu i moralnu podršku prilikom dugogodišnje izrade ovog rada, te mi približila sve ljepote istraživačkog rada i prof. dr sc. Arsenu Depolu, koji me je uveo u sve čari i ljepote kirurgije, poziva kojem sam uvijek težio, usmjerivši me da neprestano stremim ka novim izazovima.*

*Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr sc. Ines Mrakovčić-Šutić, koja mi je stalnom pomoći, uputama i podrškom omogućila eksperimentalni rad u najboljim uvjetima.*

*Veliko hvala višoj medicinskoj sestri Jadranki Utković na mom odjelu Digestivne kirurgije, koja mi je nesebično pomagala u tehničkom dijelu izrade ovog rada.*

*Također se zahvaljujem svim djelatnicima laboratorija KBC-a Rijeke i Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.*

*I na kraju se od sveg srca zahvaljujem svojoj obitelji i svojim roditeljima na bezrezervnoj potpori i razumijevanju, za bezbroj dana i noći koje sam proveo i provest ću radeći, jer tek uz njih ovaj moj rad dobiva potpuni smisao.*

## SAŽETAK

Operativna trauma i anestezija su stanja koja često uzrokuju imunosupresiju, koja pogoduje razvoju infekcije, otežanom cijeljenju rana i rasapu tumorskih metastaza. Budući da intenzitet nastalih promjena ovisi o stupnju stresa i intenzitetu traume, u posljednje vrijeme se naglašava da je laparoscopska operacija (LK) pogodnija vrsta kolecistektomije u usporedbi sa klasičnom kolecistektomijom (KK). Nastojeći pridonijeti ovom području, u ovom radu pokušali smo procijeniti prvenstveno promjene u staničnoj imunosti, analizirajući citotoksične T limfocite i NK stanice, te njihov odnos prema metaboličkim i upalnim promjenama u serumu bolesnika u ranoj fazi nakon operacije.

**METODE:** Ispitano je ukupno 44 bolesnika. Njih 21 je operirano laparoscopski, a drugih 23 je operirano na klasični način, uz otvaranje abdomena. Kontrolnu grupu od 20 bolesnika sačinjavali su zdravi ljudi (dobrovoljni davatelji krvi). Periferna krv se uzimala prije operacije i 24 sata poslije operacije. U plazmi su analizirani standardni hematološki parametri, proteini akutne faze i pro-upalni citokini (C-reaktivni protein; interleukin-6 (IL-6), čimbenik nekroze tumora (TNF- $\alpha$ ), te sindrom kolestaze (bilirubin, alkalna fosfataza i aminotransferaze). Imunološki status se procjenjivao protočnom citometrijom, uz istovremeno određivanje staničnih i unutarstaničnih markera (perforina-P) - na T limfocitima (CD3+, CD4+, CD8+) i NK stanicama (CD16+ i CD56+ stanice). Statistička analiza je izvršena pomoću Mann-Whitney U testa i Studentovog t-testa, a međusobni odnosi pojedinih varijabli procjenjivani su izračunavanjem linearnih pravaca regresije i analizom kovariance.

**REZULTATI:** Nakon operacija obje vrste utvrdili smo znakove upala u formi neutrofilije, monocitoze, porasta IL-6 i CRP. Međutim, klasična kolecistektomija je značajno smanjila postotak CD56<sup>+</sup> stanica, a povećala postotak CD19<sup>+</sup> stanica, dok je laparoscopska operacija smanjila postotak CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> T stanica, a značajno povećala postotak CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> NK stanica. Nakon LK ove stanice su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa

serumskim koncentracijama direktnog bilirubina, AP i GGT-a. Nakon operacija obje vrste utvrdili smo i statistički značajnu pozitivnu korelaciju između intenziteta kolestaze i prisustva malo poznatih CD4+P+ T limfocita. Osim toga, utvrdili smo da u obje operacije broj P+ T limfocita korelira ne samo sa intenzitetom neutrofilije i razinom CRP, već i sa serumskim koncentracijama elektrolita ( $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ). Usto, rezultati su pokazali da je nakon LK broj cirkulirajućih P+ NK stanica u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa razinom glukoze u krvi, što ukazuje na nove regulacijske mehanizme u kontroli citotoksičnih, perforin+ NK stanica, čija je aktivnost bila potaknuta pneumoperitoneumom.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati sugeriraju da u ranom postoperativnom periodu LK ima veći učinak na P+ NK stanice, no u obje vrste bolesnika utvrđene su vrlo značajne korelacije imunoloških parametara sa stupnjem preoperativne kolestaze, uzrokovane žučnim kamencima i drugim metaboličkim i elektrolitskim vrijednostima, koje se mijenjaju nakon operacije, što ukazuje na kompleksnost interpretacije imunoregulacijskih mehanizama u tom području.

## SUMMARY

### Cellular immunity and hepatic acute phase proteins after laparoscopic and open cholecystectomy

Surgical trauma and anesthesia are often conditions that provoke postoperative immunosuppression, which contributes to propagation of infection, unsuccessful healing and propagation of tumor metastases. Owing to this, over the past few years, it was repeatedly emphasized that open cholecystectomy (OC) owing to the greater trauma and prolonged anesthesia and recovery time is more associated with reduced immune functions than minimally invasive, laparoscopic cholecystectomy (LC), having important implications for the development of postoperative sepsis and malignant diseases. Contributing to this field, in this study we tried to evaluate particularly the role of cytotoxic subsets of circulating mononuclear lymphatic cells and modulatory mechanisms in these events.

**METHODS:** A total of 44 patients were studied. Twentyone of them underwent LC; the remaining 23 were operated using the open technique. Control group consisted of 20 healthy donors. Peripheral venous blood samples were drawn 1 day before surgery and repeated on the first day after surgery. Flow cytometry was used for simultaneous detection of intracellular (perforin) and cell surface antigens on T lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+) and NK cells (CD16+ and CD56+ cells). The subsets of lymphocytes were then in each person correlated with serum levels of bilirubin, alkaline phosphatase (AP), aspartat (AST) and alanine (ALT) aminotransferase, gamma-glutamyl transferase (GGT), glucose, urea and creatinin, as well as with concentrations of inflammatory mediators (tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), polymorphonuclear leucocytes and monocytes). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test for paired samples. Linear regression equations were generated using a least-squares method and analyzed for differences of covariance.

RESULTS: The data showed that both operations induce early postoperative inflammation with neutrophilia and increase of CRP and IL-6. However, OC significantly decreased the percentage of CD56<sup>+</sup> cells and increased the percentage of CD19<sup>+</sup> cells, while LC decreased the percentage of CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> T cells, and significantly increased the proportion of CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> NK cells. After LC, the later cells were found also to be in high positive correlation with serum concentrations of direct bilirubin, AP and GGT. After both types of operations linear regression analysis revealed also the existence of positive correlations between the intensity of cholestasis and the number of CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> cells in peripheral blood. Furthermore, the data showed that after the both types of operations the number of P<sup>+</sup> T cells and P<sup>+</sup> NK cells correlate not only with the number of polymorphonuclear leucocytes and CRP, but also with serum concentrations of electrolyte (Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>). Moreover, after LC the circulating P<sup>+</sup> NK cells were in highly positive correlation, and P<sup>+</sup> T cells in negative correlation with the level of glucose in the blood, pointing to the new regulatory mechanisms of cytotoxic cells, activated probably by the use of carbon dioxide pneumoperitoneum.

CONCLUSIONS: The data implicate that LC might have a greater effect on P<sup>+</sup> NK cells, but the findings of different metabolic and stress responses to cholestasis and operative stress, where several factors were in close interrelationship with the T and NK cells point to distinct mechanisms of immunoregulation and the complexity of interpretation in this field.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Kolelitijaza – etiologija i patogeneza</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Operativni pristupi žučnjaku i kolecistektomija</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. Klasična kolecistektomija .....	9
1.2.2. Laparoskopjska kolecistektomija .....	11
<b>1.3. Neuro-endokrina i imunološka reakcija na traumu</b> .....	<b>15</b>
1.3.1. Neuro-endokrine promjene tijekom traumatskog stresa .....	15
1.3.2. Imunološke posljedice traume i kirurških zahvata .....	20
1.3.2.1. Promjene prirodene i stečene imunosti .....	23
1.3.2.1.1. Fagocitno – monocitni sustav .....	28
1.3.2.1.2. Stanice prirodene imunosti (NK i NKT stanice).....	30
1.3.2.1.3. Uloga jetre u kontroli imunološkog odgovora .....	33
<b>1.4. Učinak anestezije</b> .....	<b>38</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>40</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2. Anestezija</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3. Kirurške metode</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4. Metode za određivanje biokemijskih sastojaka u serumu</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5. Metode za procjenu imunološke reakcije</b> .....	<b>51</b>
3.5.1. Analiza fenotipske pripadnosti mononuklearnih limfatičnih stanica metodom protočne citometrije .....	51
3.5.1.1. Direktna imunofluorescencija .....	51
3.5.1.2. Indirektna imunofluorescencija.....	52
3.5.2. Određivanje unutarstaničnog sadržaja perforina.....	53
<b>3.6. Statističke metode</b> .....	<b>53</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1. Učestalost i uspješnost laparoskopjskih kolecistektomija na Kirurškoj         klinici KBC Rijeka</b> .....	<b>56</b>
<b>4.2. Usporedba kliničkih čimbenika u grupama bolesnika, podvrgnutih         klasičnoj, odnosno laparoskopjskoj kolecistektomiji</b> .....	<b>57</b>

<b>4.3. Usporedbe hematoloških, biokemijskih i imunoloških nalaza nakon klasične i laparoskopske kolecistektomije .....</b>	<b>57</b>
4.3.1. Metaboličke promjene u serumu .....	58
4.3.1.1. Bilirubin u serumu.....	58
4.3.1.2. Serumski enzimi .....	59
4.3.1.3. C-reaktivni protein u serumu.....	59
4.3.1.4. Glukoza, urea i kreatinin u krvi.....	60
4.3.1.5. Elektroliti u krvi .....	61
4.3.2. Hematološke promjene.....	61
4.3.2.1. Leukociti, eritrociti i trombociti .....	61
4.3.2.2. Diferencijalna krvna slika .....	62
4.3.2.3. T i B limfocitne subpopulacije .....	62
4.3.2.4. Subpopulacija NK stanica .....	62
4.3.2.5. Perforin+ stanice .....	63
4.3.2.5.1. Ukupan broj perforin+ stanica.....	64
4.3.2.5.2. Perforin+ T limfociti .....	64
4.3.2.5.3. Perforin+ NK stanice.....	65
4.3.2.5.4. Udio P+ stanica među subpopulacijama T limfocitima i među NK stanicama .....	71
4.3.2.5.5. Prosječni sadržaj perforina u T limfocitima i NK stanicama .....	72
<b>4.4. Ispitivanje međuodnosa pojedinih varijabli .....</b>	<b>73</b>
4.4.1. Status prije operacija - promjene uzrokovane kolestazom.....	73
4.4.1.1. Verifikacija sindroma kolestaze .....	73
4.4.1.2. Kolestaza i broj perforin+ stanica u perifernoj krvi .....	74
4.4.1.3. C-reaktivni protein i broj perforin + stanica u perifernoj krvi .....	75
4.4.1.4. Odnos monocita i trombocita sa perforin+ stanicama.....	77
4.4.2. Status nakon klasične i laparoskopske kolecistektomije.....	78
4.4.2.1. Odnosi bilirubina, alkalne fosfataze i aminotransferaze sa T limfocitima i NK stanicama .....	78
4.4.2.1.1. Klasična kolecistektomija .....	78
4.4.2.1.2. Laparoskopska kolecistektomija .....	79
4.4.2.2. Odnosi neutrofila, monocita i CRP sa T limfocitima i NK stanicama .....	81

4.4.2.2.1. Klasična kolecistektomija .....	81
4.4.2.2.2. Laparoskopna kolecistektomija .....	83
4.4.2.3. Odnosi eritrocita sa T limfocitima i NK stanicama.....	85
4.4.2.3.1. Klasična kolecistektomija .....	85
4.4.2.3.2. Laparoskopna kolecistektomija .....	86
4.4.2.4. Odnosi glukoze sa T limfocitima i NK stanicama .....	86
4.4.2.4.1. Klasična kolecistektomija .....	86
4.4.2.4.2. Laparoskopna kolecistektomija .....	87
4.4.2.5. Odnosi serumskog Na <sup>+</sup> i K <sup>+</sup> sa T limfocitima i NK stanicama .....	88
4.4.2.5.1. Klasična kolecistektomija .....	88
4.4.2.5.2. Laparoskopna kolecistektomija .....	90
4.4.2.6. Odnosi B limfocita sa T limfocitima i NK stanicama.....	91
4.4.2.6.1. Klasična kolecistektomija .....	91
4.4.2.6.2. Laparoskopna kolecistektomija .....	92
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>93</b>
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED .....</b>	<b>107</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>113</b>
<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>135</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Kolelitijaza – etiologija i patogeneza

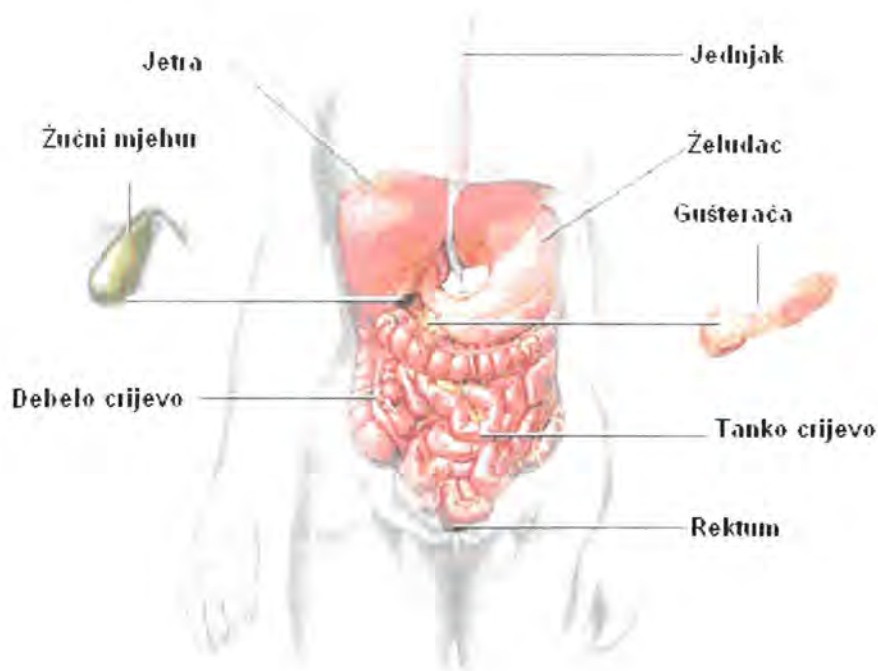
Kolelitijaza je bez sumnje danas najučestalija bolest hepatobilijarnog sustava (slika 1). Iako su još nepoznati točni statistički podaci o učestalosti bilijarne kalkuloze u nas, treba računati da svaki petnaesti muškarac i svaka deseta žena boluju od kolelitijaze. Izgleda da je kolelitijaza postala bolest modernog čovjeka današnjice, ne samo u nas već i u svijetu. Prema Schoenfeldu u SAD oko 20 000 000 stanovnika boluje od kolelitijaze.

U osnovi bilijarne kamence možemo podijeliti u dvije skupine: kolesterolske, koji su najčešći i pigmentne (bilirubinske). Ipak, valja napomenuti da su kamenci sastavljeni isključivo iz kolesterola rijetki te se u većine bolesnika nalaze miješani kamenci. Osnovu miješanih kamenaca čini kolesterol, ali uz njega se nalaze i drugi sastojci žuči: kalcijeve soli, žučne kiseline, žučni pigmenti, masne kiseline, proteini i fosfolipidi. Kolesterolski su kamenci žučkaste boje. Pigmentnih (bilirubinskih) kamenca ima dvije vrste: crni (zapadni tip) koji se češće javljaju u nas i smeđi (orijentalni tip). Promjena boje pigmentnih kamenaca iz crne u smeđu, uvjetovana je bakterijskom infekcijom žuči.

U literaturi se spominju tri osnovna faktora odgovorna za nastanak bilijarnih konkremenata: staza žuči, disholija i infekcija. Danas zahvaljujući boljem poznavanju kemijskog sastava žuči te poznavanjem fiziologije i patofiziologije žučne sekrecije, možemo bolje razumijeti mehanizam nastanka konkremenata. Osnovni preduvjet za nastanak kolesterolskih kamenaca je žuč prezasićena kolesterolom. Budući da je žuč vodena otopina (više od 80% vode), a kolesterol je netopiv u vodi, njegova "solubilnost" osigurana je vezanjem na žučne kiseline i lecitin koji imaju funkciju detergenata te omogućuju da se kolesterol dispergira u transportnim agensima, tj. vezikulama i micelama. Ravnotežu između količine kolesterola sintetiziranog u jetri i količine žučnih kiselina osigurava enzimski mehanizam 7-alfa hidroksilaze. Taj enzimski mehanizam regulira sintezu žučnih kiselina. Do poremećaja ravnoteže između kolesterola i žučnih kiselina dolazi ili zbog smanjenja kočeće

funkcije enzimskog mehanizama u jetri, ili zbog smanjenja količine žučnih kiselina. U takvim slučajevima dolazi do hipersaturacije žuči kolesterolom te se višak kolesterola ne može vezati za žučne kiseline. Za posljedicu imamo kristalizaciju i taloženje kolesterola kao jezgre budućeg konkrementa. Oko te jezgre se dalje talože novi kristali kolesterola, kalcijeve soli, žučni pigmenti i dr. Međutim do pojave "nesolubilnog" kolesterola može dovesti i staza žuči. Neadekvatno pražnjenje žučnjaka (poremećaj kontrakcije) ili zastoje žuči u ekstrahepatičnim žučnim putovima dovodi do pojačane resorpcije vode iz žuči. Uslijed takve "kondenzacije" žuči dolazi do pucanja veze kolesterola sa žučnim kiselinama i oslobađanja netopivog kolesterola koji podliježe kristalizaciji. Smatra se da je upravo mehanizam zastoja jedan od glavnih čimbenika u nastanku žučnih konkremenata. Istraživanja su pokazala da u većine bolesnika postoji njegovo usporeno pražnjenje što za posljedicu ima kolestazu, a time i povećan rizik za nastajanje konkremenata.

Pigmentni (bilirubinski) kamenci nastaju nešto drugačijim mehanizmom. Osnovni čimbenik u njihovom nastanku je povećana količina nekonjugiranog bilirubina u žuči te relativni manjak žučnih soli. Višak nekonjugiranog bilirubina povezan je sa stanjima kronične hemolize ili alkoholne bolesti jetre. Povećana količina bilirubina potiče enzimsku aktivnost beta-glukoronidaze, koja djeluje kao katalizator reakcije hidrolize konjugiranog bilirubina. Spajanjem indirektnog bilirubina (nekonjugirani) s kalcijevim solima stvara se potom kalcijev bilirubin. On se taloži i predstavlja jezgru oko koje daljnjim taloženjem žučnih boja nastaje pigmentni konkrement. Istraživanja su pokazala da enzimsku aktivnost beta-glukoronidaze može biti pojačana prisustvom nekih bakterija (infekcija) u žuči. To za posljedicu ima hidrolizu konjugiranog bilirubina i stvaranje kalcij-bilirubinata koji se precipitira. Taj "okidački" mehanizam infekcije u nastanku pigmentnih konkremenata poznat je u nastanku intrahepatične kalkuloze u zemljama Azije.



Slika 1. Prikaz digestivnog sistema čovjeka

Neosporno je da na sve veću učestalost kolelitijaze utječe i neprimjeren način prehrane modernog čovjeka. Bilijarna kalkuloza (slika 2) javlja se, naime, gotovo isključivo u ljudi koji se hrane masnom, visokokaloričnom hranom, dok je poznat manji postotak kolelitijaze u vegetarijanaca (1).

Istraživanja posljednjih godina govore u prilog i određene genetske predispozicije bilijarnoj kalkulozi. Poznata je pojava bilijarne kalkuloze u određenim obiteljima. I spol određuje određenu predispoziciju, tako je bilijarna kalkuloza prosječno dva puta češća u žena nego li u muškaraca (2).

Slično djeluju neki lijekovi: npr. estrogeni i oralna kontracepcijska sredstva, koja povećavaju sekreciju kolesterola i izazivaju predispoziciju ka bilijarnoj kalkulozi (3).

Poznato je također da adipoznost povećava sklonost bilijarnoj kalkulozi (4-5), kao i nagli gubitak na težini zbog redukcijske dijeta (6-7). Usto, zna se da oko 40% bolesnika s Chronovom bolesti ima bilijarnu kalkulozu, najvjerojatnije zbog funkcionalnog oštećenja

terminalnog ileuma, u kojem dolazi do aktivne resorpcije žučnih kiselina. Malapsorpcija žučnih kiselina dovodi do smanjenja količine istih i smanjene bilijarne sekrecije žučnih soli, pa žuč postaje litogena, zbog smanjene hidrosolubilnosti kolesterola. Zbog istog razloga učestalija je pojava bilijarne kalkuloze u bolesnika kojima je reseciran terminalni ileum.

Neke bolesti metabolizma kao što su hiperlipidemija (tip IV), šećerna bolest (8), ciroza jetre (9), ali i neprimjerena ishrana bogata kolesterolom predisponiraju razvoju bilijarne kalkuloze. Na kraju treba spomenuti da nastanku žučnih kamenaca pogoduju i strana tijela u žučnim putovima (šavi iz neresorbirajućeg materijala, otkinuti dijelovi drenova, paraziti), kao i dugotrajna parenteralna prehrana bolesnika.



Slika 2. Presjek žučnjaka sa žučnim kamencima

*Klinička slika kolelitijaze.* Ona je u svojoj tipičnoj formi dobro poznata. Napadaj bilijarnih kolika, započinje obično pojavom grčevitih bolova u sredini epigastrija, koji se šire pod desni rebrani luk, te u desnu stranu leđa i supskapularnu regiju. Zapoinju obično nakon obroka koji izazivaju kontrakciju žučnjaka (mast, jaja), ali i nakon većih fizičkih i psihičkih napora. Napadaj je često praćen povraćanjem gorkog sadržaja. Katkada može biti prisutan kratkotrajn subikterus ili ikterus (u 5-10% slučajeva), ali valja razlučiti bolesnika s koledokolitijazom kada ikterus može trajati tjednima i imati undulirajući karakter. Tijekom



napadaja prisutna je palpatorna bolnost u epigastriju i pod desnim rebranim lukom. "Defans" muskulature nije prisutan, a niti postoji jače izražena reflektorna napetost prednje trbušne stijenke u području desne subkostalne regije. Temperatura obično nije povišena i leukocitoza nije prisutna. Između napadaja bolova bolesnik ne mora osjećati nikakvih tegoba. Ipak u bolesnika s dugotrajnom bilijarnom kalkulozom, vjerojatno zbog resorpcije toksičnih produkta iz oboljelog žučnjaka i reflektornih neuromuskularnih poremećaja žučnih putova i crijeva, često su prisutne različite dispeptične tegobe (nadutost, flatulencija, tupa epigstrična bol, žgaravica). Te se teškoće javljaju obično nakon obilnih teških, masnih jela. Postprandijalnu nadutost u epigastriju ponekad može pratiti jako podrigivanje. Međutim, bilijarna kalkuloza može pokazivati vrlo atipičnu kliničku sliku. Bolesnici nemaju tipične bilijarne kolike, već kliničkom slikom dominiraju nespecifični simptomi poput glavobolje te "reumatski" bolovi u vratu, leđima i zglobovima. Najvjerojatnije je takva klinička slika uzrokovana također kroničnom intoksikacijom. Prava narav bolesti i uzrok opisanih atipičnih tegoba teško se otkriva. Katkada u takvih bolesnika dominiraju kardijalne smetnje u vidu anginoznih bolova, palpitacije, dispneje. Nakon kolecistektomije poteškoće brzo nestaju.

*Asimptomatska kolelitijaza.* Radi se o bolesnicima u kojih je slučajno otkrivena kolelitijaza (npr. prilikom ultrasonografije abdomena), a da pri tom nemaju nikakvih značajnijih simptoma bolesti. Ipak, takvi bolesnici imaju nerijetko neodređene dispeptičke tegobe. Biokemijski nalazi su normalni, a epidemiološka ultrasonografska ispitivanja su pokazala da 60–70% bolesnika s kalkulozom žučnjaka ima asimptomatsku kolelitijazu (10).

*Dijagnoza.* Za kirurga je od najveće važnosti da anamnestičke i kliničke podatke, te znakove bolesti koji govore u prilog kolelitijazi objektivizira dokazom bilijarnih konkremenata.

Mogući dijagnostički pregledi uključuju:

- ultrasonografiju (UTZ) jetre i žučnih puteva (11-12)
- intravensku holangiografiju (IVH) (slika 3)
- endoskopsku retrogradnu holangiopankreatografiju (ERCP)
- peroralnu kolecistografiju
- perkutanu transhepatična holangiografiju (PTC)
- koleoscintigrafiju s 99-m tehnejem
- kompjuteriziranu aksijalnu tomografiju (CT) (slika 4)
- nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) s kontrastom

Bilijarni konkrementi rastu obično polagano, a ponekad mogu rasti i na mahove. U istog bolesnika moguće je raspoznati različite generacije konkremenata. U određenom broju slučajeva (2 – 14%) kolecistektomija, nalazimo žučnjak bez kamenaca, tzv. akalkulozni kolecistitis (13), a kao glavni uzrok spominje se ishemija zida žučnjaka, koja se često pojavljuje u bolesnika koji boluju od kroničnih bolesti (kardiovaskularni bolesnici, dijabetičari).



Slika 3. Prikaz kamenaca uz pomoć IVH

Poznato je da postoji kolelitijaza bez upale i kolecistitis bez kalkuloze. Ipak u većine bolesnika s kolelitijazom prisutna je i upalna reakcija, pri čemu je s praktičnog gledišta svejedno koji je proces primaran. Treba upozoriti na činjenicu da je samo u 50% bolesnika s patološkim znacima upale žučnjaka moguće bakteriološki dokazati prisutnost mikroorganizama. U takvih bolesnika najčešće se radi o *eschericiji colli*, a rjeđe su prisutni strepto-stafilokoki i enterokoki, te *proteus vulgaris* i *pseudomonas*. Anaerobi su vrlo rijetki, međutim, ako su prisutni, mogu biti razlogom teških postoperativnih infekcija koje mogu završiti letalno. Upalne promjene u žučnjaku su izraženije što bilijarna kalkuloza duže traje. Ta činjenica predstavlja jedan od razloga za što ranije liječenje kolelitijaze.



Slika 4. Prikaz kolelitijaze uz pomoć CT skena

## 1.2. Operativni pristupi žučnjaku i kolecistektomija

U posljednjih 25 godina broj bolesnika sa dijagnozom bilijarne kalkuloze, i to u oba spola (14), značajno raste, a nakon uvođenja laparoskopije raste i broj kirurških zahvata u smislu kirurškog odstranjenja žučnog mjehura (15).

Odstranjenje žučnjaka predstavlja tijekom posljednjih godina najčešće primjenjivan kirurški zahvat u digestivnoj kirurgiji. Zbog toga kirurg mora dobro poznavati kiruršku tehniku kolecistektomije (laparoskopske i klasične), koja je daleko najčešća operacije na bilijarnom stablu. Pogrešno postavljena indikacija, poduzeta operacija u pogrešno vrijeme i

neadekvatna kirurška tehnika ozbiljno ugrožavaju život i zdravlje bolesnika. Dobro izvježbani kirurg s dobrim poznavanjem kirurške anatomije i patologije žučnih putova garantira niski operativni mortalitet i morbiditet.

Indikacije za kolecistektomiju su :

- kronični kalkulozni kolecistitis (predstavlja najčešću indikaciju za operaciju)
- akutni kolecistitis, unutar prva tri dana od početka bolesti
- kronični kolecistitis bez dokazane kalkuloze, ali s recidivirajućim bilijarnim kolikama
- akutni, akalkulozni kolecistitis
- akutni kolecistitis kompliciran bilijarnim peritonitisom
- hidrops, empijem, spontana perforacija žučnjaka
- traumatska oštećenja žučnjaka

Kolelitijaza je udružena sa povećanim rizikom od karcinoma žučnjaka. Iako je današnja preoperativna rana dijagnoza malignoma žučnjaka gotovo nemoguća, dugo preživljavanje je moguće jedino u rijetkim slučajevima slučajno otkrivenog karcinoma žučnjaka (PH analiza) kod kolecistektomiranih bolesnika. Stoga je i to jedan od razloga zbog čega se preporuča u starijih bolesnika (iznad 55 godina) sa višegodišnje prisutnom kolelitijazom – izvršiti operativni zahvat uklanjanja žučne vrećice (16).

### **1.2.1. Klasična kolecistektomija**

Prvo uspješno vadenje bilijarnih kamenaca iz žučnjaka izveo je John S. Bobbs 15. lipnja 1867. godine. Međutim dugogodišnje iskustvo je pokazalo da ukoliko se samo kamenci odstrane iz žučnog mjehura, a mjehur ostavi, postoji tendencija ponovnog stvaranja žučnih kamenaca. Prva uspješna kolecistektomija izvedena je u Berlinu 15. srpnja 1882. godine od strane Langenbuch-a. U početku dosta kritizirana operacija, zbog postoperacijskih komplikacija (krvarenje, bilijarna fistula), nakon boljeg upoznavanja anatomskih struktura te

regije od strane Calot-a i Paris-a 1890. (17), kolecistektomija postaje metodom izbora (18) u liječenju kolelitijaze sve do današnjih dana. Porast takvog tipa zahvata vidi se i u jednoj američkoj studiji u kojoj su bolesnici bili dječjeg uzrasta, a kao uzrok tome, opisuje se češće upućivanje bolesnika sa abdominalnim bolovima na ultrasonografski pregled (19). I dok se kolelitijaza češće javlja u dječaka, koledokolitijaza se češće nalazi u djevojčica (20). Inače, u većini slučajeva etiologija kolecistitisa i kolelitijaze u dječjoj dobi je nesigurna (21). Spominju se hematološke nepravilnosti, totalna parenteralna ishrana, resekcija ileuma.

#### *Operativni pristup kod klasične kolecistektomije.*

Bolesnik je položen na leđima, sa podmetnutim jastukom pod lumbodorzalni dio kralježnice. Anestezija je opća endotrahealna. Može se primijeniti više tipova rezova za pristup intraabdominalnoj šupljini, međutim danas se najčešće upotrebljava desni subkostalni rez po Kocheru. Po ulasku u trbušnu šupljinu često se nađe žučnjak zadebljale stijenke, sa palpabilnim kamencima i u brojnim priraslicama. Nakon rješavanja priraslica, započne se preparacija struktura u Calotovom trokutu sa ciljem odvajanja cistične arterije i cističnog voda od ostalih struktura. U tom aktu su moguće ozljede žučnih puteva i zajedničke hepatičke arterije osobito ako je udružena i akutna upala (perikolecistitični edem otežava verifikaciju struktura). Slijedi ligiranje (podvezivanje) i presjecanje cistične arterije i cističnog voda, te izljuštenje žučnjaka iz hepatalne lože koje također treba biti minuciozno zbog mogućnosti ozljeda jetrenog parenhima, te posljedičnog krvarenja ili curenja žuči iz manjih žučnih kanalića ili ozljede i perforacije žučnog mjehura sa posljedičnim curenjem žuči i ispadanjem kamenaca. Nakon ekstrakcije žučnog mjehura obično se provodi tzv. subhepatalna drenaža, odnosno postavljanje jednog gumenog drena u foramen Winslowi. Nakon provjere hemostaze slijedi zatvaranje trbušne stijenke, a preparat (žučnjak) može se poslati na PH analizu.

### 1.2.2. Laparoskopna kolecistektomija

Mouret je u Lyonu (Francuska) u ožujka 1987. prvi uspješno obavio laparoskopnu kolecistektomiju (22). Dubois u Parizu od veljače 1988. također prihvaća novu metodu kolecistektomije (23). U listopadu 1988. laparoskopna kolecistektomija se provodi i od strane Reddick-a u Nashville-u (24). Zahvaljujući entuzijazmu nekolicine američkih kirurga: Reddick, Berci u Los Angeles-u (25), Zucker u Baltimor-u (26), te Europljana kao što su Cuschieri iz Dundee-ja (27), Troidl-a iz Cologne, Buess-a iz Tubingen-a, laparoskopna kolecistektomija je dobila veliki uzlet.

Tim kirurga na čelu sa Perissat-om postavlja kriterije, odnosno među prvima vrši selekciju bolesnika kojima takav zahvat predstavlja rizik (28-29).

- Opće kontraindikacije: povećani kardijalni rizik, respiratorna insuficijencija
- Lokalne kontraindikacije: akutni ili subakutni kolecistitis sa debljinom stijenke žučnjaka više od 4 mm (UTZ)
- Pridružena asimptomatska koledokolitijaza
- Prijašnje abdominalne operacije

Međutim, u današnje vrijeme čak i akutna upala žučnjaka nije prepreka laparoskopnoj kolecistektomiji (30-32).

Svaka endoskopska operacija zbog distenzije abdominalne šupljine uzrokovane pneumoperitoneumom uzrokuje hemodinamske i respiratorne reperkusije (33). Posljedice toga su promjene u krvnom tlaku (najčešće u vidu hipotenzije), te promjene u srčanom ritmu, koje u krajnjem slučaju mogu dovesti i do kardijalnog aresta (34-35).

Laparoskopna kolecistektomija bez laparotomije je danas postala zlatnim standardom u liječenju nekomplikirane kalkuloze žučnjaka, kako u odraslih, tako i u djece (36-37). Laparoskopna procedura dokazuje se brзом i sigurnom metodom na mnogim studijama i u

trudnica (38). Prednost takve operacije je vrlo kratka hospitalizacija (1-3 dana), te vrlo brza kompletna rehabilitacija (39).

Zahvat se sastoji u tome da se kroz troakarske punkcijske transparijetalne otvore uvode u trbušnu šupljinu laparoskop i specijalni operacijski instrumentarij kojim se pod optičkom kontrolom vrši laparoskopiska kolecistektomija. Međutim, vrlo važan trenutak tijekom zahvata je insuflacija ugljičnog dioksida u peritonealnu šupljinu do tlaka od 14 mm stupca žive, kako bismo dobili dobru preglednost operacijskog polja. Naime, nakon insuflacije, na mjestu supraumbilikalne incizije uvodi se 10 ili 12 milimetarski troakar, a kroz njega kamera. Sada je moguće pod kontrolom oka eksplorirati abdominalnu šupljinu i postaviti preostala (dva ili tri) radna troakara na tipičnim mjestima, te započeti preparaciju struktura (arterija i duktus cistikus) u Calotovom trokutu, izljuštenje žučnjaka iz hepatalne lože i njegovu ekstrakciju (40).

Neki timovi, pogotovu u Sjedinjenim državama često koriste i laser (41) u laparoskopskoj kolecistektomiji. Njegovi promotori ističu visoki kvalitet reza i koagulacije, povećavajući na taj način preciznost i odsustvo propagacije topline na susjedna tkiva.

Tijekom ovog pristupa dolazi do porasta intraabdominalnog tlaka, što obično nema štetnih posljedica. No, međutim, neki od literarnih podataka ipak su dokazali da nakon laparoskopске kolecistektomije dolazi do promjena u jetrenim funkcijama, a posebno u nekim jetrenim enzimima (42-44). Promjene se vežu uz funkciju endotelnih i/ili Kupfferovih stanica. Što se tiče imunoloških funkcija, neke studije su pokazale bolji imunološki odgovor nakon laparoskopskih operacija, nego u slučaju otvorene kirurgije (45).

Petrocelli i sur. (46) opisuju veći postotak povreda žučnjaka tijekom laparoskopске kolecistektomije (16%), nego kod otvorene kolecistektomije (8%), te preporučuju modifikaciju tehnike prepariranja, odnosno disekcije žučnog mjehura od jetre.

Inače, jedna od najvećih multicentričnih studija, što se tiče povreda bilijarnog trakta, učinjena je u Mađarskoj (89 mađarska instituta), gdje je na uzorku od 26440 operacija zabilježeno 148 lezija bilijarnog stabla (47). Mortalitet u Francusko-Belgijskoj studiji iz 1991. iznosi 0,1%, a morbiditet 3,5% (48-49). Na 3708 bolesnika zabilježeno je pet smrtnih slučajeva, od kojih su dva nepoznata uzroka (Tablica 1).

Tablica 1. Učestalost komplikacija nakon laparoskopske kolecistektomije

Francusko-Belgijska studija iz 1991. na seriji od 3708 bolesnika

	n	%
Mortalitet	5	0,13
Morbiditet	133	3,5
Konverzije	273	7,3
Povrede koledokusa	7	0,18

Povrede ekstrahepatalnih žučnih puteva su također rijetke i kreću se između 1-2%, iako neke studije spominju veći broj komplikacija (50-53).

Radi prevencije povreda koledokusa u mnogim studijama preporuča se uporaba intraoperativne kolangiografije, jer se na taj način dobiva bolji uvid u anatomske odnose bilijarnog stabla (54), dok je metoda izbora pri postoperativnom curenju žuči endoskopska sfinkterotomija (55).

Jedna od najčešćih intraoperativnih komplikacija je perforacija žučnjaka sa posljedičnim ispadanjem kamenaca, koji se u većini slučajeva pronađu i ekstrahiraju. Manji broj zaostalih sitnih kamenaca obično ne uzrokuju tegobe, međutim u određenim slučajevima mogu dovesti do stvaranja hepatalnog ili retroperitonealnog apscesa (56).

Poteškoće pri zaustavljanju krvarenja i nemogućnost prepoznavanja prave anatomije vodi često konverziji, odnosno obratu iz laparoskopske u otvorenu (klasičnu) kolecistektomiju (57-58). Također konverziji treba pristupi i uslijed loše slike na ekranu, ili nestabilnog pneumoperitoneuma.



Na našem odjelu Kirurške klinike KBC Rijeka, laparoskopska kolecistektomija (LK) prvi put se izvodi 17. prosinca 1993., a do 31. prosinca 2002. je izvedeno više od 5000 takvih zahvata s vrlo malim postotkom intra i poslije-operacijskih komplikacija.

Laparoskopska kolecistektomija je primjer velikog uspjeha u endoskopskoj kirurgiji, koji uklanja sve mane otvaranja abdominalnog ili torakalnog zida (59). Zbog manje popratne traume ona je, najvjerojatnije, i operacija budućnosti.

*Ostale mogućnosti liječenja kolelitijaze.* Iako je unatrag desetljeća kolecistektomija prihvaćena kao optimalna i standardna metoda u liječenju bilijarne kalkuloze, unatrag nekoliko godina javljaju se pokušaji konzervativnog liječenja te bolesti. Osnovni razlog takvih pokušaja je prisutnost kolelitijaze u bolesnika starije dobi, u bolesnika u kojih operativni zahvat predstavlja visoki rizik, te u bolesnika mlađe dobi sa asimptomatskom kolelitijazom. Prvi pokušaj nekirurškog liječenja kolelitijaze potječe od Walkera koji je krajem 19. stoljeća upozorio na mogućnost otapanja bilijarnog konkrementa pomoću etera. Metodu su kasnije razradili Pribram i Best aplikacijom otopine etera i alkohola, kroz "T" dren u svrhu otapanja zaostalog konkrementa, a Britton i suradnici primjenjuju u tu svrhu otopinu Na-holata. Međutim prvi pokušaj primarnog nekirurškog liječenja kolelitijaze objavljeni su početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća (Schoenfeld, 1981.) primjenom henodeoksiholične kiseline peroralnim putem (60-61).

Nakon toga Allen i sur. (1985) uvode metodu brzog otapanja bilijarnog konkrementa primjenom interventne radiologije, a usavršavanje ekstrakorporalnog litotripora (ESWL – Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy), primarno namijenjenog fragmentaciji bubrežnih kamenaca, omogućuje njegovu primjenu i u liječenju kolelitijaze (Sauerbruch i sur. 1986.). Usprkos činjenici da su spomenute nekirurške metode liječenja kolelitijaze pokazale svoj manje ili više uspješan terapijski učinak, ipak je njihova primjena ograničena na određenu grupu bolesnika, ili bolje rečeno na određenu formu bilijarne kalkuloze.

### 1.3. Neuro-endokrina i imunološka reakcija na traumu

#### 1.3.1. Neuro-endokrine promjene tijekom traumatskog stresa

U protekla dva desetljeća, mnogo se raspravljalo o međusobnoj povezanosti stresa i imunološkog odgovora. Brojne su studije dokazale povezanost mozga i imunološkog sustava, kada emocionalna stanja, kao što je npr. stres, mijenjaju imunološku reakciju, bilo u eksperimentalnim (u laboratorijskih životinja), bilo u prirodnim uvjetima (u ljudi izloženih akutnom ili kroničnom stresu). Stresori se razlikuju u brojnim dimenzijama (trajanje aktualnog događaja, trajanje prijetnje događanja, dužina odgovora na aktualni događaj, da li se uklonio uzrok stresa, koliko su ozbiljne posljedice stresa, da li je stres prouzročio gubitak nekoga ili nečega, te da li je predstavljao prijetnju životu pojedinca i slično), tako da je istraživanje oblika stresnih odgovora izuzetno teško. Poseban problem istraživanja je i nemogućnost određivanja odgovarajuće kontrolne grupe ispitanika (62, 63, 64). Izuzetno jaki stresori koji uključuju strah za vlastiti život, a imaju za posljedicu i izravne tjelesne ozljede, obično se kvalitativno razlikuju od većine ostalih stresora.

Prirodne katastrofe i ostali traumatski stresori su neobični po tome što trajanje iznenadnog događaja uvijek nastupa akutno. No odgovor na taj događaj može potrajati neopisivo dugo, jer nema adaptacije na ovu vrstu uzročnika. Stalni, neprekinuti i ozbiljan stres može prijeći u posttraumatski stresni poremećaj (PTSD, prema engl. posttraumatic stress disorder), koji se bazira na ponavljanom iskustvu doživljavanja iznenadnog djelovanja stresora, njegovoj percepciji i pokušaju izbjegavanja (65). Narušavanje endokrine aktivnosti uslijedi obično odmah nakon izlaganja stresu, što dovodi i do promijenjene funkcije imunološkog sustava.

Naše tijelo, uključujući mozak, može se nositi s opasnošću na dva moguća načina: prilagodbom i/ili navikom. Prema Hans Selye-u kao reakcija na različite stresore nastaje alostaza. Prefiks *allo* je grčkog porijekla i označava promjenljivost, kojom se označava novo

stanje ravnoteže nakon napada i reakcije na negativno djelovanje stresora. Tijekom i najmanjeg nagovještaja opasnosti, u fazi uzbune ili alarma mozak obično aktivira neki oblik odgovarajuće alternativne obrambene kaskade, po obrascu "bijeg-borba-ukočenost" (prema engl. "flight-fight-freeze" defence cascade). Nakon toga slijedi faza prilagodbe ili generalnog adaptacijskog sindroma (GAP), u kojoj organizam postaje otporniji na djelovanje stresora. U kroničnom stresu, međutim, organizam može doći i u fazu iscrpljenja.

Alostaza započinje obično u hipotalamusu, koji koristi dva načina za odašiljanje signala nadbubrežnoj žlijezdi, koja odgovara proizvodeći glavninu stresnih hormona: 1) preko hipotalamičko-hipofizno-adrenalne osovine (HPA prema engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis) i 2) preko noradrenergičkog sustava lokusa ceruleusa. HPA je glavna obrambena kaskada, koja omogućuje uspješno prebrođivanje kriza. No, trajno podraživanje ove osi kroničnim stresom može izazvati i posljedice poput debljine, gubitka mišićne mase, mentalne slabosti, itd. Kada opasnost prestane, stresni odgovori se ugase, barem u većine divljih životinja, zbog mehanizama negativne povratne sprege, kojom učinci perifernih hormona blokiraju lučenje hormona iz hipotalamusa ili hipofize. Međutim, u ljudi kronični stresori mogu održati HPA neograničeno dugo aktivnom. Često nastaje hormonska neravnoteža, koja oštećuje pojedina područja mozga (66, 67).

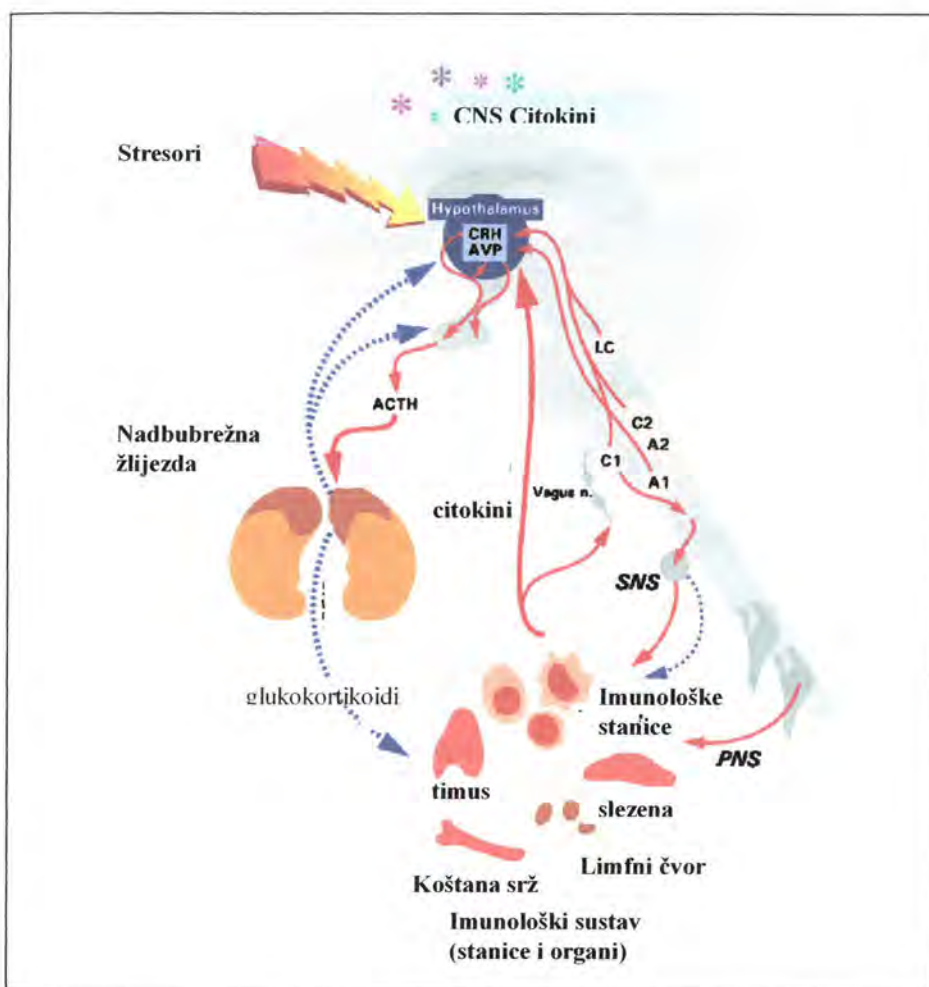
Alostaza, koja izaziva veće lučenje kortizola u jutarnjim satima, omogućuje modernom čovjeku uspješno savladavanje dnevnih izazova. Kad, međutim, alostatski teret postane previsok, odgađa se suzbijanje stresa i dolazi do narušavanja fizičkog i mentalnog zdravlja. Dva primarna cilja stresnih hormona u mozgu su: hipokampus i amigdaloidne jezgre. U ovim strukturama neuroni mogu mijenjati oblik i povezanost, kao i sam broj stanica. Za emocije su zadužene amigdaloidne jezgre koje su povezane s frontalnim korteksom. Kada su razine stresa vrlo visoke, hipokampus može biti oštećen, kao i njegova glavna uloga u formiranju pamćenja, naročito onog koje je praćeno rizikom. Traumatski stres

može, dakle, oštetiti mozak, a fiziološki simptomi koji na to ukazuju mogu biti shvaćeni kao neurološke bolesti. Posljedice traumatskih iskustava mogu biti živčane, hormonske, autonomne i mentalne promjene, koje uzrokuju i promjene ponašanja.

Opći obrazac stresnog odgovora je, dakle, nastanak stresnog sindroma, koji se sastoji od složenog psihosomatskog odgovora usmjerenog održavanju homeostaze i izbjegavanju ugroženosti organizma. Somatske promjene usmjeravaju kisik, energiju i hranjive tvari prema vitalno važnim organima i oštećenom području, ograničavajući imunološku i upalnu reakciju. Psihičke promjene podižu spremnost za svrhovito reagiranje.

U neuroendokrinom sustavu glavnu ulogu u stresnom odgovoru ima sustav hormona koji oslobađa kortikotropin (CRH-sustav) i noradrenergički sustav lokusa ceruleusa. CRH luče neuroni paraventricularnih jezgara hipotalamusa, a on u hipofizi potiče lučenje peptida, koji nastaju cijepanjem pro-opiomelanokortina (POMC). Njihovi glavni predstavnici su adrenokortikotropni hormon (ACTH) i beta-endorfin. ACTH inducira lučenje glukokortikoida iz kore nadbubrežne žlijezde stimulira na lučenje kortizola. Neuroni koji luče CRH nalaze se posvuda u mozgu: u moždanom deblu, limbičkom sustavu i kori. CRH potiče aktivnost simpatičkog sustava, budnost i pažnju, a smanjuje nagon za hranjenjem i reprodukcijom.

Noradrenergički neuroni su također široko rasprostranjeni u CNS, naročito u produženoj moždini u lokusu ceruleusu. Oni potiču adrenergičke učinke na periferiji, stimulirajući oslobađanje noradrenalina iz perifernih simpatičkih živaca, te noradrenalina i adrenalina iz srži nadbubrežne žlijezde, pojačavajući budnost i pažnju.



Slika 5. Hipotalamičko-pituitarno adrenalna osovina (HPA) (modificirano prema 67)

CRH sustav i noradrenergički sustav lokusa ceruleusa su povezani pozitivnom povratnom spregom, tj. neuroni koji luče CRH u produženoj moždini potiču aktivnost noradrenergičkog sustava lokusa ceruleusa i obrnuto, noradrenergički neuroni u paraventrikularnim jezgrama potiču lučenje CRH. Negativna kontrola: CRH potiskuje vlastito lučenje CRH-neuroni potiču lučenje POMC neurona arkuatne jezgre da luče ACTH i  $\beta$ -endorfin (68).

Izlučeni hormoni i neurotransmiteri mogu pojačati ili potisnuti djelovanje stresnih stimulacija, a svi imaju i imunomodulirajuću aktivnost. Dugo vremena se smatralo da glavnu regulacijsku ulogu u otklanjanju stresa imaju glukokortikoidi. No danas se u anti-stresne

hormone ubrajaju i opiodi, kateholaminini, acetilkolin, benzodijazepini, CRH, ACTH, spolni hormoni, tiroksin, hormon rasta, prolaktin, somatostatin, supstanca P, vazoaktivni intestinalni peptid, oksitocin i timični hormoni (69). Iako svaki od njih ima posebno anti-stresno djelovanje, važno je naglasiti da je konačan učinak zapravo rezultat međusobne interakcije između svih hormona, odnosno neurotransmitera.

Različiti kemijski posrednici oslobođeni tijekom stresa mogu prouzročiti psihosomatske smetnje, smetnje u učenju i pamćenju, koje je bazirano u hipokampusu, te dovesti do promjene u aktivnosti amigdaloidnih jezgara i medijalnog, prefrontalnog korteksa, što vodi k oštećenoj inhibiciji odgovora. Kao rezultat toga, emocionalno i autobiografsko pamćenje može postati fragmentirano. Ponavljana ili kronična izloženost traumatskom stresu može voditi dugotrajnoj disregulaciji ovih sistema, rezultirajući poremećenom funkcijom i simptomima stresu-pridruženih bolesti, kao što su: stalna budnost, disocijacija, česti povratci na staro (engl. flashback), izbjegavanje i depresija.

Produljeno trajanje stresa, odnosno kronični stres može dovesti i do sindroma kroničnog zamora. Kronični umor je riziko faktor za razvoj različitih bolesti kardiovaskularnog sustava (infarkt miokarda, cerebrovaskularni inzult)

Teške posljedice stresa su i promjene u imunološkoj reaktivnosti. Dugotrajnije su one kojima je uzrok bio ljudski faktor, negoli one izazvane prirodnim katastrofama (70,71,72). U akutnom stresu obično nalazimo značajno veću citotoksičnu aktivnost NK (eng. natural killer-NK) stanica (73,74,75), dok je ona u kroničnom stresu značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu (76). Boscarino i Chang su 1999. god.(77) opisali rezultate pretraga na Vijetnamskim veteranima, sakupljenim i uspoređenim 20 godina nakon služenja vojne službe. Utvrdili su da veterani s PTSD imaju povišene vrijednosti leukocita, ukupnog broja limfocita, te subpopulacije CD4-limfocita, u usporedbi s veteranima bez PTSD. Isti ispitanici imali su i

povišen odgođeni tip hipersenzitivnog odgovora u odnosu na veterane bez PTSD ili zdrave jedinice (78).

U većem broju studija izvršeno je i određivanje koncentracije hormona da bi se na taj način više saznalo o njihovoj međuovisnosti s aktivnošću imunološkog sustava tijekom stresa. Vrijednosti katekolamina i kortizola (79), kao i epinefrina (EPI) su u stresu bile značajno povišene. PTSD je bio praćen i većom adrenergičkom aktivnošću, iako su u nekim slučajevima pronađene i snižene vrijednosti katekolamina u plazmi, što se pokušalo objasniti interakcijama između katekolamina i kortizola (80-82). Žrtve traumatskog stresa sa PTSD-em pokazivale su i značajno veću fiziološku aktivnost na stimuluse koji su podsjećali na preživjelu stresnu situaciju, nego li žrtve bez PTSD (83). Osim toga, za razliku od uobičajenog kroničnog stresa, koji je udružen s povišenim vrijednostima katekolamina i kortizola i imunosupresijom, neuroendokrini odgovor na traumu u PTSD bolesnika je često okarakteriziran povišenim vrijednostima katekolamina i sniženim vrijednostima kortizola. Pretpostavilo se da u ovih bolesnika postoji povećana osjetljivost hipotalamo-hipofizne osovine na mehanizme povratne sprege, no nije jasno da li je ova hipotalamusna abnormalnost primarna ili sekundarna posljedica traumatskog stresa, koji je doveo do razvoja PTSD. Stoga i brojne imunološke abnormalnosti uočene u PTSD mogu, izgleda, nastati različitim mehanizmima.

### **1.3.2. Imunološke posljedice traume i kirurških zahvata**

Trauma je multisistemska bolest, čije liječenje zahvaća u široka područja moderne medicine, kao što su fiziologija, imunologija, molekularna biologija, te biokemija. Traumatska ozljeda je skupa bolest, kako za pacijenta, tako i za društvo u cjelini, te je i danas, preventiva najbolji lijek. Istraživanja, izvršena u posljednjih petnaest godina, donijela su velike novosti, jer su pridonijela razumijevanju kompleksne međugre neuroendokrinog

sustava i nespecifične i specifične imunološke obrane, te staničnih i upalnih posrednika (84). Iako 50% pacijenata umire od ireverzibilne ozljede glave koja uslijedi nakon traume glave, ipak sepsa i multipla organska ozljeda uzrokuje 78% kasnih ne-neuroloških smrti (R. Zellweger). Narušavanje homeostaze koje uslijedi nakon velike kirurške operacije, masovne ozljede ili teške bolesti, teži ka stvaranju sličnog odgovora. Kao posljedica ozljede oslobađaju se različiti imunološki čimbenici (citokini, prostaglandini, koagulacijski čimbenici, kao i toksični čimbenici), koji utječu na izmjenu plinova, energijski metabolizam, zacjeljivanje rana i obranu domaćina. Ako pacijent razvije sepsu, čiji uzročnik se ne otkrije, mortalitet raste brzinom, koja je proporcionalna broju zahvaćenih organskih sustava (85).

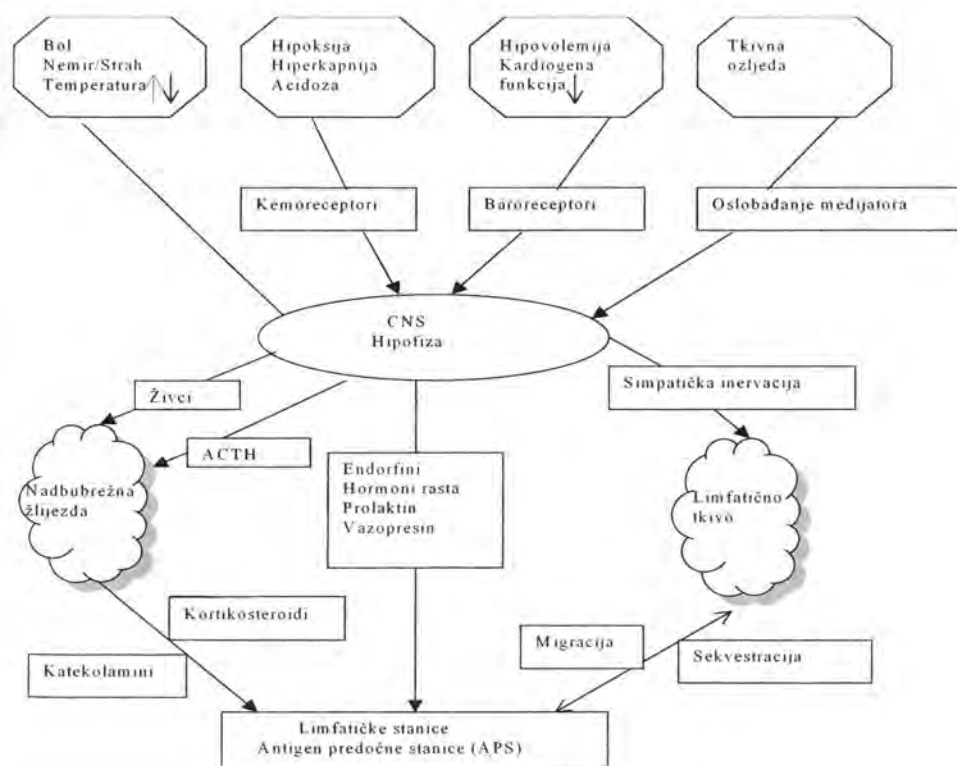
U šoku često nastaje ionska neravnoteža, u kojoj se mijenja koncentracija unutarstaničnog  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i nastaje stanično oštećenje. Upalni posrednici kao što su čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  prema engl. tumor necrosis factor- $\alpha$ ), trombocitni aktivirajući čimbenik (PAF, prema engl. platelet-activating factor), leukotrijeni i tromboksan  $\text{A}_2$  izazivaju obično prva oštećenja na membrani. U pacijenata s adultnim respiratornim distresnim sindromom (ARDS), potrošnja kisika raste s većim dotokom, unatoč smanjene periferne ekstrakcije kisika, pa bi se time mogla smanjiti tkivna hipoksija, ali postoje i kontradiktorni rezultati (86).

Slika 6 prikazuje kako ozljeda, kao tipična stresna reakcija, izaziva dramatične i kompleksne promjene u neuroendokrinom sistemu. Upalni medijatori, tkivna hipoksija i acidoza, odnosno krvarenje i hipovolemija posredstvom različitih receptorskih sustava (kemoreceptori, baroreceptori, osmoreceptori i sl.) aktiviraju HPA osovinu i locus ceruleus u hipotalamusu. Nastaje masivno simpatičko otpuštanje noradrenalina i adrenalina, te ACTH i glukokortikoida. Rano nakon ozljede obično se javlja hiperglikemija, kao posljedica glikogenolize, glukoneogeneze i inzulinske neosjetljivosti. Povećava se katabolizam mišićnih bjelančevina, što podiže razinu aminokiselina u krvi, a raste i anabolizam bjelančevina u jetri,



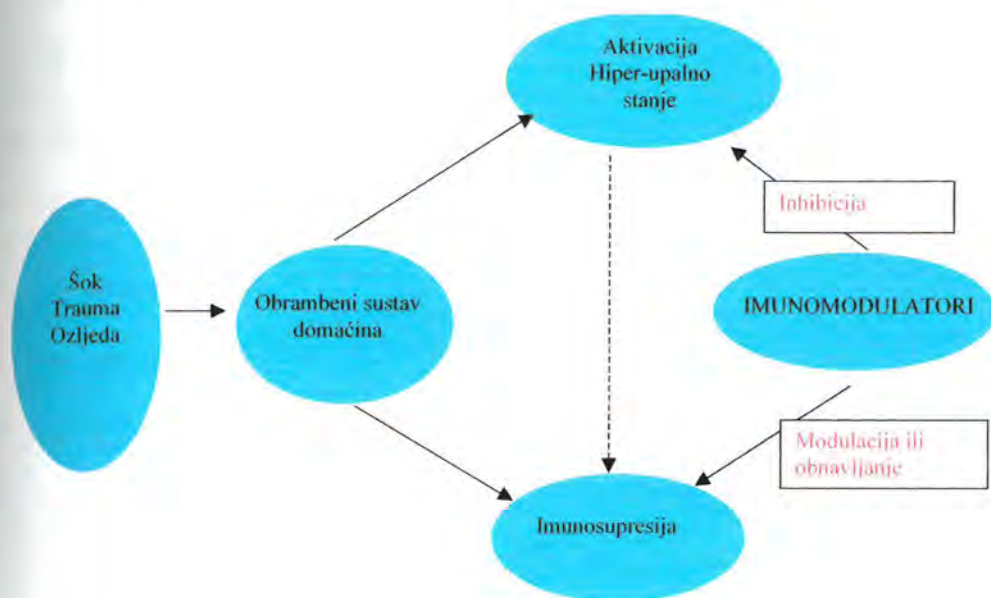
(osim albumina). U tim uvjetima brzina energetskog metabolizma povećava se za 20-50%, a kod težih ozljeda i do 100%. Nastaje negativna dušikova bilanca zbog energogenog korištenja aminokiselina. Kao sekundarne prilagodbe javljaju se hiperventilacija, ubrzanje hemodinamike i usporena probava, a koštanoj srži pojačava se granulocitopoeza i megakariocitopoeza. U razvijenom sindromu sustavnog upalnog odgovora (SIRS, engl. Systemic inflammatory response syndrome) sa susjednim zatajenjem više organskih sustava i očitovanjem odgovarajućeg sindroma (MODS, engl. Multiple organ dysfunction syndrome) sekundarni odgovori su višestruko promijenjeni, zbog djelovanja različitih patoloških čimbenika (87).

Traumatski stres vodi i promijenjenom oslobađanju drugih neuroendokrinih čimbenika, uključujući enkefaline i endorfine (88). Cirkulirajući, pro-upalni citokini (IL-1, IL-6, TNF-alfa) iz oštećenog tkiva, te IGF-1 (inzulin-like growth factor 1) mogu direktno stimulirati HPA osovinu.



Slika 6. Neuroendokrini odgovor na ozljedu

Nasuprot tome, neuroendokrini čimbenici (endorfini i enkefalini) mogu i sami imati imunoregulacijska svojstva, što govori o dvosmjernoj komunikaciji između periferije i centralnog nervnog sustava (CNS) (slika 7)



Slika 7. Mogući učinci imunomodulatora

### 1.3.2.1. Promjene prirodene i stečene imunosti

Nespecifična (urođena, prirodna) imunost jest otpornost na strane tvari svojstvena organizmu koji s tim antigenima nije nikada prije došao u dodir. Ona nije specifično usmjerena baš protiv tog antigena koji narušava integritet organizma, niti ostavlja sjećanje na njega. Predstavlja zapravo prvu liniju obrane i od rođenja osigurava vrlo dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Tek ako antigen prođe kroz tu zaštitu, javlja se specifična imunost. Specifična (stečena) imunost ne djeluje neovisno o nespecifičnoj imunosti, već je, naprotiv, nadograđena na nespecifičnu i usko s njom surađuje. Obje su imunosti toliko integrirane da ih je gotovo nemoguće odijeljeno promatrati. One se nadopunjuju i pojačavaju, čime postižu mnogo djelotvorniju ukupnu obranu.

Tablica 2. Nespecifična imunost

---

Nespecifična (urođena) imunost

---

1. Anatomske zapreke

- koža
- sluznice

2. Fiziološke zapreke

- temperatura
- sadržaj kisika
- pH tkiva
- kemijske tvari

3. Stanične zapreke

- makrofagi (fagocitoza, pinocitoza)
- granulirani leukociti
- stanice NK

4. Upalne zapreke

---

*Anatomske zapreke.* Najvažniji organi u nespecifičnoj obrani jesu koža i sluznice, koje zaštićuju organizam od prodora brojnih uljeza ne samo fizičkom pregradom i mehaničkim uklanjanjem, već i kemijskim tvarima u sekretima na površinama.

*Fiziološke zapreke.* Brojne značajke organizma ne pogoduju razvoju mikroorganizma. Tako nekima ne odgovara normalna tjelesna temperatura ili vrućica, sadržaj kisika ili pH u tkivima. Nadalje, u izvanstaničnoj se tekućini nalaze različite tvari koje sudjeluju u nespecifičnoj obrani jer djeluju mikrobicidno. To su npr. lizozim, interferon, komplement,  $\beta$ -lizin, C- reaktivni protein i drugi.

*Stanične zapreke.* Nosioци te otpornosti jesu fagociti (monocitno – makrofagna loza, neutrofilni leukociti) i stanice NK. Makrofagi su glavne izvršne stanice u pročišćavanju organizma, ali i aktivni sudionici u održavanju antigenskog i genskog integriteta organizma.

*Upalne zapreke.* Na bilo koje oštećenje – fizičko, kemijsko ili biološko – organizam reagira jedinstvenom standardnom reakcijom, upalom. Radi se o slijedu vaskularnih, neuroloških, humoralnih i staničnih događanja koja najprije razaraju, razrjeđuju ili ogradauju štetnu tvar, a poslije zacijele prouzročenu ozljedu.

Stechena imunost se temelji na specifičnom prepoznavanju molekula (antigena), koje organizam prepoznaje kao strane. Prepoznavanje se vrši putem antitijela (imunoglobulina-Ig, koje stvaraju B limfociti) i putem T limfocita. T limfociti prepoznaju samo antigene na staničnoj površini. Zbog toga se svaki unutarstanični patogeni protein mora najprije razgraditi u peptidne fragmente, koji se potom prezentiraju T limfocitima u sklopu proteina glavnog sustava histokompatibilnosti (eng. major histocompatibility complex-MHC), koji se klasificira u MHC molekule razreda I i MHC-molekule razreda II. MHC molekule razreda I vežu peptide koji su se sintetizirali u citosolu stanice domaćina iz proteina patogena (većinom iz virusa i nekih bakterija). Za razliku od toga peptidi, koji se vežu za MHC molekule razreda II nastaju iz proteina patogena, kojeg su fagocitirali makrofazi ili su bili endocitozom uvučeni u stanicu koja predočava antigene (engl. antigen-presenting cells - APC). Glavne APC su makrofazi, dendritičke stanice, B limfociti. T stanice prepoznaju kompleks MHC molekula i peptida putem T staničnog receptora (eng. T cell receptor-TCR). Pritom CD8+ T limfociti prepoznaju MHC molekule razreda I, a CD4+ T limfociti prepoznaju MHC molekule razreda II. Prema tome, unutarstanični patogeni stimuliraju citotoksične limfocite, koji uništavaju inficiranu, ili maligno promijenjenu stanicu, dok ekstracelularni patogeni stimuliraju uglavnom pomoćničke (helper) T limfocite.

Osobitost stečene imunosti je i stjecanje memorije, koja omogućuje bržu reakciju nakon ponovnog ulaska istog patogena, zbog nagle proliferacije i ekspanzije specifičnog klona T ili B limfocita. B limfociti, koji su odgovorni za humoralnu imunost sazrijevaju u plazma stanice, koje proizvode antitijela. Integracija imunološkog odgovora, odnosno komunikacija između stanica odgovornih za stečenu imunost, te između stanica prirodene i stečene imunosti vrši se izravnim staničnim kontaktom ili posredstvom različitih kemijskih tvari, koje mogu biti više ili manje specifične za antigen, koji je pokrenuo imunološku reakciju (88).

Prema jednoj od klasifikacija (89) reakcija organizma na stimulacije može se svrstati u dvije kategorije: nespecifičan ili specifičan upalno-imunološki odgovor. Kao reakcija na bilo koji strani materijal (strana tijela, nekrotične stanice, promijenjene proteine) razvija se nespecifičan upalno-imunološki odgovor, koji ovisi o: 1) mehaničkim barijerama, 2) fagocitozi, 3) sustavu komplementa, 4) kininskom sustavu, 5) koagulacijskom sustavu, 6) djelovanju toksičkih tvari i 8) proteinima toplinskog šoka (heat shock proteins-HSP). Nasuprot tome, specifični upalno-imuni odgovor bazirao bi se na djelovanju različitih staničnih produkata koji mogu modulirati upalni i imunološki odgovor. Prema Zellwegeru onaj tip reakcije uključivao bi četiri osnovna područja: 1. limfokine/monokine, 2. slobodne kisikove radikale, 3. metabolite arahidonske kiseline, 4. dušični oksid (89).

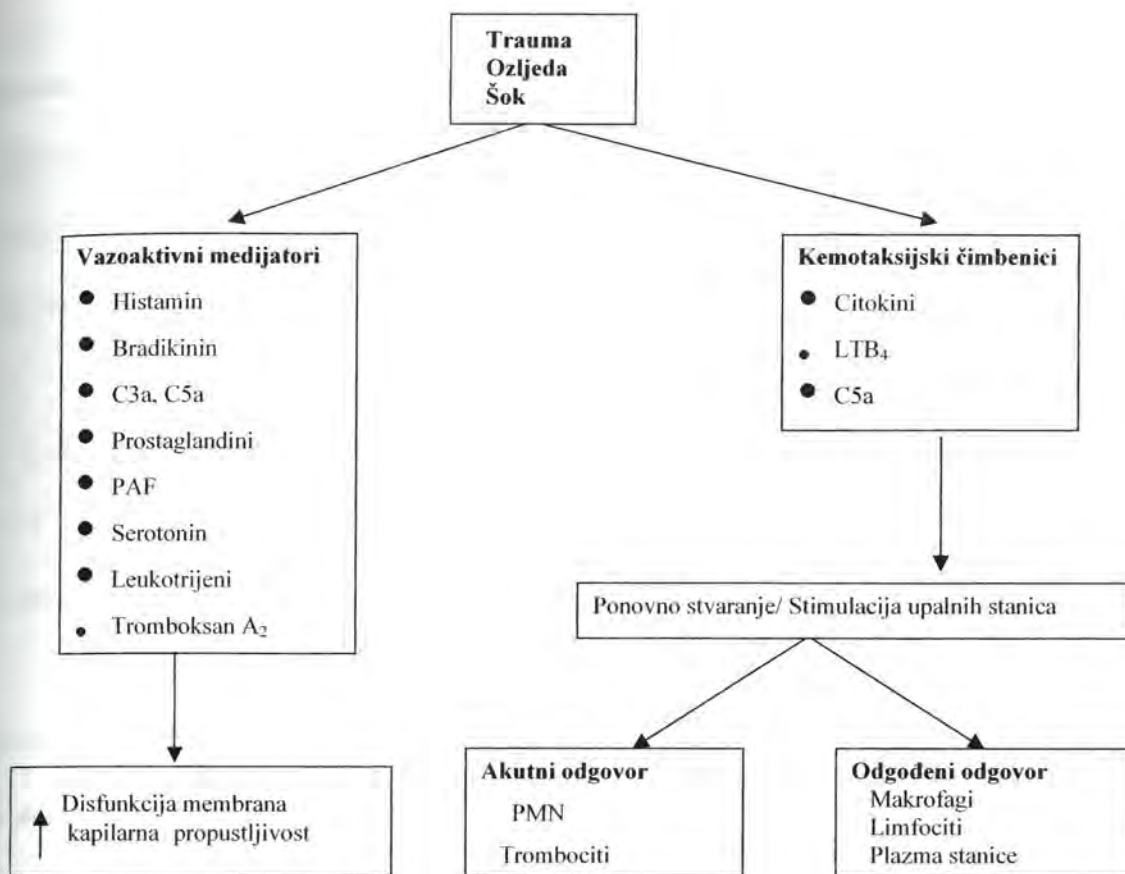
Centralnu ulogu u uključivanju citokina u protuupalni odgovor ima monocitno-makrofagna linija stanica. Makrofazi izlučuju oko sto različitih supstancija. Kao što je već opisano, među njima su najvažniji IL-1, IL-6 i TNF-alfa, koji nakon ozljede dovode do proteolize i lučenja proteina akutne faze u jetri. Ovi monokini imaju i prokoagulantnu aktivnost, što potiče stvaranje mikrotromba nakon ozljede. Ozljede dovode i do znatne disregulacije stvaranja IL-2, koji je glavni citokin T limfocita.

Bazična i klinička ispitivanja u području traume su se usredotočila i na metabolite arahidonske kiseline, naročito na prostaglandine, leukotrijene i tromboksan. Najvažniji metabolit arahidonske kiseline u traumi je PGE<sub>2</sub> koji u glavnini djeluje inhibirajuće na monocite, makrofage, T-helpere i B stanice, što ima važnu regulacijsku ulogu u aktivaciji specifične imunosti. Nakon traume se tako javlja monocitoza i veća produkcija PGE<sub>2</sub>, te supresija funkcije pomoćničkih T-limfocita i defekt u B-staničnom sazrijevanju (90), a opisana je i druga autoregulacijska petlja u kojoj sudjeluju PGE<sub>2</sub>, TNF i cAMP. U njoj TNF stimulira endogenu produkciju PGE<sub>2</sub>, što dovodi do povećanja intracelularnog cAMP. Zbog toga napr. davanje, ciklooksigenaznog inhibitora-ibuprofena (ciklooksigenaza je enzim odgovoran za PGE<sub>2</sub> produkciju), može smanjiti stanje šoka inducirano TNF-om i reducirati mortalitet u bolesnika.

Važan upalni medijator kojeg proizvode različite stanice (makrofazi, endotelne stanice i polimorfonuklearni leukociti, PMN) je i PAF (prema engl. platelet-activating factor). U modelu ishemije PAF je važan u PMN-induciranoj tkivnoj ozljedi. Apliciranje PAF antagonista RO 24-4736 (thianodiazepine) nakon hemoragije, spriječilo je napr. supresiju funkcija slezene. (91).

Slobodne kisikove radikale tijekom obrambenog odgovora domaćina na bakterijsku aktivnost stvaraju leukociti. Imaju baktericidnu aktivnost, ali promjene u regulaciji ovog procesa zbog ishemije ili ozljede mogu rezultirati hiperprodukcijom slobodnih kisikovih radikala s kobnim posljedicama po funkciju organa (92). Rana posljedica ozljede je i aktivacija komplementa, koja aktivira PMN i potiče oslobađanja slobodnih kisikovih radikala. Nastala ozljeda endotela dovodi do trombocitnog i fibrinskog taloženja, mikrocirkularne ishemije, tkivne ozljede, te kasnije do aktivacije komplementa, što sve skupa rezultira nastankom začaranog kruga oštećenja stanica i funkcija organa (92).

Sumarni prikaz mogućih učesnika u akutnoj fazi upale, prikazan je na slici 8.



Slika 8. Stimulacije koje potiču odgovor akutne faze u upali.

U nastavku ću se posebno osvrnuti na neke od stanica, čija bi funkcija mogla biti promijenjena nakon primjene laparoskopske kolecistektomije.

### 1.3.2.1.1. Fagocitno-monocitni sustav

Fagocitne stanice (fagociti) jesu prve ili jedne od prvih stanica što dolaze u dodir sa tuđim tvarima ili mikroorganizmima koji dospiju u organizam. Mehanizmom pinocitoze i fagocitoze, te ubijanjem mikroorganizama i enzimskom razgradnjom upijanih tvari, te stanice uspijevaju odstraniti mnoge uljeze, a da pritom ne mora biti potaknuta specifična (adaptivna) imunost. Ta aktivnost fagocitnih stanica temeljni je mehanizam u nespecifičnoj imunološkoj obrani organizma.

Među fagocitne stanice pripadaju u prvom redu monociti-makrofagi i srodne stanice mononuklearnog fagocitnog sustava, te neutrofilni leukociti i druge stanice polimorfonuklearnoga fagocitnog sustava. Premda se te stanice razlikuju po morfološkim, biološkim i drugim svojstvima, neka od funkcijskih svojstava zajednička su za sve ili većinu fagocitnih stanica.

Sve stanice fagocitno-monocitnog sustava nastaju iz hematopoetske matične stanice u koštanoj srži. U cirkulaciji se pojavljuju kao monociti, a zatim iz krvi odlaze u vezivno tkivo, jetru, slezenu, pluća, limfne čvorove, koštanu srž, serozne šupljine i kost gdje formiraju populaciju slobodnih i fiksnih makrofaga.

Različite i specijalizirane funkcije stanica fagocitno-mononuklearnog sustava uvjetovane su njihovim topografskim smještajem, ali izgleda da svi posjeduju zajedničku osobinu: fagocitiranje stranih čestica i oštećenih ili ostarjelih stanica, te sudjelovanje u imunološkim reakcijama nespecifične imunosti.

Stanice fagocitno-monocitnog sustava adheriraju na površinu stanice, fagocitiraju strani materijal i bakterije, procesiraju antigen i predočuju ga, sudjeluju u IV tipu preosjetljivosti, izlučuju komponente komplemента, te IFN- $\alpha$  i IL-1. Razlikuju se dva tipa makrofaga: migracijski - koji se kreću od tkiva do tkiva i fiksni makrofazi - koji se nazivaju histiociti (93). Tkivni makrofazi najvažnija su komponenta sustava pomoću kojega se iz organizma uklanjaju patogeni mikroorganizmi. Fagocitnu aktivnost reguliraju opsonini na patogenom materijalu i endogeni citokini. Citokine koji djeluju na makrofage proizvode i T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 klonovi limfocita. IFN- $\gamma$  pospješuje aktivaciju makrofaga za ubijanje intrastaničnih parazita i potiče sintezu Ia antigena i Fc- $\gamma$  receptora, a čimbenik koji stimulira proizvodnju granulocitno-makrofagne kolonije (engl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor - GM-CSF) pospješuje proizvodnju i migraciju makrofaga na mjesto imunološke reakcije. Poznato je da i IL-4 aktivira makrofage na ekspresiju Ia i ubijanje u stanicama, ali ipak



mного manje no IFN- $\gamma$  (94). Ključni stanični biljeg na površini makrofaga jest MAC-1<sup>+</sup>, odnosno CR1 i CR3 kao receptori komplementa, a osim njih na površini se nalaze i drugi receptori, npr. receptori za IFN- $\gamma$ , te receptori za Fc fragment IgG i IgE.

#### 1.3.2.1.2. Stanice prirodene imunosti (NK i NKT stanice)

Prirodnoubilačka sposobnost ili aktivnost NK (prema engl. *natural killer activity*) označuje sposobnost limfatičnih stanica iz normalnog (nesenzibiliziranog) organizma da ubiju neke tumorske i nezrele hematopoetske stanice te stanice zaražene virusom. Efektorske stanice ubijaju ciljne stanice bez posredovanja protutijela tj. u izravnom dodiru. Glavnu aktivnost NK obavljaju limfociti 0 (stanice NK), i to pretežno oni koji imaju izgled velikih granuliranih limfocita.

Stanice NK, za razliku od CTL, nemaju specifične (idiotipske) receptore za antigen te pri prepoznavanju i lizi ciljnih stanica ne pokazuju gensku spregnutost (tj. ne prepoznaju tuđe determinante u sklopu antigena MHC). Općenito se smatra da stanice NK prepoznaju neku zajedničku, ugljikohidratnu komponentu na svim ciljnim stanicama. Pretpostavlja se da receptor na NK stanicama sadrži i neke strukture komplementarne ugljikohidratima, a to bi mogle biti molekule LFA-1, laminin B2, molekula CD2 ili receptor za fragment Fc (Fc $\gamma$ III;CD16).

Ligand za CD2 i CD16 na ciljnim stanicama mogla bi biti molekula slična molekuli LFA-3 odnosno "struktura slična imunoglobulinu". Naime, monoklonska protutijela protiv molekula CD2 ili CD16 u mnogim slučajevima obuzdavaju lizu stanicama NK. Slično tome, liza se može obuzdati i protutijelima protiv molekule LFA-1, ali ne i protiv molekula CD3, CD8 ili klonotipskog receptora limfocita na CTL. Prevladava mišljenje da u reakciji između stanica NK i ciljnih stanica sudjeluje više receptora i ciljnih struktura – liganda.

Samo ciljne stanice koje imaju te ugljikohidratne komponente odnosno ligande podložne su lizi stanicama NK. Stoga se među ciljnim stanicama (posebice tumorskim) razlikuju one koje su osjetljive na lizu (NK- senzitivne) od onih koje su neosjetljive (NK- rezistentne).

Pažljiva analiza je, međutim, pokazala da spektar se osjetljivih i neosjetljivih ciljnih stanica razlikuje za pojedine klonove izoliranih stanica NK, što govori za određenu heterogenost tih stanica. Ta heterogenost mogla bi ipak biti posljedica određene varijabilnosti receptora na zrelih stanicama NK, postojanja različitih subpopulacija (ili čak, linija) stanica ili postojanja različitog tipa receptora na različitim razvojnim stadijima jedne te iste vrste stanica.

Što je izraženost molekula razreda I MHC veća na ciljnim stanicama, to je njihova osjetljivost na NK-lizu manja. To je posljedica tzv. receptora KIR na stanicama NK. Mnoge tumorske stanice ili stanice zaražene virusom gube na površini molekule MHC-I, čime one postaju neosjetljive na lizu sa CTL, ali postaju osjetljivije na lizu stanicama NK.

*Aktivacija stanica NK.* Aktivnost NK pojačavaju uglavnom isti agensi koji aktiviraju makrofage, ali ima i onih koji djeluju samo ili pretežno na stanice NK, kao što su interleukin 1 i interleukin 2. Čini se da svi ili većina tih agensa djeluju tako što induciraju sintezu interferona, koji onda aktivira stanice NK. Interferon uglavnom pospješuje prijelaz precitotoksičnih u citotoksične stanice NK, a možda i pojačava aktivnost već postojećih stanica. Limfociti T mogu pospješiti ili potisnuti stvaranje citotoksičnih stanica NK.

Za razliku od djelovanja na CTL, interleukin 2 (IL-2) sam, tj. bez dodataka antigena ili mitogena, može aktivirati stanice NK i uzrokovati njihov daljnji rast i proliferaciju *in vitro*. Stanice aktivirane s IL-2 znatno se razlikuju od neaktivnih stanica; morfološki više nalikuju na T-limfoblaste, razaraju i one ciljne stanice koje su rezistentne na lizu neaktiviranim stanicama, gube biljege limfocita 0 (HNK-1, CR3), a pojačano izražavaju biljege limfocita T

u mirovanju (CD2 i CD8) i neke aktivacijske biljege limfocita T. To, pak, upućuje na određenu srodnost stanica NK s nezrelim limfocitima T, odnosno s tzv. *ubilačkim limfocitima aktiviranim limfokinima*.

Odavno je već poznato da je upravo timus organ koji održava T-staničnu diferencijaciju. Međutim, pronađena je subpopulacija T stanica čija diferencijacija se odvija bez podrške timusa. Te stanice se nazivaju ekstratimične T stanice (95). Glavno mjesto njihove diferencijacije su jetra (96) i tanko crijevo (97, 98, 99, 100), iako su ove stanice pronađene i u maternici (101, 102), crvenoj pulpi slezene, te u žlijezdama s vanjskim lučenjem, npr. u žlijezdama slinovnicama (103), i u suznoj žlijezdi (104). U ovisnosti o mjestu gdje se nalaze, ekstratimične stanice imaju neke zajedničke karakteristike, kao i neka specifična svojstva.

Glavni put T-stanične diferencijacije u timusu potiče konvencionalne T stanice negativnom selekcijom autoreaktivnih zabranjenih klonova. Alternativni intratimički put T-stanične diferencijacije potiče NK1.1<sup>+</sup> subpopulaciju TCR<sup>int</sup> stanica (tj. NKT stanica), kao i NK1.1<sup>-</sup> subpopulaciju TCR<sup>int</sup> stanica. Ovaj alternativni put je možda ostatak T-stanične diferencijacije koja je filogenetski postojala u prvobitnoj drevnoj koži (104). Konvencionalne T stanice koje nastaju u timusu, migriraju u limfne čvorove i u slezenu, naročito u njenu bijelu pulpu. Napuštajući bijelu pulpu slezene timusne NKT stanice odlaze u jetru, kao i u neke druge organe.

Da bi ekstratimične T stanice sačuvale svoje specifične lokalizacije tj. svoja ekstratimična mjesta, neobično su važne adhezijske molekule na njihovoj površini. Ekstratimične T stanice su, naime, CD44<sup>+</sup>, L-selektin<sup>-</sup> i LFA-1<sup>jako+</sup> (prema engl. LFA-1<sup>high</sup>), za razliku od klasičnih T limfocita, koji su CD44<sup>-</sup> L-selektin<sup>+</sup> i LFA-1<sup>slabo+</sup> (prema engl. LFA-1<sup>low</sup>).

NKT stanice imaju, čini se posebnu ulogu u stanjima stresa, suviška glukokortikoida, katekolamina i hipersekrecije upalnih citokina, jer se više stvaraju u situacijama kad je stres izazvao akutnu atrofiju timusa (105, 106). Budući da je utvrđeno da su ovi primitivni T limfociti citokoksični prema singeničnim stanicama, pretpostavljeno je da bi NKT stanice mogle imati zaštitnu ulogu u odstranjivanju abnormalnih autoreaktivnih stanica, koje se oslobadaju za vrijeme stresa.(107).

#### **1.3.2.1.3. Uloga jetre u kontroli imunološkog odgovora**

Jetra ima ključnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu, ali zahvaljujući nekim svojim funkcijama, jedna je od izuzetno važnih komponenata složenog i sveobuhvatnog mehanizma obrane organizma. Poremećaji homeostaze izazvani infekcijom, ozljedom ili tumorskim rastom dovode do otpuštanja citokina i ostalih medijatora upale, a njihova je uloga u imunološkom sustavu poznata i opisana (108). U procesima nespecifične imunosti važnu ulogu imaju neparenhimske stanice jetre koje su sastavni dio fagocitno-monocitnog sustava, a posebno su značajne Kupfferove stanice. U jetri se vrše procesi ekstramedularne hematopoeze, diferencijacija nekih stanica i razgradnja ostarjelih ili oštećenih krvnih stanica. Metaboličke funkcije jetre također su nužne za obranu organizma. Sinteza proteina plazme jedna je od najvažnijih, jer se u hepatocitima za vrijeme imunološke reakcije pod utjecajem citokina i ostalih medijatora upale sintetiziraju proteini akutne faze, koji mogu modificirati upalni odgovor organizma. Istovremeno citokini mogu utjecati i na druge metaboličke funkcije, te se u jetri za vrijeme imunološke reakcije dešavaju brojne metaboličke promjene, koje međutim nisu dovoljno poznate.

Jetra predstavlja složeni organ epiteloidne strukture, koji uspješno obavlja mnogostruke fiziološke, ali i imunološke funkcije, kao što su odstranjenje patogena i antigena iz krvi, sinteza imunoglobulina i komponenti komplementa, te stvaranje i aktivacija

brojnih staničnih elemenata (109). Pritom, patogeni mikroorganizmi, dopremljeni portalnom krvlju moraju biti adekvatno odstranjeni, dok se na većinu dijetalnih antigena, koji pristižu iz gastrointestinalnog trakta portalnom krvlju mora razviti tolerancija. Razna eksperimentalna promatranja pokazuju da jetra doprinosi razvoju i transplantacijske tolerancije na one antigene koji dolaze arterijskom krvlju (110).

Primjena npr. toksičnih doza acetanimofena, ugljičnog tetraklorida, fenobarbitala ili endotoksina u pokusnih će životinja izazvati nakupljanje makrofaga u jetri. Mononuklearni fagociti, hepatičke endotelne stanice i *Ito* stanice aktiviraju se pri tome, te oslobađaju proupalne i citotoksične medijatore kao što su vodikov peroksid, dušični monoksid (NO), bioaktivne lipide, IL-1, čimbenik aktivacije trombocita i TNF- $\alpha$ . Svaki od ovih medijatora ima sposobnost da izazove oštećenje tkiva jetre izravno ili pospješujući upalni odgovor (111), odnosno aktivirani makrofazi luče široki niz biološki aktivnih produkata koji su važni posrednici tkivnog razaranja i fibroze karakteristične za upalu.

Kupfferove stanice u jetri tipični su fiksni makrofazi. Smještene su na luminalnoj površini endotelnih stanica sinusoida jetre, a neposredno ih oplakuje krvna plazma koja se cijedi kroz poroznu endotelnu stijenku. Kupfferove stanice predstavljaju najveću koncentraciju mononuklearnih fagocita u organizmu, ali nisu samo obični fagociti. One proizvode i izlučuju mnoštvo tvari kojima reguliraju funkciju drugih stanica. Djeluju i na stanice imunološkog sustava, a mogu izravno citotoksično djelovati na tumorske stanice i parazite. Porijeklo i citokinetika, a posebno povezanost Kupfferovih stanica s monocitno-makrofagnim sustavom ipak nisu sasvim razjašnjeni. Poznato je da ove stanice imaju sposobnost proliferacije i da nisu konačni oblici. Pokazalo se da pod određenim okolnostima Kupfferove stanice mogu odgovoriti na podražaj mitotičkom aktivnošću. Osim toga, stanice koštane srži mogu pod određenim uvjetima migrirati u jetru i diferencirati se u makrofage (112, 113). Uočeno je da u normalnoj jetri postoje dvije vrste Kupfferovih stanica, koje se

razlikuju po veličini, što upućuje na mogućnost da imaju različite funkcije. Iako im je fagocitna aktivnost, te sinteza prointerleukina-1- $\alpha$  i prointerleukina-1- $\beta$  izazvana lipopolisaharidom (LPS) podjednaka, veće stanice sintetiziraju više C1-inhibitora i apolipoproteina E (114).

*Ito* stanice su perisinusoidalne zvjezdolike stanice koje sadrže masne kapljice, a nalaze se uz endotelne sinusoidalne stanice u Disseovim prostorima. Poznato je da se u njima nalazi skladište vitamina A. Ove stanice su prekursori miofibroblasta, odnosno aktiviraju se u upalnim područjima, gdje gube svoje zalihe retinil-estera, proliferiraju i transdiferenciraju se u stanice koje proizvode osnovne sastojke vanstaničnog matriksa (engl. extracellular matrix - ECM). Tako aktivirane *Ito* stanice jetre nazivamo miofibroblasti (MFB). Aktivacija *Ito* stanica započinje djelovanjem citokina oslobođenih iz Kupfferovih stanica i trombocita. Najznačajniji citokin je čimbenik transformacije rasta- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$  - TGF- $\beta$ ) koji u *Ito* stanicama stimulira ekspresiju gena za molekule ECM-a, inhibira proliferaciju i inducira fenotipsku transdiferencijaciju. U aktivaciji TGF- $\beta$  sudjeluju i endotelne stanice. Kupfferove stanice oslobađaju i TGF- $\alpha$  koji stimulira proliferaciju *Ito* stanica. Ovu proliferaciju također pospješuju i hepatociti, ali oni pri tome ne utječu na proizvodnju ECM. Parakrini signali hepatocita povećavaju se sa stupnjem njihovog oštećenja. Za vrijeme transdiferencijacije MFB pojačano proizvode TGF- $\beta$  i TGF- $\alpha$ , za koje se pretpostavlja da su uključeni u autokrinu stimulaciju MFB i parakrinu aktivaciju onih *Ito* stanica koje se još nisu aktivirale. U postupalnoj fazi, autokrinim mehanizmima iz MFB-a stimulira se prelazak u fibrogenezu, čak i nakon što se primarno oštećenje hepatocita smirilo. Poznavanje ovog mehanizma aktivacije *Ito* stanica neobično je važno za razumijevanje nastanka fibrogeze u jetri (115).

U aktiviranim makrofazima stimuliranim bakterijskim LPS-om, IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  utvrđena je i njihova iNOS aktivnost. U sepsi makrofazi aktivirani endotoksinom proizvode

velike količine NO koji dovodi do vazodilatacijske hipotenzije i hipoperfuzije tkiva, te tako uz ostale posrednike sudjeluje u razvoju septičkog šoka (116).

Tijekom septičkog šoka nastaje rano nakupljanje polimorfonuklearnih leukocita naročito u jetri (za 3 sata), iza koje slijedi nakupljanje mononuklearnih makrofaga (30 sati). Procesu pridonosi ekspresija površinskih adhezijskih molekula u području upale, kao i ekspresija najmanje četiri podskupine integrina, koje su odgovorne za reakcije s komponentama ECM (117). Tijekom upalnih procesa međustaničnom komunikacijom Kupfferove stanice utječu, osim toga, na izlučivanje različitih medijatora upale iz hepatocita. Ispitivanja su pokazala da IL-1 kojega luče Kupfferove stanice regulira i sintezu IL-8 u hepatocitima, koji privlači neutrofile i dovodi do njihova nakupljanja u jetri tijekom njenog oštećenja (118).

Neparenhimske stanice jetre - Kupfferove stanice, epitelne stanice u sinusoidama jetre, Ito stanice i jetri pridruženi limfociti - komuniciraju međusobno i s hepatocitima izravnim kontaktom stanica-stanica ili putem topivih medijatora. Neparenhimske stanice jetre izvor su IL-6, te time sudjeluju u reakciji akutne faze koja ovisi o IL-6. Kupfferove stanice izlučuju IL-10, čime se smanjuje proizvodnja IL-10 i to je vjerojatno način pomoću kojega se postiže smirivanje odgovora akutne faze. Pri tome ipak ostaje nejasan mehanizam prelaska u kroničnu upalu (119).

Neparenhimske stanice jetre imaju važnu ulogu i u antigen-specifičnom imunološkom odgovoru. Kupfferove stanice djeluju kao stanice koje prezentiraju antigen, a limfociti pridruženi jetri sudjeluju u izvršnim funkcijama. Citokini i/ili adhezijske molekule reguliraju lokalnu interakciju hepatocita i neparenhimskih stanica jetre. Npr. Kupfferove stanice oslobađaju TNF- $\alpha$  čime se pospješuje ekspresija MHC-II na hepatocitima, a time i antigen-specifični imunološki odgovor (119).

Utvrđeno je da u sinusoidama jetre štakora postoje i tzv. *pit* stanice - veliki granularni limfociti koji posjeduju prirodno protutumorsko djelovanje. To je heterogena skupina stanica koje se i funkcionalno i fenotipski razlikuju od granularnih limfocita periferne krvi, a pokazuju izuzetnu aktivnost i diferenciranost (120). Jetra je osim toga i glavno mjesto stvaranja već opisanih NKT stanica, koje imaju sposobnost prepoznavanja različitih neproteinskih struktura stanica, veliku citotoksičnost prema vlastitim stanicama i sposobnost reguliranja citokinske produkcije (121).

Većina limfocita i makrofaga slezene imaju sposobnost proizvodnje ACTH, endorfina i enkefalina. Ti hormoni, koji su porijeklom iz leukocita identični su prema brojnim kriterijima hormonima hipofize, posebno po svojoj antigeničnosti, molekulskoj masi i redoslijedu aminokiselina (122).

Zahvaljujući različitim staničnim populacijama, u jetri se odvijaju i različiti mehanizmi nastanka tolerancije. Eksperimenti provedeni *in vitro* pokazali su da se djevičanske T stanice mogu aktivirati pomoću jetrenih sinusoidalnih endotelnih stanica, ali se one pritom ne diferenciraju u efektorske T stanice, a pobudene stanice fenotipski i citokinski odgovaraju stanicama neophodnim za indukciju tolerancije. Ovako aktivirani, djevičanski T limfociti su često CD62L<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T stanice, koje se stvaraju u odsustvu IL-12, što se ne opaža nakon aktivacije makrovaskularnim endotelnim stanicama iz drugih organa (123, 124). Međutim, za razliku od klasičnih APC, jetrene sinusoidne epitelne stanice nemaju sposobnost poticanja diferencijacije unutar Th1 stanica. Aktivirane CD4<sup>+</sup> T stanice, potaknute LSEC-om, na svojoj površini izražavaju IFN $\gamma$ , IL-4 i IL-10, što su karakteristike Th0 fenotipa. Egzogeni citokini (IL-1 $\beta$ , IL-12 ili IL-18), ne mogu tada potaknuti stvaranje Th1 fenotipa.

Međutim, osim sinusoidalnih endotelnih stanica u tim mehanizmima vjerojatno sudjeluju i sve druge stanične populacije u jetri (kao što su dendritičke stanice, Kupfferove stanice, a možda i hepatociti), potičući deleciju T stanica mehanizmom apoptoze.



#### 1.4. Učinak anestezije

Imunosupresija koja nastaje nakon trauma i kirurških zahvata izvršenih u općoj endotrahealnoj ili lokalnoj anesteziji, sekundarnog je karaktera, no iako je ona prolazna pojava, mogla bi imati veliko značenje u postoperativnom tijeku bolesti, prognozi i uspjehu liječenja. Svaka dodatna imunodepresija mogla bi naime uzrokovati daljnje napredovanje infekcije sve do teških oblika postoperativne sepse, otežati cijeljenje rana i čak dovesti do rasapa tumorskih metastaza nakon izvršene operacije (125).

Nastanku ove specifično i nespecifično promijenjene imunološke reaktivnosti u velikoj mjeri pridonose sami anestetici svojim učincima na CNS ili izravnim, toksičnim učincima na nivou samih limfatičnih stanica. Prilikom primjene općih inhalacijskih anestetika izaziva se, naime, reverzibilna paraliza centralnog i perifernog nervnog sustava, a time se mijenja i neuroendokrina homeostaza, koja je odgovorna za održavanje već opisanih aferentnih i eferentnih putova u regulacijskoj petlji, koja djeluje između neuroendokrinog i imunološkog sustava. Budući da se za razmjenu međusobnih informacija koristi velik broj potpuno identičnih signalnih molekula nakon anestezije često nastaju brojni poremećaji (126, 127).

Opća endotrahealna anestezija izazvana halotanom utječe, tako, na dopaminske, serotoninске i kateholaminske živčane puteve i time mijenja aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine, mijenjajući razinu brojnih stresnih hormona (128), a utječe i na inervaciju limfatičkih organa i migracijske putove limfatičkih stanica.. Osim toga inhalacijski anestetici, poput etera i halotana, djeluju i izravno citotoksički na veliki broj stanica koje učestvuju u imunološkoj reakciji, inhibirajući proces fagocitoze (129, 130), motilitet leukocita, proces transformacije i diobe limfocita, kao i citotoksično djelovanje peritonealnih makrofaga na tumorsku stanicu (131). Halotanska anestezija utječe osim toga i na aktivnost NK i K stanica

(132), a uzrokuje i smanjenu sintezu antitijela (133), kao i smanjeno oslobađanje citokina iz aktiviranih limfatičkih stanica.

Na promjene, izazvane anestheticima posebno su osjetljivi oni pacijenti koji već boluju od određenih imunodeficientnih stanja, izazvanih primjerice karcinomom, sepsom, opsežnim opekotinama, jakim psihičkim podražajima itd.

Imunosupresija koja nastaje u operiranih bolesnika može, dakle, biti uzrokovana djelovanjem anestetika, kirurškog stresa ili kombinacijom obiju čimbenika. Budući da je laparoskopna kolecistektomija obično kraća i manje opsežna operacija od klasične kolecistektomije moglo bi se očekivati da i ovaj mehanizam može pridonijeti većoj uspješnosti ove nove metode vađenja žučnih kamenaca.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Trauma i kirurški zahvati dovode do lokalne i sistemske upalne reakcije i do stresa, koji aktivira neuroendokrini sustav (134, 135). Obrambena tkivna upalna reakcija uključuje infiltraciju upalnim stanicama, proizvodnju kisikovih radikala, aktivaciju fagocitnih mehanizama, promjene na žilju, vezivotvornu reakciju, lučenje protu-endotoksinskih molekula i kočenje tkivnih funkcija, a sustavne promjene odnose se na odgovor živčanog sustava, jetrenu sintezu proteina akutne faze, hemodinamsku prilagodbu, tvarne i energijske preinake, te pokretanje upalostatskih procesa. Kinetika, jačina i ishod reakcije, stoga, sumarno ovisi o trima skupinama nutarnjih čimbenika: upalotvornim mehanizmima, upalostatskim mehanizmima i permisivnoj reaktivnosti organizma (136).

Središnju ulogu u pokretanju odgovora akutne faze upale imaju čimbenik nekroze tumora alfa (TNF-alfa), interleukin 1 (IL-1) i IL-6, koje sintetiziraju makrofazi, aktivirani raspalim produktima tkiva, mikroorganizmima i njihovim toksinima. Isti, dugodometni citokini sudjeluju i u pobuđivanju neuroendokrinog stresnog odgovara, koje se očituje u porastu koncentracije stresnih hormona - katekolamina, adrenokortikotropina, kortizola, prolaktina i glukagona, te u snižavanju koncentracije inzulina. Istovremeno citokini pobuđuju i akutnofazni odgovor jetre, koji se očituje u promjenama proteina akutne faze. Pritom, neki proteini djeluju kao plazmini pojačivački upalotvorni sustavi (molekule komplementa, koagulacijski sustav), dok drugi djeluju upalostatski (inhibitori proteinaza), a treći, poput serumskog amiloida A i P, te C-reaktivnog proteina (CRP) imaju istodobno i upalotvorne i upalostatstke učinke. U hepatocitima se istovremeno smanjuje sinteza albumina, transferina i drugih bjelančevina, koji se stoga nazivaju "negativnim proteinima akutne faze". Uz ovu, prema agensu nespecifičnu upalnu reakciju, pokreću se i mehanizmi specifične imunosti, koji pomažu odstranjivanju određenih uzročnika (135). Neposredno nakon traume aktiviraju se, stoga, i mehanizmi citotoksičnosti posredovani aktivacijom NK satnica i T limfocita, a obično nastaje i preusmjeravanje TH1 odgovora prema TH2 odgovoru, čime se potiče humoralna

imunost (137). Svi ovi mehanizmi potiču reakcije negativne povratne sprege, koje služe reparaciji i otklanjanju štetne nokse, no pretjerana proizvodnja proupalnih citokina može, mehanizmima pozitivne sprege, dovesti i do sustavnog zatajenja organizma (135).

S obzirom na to da intenzitet upalne i stresne reakcije ovisi o intenzitetu traume, često se naglašava da manje i kratkotrajnije operacije izazivaju manju upalu i manji postoperativni stres. Tomu obično pridonosi i kraće trajanje opće anestezije, koja sama po sebi također može pridonijeti nastanku postoperativne supresije imunološkog odgovora (138). Stoga, i nedavno uvedena laparoscopska kolecistektomija (LK) ima, čini se, određene prednosti u usporedbi s otvorenom, klasičnom kolecistektomijom (KK). Obje operacije se vrlo često koriste, zbog velike učestalosti kolelitijaze, pa je postoperativna dinamika upalnih i imunoloških zbivanja u ovih bolesnika u novije vrijeme predmet intenzivnog istraživanja. Tako je utvrđeno da su imunološke funkcije, poput testova blastične proliferacije limfocita, NK aktivnosti i HLA-DR ekspresije na monocitima periferne krvi nakon LK manje blokirane u usporedbi sa KK (139), kao i serumske vrijednosti kortizola, IL-6 i CRP (140, 141). Nakon LK nađena su i manja odstupanja u serumskim vrijednostima proteina akutne faze (142), kao i manji porast u koncentracijama noradrenalina (143), ali opisane promjene su često proturječne (144), a pojavljuju se i radovi koji pokazuju da bi laparoscopska kolecistektomija mogla imati i neke negativne posljedice, vezane uz promjene intraabdominalnog tlaka zbog insuflacije CO<sub>2</sub>, uz izravno oštećenje jetrene površine ili uz oštećenje perisinusoidne endotelne aktivnosti (145). Ukazuje se i na moguću blokadu Kupfferovih stanica u jetri (146), ali detaljnije analize još nisu objavljene. U literaturi, osim toga, ima vrlo malo podataka o utjecaju LK i KK na limfocitne subpopulacije i mehanizme citotoksičnosti, a niti jedan podatak o eventualnoj promjeni u dinamici NK stanica i citotoksičkih T limfocita, koje sadrže citolitički enzim perforin.

Cilj ovih istraživanja bio je, stoga usporediti jetrenu reakciju akutnog upalnog odgovora i stanicama posredovanu imunost nakon laparoskopske i klasične (otvorene) kolecistektomije, kako bi utvrdili eventualne razlike vezane uz veličinu i trajanje traume, odnosno uz primjenu pneumoperitoneuma, i uz porast intraabdominalnog tlaka. Istraživanje se obavilo na skupini od 44 bolesnika sa kolelitijazom od kojih je polovica bila podvrgnuta laparoskopskoj kolecistektomiji, a polovica klasičnoj (otvorenoj) laparotomiji. Pratile su se prvenstveno rane postoperativne, sistemske promjene u krvi bolesnika u kojoj se primjenom standardnih hematoloških testova procjenjivala rana upalna reakcija i stanična imunost, analizom E, L, Hb, SE, jetrenih proba (proteini, albumini, CRP, AST, ALT, alkalna fosfataza, bilirubin). Istovremeno se procjenjivao imunološki status bolesnika, analiziranjem koncentracije proupalnih citokina, te određivanjem limfocitnih subpopulacija u krvi. Posebna pažnja se poklonila utvrđivanju sadržaja ukupnog perforina u pojedinim limfocitnim populacijama i njihovom odnosu prema intenzitetu kolestaze i upale u ovih bolesnika. Preoperativne vrijednosti, utvrđene u svih bolesnika sa kolestazom, uspoređene su osim toga i sa imunološkim statusom dobno i spolno podudarne zdrave populacije, kako bi se pridonijelo i rasvjetljavanju problema često opisivane imunosupresije vezane uz mehaničku žuticu (147).

### 3. ISPITANICI I METODE

### 3.1. Ispitanici

U našem smo radu ispitali 44 pacijenata sa žučnim kamencima koji su podvrgnuti kolecistektomiji. Dvadeset i troje je podvrgnuto otvorenoj kolecistektomiji, dok je preostalih 21 podvrgnuto laparoskopskoj kolecistektomiji. Kontrolnu grupu su predstavljala dvadesetorica zdravih dobrovoljnih davaoca krvi. Uzorci periferne venske krvi su uzimani dan prije operacije i ponavljano prvi postoperativni dan. Protočna citometrija je korištena za istovremeno određivanje unutarstaničnog antigena (perforina) i staničnih površinskih antigena na T limfocitima i NK stanicama. Podvrste limfocita su nakon toga uspoređivane po svakom pojedinačnom pacijentu sa količinom ukupnog i direktnog bilirubina, količinom alkalne fosfataze (AP), aspartat (AST) i alanin (ALT) aminotransferaze,  $\gamma$ -glutamil transferaze (GGT), glukoze, uree, kreatinina, kao i s koncentracijom upalnih medijatora, kao što su: tumor nekrotizirajući čimbenik  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), C-reaktivni protein (CRP), kao i sa brojem eritrocita, leukocita i trombocita.

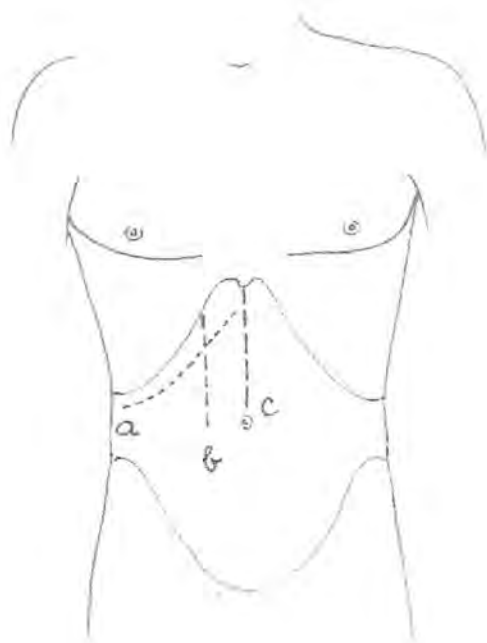
### 3.2. Anestezija

Anestezija izbora kod naših pacijenata je totalna intravenozna balansirana anestezija. Preoperativna sedacija provodi se peroralnom dozom Midazolanom (Dormicum). Indukcija u anesteziju izvodi se kombinacijom opioidnog analgetika Sufentanyl i hipnotika Propofola. Relaksacija se osigurava nedepolarizirajućim (srednje kratkog djelovanja) relaksansom Rocuroniumom (Esmeron). Nakon indukcije, održavanje anestezije uključuje inhalacionu primjenu kombinacije smjese kisika i zraka, Propofol u dripu kontinuirano na perfuzionu pumpu, te bolusnu aplikaciju Sufentanyl i Esmerona. Završetkom operativog zahvata isključuje se Propofol desetak minuta prije zahvata, bolesnik se inhalira kisikom. U slučaju nedovoljne uspostave funkcije poprečnoprugaste muskulature primjenjuje se medikamentozna dekurarizacija (Atropin i Prostigmin).



### 3.3. Kirurške metode

U naših smo pacijenata primijenili, kao što je već navedeno, dvije vrste kolecistektomije: klasičnu i laparoskopsku operaciju. Pri klasičnoj kolecistektomiji veoma česti operativni pristup za žučni mjehur i žučne puteve je desni subkostalni rez po Kocheru (slika 9), koji presijeca čitav desni m. rectus abdominis i medijalne mišićne dijelove vanjskog i unutrašnjeg kosog mišića, te desni poprečni mišić trbuha. Rez ide 2 cm ispod desnog rebranog luka, paralelno s njim u dužini 15 – 18 cm. Omogućuje dobar pregled nad čitavim ekstrahepatičnim bilijarnim stablom, te inspekciju duodenuma, glave pankreasa i hepatoduodenalni ligament. Može se primijeniti i desni transrektalni rez, koji započinje ispod desnog rebranog luka, spuštajući se prema dolje i uzdužno razdvajajući niti mišića rektusa u dužini 10 – 15 cm.



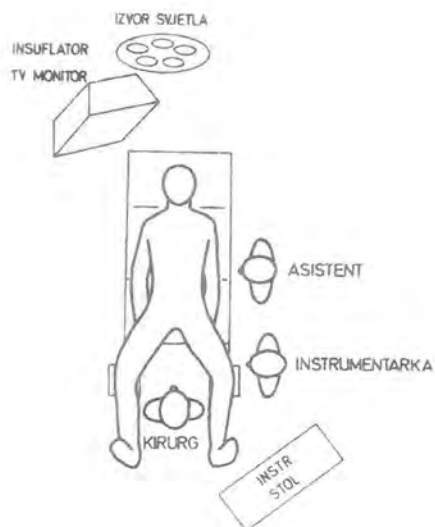
Slika 9. Prikaz mogućih kirurških rezova radi izvođenja kolecistektomije

Akt kolecistektomije može se provesti na dva načina: od fundusa prema vratu žučnog mjehura i cističnom kanalu (anterogradna kolecistektomija), ili od duktusa u smjeru fundusa žučnjaka (retrogradna kolecistektomija). Nema značajnije razlike između ta dva puta, ali se čini da retrogradni put olakšava preparaciju Calotovog trokuta, identifikaciju cistične arterije i istoimenog kanala i njihovo odgovarajuće zbrinjavanje. Nakon što je cistički kanal s istoimenom arterijom ligiran i reseciran, oslobađa se žučnjak iz njegova ležišta u jetri. Operativni zahvat se obično završava kontaktnom drenažom subhepatične regije.

Kod laparoskopske kolecistektomije, kao i kod svake endoskopske operacije, zbog rastezanja trbušne šupljine uzrokovane pneumoperitoneumom nastaju hemodinamske i respiratorne promjene (slika 10). Laparoskopska kolecistektomija bez laparotomije (slika 11) je danas sve češće izvođeni zahvat zbog kratke hospitalizacija i brzog kompletnog oporavka.

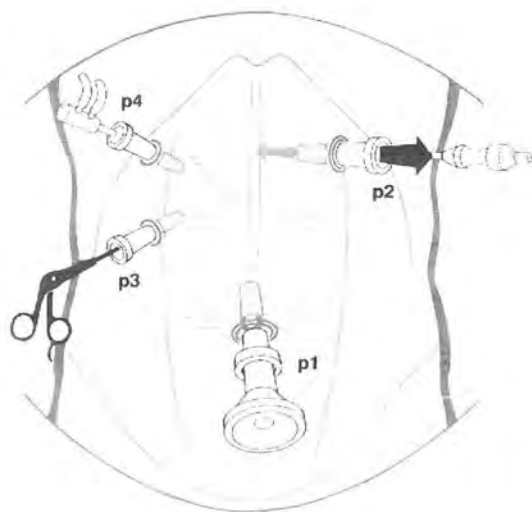
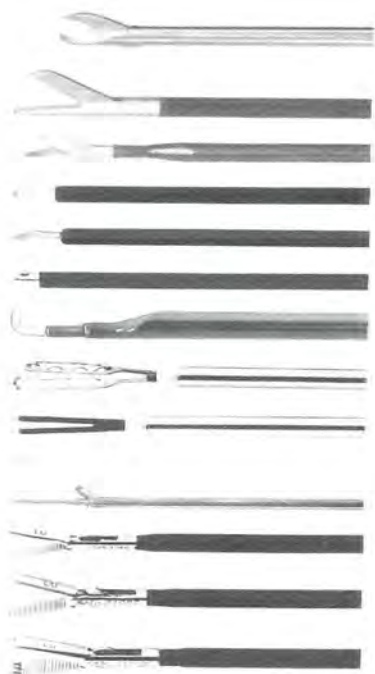


Slika 10. Stup za izvođenje laparoskopske kolecistektomije



Slika 11. Laparoskopski transperijetalni pristup bez laparotomije

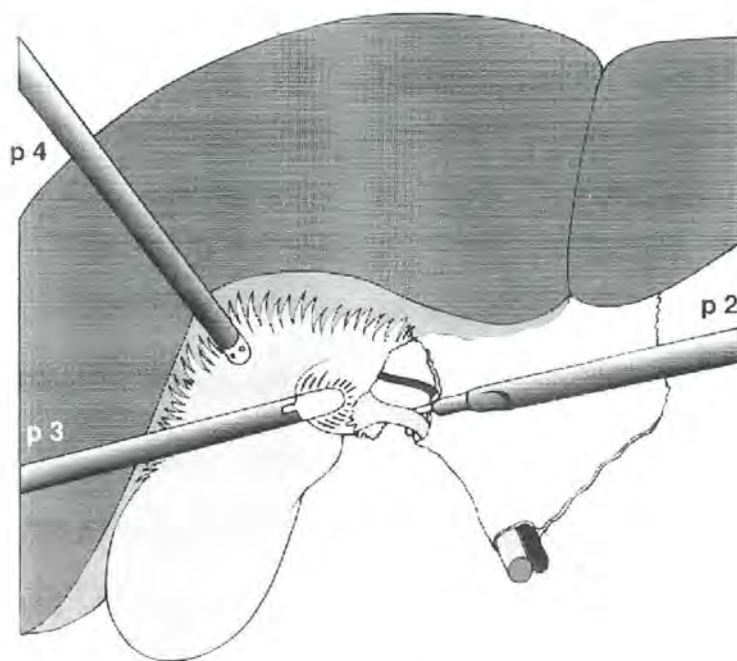
Zahvat se osniva na uvođenju laparoscopa i specijalnog operacijskog instrumentarija (slika 12) u trbušnu šupljinu kroz troakarske punkcijske transperijetalne otvore (slika 13) kojim se pod optičkom kontrolom vrši laparoskopna kolecistektomija.



Slika 13. Troakarski punkcijski otvori

Slika 12. Laparoskopski instrumenti

Insuflacija ugljičnog dioksida u peritonealnu šupljinu do tlaka od 14 mm Hg, omogućuje dobru preglednost operacijskog polja. Nakon insuflacije, na mjestu supraumbilikalne incizije uvodi se 10 ili 12 milimetarski troakar, a kroz njega kamera. Tako je omogućeno pod kontrolom oka eksplorirati abdominalnu šupljinu i postaviti preostala (dva ili tri) radna troakara na tipičnim mjestima i započeti preparaciju struktura (arterija i duktus cystikus) u Calotovom trokutu (slika 14), izluštenje žučnjaka iz hepatalne lože i njegovu ekstrakciju.



Slika 14. Preparacija struktura u Calotovom trokutu

U svrhu prevencije povreda bilijarnog stabla CBD (common bile duct) preporuča se u mnogim studijama upotreba intraoperativne kolangiografije (slika 15), jer se tako dobiva bolji uvid u anatomske odnose navedenih struktura, a metoda izbora pri postoperativnom curenju žuči je endoskopska sfinkterotomija .



Slika 15. Prikaz intraoperativne kotangiografije

### 3.4. Metode za određivanje biokemijskih sastojaka u serumu

Za određivanje rutinskih laboratorijskih nalaza koristili smo vrijednosti krvnih slika dobivenih na elektronskom brojaču Technicom H-1 system, USA. Broj eritrocita, leukocita i trombocita se određuje optičkim principom tamnih boja pomoću lasera. Eritrocitne konstante se dobivaju računski, a za određivanje hemoglobina koristi se hemoglobincijanid metoda. Diferencijalna krvna slika se dobiva kombinacijom lasera i peroksidazne aktivnosti. Glukožu, C-reaktivni protein (CRP), totalni bilirubin, direktni bilirubin, kreatinin, ureju, aspartat aminotransferazu (AST),  $\alpha$ -amilazu,  $\gamma$ -glutamilttransferazu (GGT), alkalnu fosfatazu (ALP), aminotransferazu (ALT) i lipazu smo određivali na automatskom analizatoru Olympus (Olympus, Japan). Određivanje koncentracije elektrolita (natrija i kalija) u serumu izvršeno je također na biokemijskom autoanalizatoru Olympus, metodom na principu ion-selektivnih elektroda (148, 149, 150, 151). Serume za određivanje koncentracije interleukina (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) smo odvojili i čuvali, najviše 2 mjeseca na  $-20^{\circ}\text{C}$ , te ih nakon toga određivali imunoenzimometrijskom metodom komercijalnim reagensom (Diagnostic Products Corporations, Los Angeles, USA).

### **3.5. Metode za procjenu imunološke reakcije**

#### **3.5.1. Analiza fenotipske pripadnosti mononuklearnih limfatičnih stanica metodom protočne citometrije**

Fenotip stanica smo određivali protočnom citometrijom pomoću FACScalibur protočnog citometra ( Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), kojim se može pratiti i analizirati pet različitih staničnih parametara: FSC (parametar veličine stanica), SSC (parametar granuliranosti-gustoće stanica), te valna dužina i intenzitet tri različita emisijska spektra fluorescentnih boja: FL1 (intenzitet zelene fluorescencije), FL2 (intenzitet narančaste fluorescencije), FL3 (intenzitet crvene fluorescencije).

Stanice se pripreme na ledu i pobroje, u svaku probu se stavi  $1 \times 10^6$  stanica/ml i pristupi direktnoj ili indirektnoj metodi obilježavanja. Metoda imunofluorescencije se osniva na konjugaciji protutijela fluorescentnim bojama, čime se dokazuje specifičnost epitopskog vezivanja antigena za protutijelo, te fluorescentna boja koja je potaknuta ultraljubičastom ili laserskom svjetlošću određene valne duljine, počinje emitirati vlastitu svjetlost, kojom se tada antigen dokazuje.

##### **3.5.1.1. Direktna imunofluorescencija**

Imunofenotipizacija ovom metodom podrazumijeva korištenje monoklonskih protutijela za obilježavanje staničnih biljega koja su izravno vezana za fluorescentnu boju. Broj od  $10^6$  stanica je resuspendiran u 50  $\mu$ l hladnog FACS pufera i u suspenziju je dodano 1; 2; 2,5 ili 5  $\mu$ g monoklonskih protutijela direktno ili u otopljenom obliku u istom volumenu. U našem radu koristili smo slijedeća protutijela:

Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ , ispiranjem u FACS mediju smo odstranili suvišak nevezanih protutijela, stanice smo resuspendirali u 1ml FACS medija sa

1 µg/ml propidijum jodida (Serva33671), koji kao fluorescentna boja služi za odvajanje mrtvih stanica na protočnom citometru.

U velikom dijelu pokusa pratila sam zastupljenost dva biljega na stanicama. To se postiže istovremenim dvostrukim bojanjem stanica protutijelima konjugiranim sa različitim fluorescentnim bojama. Osim ovog načina dvostrukog bojanja direktnim bojanjem staničnih biljega, mogu se primijeniti i neke druge detekcijske metode (indirektno bojanje, ili bojanje biotiniziranim protutijelima u sustavu: biotin-avidin-kromogen).

### 3.5.1.2. Indirektna imunofluorescencija

Za ovu indirektnu metodu obilježavanja je karakteristično da primarna protutijela koja su specifična za određeni biljeg nisu vezana za fluorescentnu boju. Kako bi se zabilježila specifična reakcija primarnog protutijela na membrani stanica, nakon trideset minutne inkubacije na +4°C, koristi se sekundarno protutijelo konjugirano sa fluorescentnom bojom, specifično za vrstu i razred primarnog protutijela. Slijedi ponovna inkubacija sa suspenzijom stanica 30 minuta na +4°C. Nakon ispiranja nevezanih protutijela i dodavanja propidij jodida, suspenzija se očitava na protočnom citometru. Tijekom cijele metode pripremanja stanica, treba ih držati na ledu, kako bi se smanjile mogućnosti nespecifičnog bojanja radi gubitka vijabilnosti stanica.

Postotak nespecifičnog vezivanja određivali smo kontrolnom probom, koja se priprema po postupcima bilo direktne ili indirektno imunofluorescencije, a koristi se primarno protutijelo irelevantno za biljege analiziranih stanica. Ono mora, osim specifičnosti vezanja (Fab)<sub>2</sub> fragmenta, imati sve ostale karakteristike kao i protutijelo koje je korišteno za detekciju biljega (iste vrste i izotipa).

### 3.5.2. Određivanje unutarstaničnog sadržaja perforina

Željeli smo ispitati količinu citolitičkog proteina perforina u limfocitima periferne krvi pacijenata dan prije izvedenog zahvata kolecistektomije, kao i prvog poslijeoperativnog dana. Kako je perforin unutarstanični antigen, prije obilježavanja staničnu membranu treba fiksirati i permeabilizirati. Stanična membrana se fiksira 4% otopinom paraformaldehida, koja se dodaje na talog (100 µg) i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice se zatim dva puta isperu u FACS mediju (karakterističan medij za protočni citometar) i pohrane u 100 µl saponinskog pufera radi permeabilizacije stanične membrane. Stanice smo inkubirali 20 minuta, te na talog dodali monoklonska mišja protu-humana protu-perforinska protutijela u dozi od 3 µl po uzorku, razrijeđena u 100 µl saponinskog pufera i dodatno inkubirali 30 minuta na +4°C. Nakon inkubacije, uzorke smo dva puta isprali u saponinskom puferu da bi uklonili nevezana primarna protutijela. Na talog smo dodali sekundarno protutijelo GAM-FITC (prema engl. Goat-Anti-Mouse) obilježeno fluorescein-izo-tio-cijanatom (FITC) u dozi od 1 µg po uzorku, razrijeđeno u 100 µl saponinskog pufera, inkubirali 30 minuta na +4°C i ponovno dva puta isprali u saponinskom puferu. Na talog smo dodali 0,5 ml FACS medija, čija je funkcija zatvaranje stanične membrane permeabilizirane saponinom.

### 3.6. Statističke metode

Statistička obrada podataka je rađena u programu Statistics per Windows, Kernel release 5,5 A (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Slikovni prikazi rezultata su napravljeni u kompjuterskom programu Sigma Plot 2000 for Windows (Jandel Scientific Software, Chicago, IL, USA), te u Excelu.

Pri izračunavanju razlika između pojedinih eksperimentalnih grupa, koristili smo se Mann-Whitney U-testom, karakterističnim za male zavisne uzorke.



Za neparametrijske nezavisne uzorke koristili smo Kruskal-Walis-ov ANOVA, median test uz, po uputama, izračunate statističke značajnosti. Za statistički značajnu razliku između različitih eksperimentalnih grupa, računali smo razinu značajnosti od  $p < 0,05$ . Međusobni odnosi pojedinih varijabli procjenjivani su izračunavanjem linearnih pravaca regresije i analizom kovariance.

## 4. REZULTATI

#### 4.1. Učestalost i uspješnost laparoskopskih kolecistektomija na Kirurškoj klinici KBC Rijeka

Prva laparoskopska kolecistektomija (LP) izvršena je na kirurškoj klinici KBC Rijeka 17. prosinca 1993. Od tada pa do 31. prosinca 2002.g. izvršeno je više od 5000 takvih zahvata s vrlo malim postotkom intra i postoperacijskih komplikacija. Mortalitet je iznosio 0.02%, a od komplikacija najčešća je bila perforacija žučnjaka (Tabl.3. i 4).

Tablica 3. Učestalost i uspješnost lap. kolecistektomije na Kirurškoj klinici KBC Rijeka

	<i>Broj operacija</i>	<i>Postotak</i>
<i>Laparoskopska kolecistektomija</i>	5443	100
<i>Konverzija (laparotomija)</i>	122	2,24
<i>Mortalitet</i>	1	0,02
<i>Reoperacija</i>	13	0,23

Tablica 4. Intra i postoperativne komplikacije nakon lap. kolecistektomija na Kirurškoj klinici KBC Rijeka

	<i>Broj</i>	<i>Postotak</i>	
<i>Intraoperativne komplikacije</i>	Perforacija žučnjaka	690	12,68
	Krvarenje	302	5,55
	Gubitak kamenca	283	5,20
	Povrede jetre	16	0,29
	Povrede žučnih vodova	13	0,24
<i>Postoperativne komplikacije</i>	Krvarenje	38	0,70
	Istjecanje žuči	30	0,55
	Subhepatične kolekcije	5	0,09
	Sekundarne infekcije rane	8	0,14

#### 4.2. Usporedba kliničkih čimbenika u grupama bolesnika, podvrgnutih klasičnoj, odnosno laparoskopskoj kolecistektomiji

U radu je analizirano ukupno 44 bolesnika, koji su zbog žučnih kamenaca, bili operirani na Klinici za kirurgiju u Rijeci, u razdoblju od 2 godine. Od toga je 21 bolesnik bio operiran klasičnim putem, uz otvaranje abdomena, a 23 ih je operirano laparoskopskim putem. Prema dobi i spolu, grupe su imale ujednačeni sastav. Vrijeme anestezije i trajanja operacije je, međutim, bilo značajno kraće u grupi bolesnika, podvrgnutoj laparoskopskoj operaciji (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba kliničkih čimbenika u grupama bolesnika, podvrgnutih klasičnoj, odnosno laparoskopskoj kolecistektomiji

	<i>Laparoskopska kolecistektomija</i>	<i>p</i>	<i>Klasična kolecistektomija</i>
<i>Broj ispitanika</i>	23	-	21
<i>Omjer spolova (žene: muškarci)</i>	13:10	-	13:8
<i>Starost</i>	61,8 (31-85)	0,23	55,5 (28-82)
<i>Trajanje anestezije (min)</i>	90 (74-130)	0,38	120 (90-150)
<i>Trajanje operacije (min)</i>	65 (35-120)	0,45	90 (40-150)

#### 4.3. Usporedbe hematoloških, biokemijskih i imunoloških nalaza nakon klasične i laparoskopske kolecistektomije

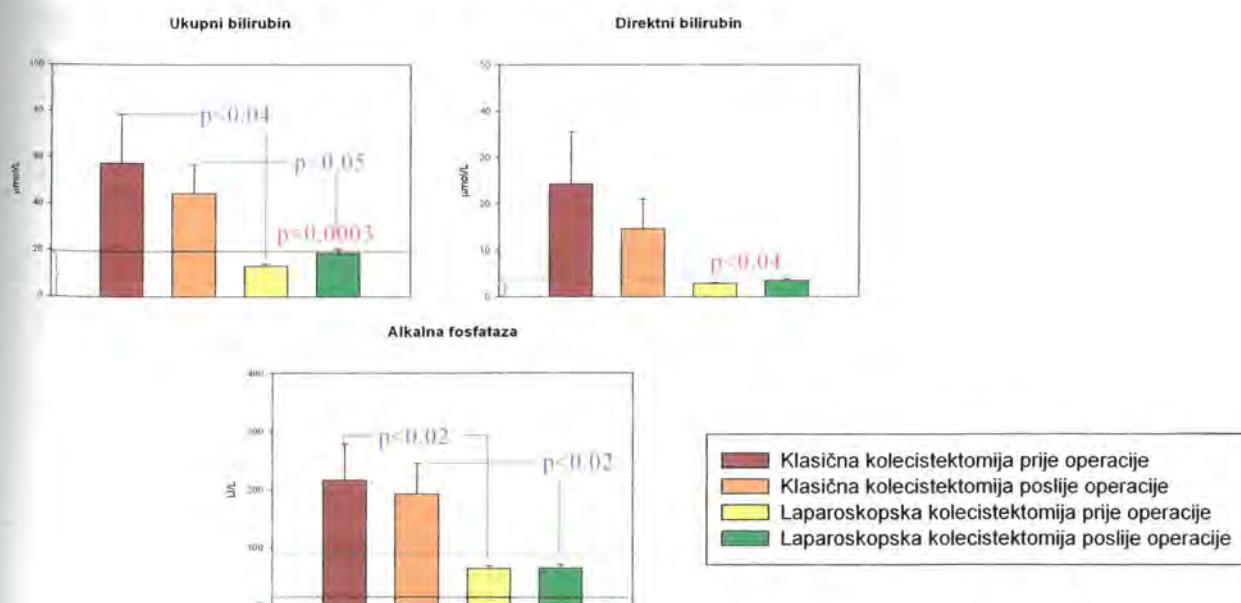
U svakog bolesnika krv se uzimala prije operacije, te 24 sata nakon operacije, a vrijednosti su uspoređivane sa nalazima, dobivenima u grupi zdravih ljudi. Sindrom kolestaze i jetrena reakcija akutne faze procjenjivani su na osnovu koncentracija bilirubina, C reaktivnog proteina i pro-upalnih citokina (IL-6 i TNF alfa), te promjena u aktivnosti alkalne fosfataze i aminotransferaza. Istovremeno su u krvi bolesnika praćeni i ostali metaboliti

(glukoza, urea i kreatinin) i elektroliti (natrij i kalij). Od standardnih hematoloških parametara praćeni su eritrociti, leukociti i trombociti, te hemoglobin, hematokrit i diferencijalna krvna slika, a imunološki status se procjenjivao na osnovu fenotipskog određivanja T limfocitnih subpopulacija ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  stanice), B limfocita ( $CD19^+$  stanice) i NK stanica ( $CD16^+$  i  $CD56^+$  stanice), te njihovog sadržaja perforina.

### 4.3.1. Metaboličke promjene u serumu

#### 4.3.1.1. Bilirubin u serumu

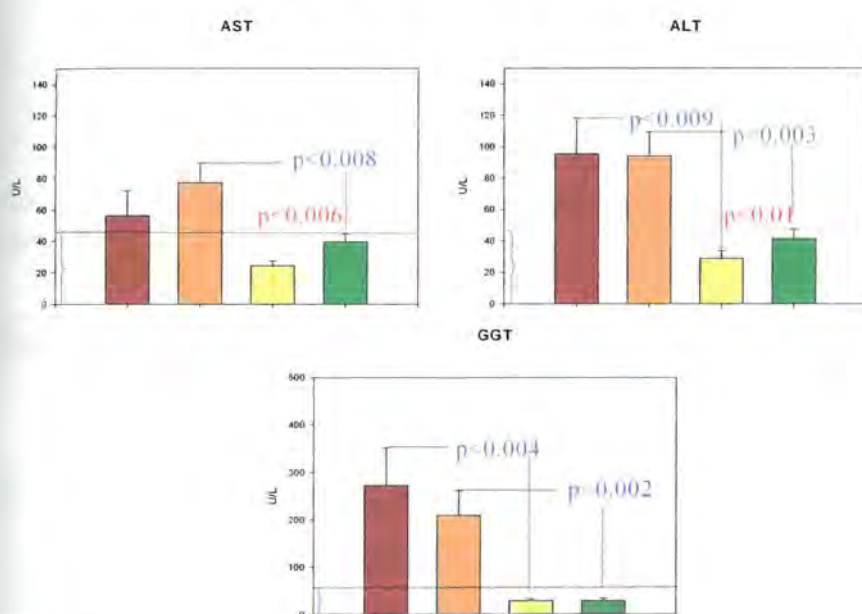
U svih bolesnika koji su upućeni na operaciju zbog žučnih kamenaca utvrđen je sindrom kolestaze (Slike 16-18). No analiza preoperativnih vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina, te alkalne fosfataze pokazala je da je težina bolesti utjecala i na izbor operacije, jer su bolesnici sa većim stupnjem kolestaze bili podvrgnuti uglavnom klasičnoj kolecistektomiji (Slika 16). U ovih bolesnika je nakon klasične operacije opaženo izvjesno smanjenje koncentracije bilirubina, no dobivene vrijednosti nisu bile statistički značajne. Nasuprot tome, nakon laparoscopske operacije došlo je do značajnog porasta koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina ( $p < 0.0003$  i  $p < 0.04$ ).



Slika 16. Promjene u serumskim koncentracijama bilirubina i alkalne fosfataze

#### 4.3.1.2. Serumski enzimi

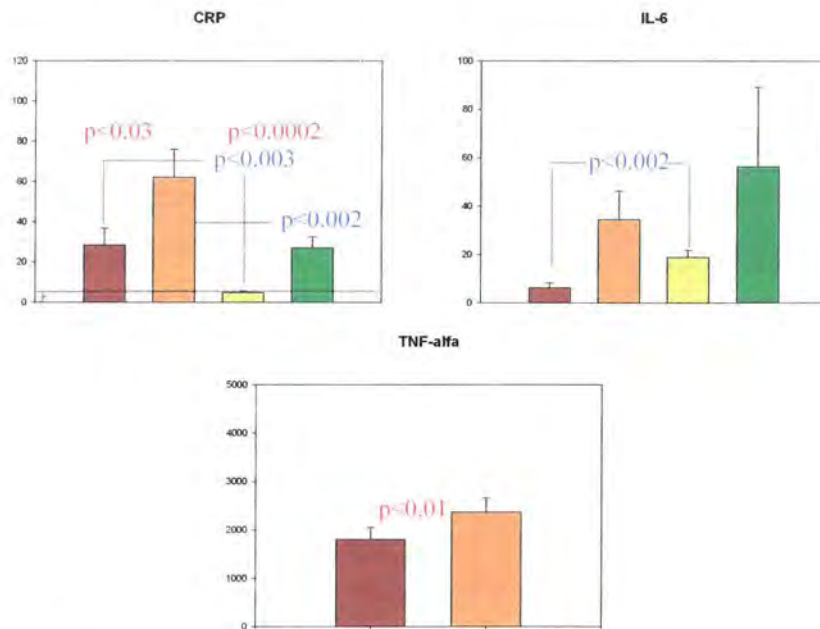
Veći stupanj preoperativne kolestaze u bolesnika podvrgnutih klasičnoj operaciji potvrđen je i analiziranjem aktivnosti aminotferaza (AST i ALT) i serumske gama-glutamyl-transferaze (Slika 17). Njihove vrijednosti su u ovoj grupi bile značajno veće od onih u grupi bolesnika izabranih za laparoskopsku operaciju. U ranoj fazi nakon klasične operacije koncentracija ovih enzima nije se promijenila, dok je nakon LK i ovdje došlo do laganog porasta aktivnosti AST i ALT ( $p < 0.006$  i  $p < 0.01$ ).



Slika 17. Promjene u serumskim koncentracijama aminotferaza i gama glutamil-transferaze

#### 4.3.1.3. C-reaktivni protein u serumu

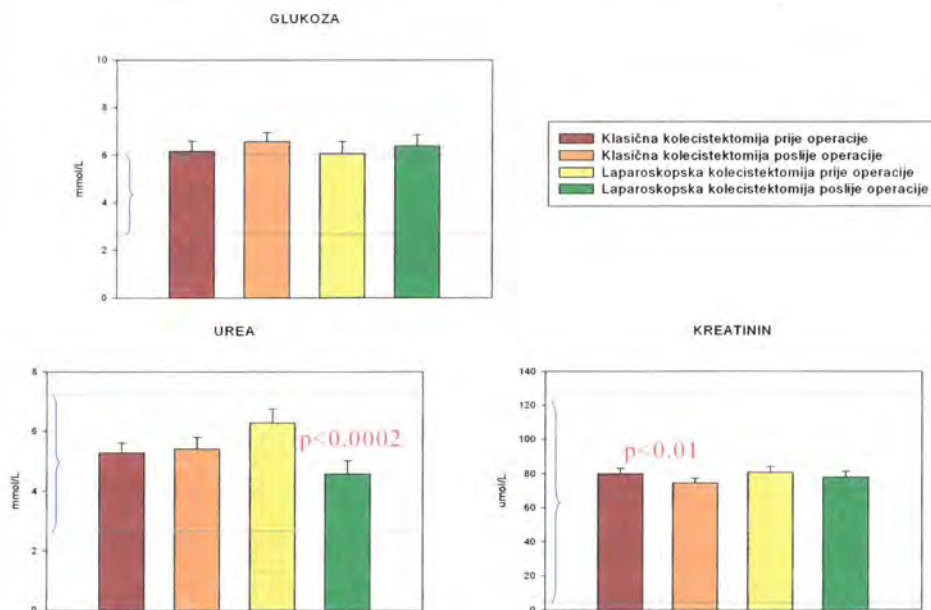
Preoperativne vrijednosti CRP bile su značajno veće u grupi bolesnika podvrgnutih klasičnoj laparotomiji, a IL-6 u grupi bolesnika izabranih za laparoskopsku operaciju. No, međutim, u obje grupe ispitanika, nakon operacije, dodatno je porasla koncentracija CRP u serumu (Slika 18;  $p < 0.03$  i  $p > 0.0002$ ). U bolesnika, podvrgnutih klasičnoj operaciji, primijećeno je i povećanje koncentracije TNF alfa nakon operacije ( $p < 0.01$ ).



Slika 18. Promjene u serumskim koncentracijama C-reaktivnog proteina i pro-upalnih citokina

#### 4.3.1.4. Glukoza, urea i kreatinin u krvi

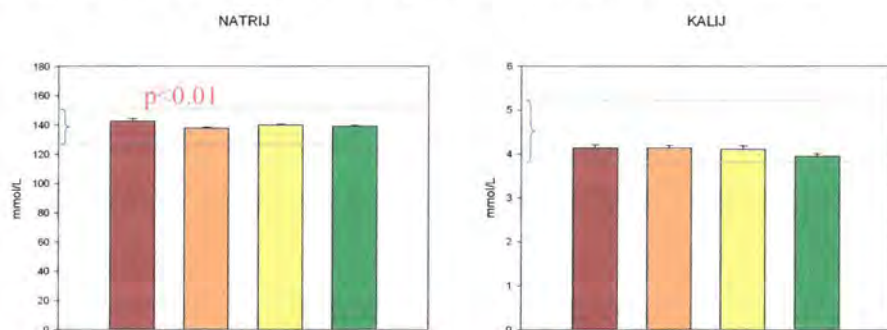
Vrijednosti glukoze, ureje i kreatinina bili su u obje grupe bolesnika unutar normalnih granica (Slika 19). Primijećeno je, međutim, da LK značajno smanjuje postoperativne vrijednosti ureje ( $p < 0.0002$ ), a KK postoperativne vrijednosti kreatinina ( $p < 0.01$ ).



Slika 19. Promjene u koncentracijama glukoze, ureje i kreatinina

### 4.3.1.5. Elektroliti u krvi

Iako vrijednosti  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u bolesnika nisu odstupale od normale, nakon KK opaženo je značajno smanjivanje koncentracije  $\text{Na}^+$  u krvi (Slika 20;  $p < 0.01$ ).

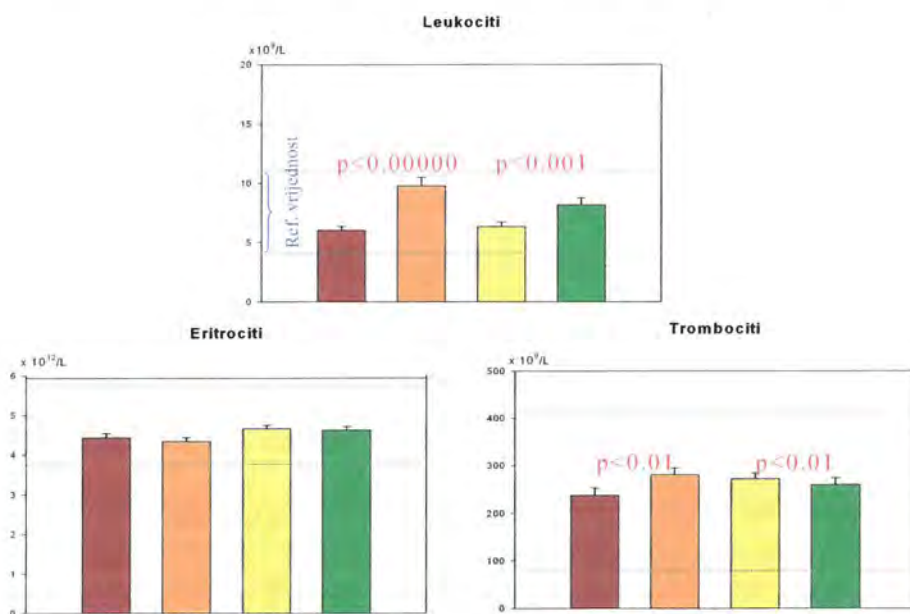


Slika 20. Promjene u serumskim koncentracijama natrija i kalija

### 4.3.2. Hematološke promjene

#### 4.3.2.1. Leukociti, eritrociti i trombociti

Nakon obih operacija primijećena je postoperativna leukocitoza ( $p < 0.0000$ ,  $p < 0.001$ ), iako su obje vrijednosti bile unutar referentnih vrijednosti. Broj eritrocita nije se značajnije mijenjao, a nešto veća trombocitoza primijećena je nakon KK (Slika 21).

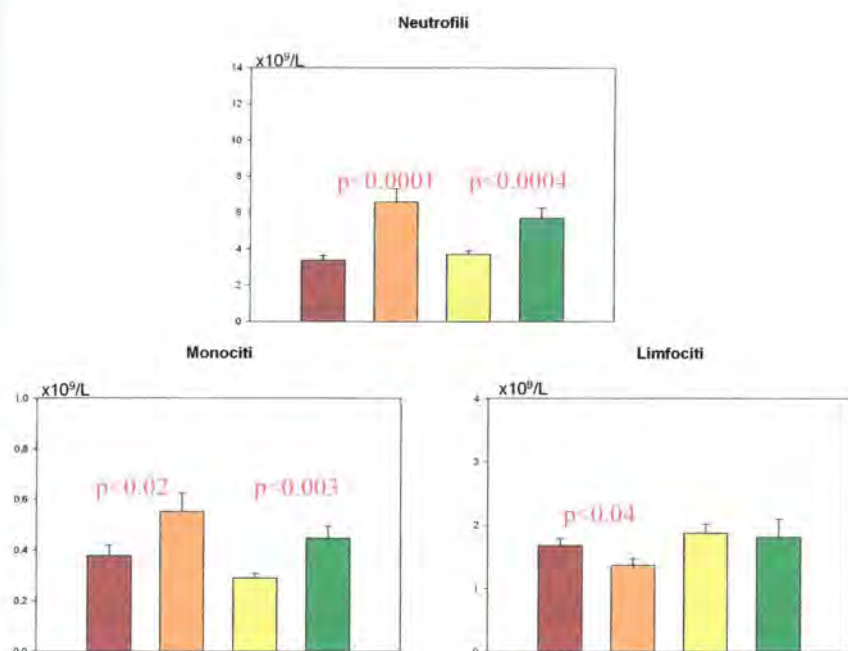


Slika 21. Usporedba broja eritrocita, leukocita i trombocita prije i poslije dviju vrsta operacija



### 4.3.2.2. Diferencijalna krvna slika

Nakon obje vrste operacija došlo je do porasta broja neutrofila i monocita, dok se broj limfocita značajno smanjio samo nakon klasične kolecistektomije (Slika 22).



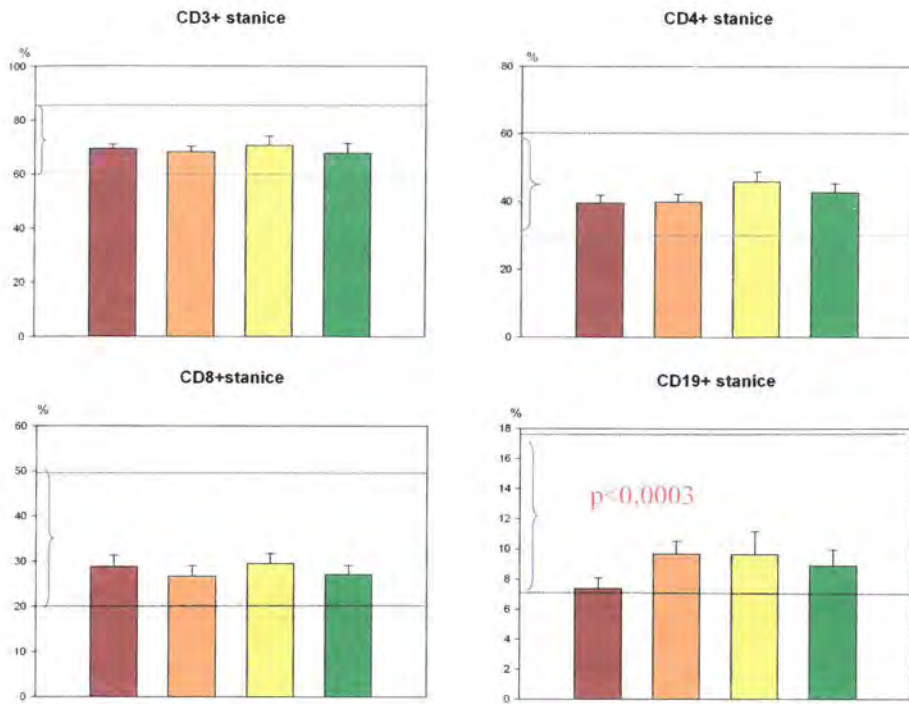
Slika 22. Diferencijalna krvna slika prije i nakon različitih vrsta kolecistektomija

### 4.3.2.3. T i B limfocitne subpopulacije

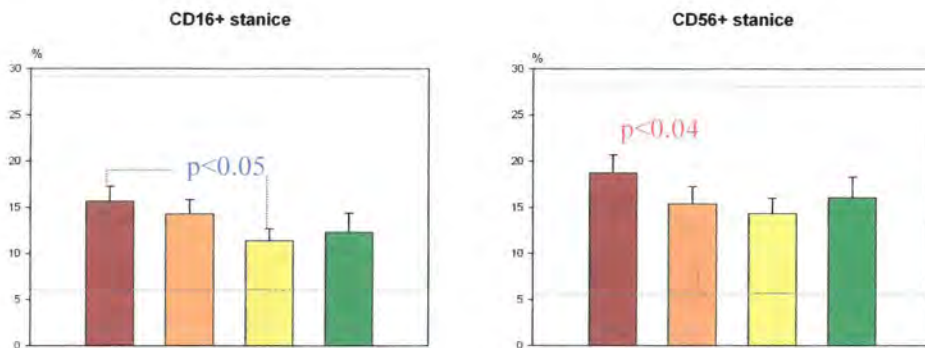
Fenotipska analiza mononuklearnih stanica u perifernoj krvi bolesnika pokazala je da u ranom postoperativnom periodu nema promjena u proporciji  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T limfocita ovisnih o vrsti operacije. No, nakon KK utvrđen je značajan porast postotka B limfocita, odnosno  $CD19^+$  stanica (Slika 11;  $p < 0.0003$ ).

### 4.3.2.4. Subpopulacija NK stanica

U bolesnika podvrgnutih KK nakon operacije značajno se smanjio postotak  $CD56^+$  stanica, (Slika 23;  $p < 0.05$ ). No, u grupi bolesnika, izabranih za KK, primijetili smo značajno više preoperative vrijednosti  $CD56^+$  i  $CD16^+$  NK stanica.



Slika 23. Limfocitne subpopulacije u perifernoj krvi prije i nakon kolecistektomija



Slika 24. NK stanice u perifernoj krvi prije i nakon kolecistektomija

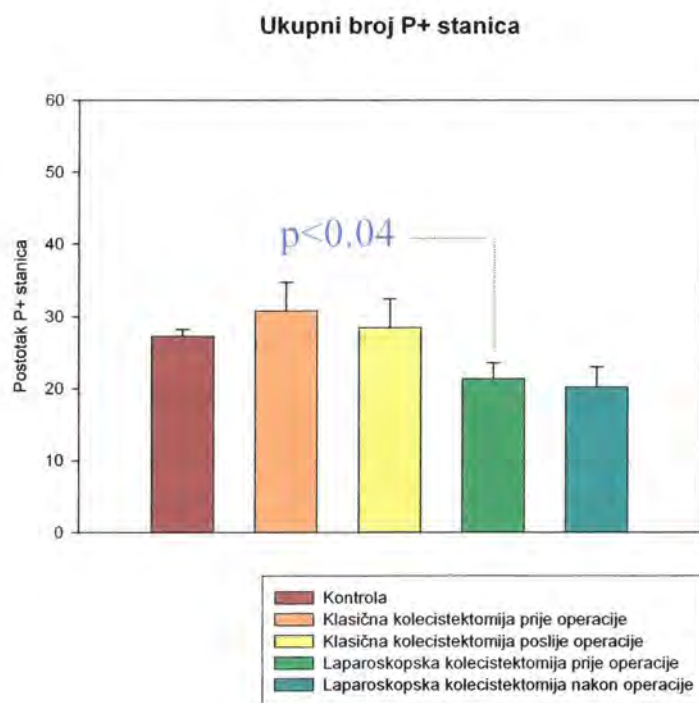
#### 4.3.2.5. Perforin+ stanice

U daljnjim analizama utvrđivali smo u perifernoj krvi bolesnika prisustvo stanica, koje u sebi sadrže citolitički protein-perforin (P). Rezultate smo izražavali kao ukupan broj  $P^+$  stanica, te kao broj  $P^+$  stanica, unutar pojedinih subpopulacija T limfocita ( $CD3^+P^+$  stanice,  $CD4^+P^+$  stanice i  $CD8^+P^+$  stanice) i NK stanica ( $CD16^+P^+$  stanice i  $CD56^+P^+$  stanice). Osim toga, izračunavali smo i udio perforin+ stanica unutar neke subpopulacije stanica, izražene

kao 100% vrijednost (primjerice % P+ stanica unutar CD4<sup>+</sup> populacije stanica), te prosječan sadržaj perforina u svim subpopulacijama (izražen kao prosječan intenzitet fluorescencije, odnosno AFI).

#### 4.3.2.5.1. Ukupan broj perforin+ stanica

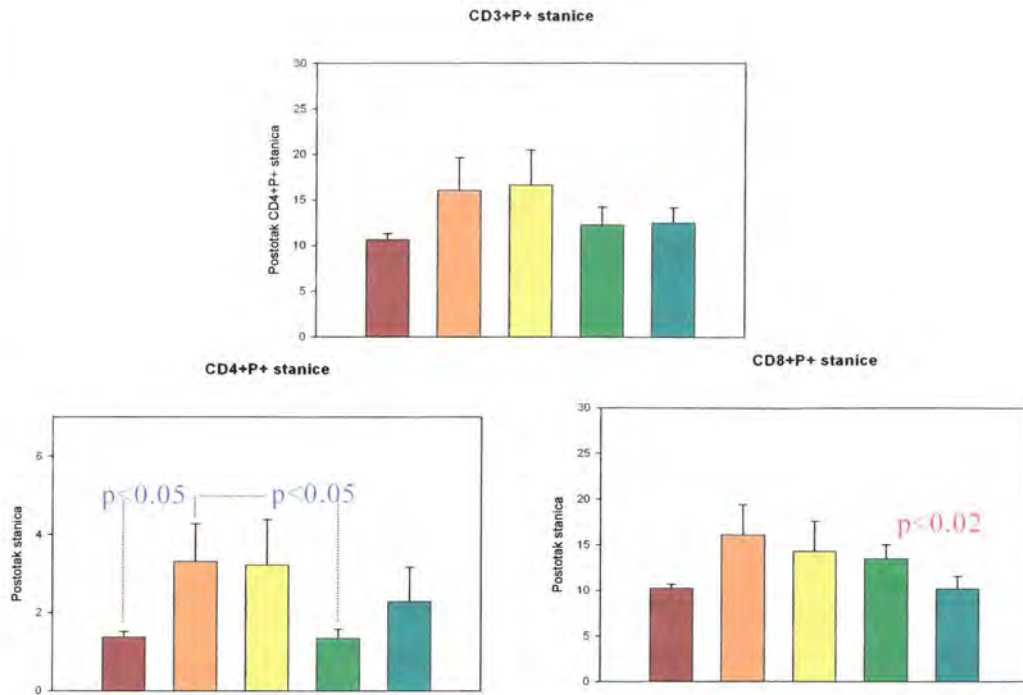
Rezultati su pokazali da nakon obje vrste operacija nema značajnih promjena u ukupnom broju P+ stanica. No, utvrdili smo da su preoperativne vrijednosti za broj P+ stanica u grupi bolesnika upućenim na klasičnu kolecistektomiju bile značajno više, negoli u drugoj grupi bolesnika (Slika 25;  $p < 0.04$ ).



Slika 25. Ukupan broj perforin+ (P) stanica u perifernoj krvi izražen u postotku

#### 4.3 2.5.2. Perforin+ T limfociti

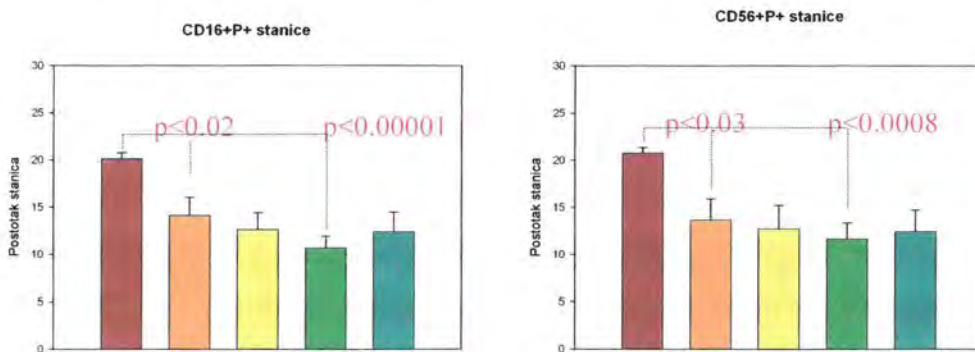
Rezultati su, osim toga, pokazali da grupa bolesnika upućenih na KK i preoperativno ima više CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> subpopulacije stanica, te da se samo nakon laparoskopske operacije smanjuje postotak CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica (Slika 26;  $p < 0.02$ ).



Slika 26. Perforin+ T limfociti

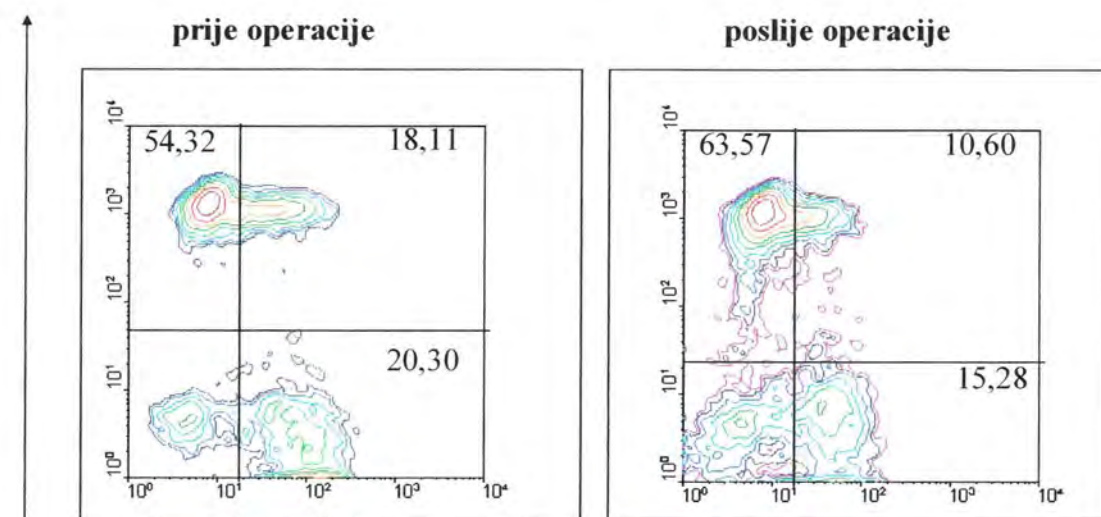
#### 4.3.2.5.3. Perforin+ NK stanice

Određivanje broja P<sup>+</sup> stanica u populaciji NK stanica je pokazalo da obje operacije ne mijenjaju broj P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> i P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica. No, utvrđeno je da su preoperativne vrijednosti ovih stanica značajno manje od kontrolnih vrijednosti, u obje grupe bolesnika, vjerojatno zbog postojeće kolestaze (Slika 27). Slijedeće slike (Slike 28-32) prikazuju primjere navedenih vrijednosti po jednom pacijentu.



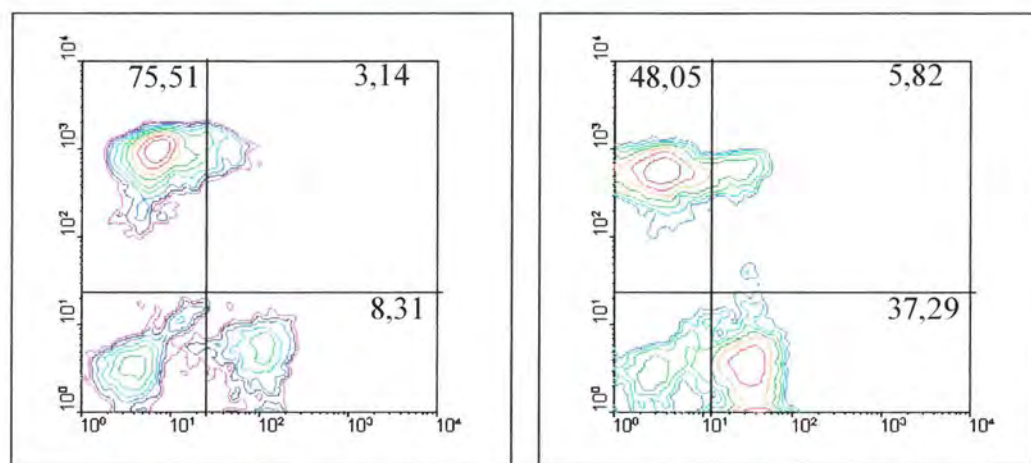
Slika 27. Perforin+ NK stanice

## LAPAROSKOPSKA OPERACIJA



CD3

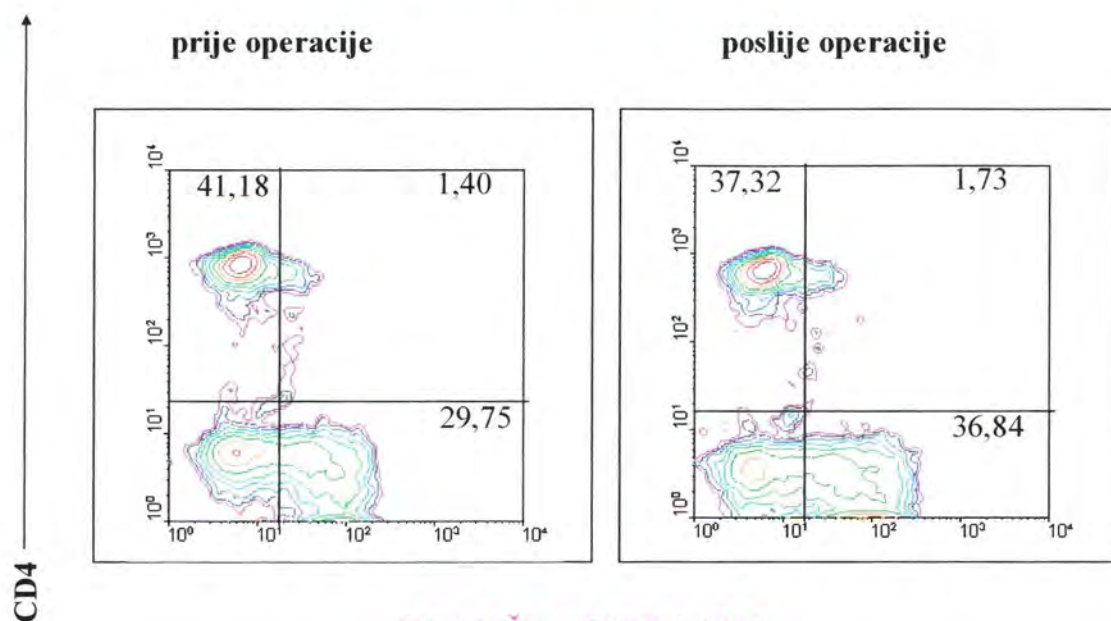
## KLASIČNA OPERACIJA



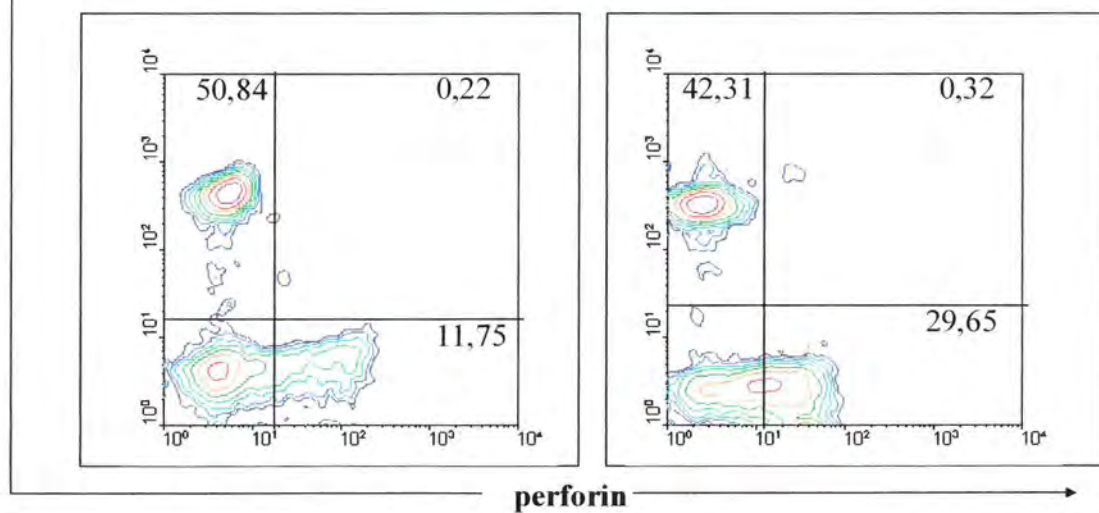
perforin →

Slika 28: Postotak dvostruko pozitivnih (perforin+ CD3+) stanica u limfocitima periferne krvi pacijenata prije i poslije laparoskopske i klasične kolecistektomije

## LAPAROSKOPSKA OPERACIJA

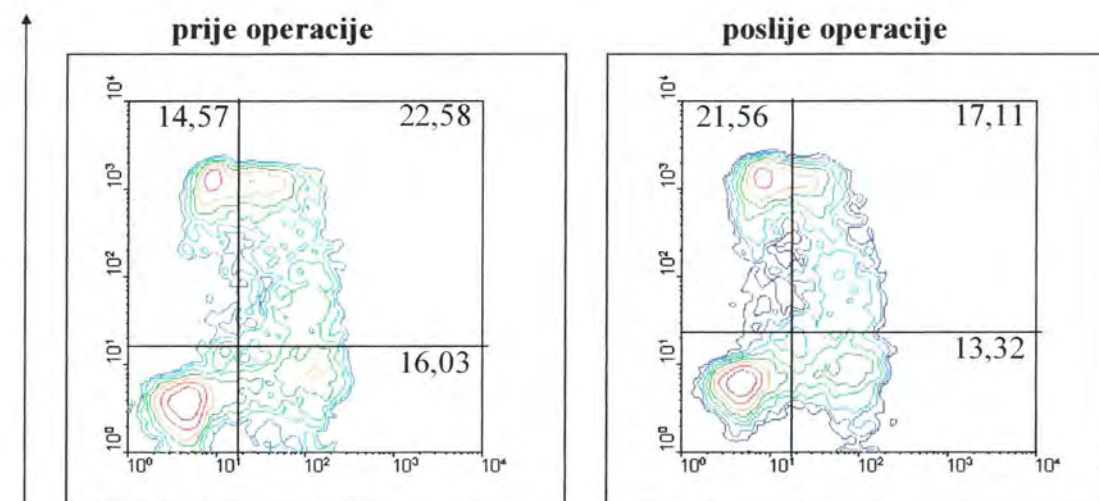


## KLASIČNA OPERACIJA

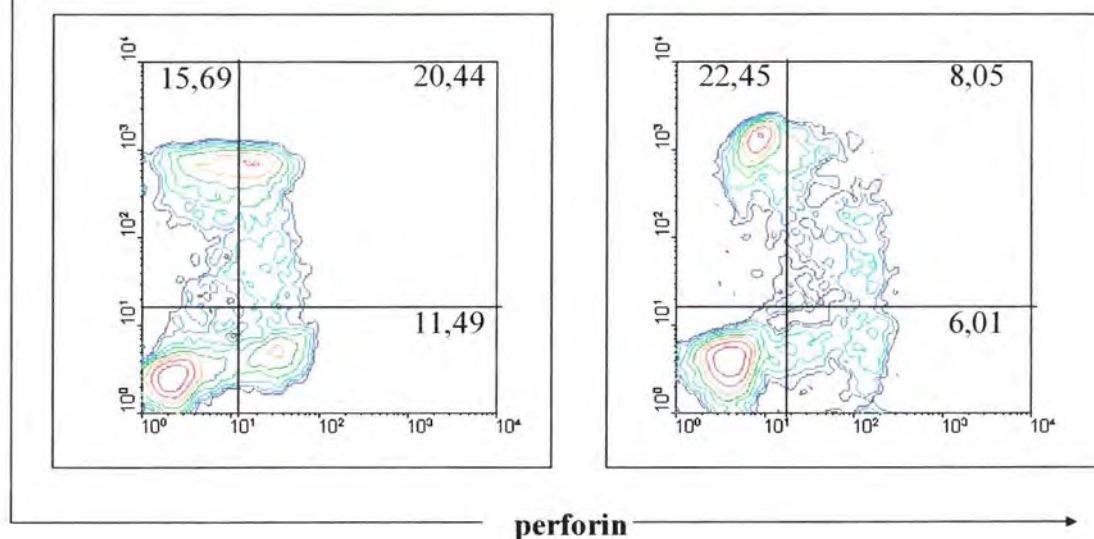


Slika 29: Postotak dvostruko pozitivnih (perforin+ CD4+) stanica u limfocitima periferne krvi pacijenata prije i poslije laparoskopske i klasične kolecistektomije

## LAPAROSKOPSKA OPERACIJA

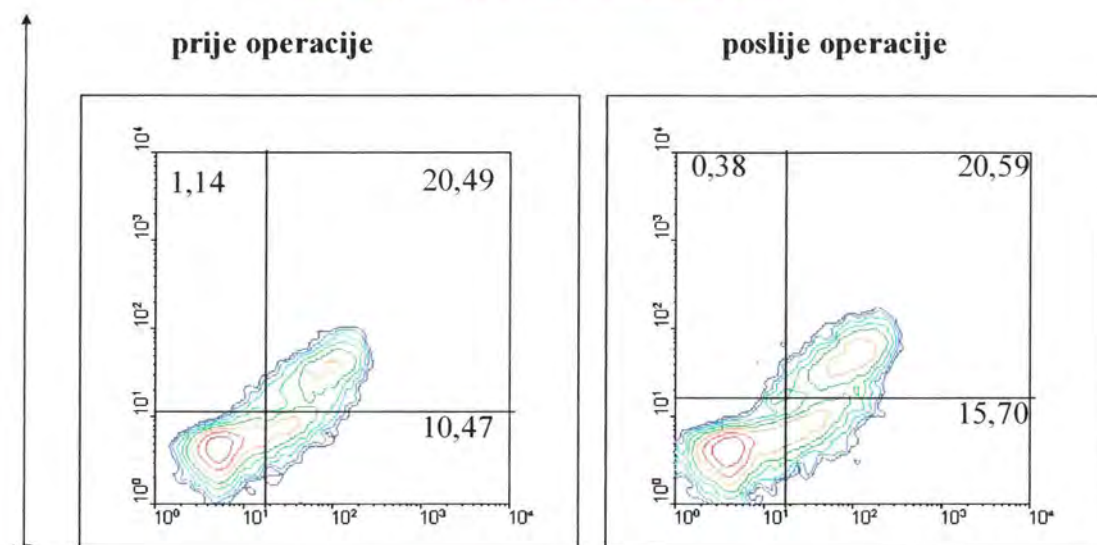


## KLASIČNA OPERACIJA

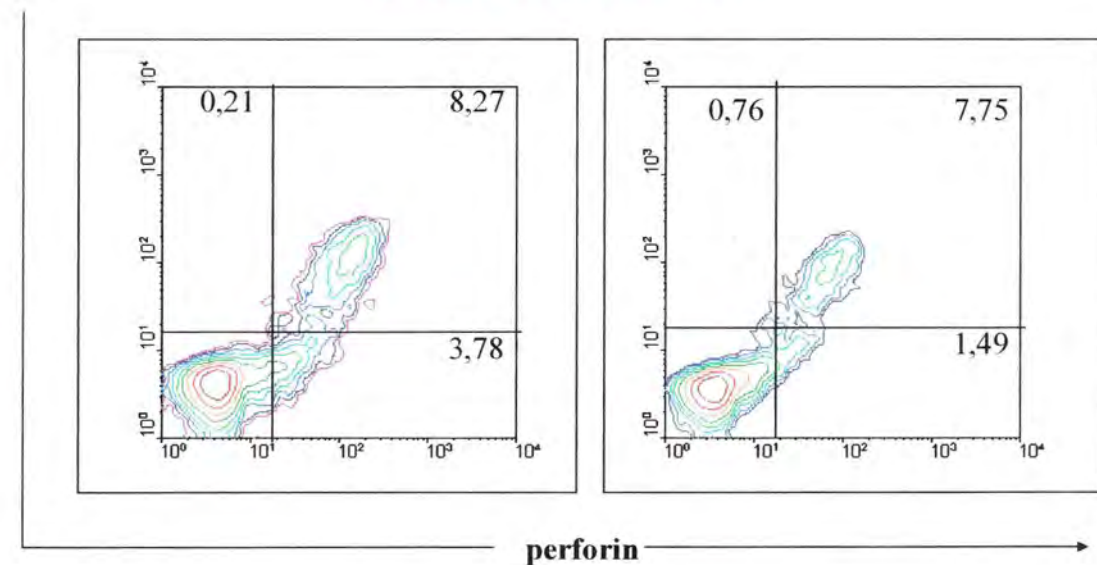


Slika 30: Postotak dvostruko pozitivnih (perforin+ CD8+) stanica u limfocitima periferne krvi pacijenata prije i poslije laparoskopske i klasične kolecistektomije

## LAPAROSKOPSKA OPERACIJA



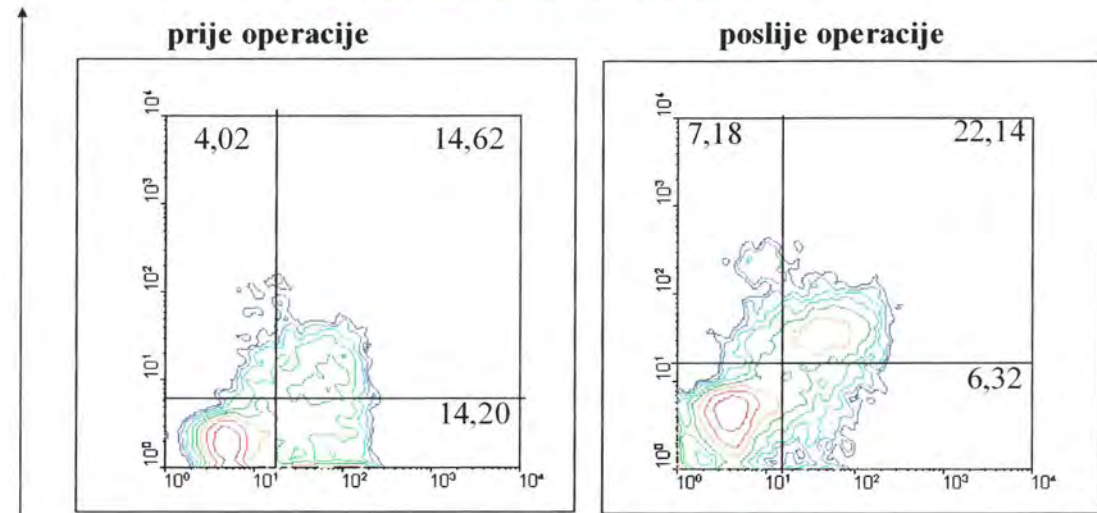
## KLASIČNA OPERACIJA



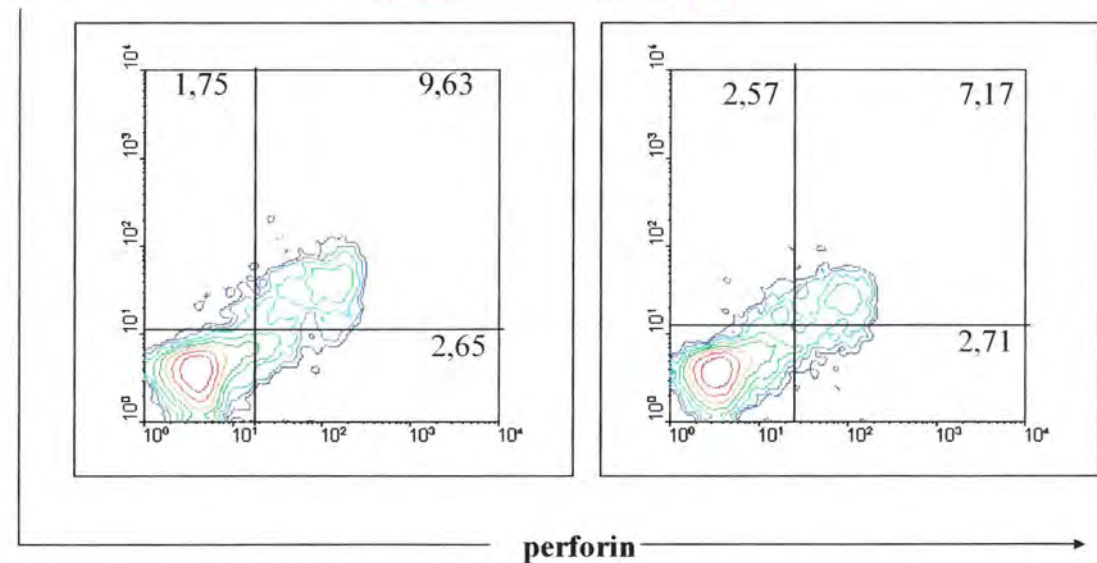
Slika 31: Postotak dvostruko pozitivnih (perforin+ CD16+) stanica u limfocitima periferne krvi pacijenata prije i poslije laparoskopske i klasične kolecistektomije



## LAPAROSKOPSKA OPERACIJA



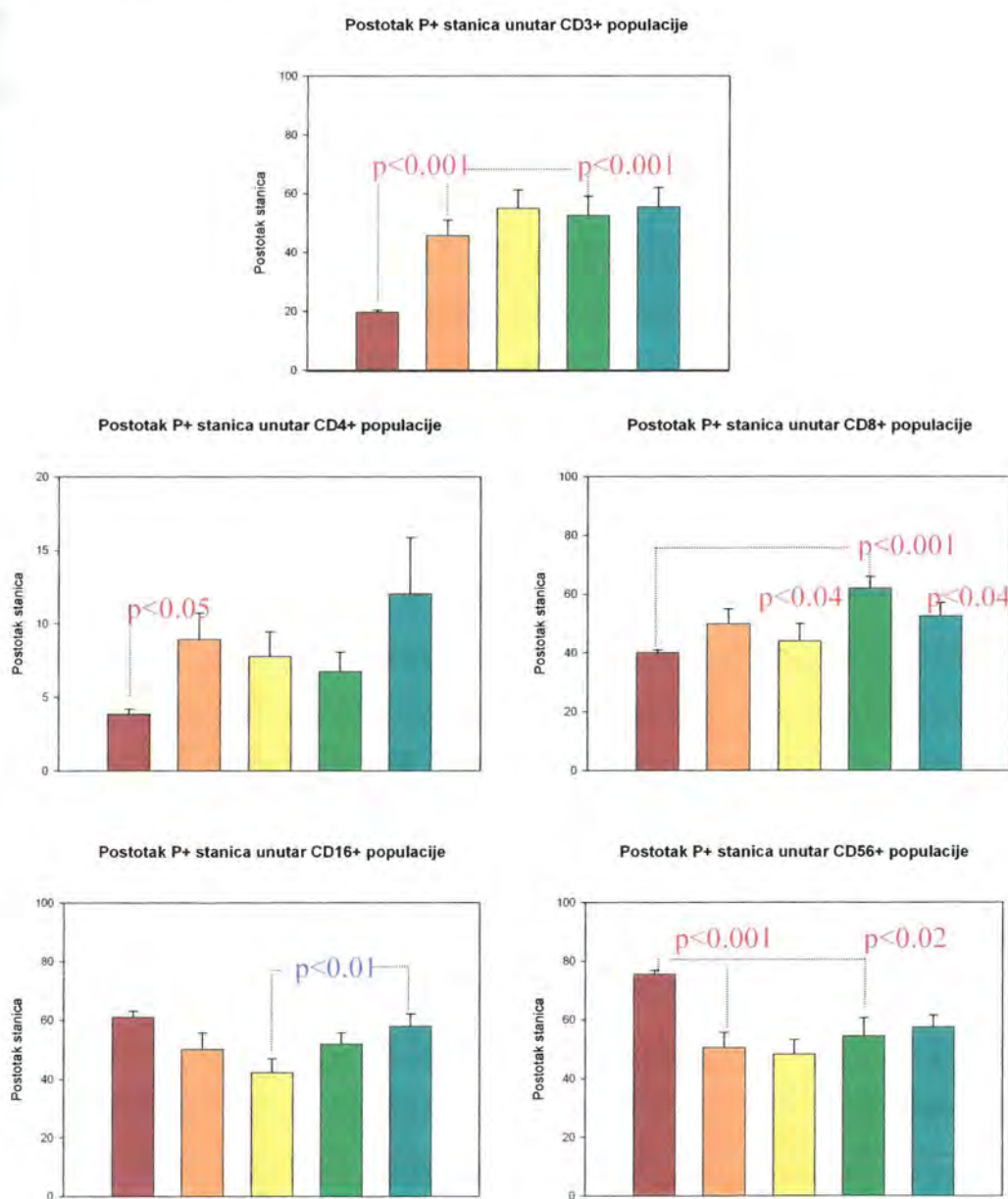
## KLASIČNA OPERACIJA



Slika 32: Postotak dvostruko pozitivnih (perforin+ CD56+) stanica u limfocitima periferne krvi pacijenata prije i poslije laparoskopske i klasične kolecistektomije

#### 4.3.2.5.4. Udio P<sup>+</sup> stanica među subpopulacijama T limfocitima i među NK stanicama

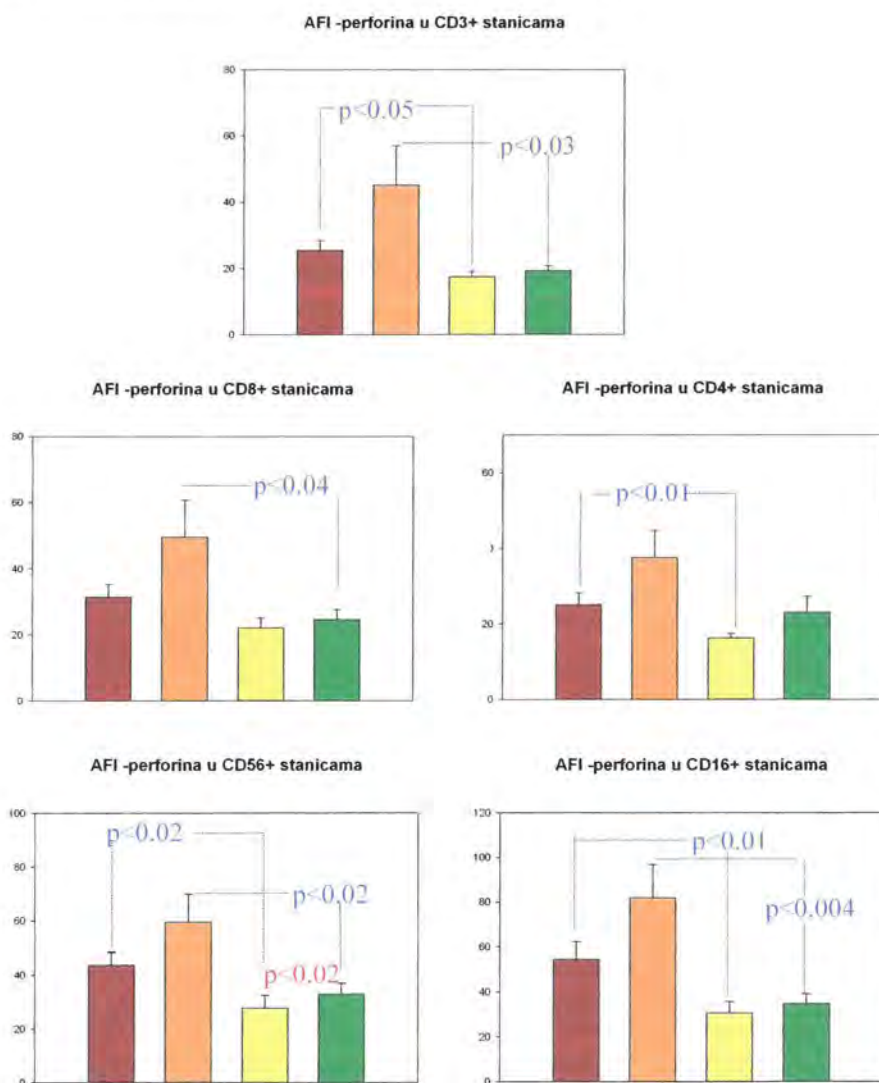
Dodatne analize su osim toga pokazale da su i relativni postoci P<sup>+</sup> stanica unutar T limfocita veći u krvi bolesnika koji imaju žučne kamence, nego li u zdravoj populaciji (Slika 33). No, obje su operacije dovele do značajnog smanjenja udjela P<sup>+</sup> stanica, unutar populacije CD8<sup>+</sup> T limfocita, a slično je utvrđeno i za udio P<sup>+</sup> stanica u preoperativno uzetim uzorcima krvi, unutar CD56<sup>+</sup> NK stanica. Najmanja odstupanja od normalnih vrijednosti opažena su nakon LK u populaciji CD16<sup>+</sup> NK stanica (Slika 34).



Slike 33 i 34. Udio P<sup>+</sup> stanica unutar određene subpopulacije T limfocita i NK stanica

#### 4.3.2.5.5. Prosječni sadržaj perforina u T limfocitima i NK stanicama

Na pojedinim limfocitnim subpopulacijama i NK stanicama praćen je i prosječni intenzitet fluorescencije perforina. Utvrđeno je da operacije ne mijenjaju sadržaj perforina u T limfocitima no, preoperativno, je ova vrijednost u CD3 i CD4+ limfocitima bila značajno veća u bolesnika predviđenih za KK. Osim toga, u ovoj grupi su i postoperacijske vrijednosti perforina u CD3 i CD8 bile veće negoli nakon LK (Slika 35). Slično je utvrđeno i na populaciji NK stanica, gdje je prosječni intenzitet fluorescencije perforina u CD16 i CD56 stanicama bio također veći u oba mjerenja. Osim toga, uočeno je da nakon LK dolazi do porasta sadržaja perforina u CD56 stanicama (Slika 36).



Slika 35 i 36. Prikaz prosječnog intenziteta fluorescencije za perforin u T limfocitima i NK stanicama

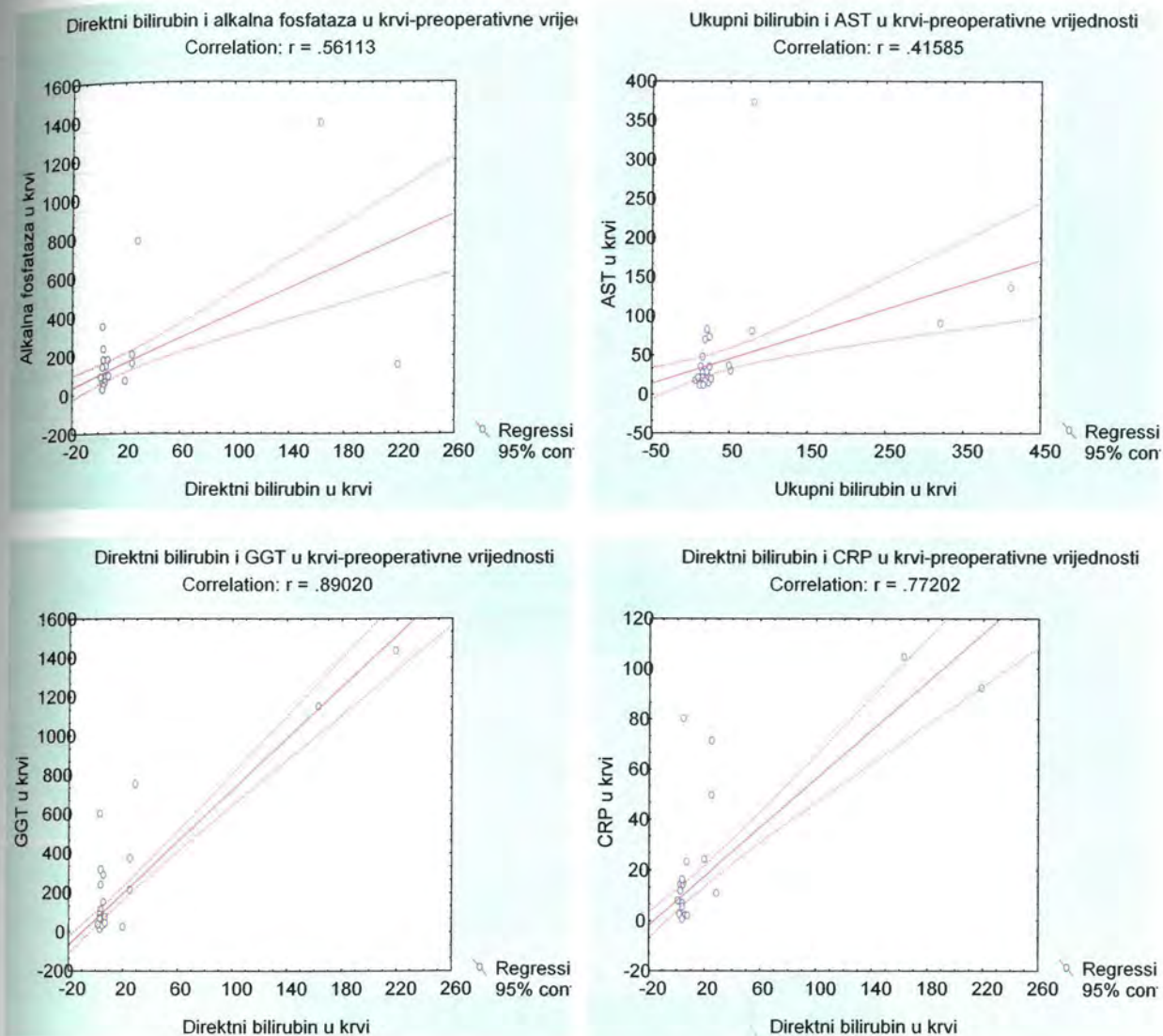
## **4.4. Ispitivanje međuodnosa pojedinih varijabli**

### **4.4.1. Status prije operacija-promjene uzrokovane kolestazom**

Do sada opisani rezultati pokazali su da vrsta operacije značajno utječe na ispitivane metaboličke i imunološke parametre. No usporedba nekih preoperativnih vrijednosti sa kontrolnim vrijednostima, dobivenima u grupi zdravih ljudi pokazala je, da je na izbor operacije ipak utjecala težina kolestaze, jer je utvrđeno da su preoperativne vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina, alkalne fosfataze, te ALT i GGT bili značajno veći u bolesnika izabranih za klasičnu kolecistektomiju, od onih izabranih za laparoskopsku operaciju (Slike 16 i 17). Postoperativne razlike između operacija mogle su, stoga, biti vezane i uz početne razlike u intenzitetu kolestaze. Kako bi utvrdili, utječe li kolestaza na pojedine imunološke parametre, neovisno o vrsti operacije, u dodatnim analizama izračunavali smo koeficijent korelacije i pravac regresije između preoperativnih vrijednosti, nađenih u krvi svih ispitanika (N=45) i pojedinih imunoloških parametara.

#### **4.4.1.1 Verifikacija sindroma kolestaze**

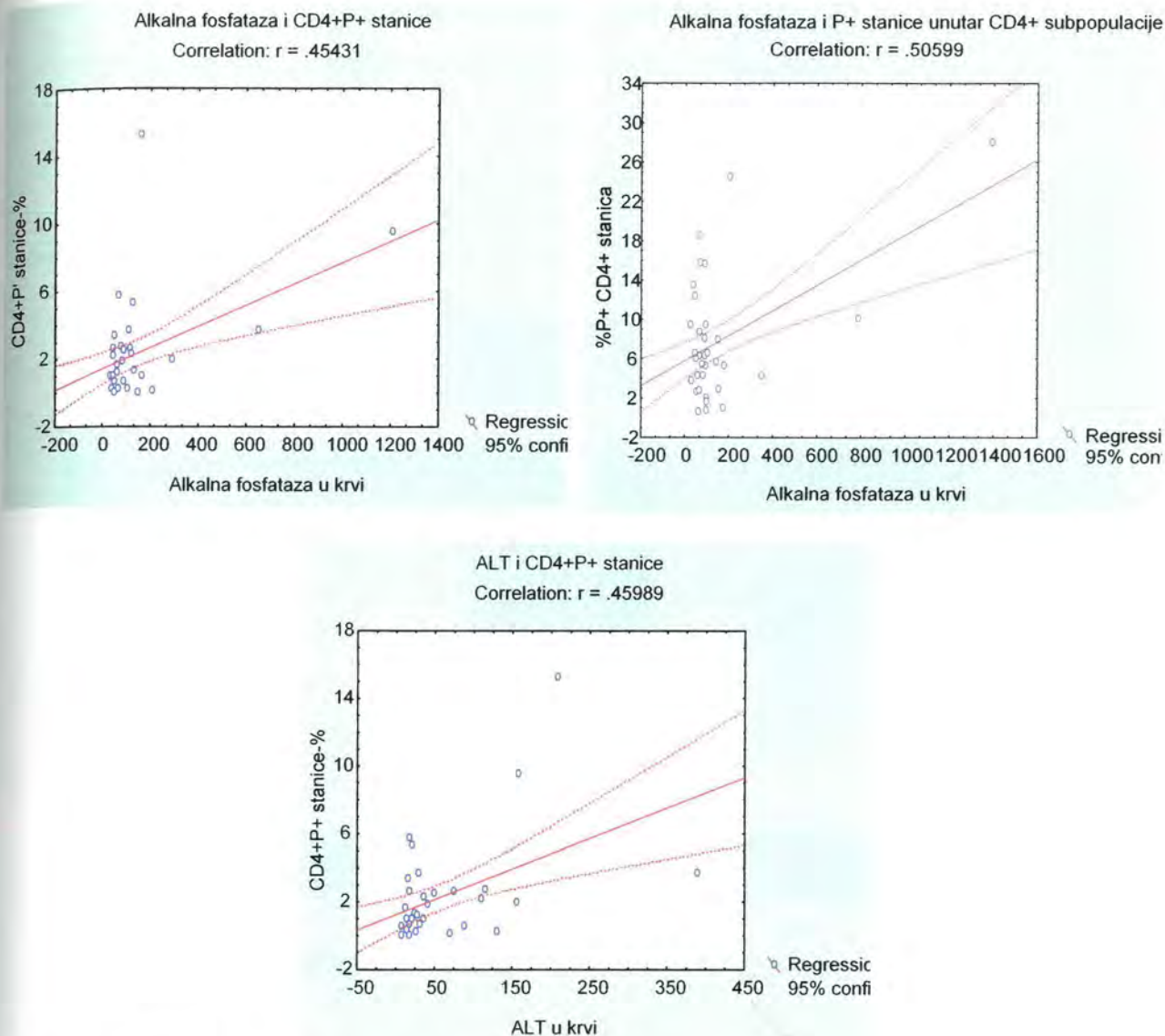
Postojanje preoperativne kolestaze u svih ispitanika potvrđeno je nalazom pozitivnih korelacija između ukupnog i direktnog bilirubina u krvi i vrijednosti alkalne fosfataze ( $r=0.56$ ;  $p<0.000$ ), AST ( $r=0.415$ ;  $p<0.005$ ) i GGT ( $r=0.89$ ,  $p<0.000$ ) u krvi. Vrlo značajna pozitivna korelacija utvrđena je i između koncentracija direktnog bilirubina i CRP u krvi ( $r=0.772$ ,  $p<0.000$ ) sugerirajući da kolestaza, potiče i upalnu reakciju (slika 37).



Slika 37. Korelacija između vrijednosti CRP, ukupnog i direktnog bilirubina i kolestaze

#### 4.4.1.2. Kolestaza i broj perforin+ stanica u perifernoj krvi

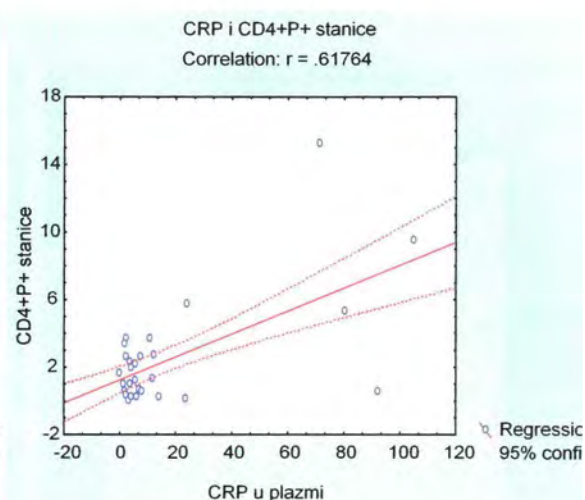
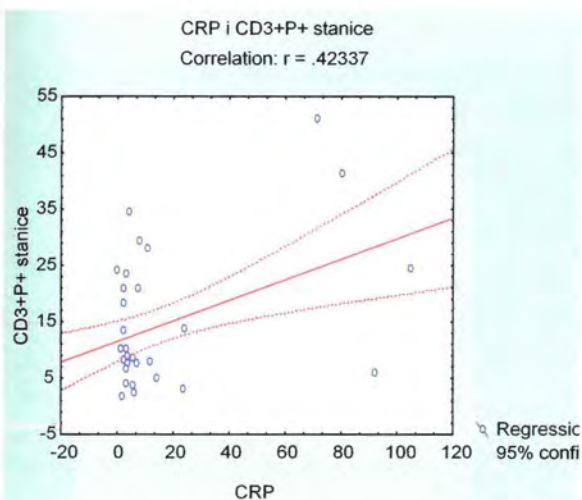
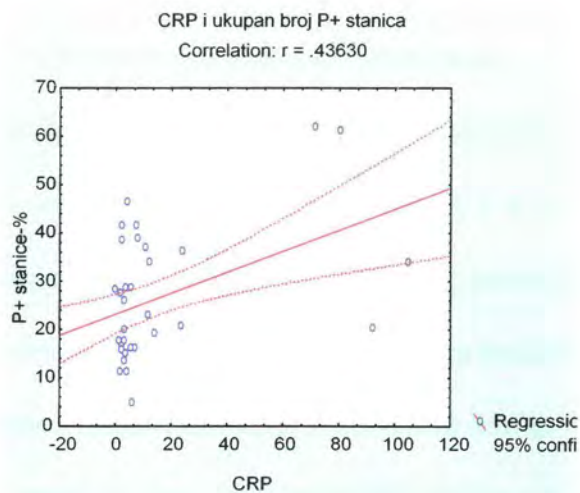
Rezultati su pokazali da su nivoi alkalne fosfataze u krvi u pozitivnoj korelaciji sa brojem  $CD4^+P^+$  stanica ( $r=0.454$ ;  $p<0.007$ ), te sa relativnim postotkom  $P^+$  stanica unutar  $CD4^+$  limfocita ( $r=0.51$ ;  $p<0.002$ ). Slična, pozitivna korelacija utvrđena je i između nivoa ALT u krvi i postotka  $CD4^+P^+$  stanica ( $r=0.459$ ;  $p<0.006$ ) (Slika 38).



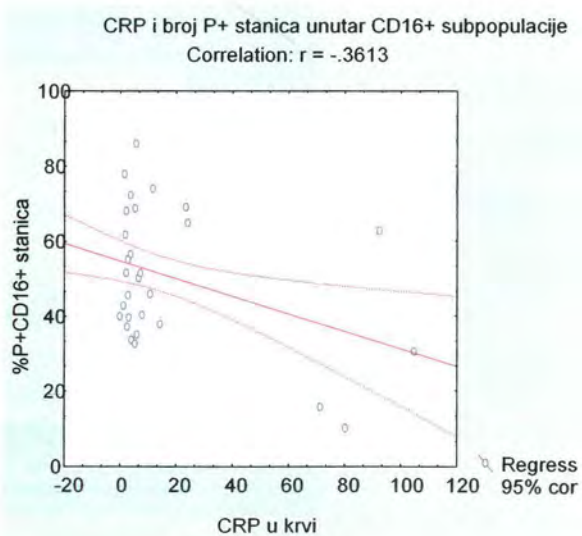
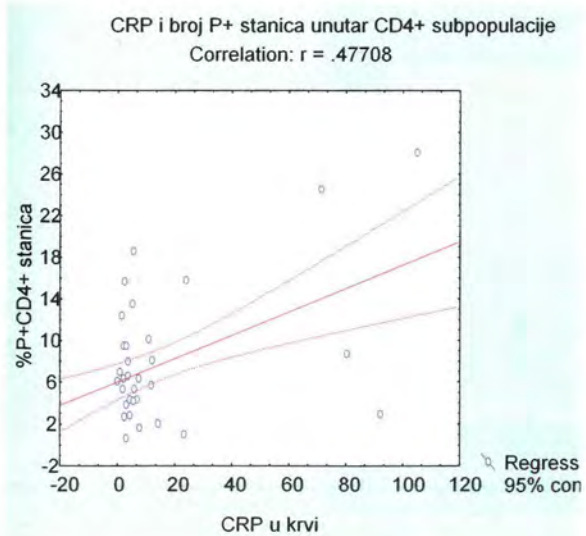
Slika 38. Alkalna fosfataza, ALT i broj P+ T limfocita

#### 4.4.1.3. C-reaktivni protein i broj perforin<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi

Ukupan broj P+ stanica ovisio je i o koncentracijama C reaktivnog proteina u krvi ( $r=0.436$ ;  $p<0.01$ ). Pritom se prvenstveno povećavao broj CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica ( $r=0.423$ ;  $p<0,01$ ) i broj CD4<sup>+</sup> P<sup>+</sup> stanica ( $r=0.617$ ;  $p<0000$ ) (Slika 39). Rezultat je potvrdio i nalaz pozitivne korelacije između CRP u plazmi i broja P<sup>+</sup> stanica unutar CD4<sup>+</sup> limfocita, uz istovremeno smanjivanje udjela P<sup>+</sup> stanica unutar CD16<sup>+</sup> subpopulacije (Slika 40).



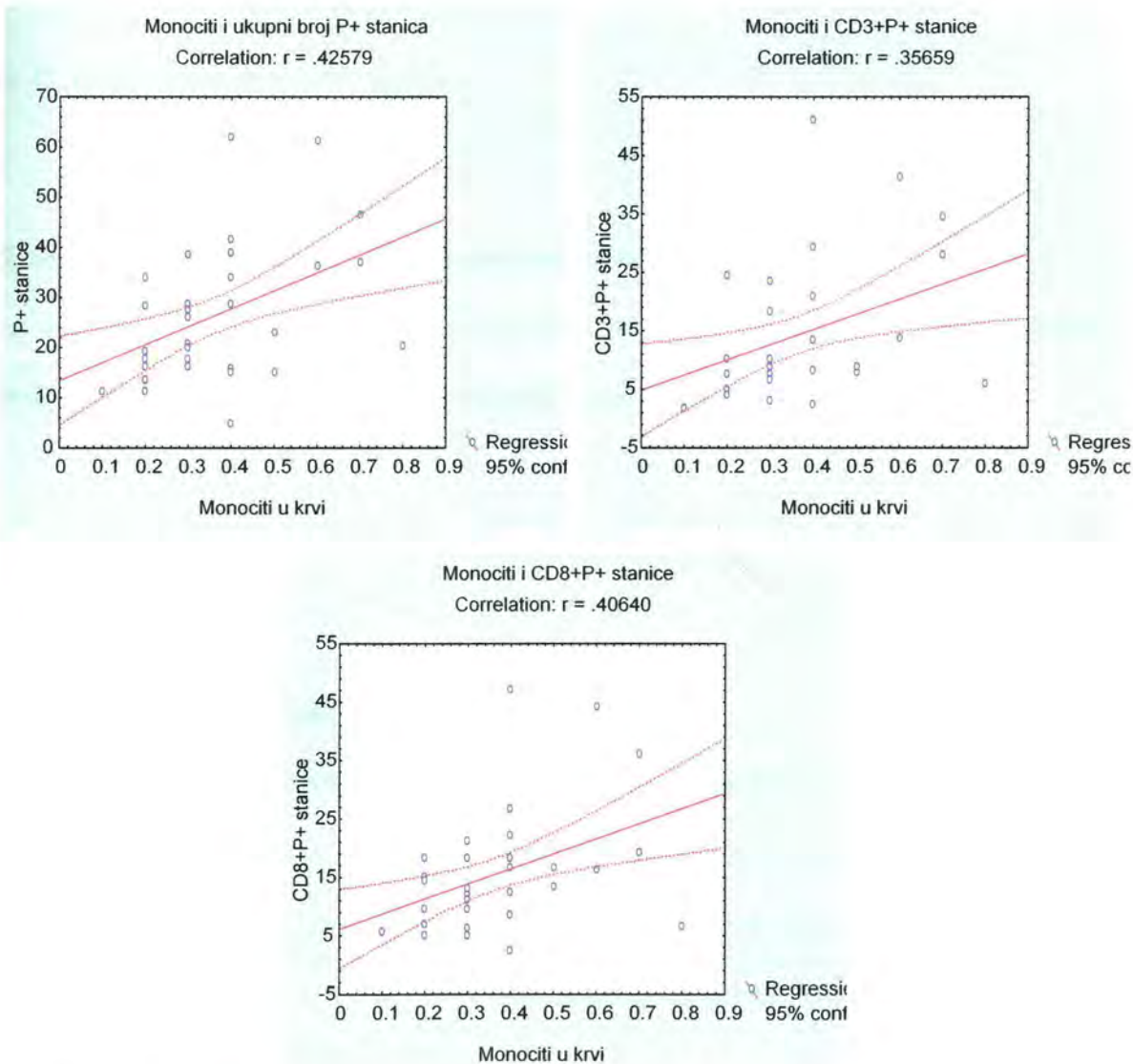
Slika 39. C reaktivni protein i P+ T limfociti



Slika 40. Koleracije između CRP i određenih limfocitnih subpopulacija

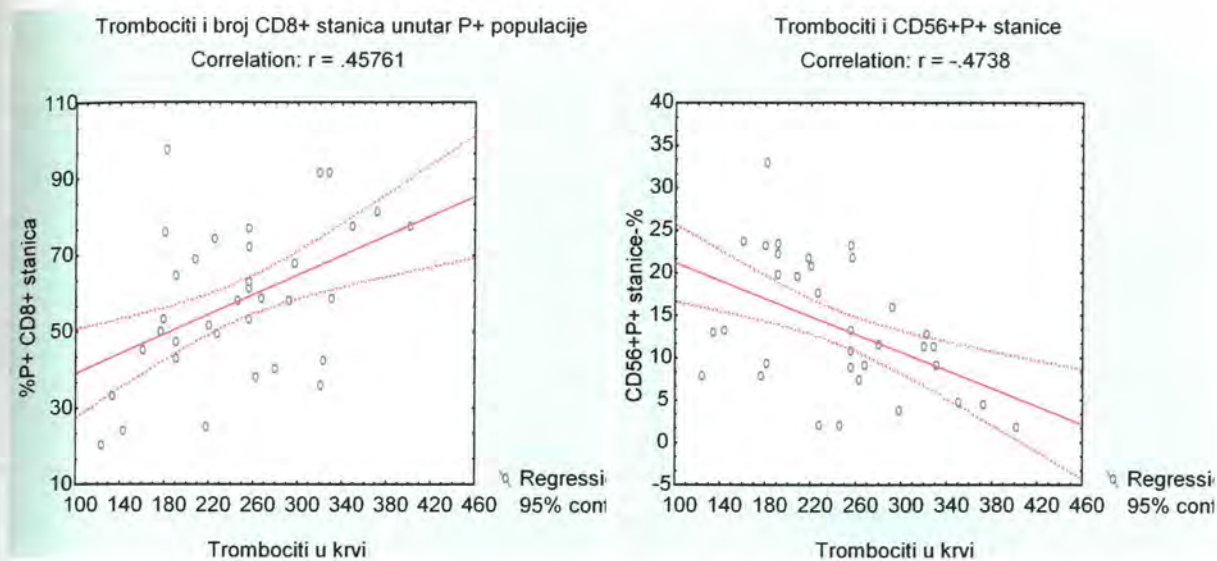
#### 4.4.1.4. Odnos monocita i trombocita sa perforin+ stanicama

Osim opisanog, utvrdili smo postojanje korelacija između monocita i trombocita u perifernoj krvi i postotka stanica sa perforinom (Slike 41 i 42). U monocitozi rastao je postotak stanica sa perforinom ( $r=0.426$ ,  $p<0.012$ ), i to prvenstveno  $CD3^+P^+$  ( $r=0.356$ ;  $p<0.03$ ) i  $CD8^+P^+$  stanica ( $r=0.40$ ,  $p<0.17$ ). Usto, rezultati su pokazali da postotak  $CD8^+P^+$  T limfocita raste proporcionalno broju trombocita u perifernoj krvi ( $r=0.457$ ;  $p<0.006$ ), dok se postotak  $CD56^+P^+$  stanica smanjuje ( $r=-0.473$ ;  $p<0.0005$ ) (Slika 42).



Slika 41. Odnos monocita i  $P^+$  stanica





Slika 42. Odnos trombocita i P<sup>+</sup> stanica

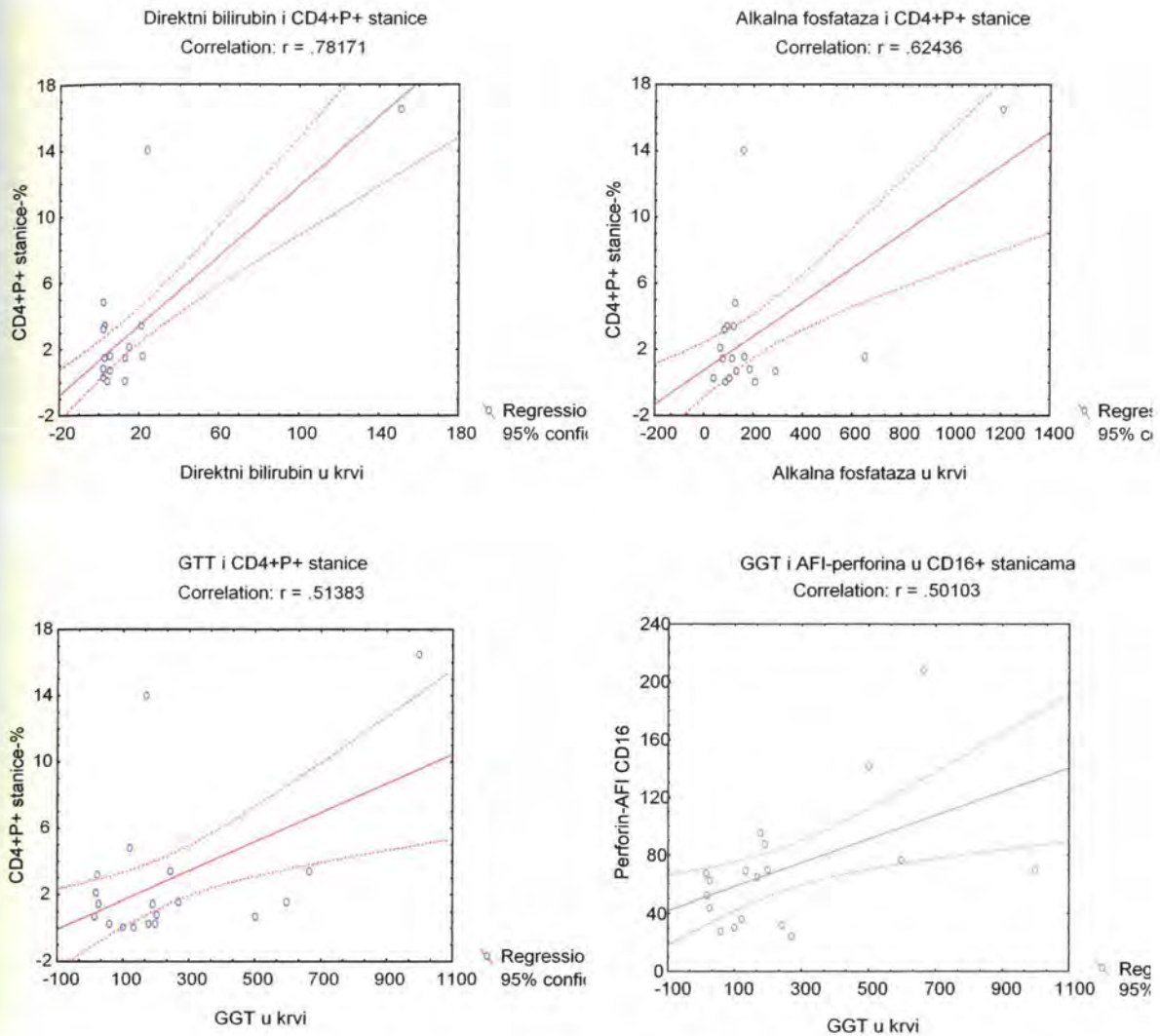
#### 4.4.2. Status nakon klasične i laparoskopske kolecistektomije

U nastavku analizirali smo odnose pojedinih varijabli nakon operacija i uspoređivali ih međusobno, kako bi utvrdili međusobne sličnosti i različitosti.

##### 4.4.2.1. Odnosi bilirubina, alkalne fosfataze i aminotransferaza sa T limfocitima i NK stanicama

###### 4.4.2.1.1. Klasična kolecistektomija

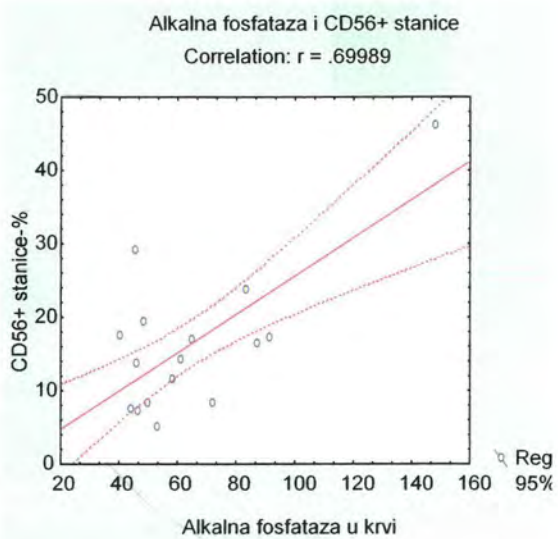
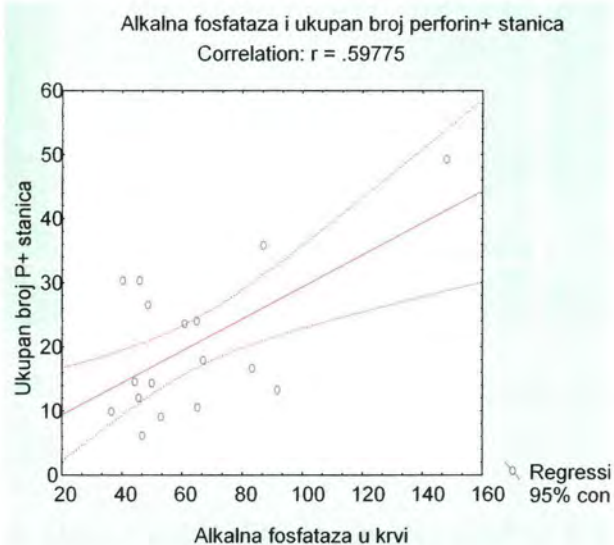
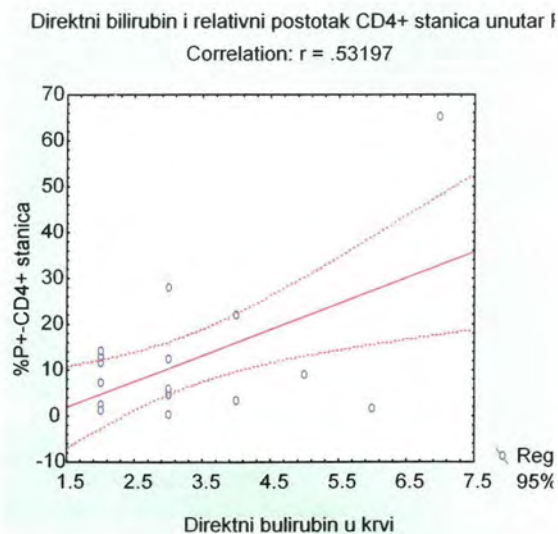
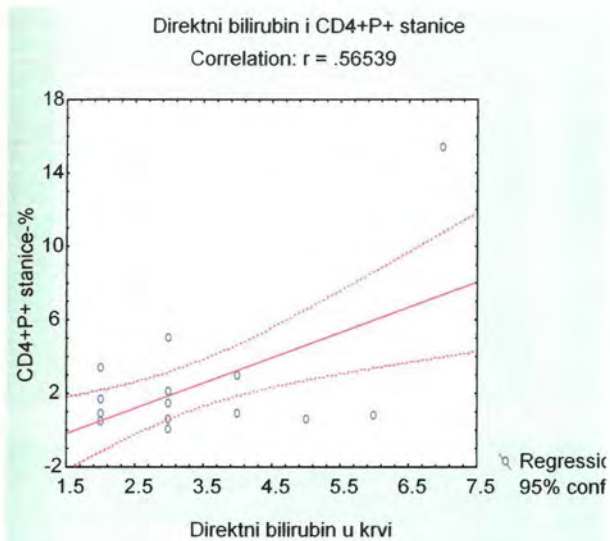
Visoki stupanj pozitivne korelacije između direktnog bilirubina i alkalne fosfataze i CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica bio je vidljiv i nakon klasične kolecistektomije (Slika 43;  $r=0.78$ , i  $r=0.62$ ;  $p<0.02$ ), Usto, opažena je i pozitivna korelacija između razine GGT u plazmi i postotka CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica ( $r=0.513$ ), te između GGT i prosječnog intenziteta fluorescencije za perforin u CD16<sup>+</sup> NK stanicama ( $r=0.50$ ;  $p<0.02$ ).



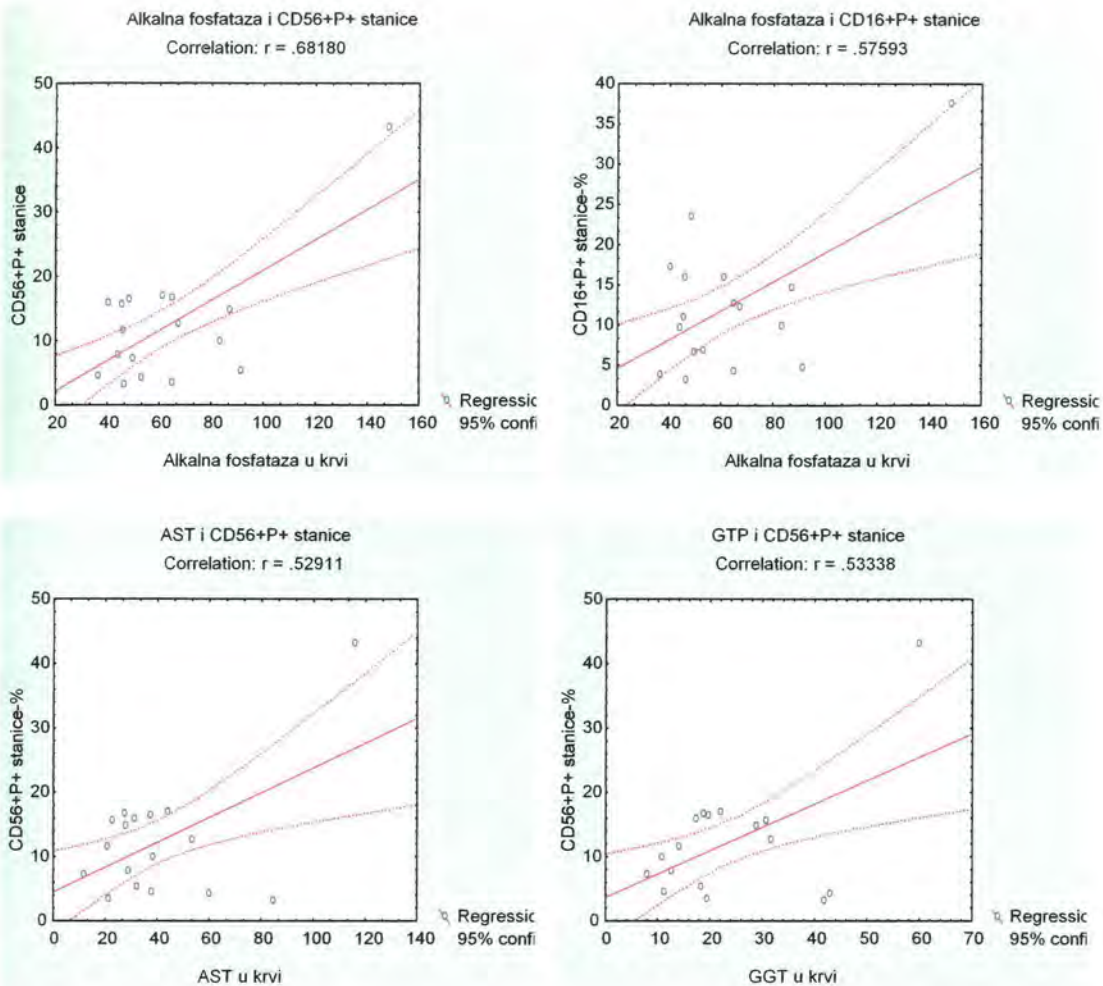
Slika 43. Promjene uzrokovane kolestazom nakon klasične kolecistektomije

#### 4.4.2.1.2. Laparoskopiska kolecistektomija

Korelacije između direktnog bilirubina i  $CD4^+P^+$  stanica opažene su i nakon LK (slika 44). No nakon ove operacije utvrđeno je postojanje i dodatne pozitivne korelacije između broja  $CD56^+$  stanica ( $r=0.69$ ;  $p<0.003$ ), ukupnog broja  $P^+$  stanica ( $r=0.59$ ;  $p<0.01$ ), te obje vrste  $P^+$  NK stanica ( $CD56^+P^+$  i  $CD16^+P^+$  stanica). Slična pozitivna korelacija utvrđena je između razina AST i GGT i  $CD56^+P^+$  stanica (Slika 45).



Slika 44. Promjene uzrokovane kolestazom nakon laparoscopske kolecistektomije

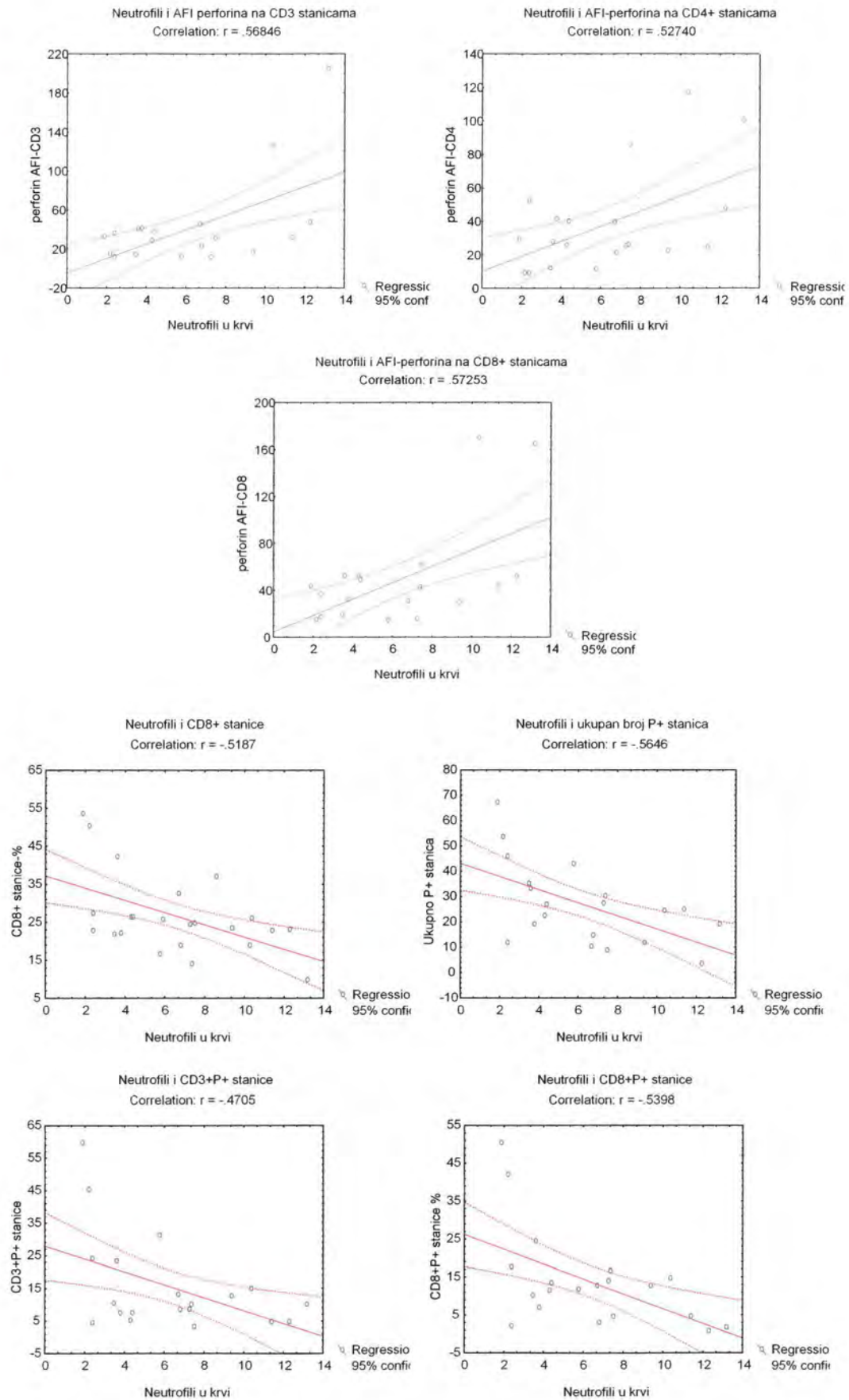


Slika 45. Promjene uzrokovane kolestazom nakon laparoskopske kolecistektomije

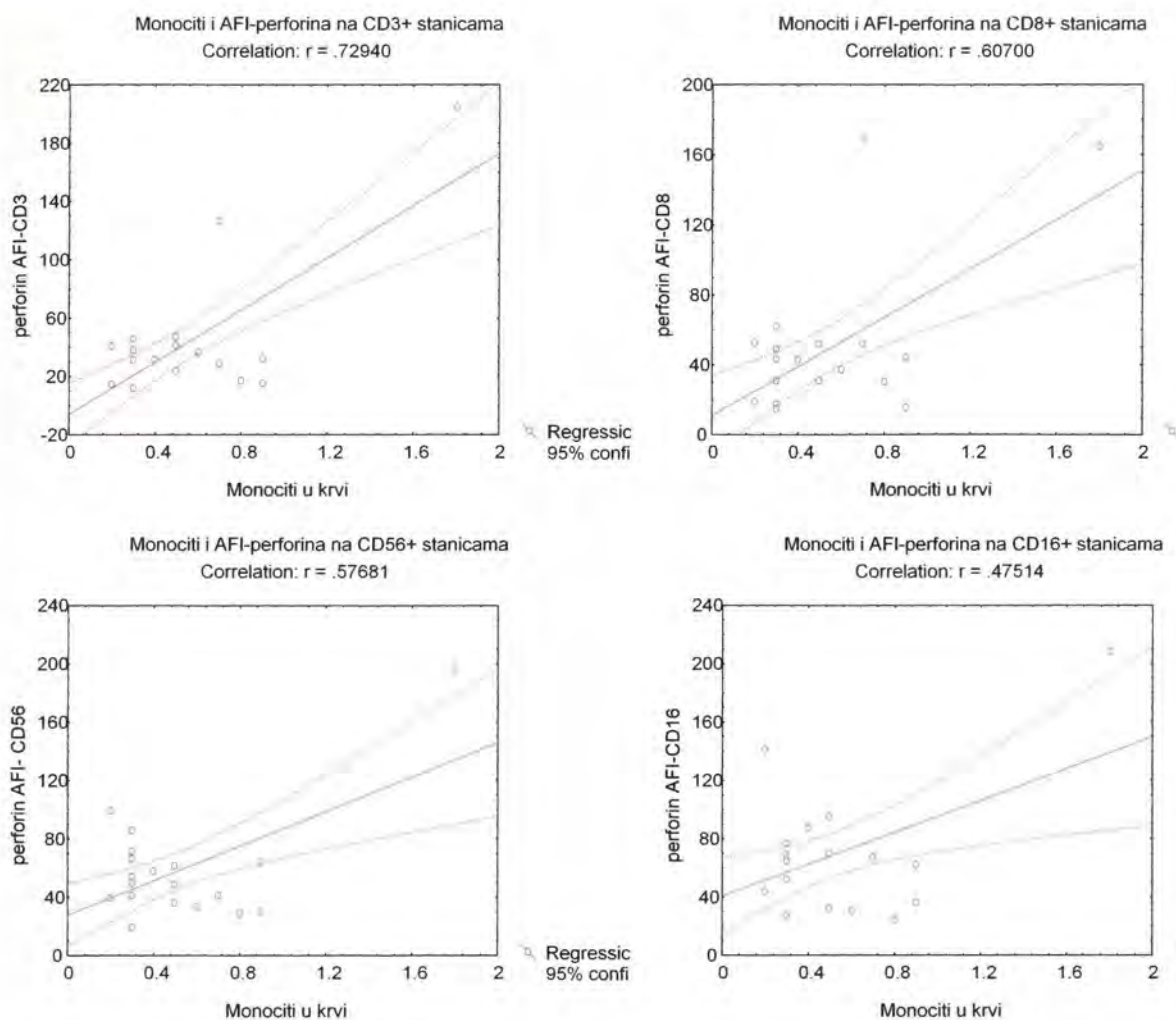
#### 4.4.2.2. Odnosi neutrofila, monocita i CRP sa T limfocitima i NK stanicama

##### 4.4.2.2.1. Klasična kolecistektomija

Nakon klasične kolecistektomije primijećeno je da pojava neutrofilije negativno korelira sa brojem  $CD8^+$  stanica u perifernoj krvi i to prvenstveno sa brojem  $CD8^+P^+$  stanica ( $r = -0.51$ ;  $p < 0.01$ ) i ( $r = -0.54$ ;  $p < 0.014$ ), sugerirajući da su ovi citotoksički limfociti migrirali u tkivo. Istovremeno je, međutim, primijećeno da se u neutrofiliji povećao prosječni intenzitet fluorescencije perforina na CD3, CD4 i CD8 preostalim T limfocitima u cirkulaciji (Slika 46;  $r = 0.568$ ;  $p = 0.009$  i  $p < 0.008$ ). Sličnu ushodnu regulaciju perforina na CD3 i CD8 limfocitima, te na CD56 i CD16 stanicama izazivala je i monocitoza u perifernoj krvi (Slika 48).



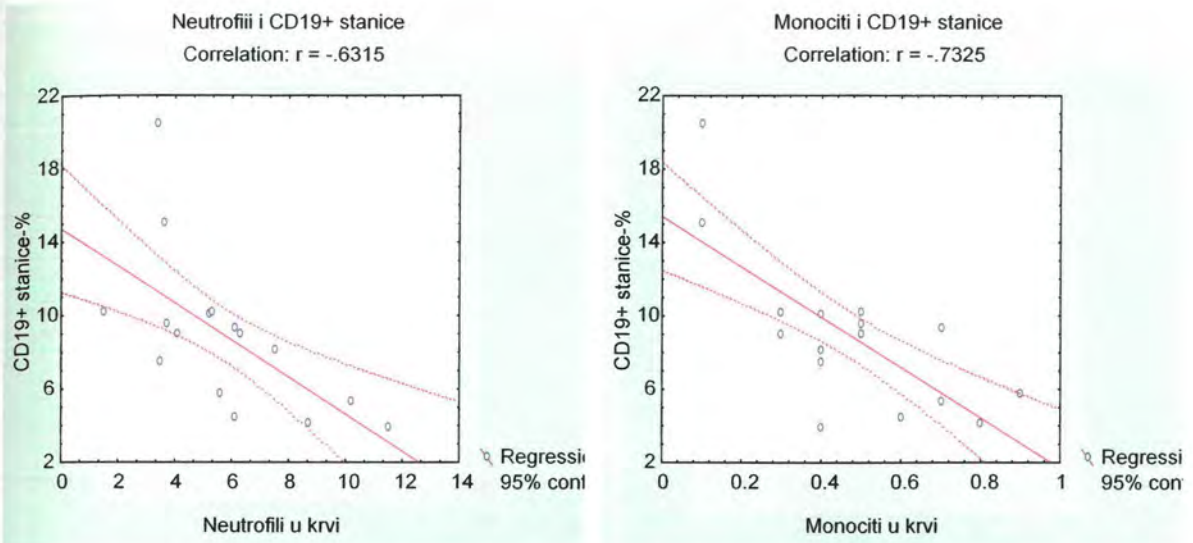
Slika 46 i 47. Međudnosi između neutrofila i T limfocita nakon klasične kolecistektomije



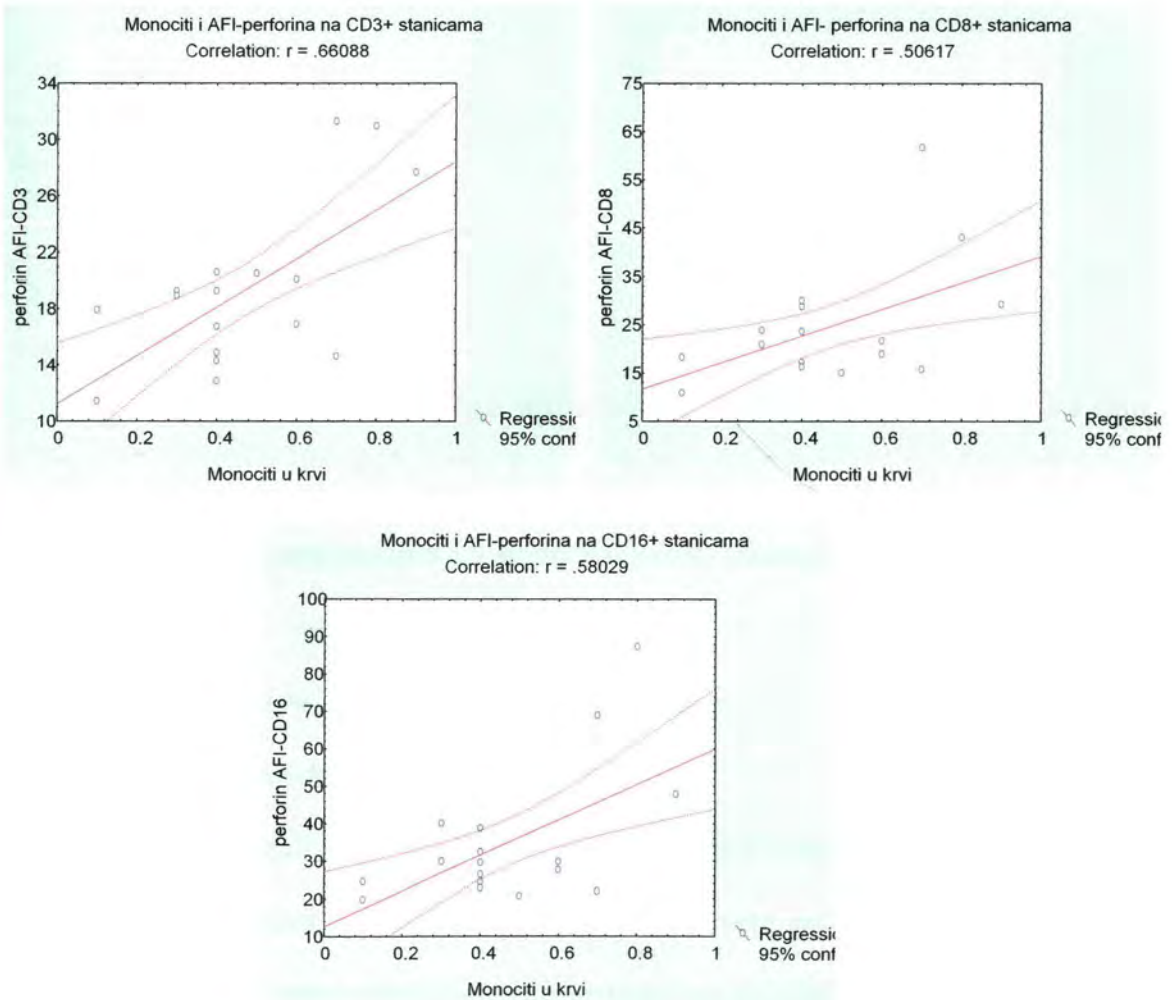
Slika 48. Monociti i prosječni intenzitet fluorescencije perforina u T limfocitima i NK stanicama nakon klasične kolecistektomije

#### 4.4.2.2.2. Laparoskopiska kolecistektomija

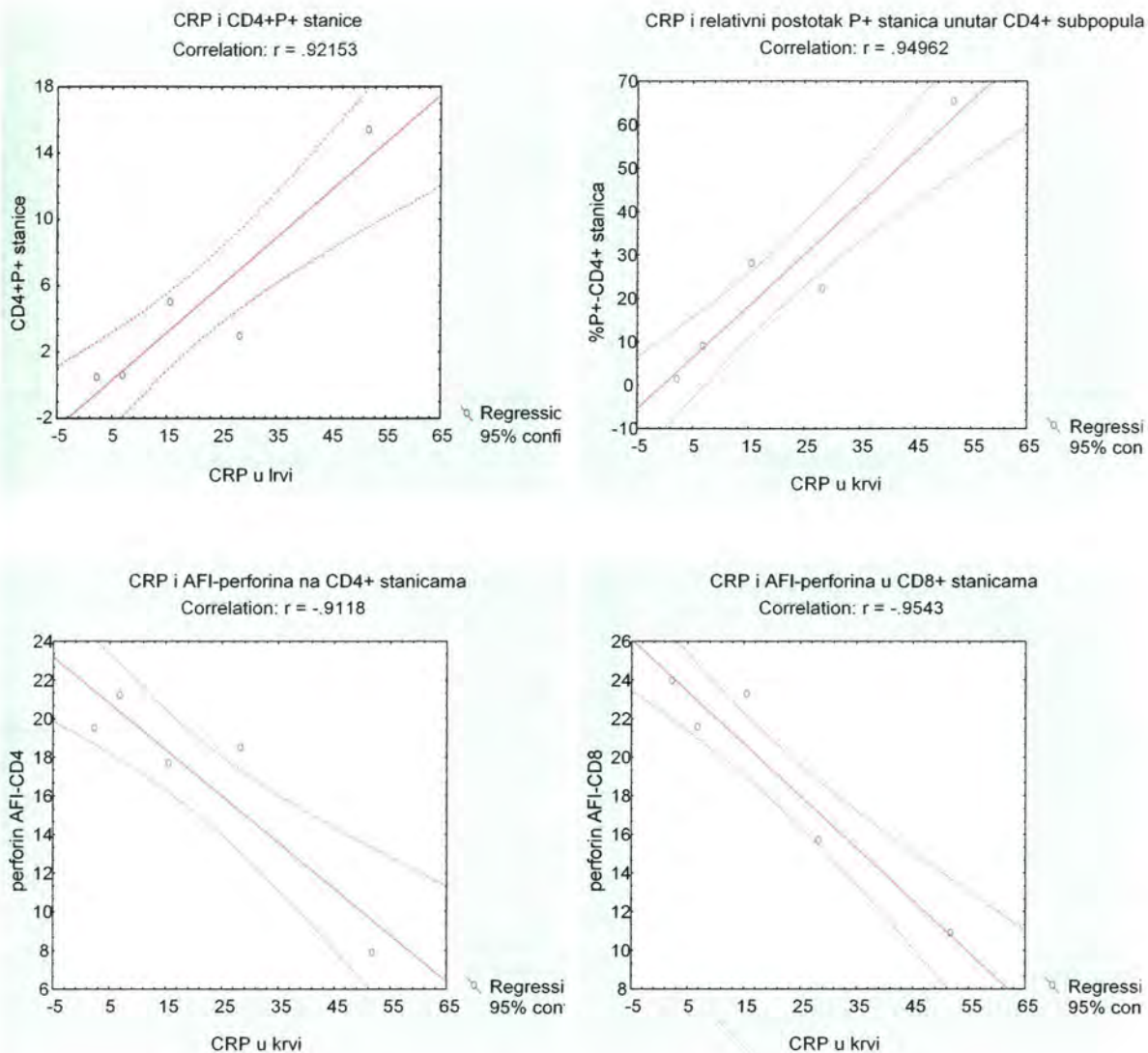
Nakon LK, međutim, utjecaja neutrofilije na T limfocite nije bilo. No, nakon ove operacije primijetili smo da neutrofilija i monocitoza izrazito negativno koreliraju sa brojem CD19+ stanica (Slika 49;  $r = -0.63$ ; i  $r = -0.73$ ;  $p < 0.001$ ), sugerirajući veći utjecaj na B limfocite. Slično KK, monocitoza je i ovdje uzrokovala ushodnu regulaciju perforina na CD3, CD8 i CD16 stanicama (Slika 50). Suprotno tome, primijećeno je da razina CRP u krvi pozitivno korelira sa postotkom CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica u krvi ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.03$ ), izazivajući usto i nishodnu regulaciju perforina u CD4 i CD8 stanicama ( $r = -0.91$ ;  $p < 0.01$ ) (Slika 51).



Slika 49. Odnos neutrofila i B limfocita nakon laparoskopske operacije



Slika 50. Odnos monocita i prosječne fluorescencije perforina nakon laparoskopske operacije



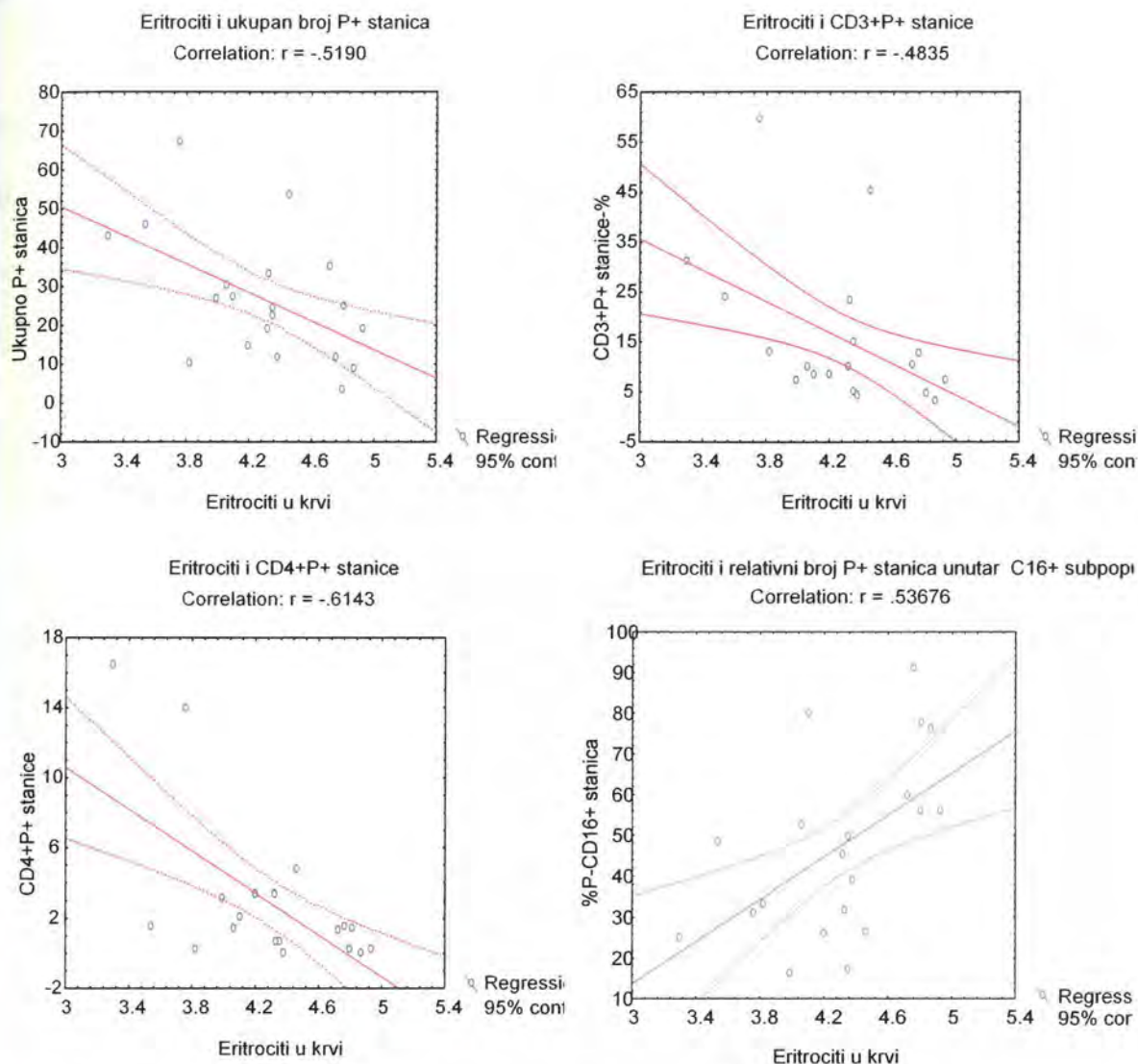
Slika 51. Odnos C reaktivnog proteina i T limfocita nakon laparoskopske operacije

#### 4.4.2.3. Odnosi eritrocita sa T limfocitima i NK stanicama

##### 4.4.2.3.1. Klasična kolecistektomija

Rezultati su pokazali je da nakon KK ukupan broj P<sup>+</sup> stanica i to prvenstveno na CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama u negativnoj korelaciji sa brojem eritrocita u perifernoj krvi. Istovremeno je, međutim, broj eritrocita pozitivno korelirao sa relativnim brojem P<sup>+</sup> stanica unutar CD16<sup>+</sup> subpopulacije stanica (Slika 52).





Slika 52. Odnos eritrocita i T limfocita nakon klasične kolecistektomije

#### 4.4.2.3.2. Laparoskopiska kolecistektomija

U pacijenata operiranih laparoskopskim putem statističkim metodama nisu utvrđene korelacije s brojem eritrocita (rezultati nisu prikazani).

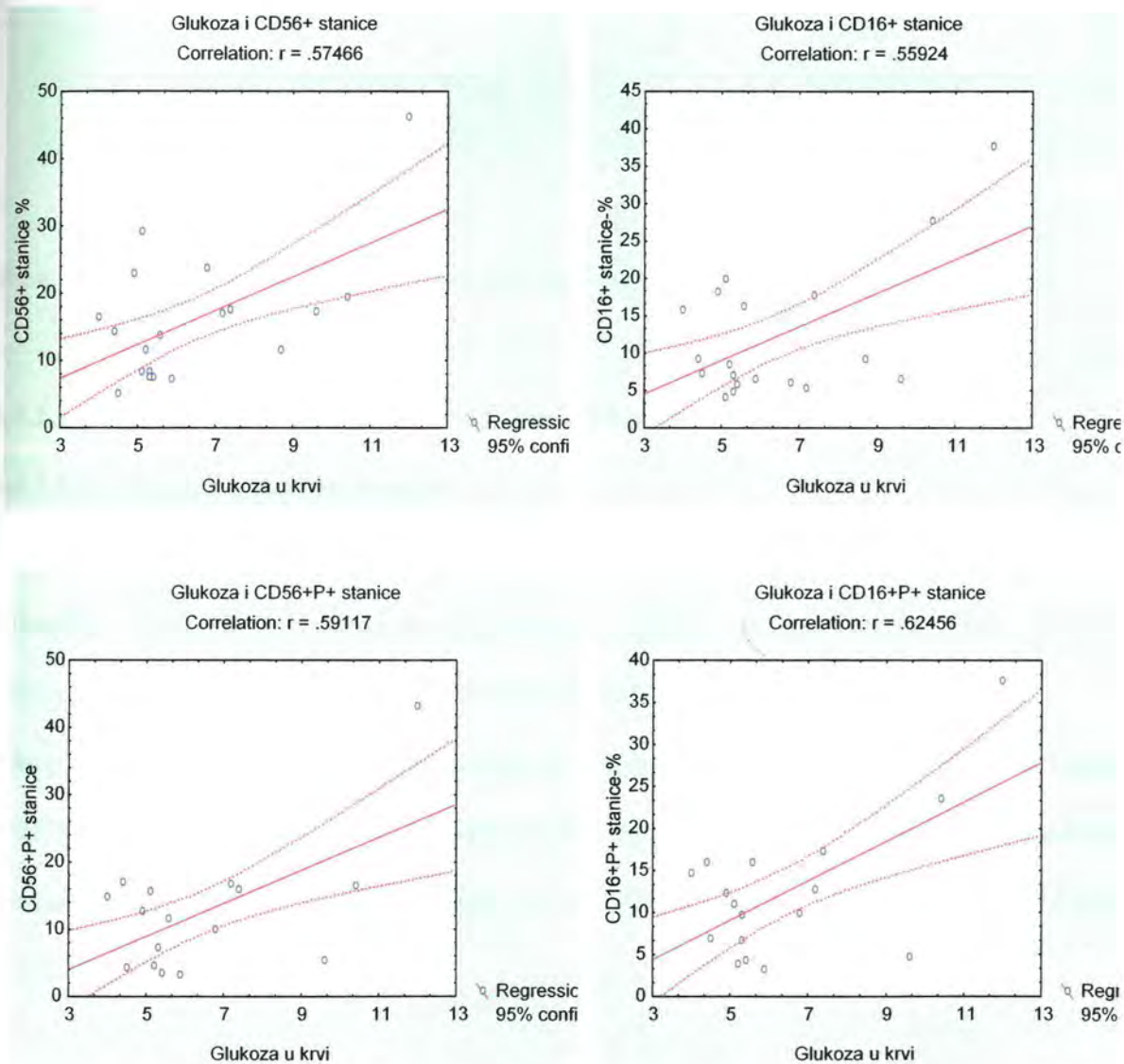
#### 4.4.2.4. Odnosi glukoze sa T limfocitima i NK stanicama

##### 4.4.2.4.1. Klasična kolecistektomija

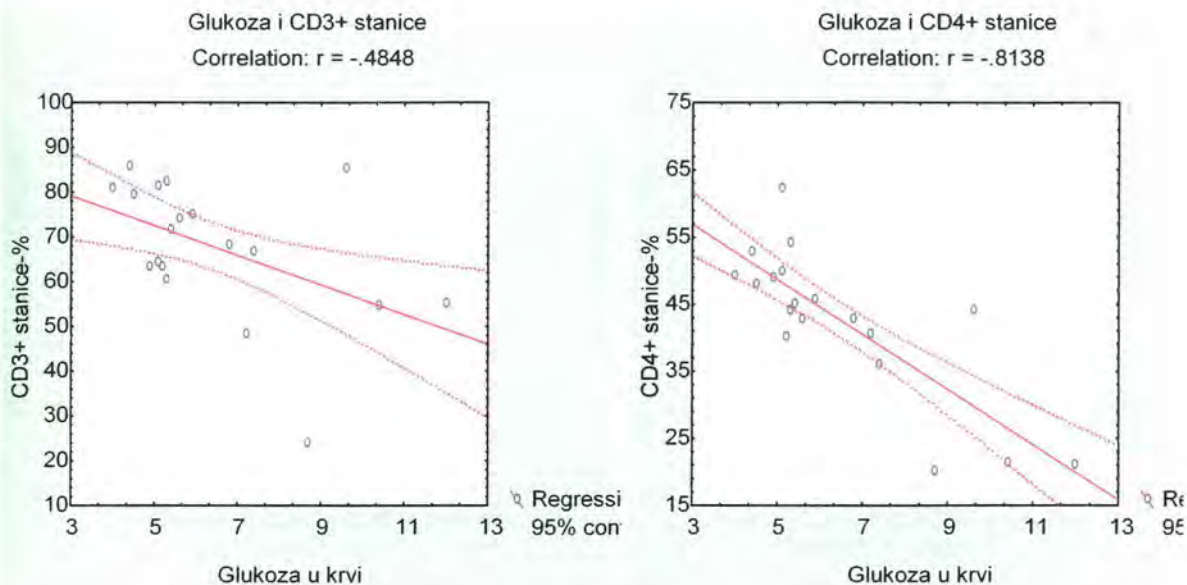
Kod pacijenata operiranih na klasični način uspoređujući vrijednosti glukoze sa brojem T i NK limfocitnih subpopulacija nismo zamijetili nikakve promjene u njihovoj korelaciji (rezultati nisu prikazani).

#### 4.4.2.4.2. Laparoskopiska kolecistektomija

Vrlo značajne pozitivne korelacije utvrdili smo samo nakon LK između koncentracije glukoze u krvi i broja CD56<sup>+</sup> i CD16<sup>+</sup> stanica i to prvenstveno onih koje su P<sup>+</sup> ( $r=0.57-0.62$ ;  $p<0.01$ ) (Slika 53), sugerirajući da je hiperglikemija povećala broj NK stanica. Istovremeno, hiperglikemija je negativno korelirala sa brojem CD3<sup>+</sup> i brojem CD4<sup>+</sup> T limfocita ( $r=-0.81$ ,  $p<0.000$ ). (Slika 54).



Slika 53. Odnos glukoze i NK stanica nakon laparoskopiske operacije



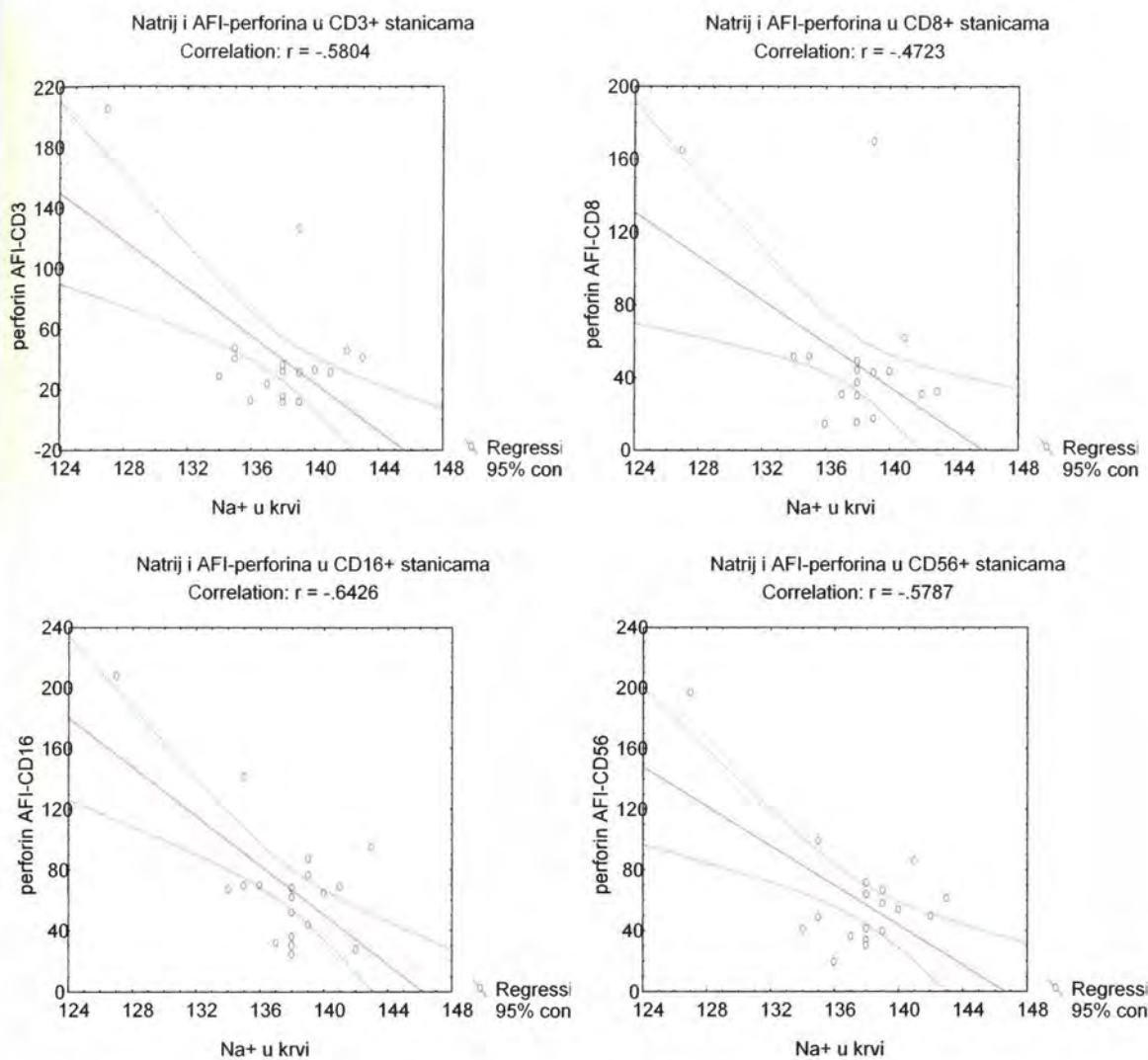
Slika 54. Odnos glukoze i T limfocita nakon laparoskopske operacije

#### 4.4.2.5. Odnosi serumskog $\text{Na}^+$ i $\text{K}^+$ sa T limfocitima i NK stanicama

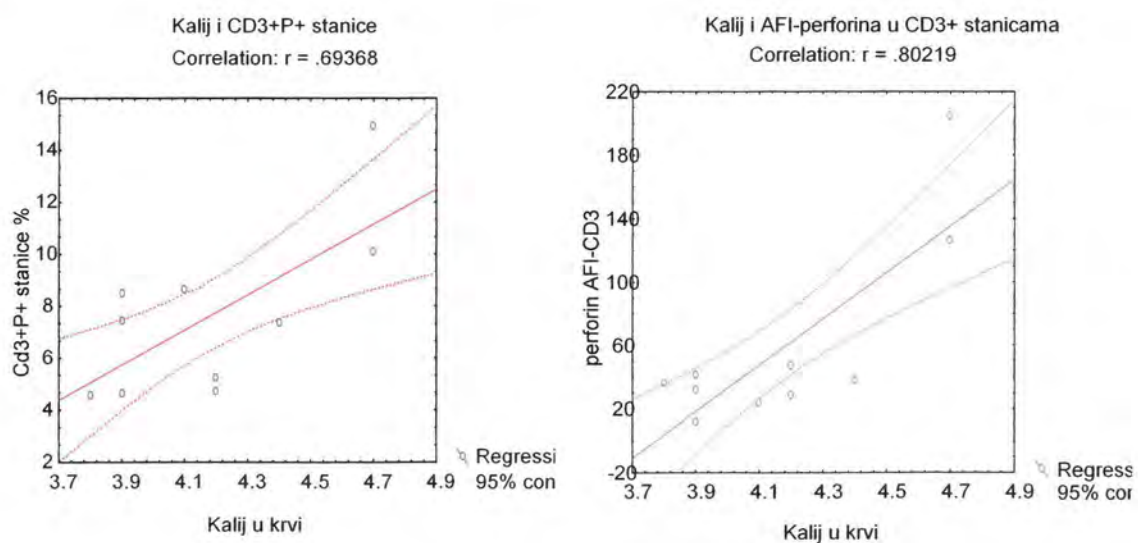
##### 4.4.2.5.1. Klasična kolecistektomija

Značajne negativne korelacije utvrđene su između koncentracije  $\text{Na}^+$  u serumu bolesnika i prosječnog intenziteta fluorescencije (AFI) za perforin u CD3+ i CD8+ limfocitima, te u CD16+ i CD56+ stanicama (Slika 55).

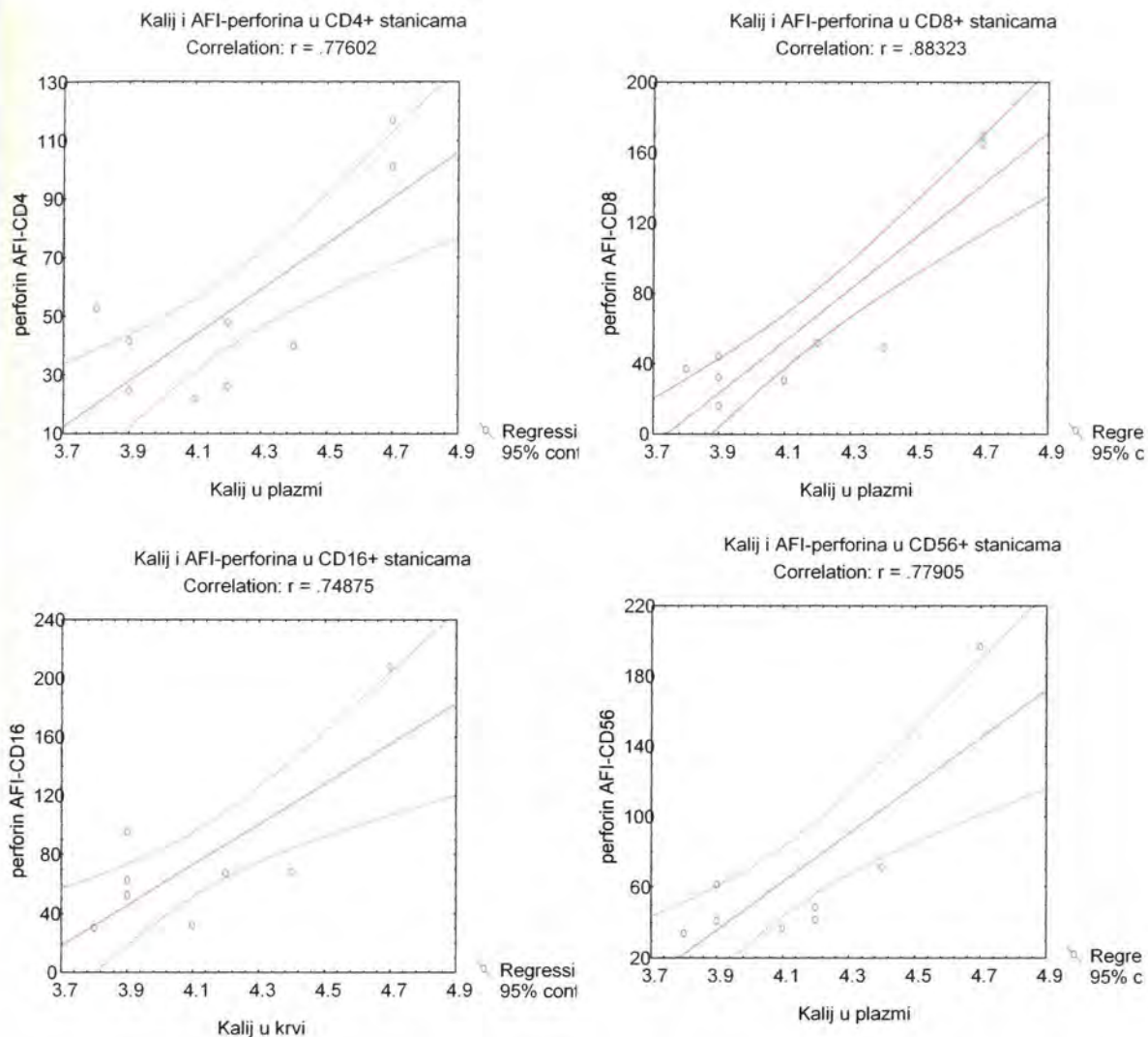
Nasuprot tome, opaženo je koncentracija  $\text{K}^+$  u serumu pozitivno korelirala sa brojem CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi ( $r=0.69$ ;  $p<0.02$ ) (Slika 56), a dovela je i do porasta sadržaja perforina u CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima, te na CD16<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> stanicama ( $r=0.74-0.88$ ;  $p<0.002$ ). (Slika 57).



Slika 55. Regulacijski učinci Na<sup>+</sup> u plazmi nakon klasične kolecistektomije



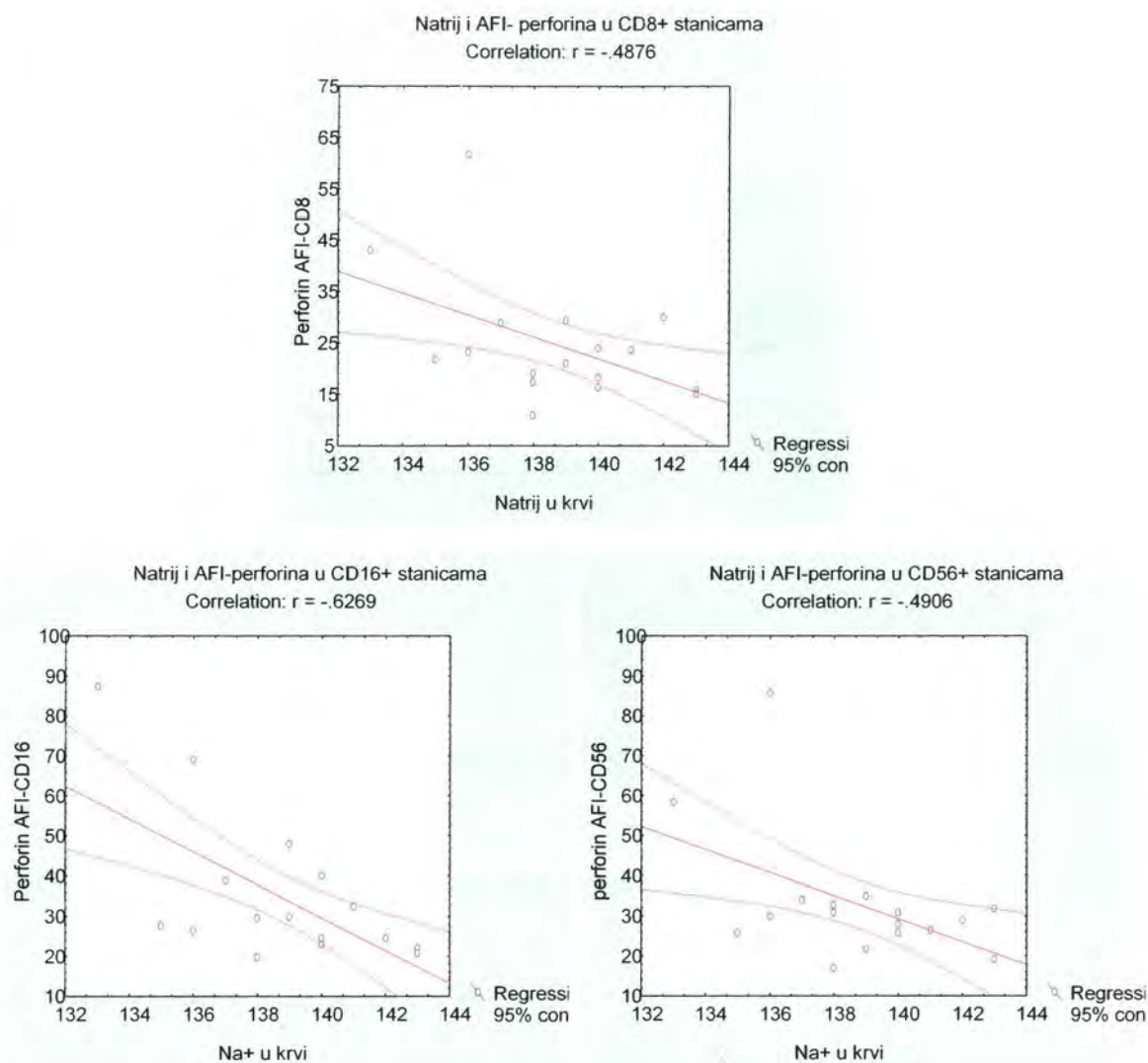
Slika 56. Regulacijski učinci K<sup>+</sup> u plazmi nakon klasične kolecistektomije



Slika 57. Regulacijski učinci  $K^+$  u plazmi nakon klasične kolecistektomije

#### 4.4.2.5.2. Laparoskopna kolecistektomija

U bolesnika podvrgnutih laparoskopnoj kolecistektomiji, koncentracija  $Na^+$  je na isti način utjecala na sadržaj perforina u CD3, CD8, CD16 i CD56 stanica (Slika 58), dok su veće koncentracije  $K^+$  povećale prvenstveno postotak CD56<sup>+</sup> stanica u krvi ( $r=0.536$ ;  $p<0.03$ , nije prikazano).

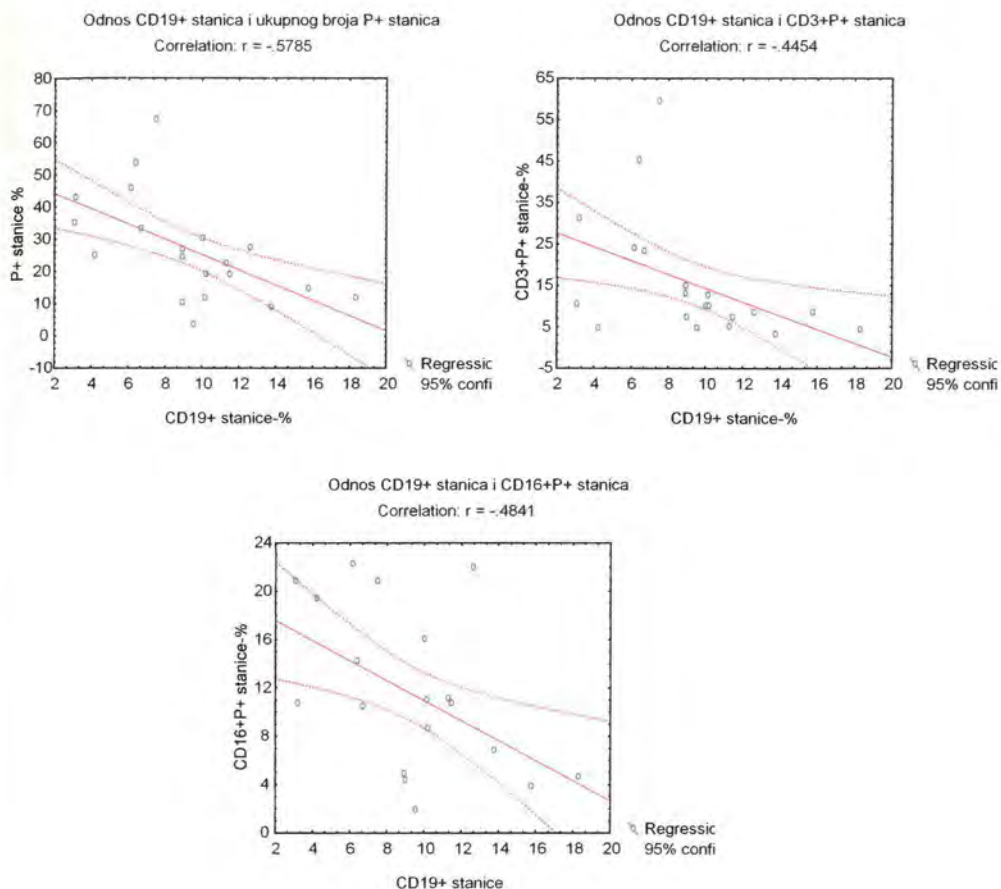


Slika 58. Regulatorijski učinci  $\text{Na}^+$  u plazmi nakon laparoskopske kolecistektomije

#### 4.4.2.6. Odnosi B limfocita sa T limfocitima i NK stanicama

##### 4.4.2.6.1. Klasična kolecistektomija

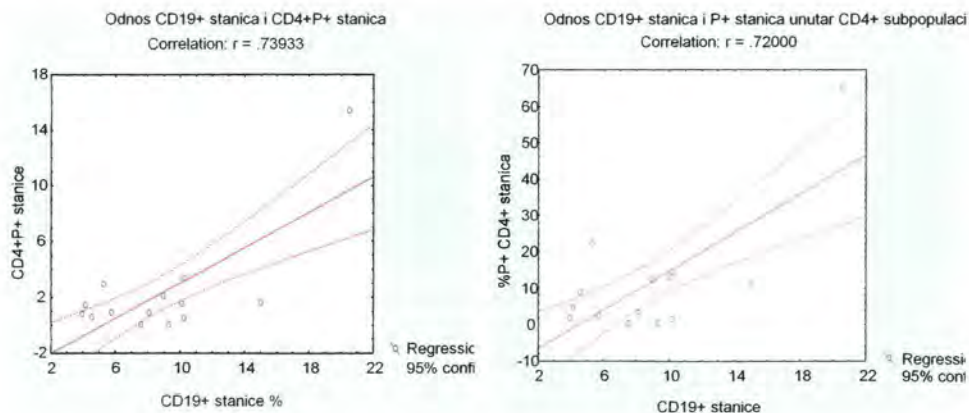
Rezultati su pokazali da u bolesnika podvrgnutih klasičnoj operaciji postoji inverzan odnos između broja  $\text{CD19}^+$  stanica, odnosno B limfocita i ukupnog broja  $\text{P}^+$  stanica, te stanica koje su  $\text{CD3}^+\text{P}^+$  i  $\text{CD16}^+\text{P}^+$  (Slika 59).



Slika 59. Odnos B limfocita sa T limfocitima i NK stanicama nakon klasične operacije

#### 4.4.2.6.2. Laparoskopiska kolecistektomija

Nasuprot tome nakon LK utvrđeno je da CD19+ stanice pozitivno koreliraju sa brojem CD4+P+ stanicama, pri čemu se povećao i udio P+ stanica, unutar CD4+ populacije stanica (Slika 60)



Slika 60. Odnos B limfocita sa T limfocitima i NK stanicama nakon laparoskopiske operacije

## 5. RASPRAVA

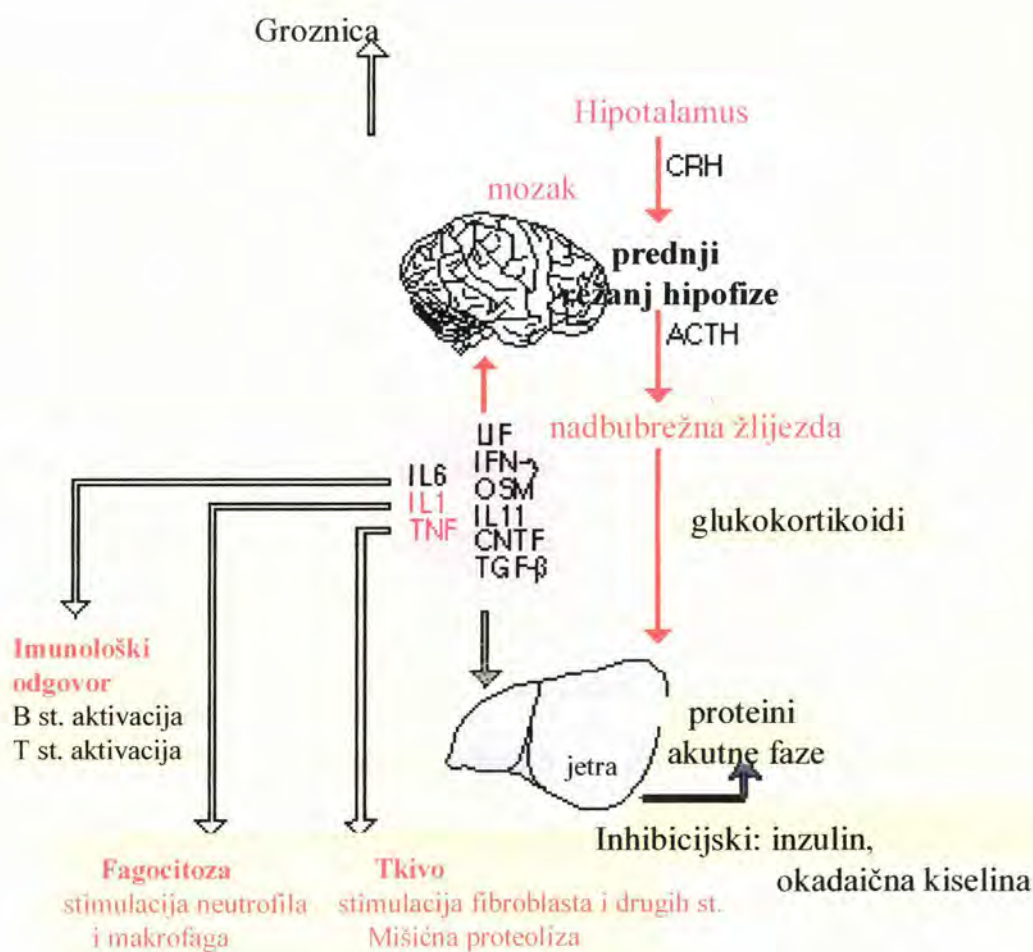


Cilj opisanih istraživanja bio je utvrditi promjene u imunološkom statusu bolesnika, nakon klasične i novije-laparoskopske kolecistektomije. Budući da je LK kraća i lakša operacija, očekivalo se da će manja trauma proizvesti i manji imunosupresiju, što je i potvrđeno u brojnim radovima drugih autora (152, 153). U literaturi međutim, nismo našli puno podataka u mogućoj ulozi NK stanica i citotoksičkih T limfocita u ovom području, kao niti detaljnih podataka o izvršnim mehanizmima ovih stanica nakon ovih dviju operacija. Usto, gotovo da i nismo naišli na podatke o regulacijskim mehanizmima, kojima se u ljudi nadziru funkcije perforin+ stanica u stanjima operativnog stresa i kolestaze.

Nasuprot tome, podaci o imunosupresivnim učincima operacija su relativno dobro poznati. Opisane su izravne i neizravne promjene u nespecifičnoj i specifičnoj imunosti, koje nastaju zbog udruženog djelovanja anestezije, traume i operativnog stresa (154, 155). Operacija, naime, kao stresna reakcija aktivira hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu (HHA) i simpatički nervni sustav (locus ceruleus–noradrenergički sustav), što posredstvom višestrukih promjena u neuroendokrinoj homeostazi može indirektno utjecati na migraciju limfocita i njihove funkcije (154-156). Aktivacija hipotalamusa, pritom, može biti potaknuta psihičkim stresom ili anestezijom, koji utječu na hipotalamus posredstvom moždane kore i limbičkog sustava. No, aktivacija obih osovina može nastati i zbog signala, koji dolaze iz periferije, posredstvom aferentnih živčanih impulsa ili putem citokina, koji se mobiliziraju iz traumatiziranog područja i dolaze u CNS (156). Kompleksnosti zbivanja pridonose i promjene u dopaminskom i endorfinskom sustavu, te periferno lučenje CRF i drugih hormona i neurotransmitera iz simpatičkih i senzoričkih nervnih okončina, koji potom mijenjaju funkcije limfocita izravnim vezanjem za specifične adrenergičke i hormonske receptore eksprimirane na svim limfatičkim stanicama. Usto, treba istaknuti, da regulacijski mehanizmi uključuju i mogućnost stvaranja i sekrecije ne samo različitih citokina iz makrofaga i limfocita, već i

većeg broja hormona podrijetlom iz limfocita, koji mogu biti iste strukture kao i oni što se stvaraju u endokrinom sustavu (157).

U aktivaciji hormonske petlje posebnu ulogu imaju proupalni citokini –TNF alfa, IL-1 i IL-6, koji prolaze hematoencefalnu barijeru i stimuliraju lučenje CRF i vazopresina (ADH) iz paraventricularnih jezgara hipotalamusa. Izlučeni kortizol smiruje zatim upalu, djelujući na makrofage i antigen-predodne stanice, kao i na same limfocite suprimirajući daljnje lučenje i djelovanje proupalnih citokina. Istovremeno kortizol na razini jetre potiče stvaranje proteina akutne faze, koji pomažu uklanjanju upale. Neke od ovih kompleksnih odnosa prikazuje slika 61.



Slika 61. Regulacija reakcije akutne faze (modificirano prema 158).

Tijekom akutne faze upale, osim citokina, u plazmi rastu i koncentracije C reaktivnog proteina, serumskog amiloida A, haptoglobina, ceruloplazmina, transferina i  $\alpha$ 2-makroglobulina, koji zbog snažnih antioksidacijskih funkcija imaju važnu ulogu u obrani domaćina. Osim toga, hipersekrecija kortizola, adrenalina i glukagona nakon operacije izaziva obično hiperglikemiju, koja se djelomično veže i uz postojanje inzulinske rezistencije. Metaboličke promjene nastaju i zbog većeg lučenja hormona rasta, te IGF-I, koji pomažu u reparaciji oštećenja u kasnijoj fazi upale (159).

Veliki broj radova pokazuje da nakon operacije dolazi do imunosupresije (155). Ona se veže uz promjene nespecifične i specifične imunosti. Kao što je već rečeno, oštećuju se mehaničke barijere, nastaju promjene u fagocitozi, u sustavu komplementa, sustavu kinina, u koagulacijskom sustavu i slično, a mijenjaju se i mehanizmi vezani uz prirodenu i stečenu imunost. Smanjuje se naročito stanična imunost i to funkcija TH1 limfocita, što se očituje smanjenim stvaranjem IL-2, IFN-gama i TNF- $\alpha$  (154). To rezultira smanjenjem reakcije na proteinske antigene i manjom obranom od raznih intracelularnih patogenih mikroorganizama, te većim rasapom tumorskih metastaza. TH2 odgovor je obično manje suprimiran, kao i humoralna imunost (154), no promjena ovisi i o intenzitetu traume i dužini operacije, te o vremenu analize u odnosu na operaciju. Veća trauma dovodi, izgleda i do većeg porasta IL-6 u plazmi, koji je glavni posrednik u stimulaciji HHA osi (160). Smanjena stanična proliferacija i produkcija IL-2 veže se i uz traumom izazvanu stimulaciju makrofaga koji luče inhibicijske tvari, poput prostaglandina E2 i NO, kao i uz nishodnu regulaciju HLA-DR i kostimulacijskih molekula na APS, što inhibira aktivaciju limfocita. No, inhibicijski učinak traume može nastati i zbog izravne blokade signaliranja posredstvom T staničnog receptora i CD28 molekule, bez blokade procesa antigenske prezentacije na antigen-predočnim stanicama (161).

Operacijom izazvana neravnoteža između pro-upalnih i anti-upalnih citokina, te broja imunokompetentnih stanica često određuje i tip bolesti koji će se možda razviti nakon operativnog stresa (pojava virusne ili parazitarne infekcije, alergija, autoimune bolesti, rasap tumora itd.), kao i vrstu terapije koja bi se mogla primijeniti u određeno vrijeme nakon operacije (163).

S obzirom da je intenzitet traume jedan od čimbenika koji regulira intenzitet promjena u imunološkom sustavu, imunosupresija nakon LK obično je manje izražena. U usporedbi sa klasičnom kolecistektomijom tako je utvrđeno da je pad u broju CD2, CD3 i CD8+ stanica, te u NK subpopulaciji manje izražen (152). Osim toga, primijećeno je da je i supresija TH1 odgovora veća nakon klasične negoli nakon LK (153). Veći operativni stres izazivao je i veće promjene u broju NK stanica u perifernoj krvi, što je obično bilo praćeno i smanjivanjem citotoksične aktivnosti NK stanica (155). Laparoskopska operacija izazivala je i manju lokalnu i sistemsku produkciju citokina i proteina akutne faze, a sugerirano je i da bi insuflacija zraka u abdomen, odnosno indukcija pneumoperitoneuma mogla djelovati i imunostimulacijski (163, 164). Pritom su, čini se bile zaštićene naročito funkcije peritonealnih makrofaga, jer je njihova sposobnost fagocitoze bila manje blokirana negoli nakon klasične operacije (165). Osim toga, primijećeno je da poslijeoperativna hiperkoagulabilnost korelira sa razinom IL-6 u krvi, te da je sklonost ka trombozama manje izražena u bolesnika podvrgnutih LK (166).

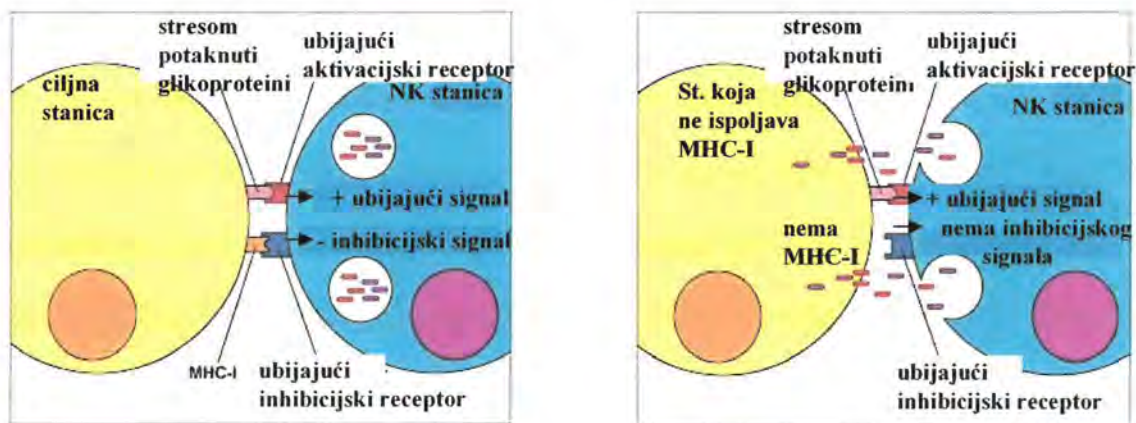
Naši rezultati u tom području odnose se samo na ranu postoperativnu fazu nakon klasične i laparoskopske kolecistektomije (prvih 24h). Uspoređivane su preoperativne i postoperativne vrijednosti pojedinih varijabli nakon svake operacije, a vrijednosti su uspoređivane međusobno i sa nalazima u zdravih ljudi. Utvrdili smo da obje operacije izazivaju jednakomjernu postoperativnu upalu praćenu leukocitozom (Sl. 21), neutrofilijom i monocitozom (Sl. 22), no samo klasična operacija izazivala je i statistički značajnu

trombocitozu (Sl. 21). Obje su operacije smanjile i frekvenciju P<sup>+</sup> stanica unutar CD8<sup>+</sup> subpopulacije limfocita (Sl. 33, 34), no klasična operacija je osim toga bila praćena i značajnim padom postotka CD56<sup>+</sup> stanica (Sl. 27.) i većom produkcijom B limfocita (CD19<sup>+</sup> stanice) (Sl. 23). Nasuprot tome, nakon laparoscopske operacije statistički je značajno porastao postotak CD16<sup>+</sup> P<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ) i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica ( $p < 0.0008$ ) (Slika 27), što je bilo praćeno i većom frekvencijom P<sup>+</sup> stanica unutar populacije CD56<sup>+</sup> NK stanica (Sl. 33;  $p < 0.02$ ), te porastom prosječnog sadržaja perforina u ovim stanicama (Sl. 34). Rezultati, dobiveni u prvoj grupi bolesnika, su u skladu sa opažanjima o većom imunosupresivnom djelovanju intenzivnije traume na T limfocite i mogućem skretanju citokinskog profila prema TH2 odgovoru, koji potiče proliferaciju B limfocita (153), a rezultati postignuti nakon laparoscopske operacije potvrđuju one koji govore o stimulacijskom djelovanju pneumoperitoneuma (167) na NK stanice. Ovi naši rezultati su, čini se, među prvim literaturnim podacima, koji pokazuju da laparoscopska operacija povećava postotak i sadržaj perforina u NK stanicama periferne krvi. Budući da su među imunim stanicama upravo NK stanice- najagresivnije stanice, koje sačinjavaju prvu liniju obrane od virusno promijenjenih stanica i tumorskih stanica, te od aberantnih vlastitih stanica, ovaj rezultat ukazuje na određene prednosti laparoscopske kolecistektomije.

NK stanice imaju, naime, sposobnost prepoznavanja određenih ciljnih stanica bez prethodnog kontakta sa tim stanicama, jer sadrže genetski pre-programirane NK receptore. Nakon aktivacije imaju sposobnost izravnog ubijanja ciljnih stanice, te brzog lućenja antivirusnih i proupalnih citokina tipa IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . U normalnim okolnostima njihova aktivnost je zakoćena, jer su aktivacijski signali blokirani kontaktom inhibicijskih KIR receptora (KIR-prema eng. Killer immunoglobulin-like receptors) sa antigenima MHC sustava razreda I, koje ispoljavaju sve nukleirane stanice u zdravom tkivu. Gubitak MHC antigena, odnosno HLA ekspresije na virusnim i tumorski promijenjenim stanicama otklanja, međutim,

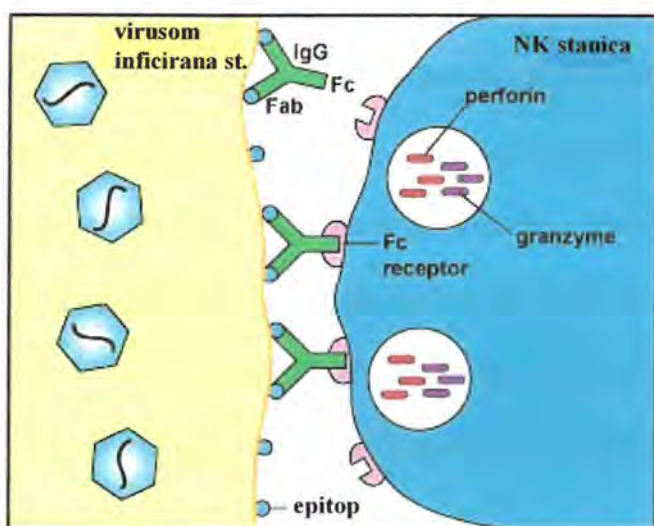
ovu inhibiciju, pa NK stanica počinje lučiti medijatore, kojima ubija ciljnu stanicu. Procesom egzocitoze počinju se izlučivati perforini i granzimi, odnosno proteolitički proteini, koji imaju sposobnost izazivanja pora na ciljnoj stanici. Granzimi ulaze kroz pore u stanicu, gdje aktiviraju pro-apoptične enzime, koji uništavaju ciljnu stanicu izazivajući razgradnju strukturnih citoskeletnih proteina i kromosoma. Preostale segmente inficirane stanice odstranjuju zatim fagociti. Poznato je da u perifernim CD8+ CD4- T limfocitima sintezu perforina induciraju IL-2 i IL-1, te da IL-2-induciranu sintezu perforina može povećati i IL-6, koji sam po sebi nema tu sposobnost (168-171).

Do sada su okarakterizirane tri porodice inhibicijskih receptora: 1) KIR (killer cell Ig-like receptori) u ljudi, 2) Ly49 lektinu slični receptori u miša i 3) CD94/NKG2A lektinski receptori u obje vrste. Aktivacijski receptori su pak klasificirani u 7 različitih vrsta, a mogu biti specifični za klasične i za ne-klasične MHC molekule (172). Naglasio bih, da aktivaciju NK stanica mogu potaknuti i različite stresom inducirane molekule, koje oštećena stanica počinje eksprimirati na svojoj površini, a prepoznaju je aktivacijski receptori. Ligandi za aktivacijski NKG2D receptor u ljudi su obično ne-klasične MHC molekule poput MICA (prema eng. MHC class I chain-related gene A), MICB i UL-16 (herpes simplex virus I unique long genome region-16) (173).



Slika 62. Prema Doc Kaiser's Microbiology Home Page, 2003.

U nekim slučajevima NK stanica može dovesti i do lize ciljne stanice. Tada se Fab fragment protutijela veže na epitope "strane" stanice, što potiče oslobađanje perforina i kemokina.



Slika 63. Prema Doc Kaiser's Microbiology Home Page (174).

Dodatna pogodnost laparoskopske operacije je svakako i nalaz manje trombocitoze, koja bi mogla izazvati nove postoperativne komplikacije.

Do sada raspravljeni rezultati su u skladu sa opažanjima drugih autora, no istovremena analiza metaboličkih sastojaka u plazmi i proteina akutne faze pokazala je da se pri analizi promjena u imunološkom sustavu treba voditi računa i o dodatnim čimbenicima. Usporedbe među grupama pokazale su, naime, da među ispitanicima postoje velike i statistički značajne razlike u brojnim varijablama ne samo poslije, već i prije same operacije. Naime, iako su svi bolesnici, imali žučne kamence, pokazalo se da su oni s intenzivnijom kolestazom u pravilu bili upućivani na klasičnu operaciju. O tome govore nalazi povišene vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina, aminotransferaza (ALT; AST i GGT), te alkalne fosfataze. Usto, ti bolesnici su imali i povišene vrijednosti CRP u plazmi, što je upućivalo na prisustvo kronične upale. U usporedbi sa zdravim ljudima, bolesnici upućeni na klasičnu kolecistektomiju imali su, najvjerojatnije zbog toga, već prije operacije u perifernoj krvi značajno više vrijednosti

CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica i značajno veći broj P<sup>+</sup> stanica unutar CD3<sup>+</sup> populacije stanice. Istovremeno, oni su već preoperativno, imali značajno manje vrijednosti CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica. Rezultati su upućivali na zaključak da kolestaza i kronična upala potiču stvaranje CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, a smanjuju broj NK stanica. Da bi dokazali ovu hipotezu pojedini metabolički parametri nađeni, prije operacije, u krvi svih bolesnika sa žučnim kamencima korelirani su sa vrijednostima T i B limfocita, te sa NK stanicama u krvi svakog bolesnika upućenom na operaciju. Nalaz statistički značajne pozitivne korelacije između vrijednosti alkalne fosfataze u krvi i postotka CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica, te razine CRP u krvi i postotka CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica jasno je potvrdio ovu hipotezu. Nasuprot tome, CRP u krvi negativno je korelirao sa frekvencijom P<sup>+</sup> stanica unutar CD16<sup>+</sup> populacije.

Indukcija CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica vezana uz kolestazu i kroničnu upalu malo je poznata. Klasični CD4<sup>+</sup> T limfociti su, naime stanice koje luče citokine tipa TH1 (IL-2) ili TH2 (IL-4), vršeći pomagačku funkciju drugim T ili B stanicama. Tek posljednjeg desetljeću ističe se da neki CD4<sup>+</sup> T limfociti u *in vitro* uvjetima mogu imati i citotoksična svojstva (175-177). Godine 2002. godine opisuju ih Appay i sur. (176) kao *in vivo* ekspandirani klon limfocita u bolesnika sa ranom fazom HIV infekcije. U tom ispitivanju, prema fenotipskim osobitostima, to su bile zrele CD4<sup>+</sup> stanice s pamćenjem, koje su tijekom maturacije izgubile kostimulacijske molekule CD28 i CD27, a koje su intracelularno ispoljavale citotoksična granula i perforin, poput CD8<sup>+</sup> T limfocita. Prema njihovim podacima, te stanice imaju malu moć proliferacije (Ki-67-) i slabu sposobnost lučenja IL-2, no one kao dugo-živuće stanice intenzivno ekspimiraju Bcl-2 molekulu (177). Budući da su ih našli u ranim stadijima HIV infekcije raspravljali su o mogućnosti da se tijekom virusne infekcije CD4<sup>+</sup> P<sup>+</sup> T limfociti stvaraju zbog skretanja imunološkog prepoznavanja prema MHC-molekulama klase II, jer virusi izbjegavaju prepoznavanje putem CD8<sup>+</sup> T limfocita izazivajući nishodnu regulaciju



MHC-antigena klase I. Posebno se naglašava i mogućnost da se ove stanice generiraju pod utjecajem IL-15, koji se intenzivno stvara u područjima kronične upale (177).

Prema tome, CD4+P+ stanice, opažene u naših bolesnika sa kolestazom, su možda citotoksički CD4+ T limfociti, čije stvaranje je potaknula kolestaza i kronička upala, izazvana žučnim kamencima. Treba, međutim, naglasiti da bi CD4+P+ stanice mogle biti i NKT stanice, koje pripadaju populaciji "primitivnih" limfocita, a filogenetski se nalaze između NK stanica i T limfocita (178-181). Ovi primitivni limfociti nastaju iz primordijalnih makrofaga u intra-epitelijalnim regijama različitih organa, a prisutni su u jetri, slezeni i koštanoj srži. Moguće je da se u određenim uvjetima stvaraju ektratimično i to naročito u jetri, iako ima i suprotnih mišljenja, koja smatraju da su ove jetrene NKT stanice zapravo subpopulacija timičnih NKT stanica, koje su proliferirale na periferiji (181). U svakom slučaju te NKT stanice su restriktivne na CD1d antigene, odnosno na neklasične MHC molekule razreda I, koje mogu prezentirati različite endogene i egzogene glikolipidne antigene. Na svojoj membrani ispoljavaju receptore svojstvene NK stanicama (NK1.1, IL-2Rbeta, CD16, Ly49), ali i T limfocitima, a okarakterizirane su prisustvom invarijantnog T staničnog receptora, sa V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 (u miša) ili V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 (u čovjeka), koji je često udružen sa V $\beta$ 8.2 ili 7.2 (u miša), odnosno sa V $\beta$ 11 (u čovjeka).

Nakon stimulacije ove invarijantne *i*NKT stanice promptno izlučuju velike količine IL-4, IFN-gama, GM-CSF, IL-13 i drugih citokina, djelujući kao važan modulator imunološkog odgovora. Njihov citokinski profil ovisi, izgleda, i o načinu njihove stimulacije, jer aktivacija putem TCR potiče veću sekreciju IL-4, a ona posredstvom NK receptora veću sekreciju IFN-gama (179-181), no zbog njihove heterogenosti učinak im još uvijek nije dobro definiran. U miša se svrstavaju u 4 podvrste, ovisno o tome je su li ili nisu restriktivne na CD1d i imaju li NK1.1 antigene, a u čovjeka su V $\alpha$ 24i samo manji dio CD161<sup>+</sup> T limfocita (182). Njihova sposobnost reagiranja na neproteinske komponentne otkrivena je nakon

stimulacije sa sintetskim glikolipidom  $\alpha$ -galaktozil-ceramidom ( $\alpha$  Gal-Cer), koji je izoliran iz morske školjke, no danas se zna da NKT stanice ne reagiraju samo na egzogene stimulse, već i na brojne endogene glikoproteine i proteine toplinskog šoka porijeklom iz oštećenih vlastitih stanica (185, 186). Dapače, u brojnim pokusima dokazana su njihova autoreaktivna svojstva (178, 183, 187), pa se pretpostavilo da ovi citotoksični autoreaktivni klonovi imaju zadatak da odstranjuju vlastite aberantne stanice, odnosno da sudjeluju u nadzoru nad vlastitim i održavanju tolerancije. Njihovo odsustvo ili blokada, stoga često rezultira nastankom autoimunih bolesti poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa ili dijabetesa tipa I (180, 182). Čini se, da brzini njihove reakcije, doprinosi i činjenica da su pod izravnom simpatičkom kontrolom, jer eksprimiraju mnogo više adrenergičkih receptora, nego li klasični T limfociti (178). Vjerojatno zbog toga dolazi do veće akumulacije NKT stanica na mjestima ekstratimične limfopoeze u svim stanjima kad stres i aktivacija HHA osi potaknu lučenje adrenalina i kortizola i izazovu atrofiju timusa. Stoga različita stanja, poput stresa, infekcije, parcijalne hepatektomije, starenja, trudnoće i sl. pobuđuju stvaranje i/ili nagomilavanje autoreaktivnih NKT klonova stanica u jetri, koji potom reagiraju na autoantigene izlučene iz oštećenih stanica, odstranjujući promijenjene stanice i nadgledajući procese reparacije, modulirajući istovremeno, selektivnom produkcijom citokina, i imunološku na strane antigene (178).

Jetra, čiji imunološki sustav tijekom života reagira na veliku količinu antigena dospjelih portalnom krvlju indukcijom imunosti ili tolerancije, bila je u tim stanjima glavno strateško mjesto koje posredstvom NKT stanica reagira na narušavanje homeostaze (178, 183-185, 187). U tom pravcu govore i najnoviji radovi, koji pokazuju da su upravo invarijantne CD4(+) NKT cells, potrebne za stvaranje regulacijskih CD8+ T stanica za indukciju tolerancije na antigene inokulirane u imunološki privilegirana mjesta (188), kao i da upravo CD1d-restriktivne CD4+ NKT stanice potiču B1 limfocite na produkciju antitijela (189).

Dapače, nedavno je dokazano da glikolipidi, oslobođeni iz kože tijekom inicijacijske reakcije na antigene, izazivaju u roku od par minuta ekspanziju V alfa14+*i* NKT stanica u jetri, koje stvaranjem IL-4 stimuliraju peritonealne B-1 B stanice na produkciju cirkulirajućim antigen-specifičnih IgM protutijela, koja će nakon stvaranja kompleksa sa antigenom, omogućiti ekstravazaciju T limfocita do mjesta ulaska antigena (190).

Opisani podaci pokazuju da bi CD4+P+ limfociti, koji su u pozitivnoj korelaciji sa intenzitetom kolestaze, i ALT i AST u serumu bolesnika sa žučnim kamencima mogle biti autoreaktivne CD4+NKT stanice, koje su nastale zbog toksičkog učinka nagomilanog bilirubina ili žučnih kiselina na hepatocite i druge stanice. Perforinskim mehanizmom one vjerojatno sudjeluju u eliminaciji aberatnih vlastitih stanica, a citokinskom sekrecijom vjerojatno pomažu aktivaciji ostalih antigen specifičnih limfocita. U istom pravcu govore i naši eksperimentalni podaci, koji su pokazali da u miševa sa podvezanim duktus koledokusom nastane jaka ekspanzija NKT stanica u jetri, te da izolirane intrahepatične stanice i stanice slezene imaju citotoksična svojstva prema singeničnim i prema NK-osjetljivim tumorskim linijama (191). Kolestazom inducirana ekspanzija CD4+ T limfocita u perifernoj krvi u ljudi je, međutim, još uvijek slabo poznati podatak.

Ove, kolestazom uzrokovane promjene, bile su dakle vidljive u svih bolesnika sa kolestazom već preoperativno. Analize izvršene nakon klasične, odnosno laparoskopske operacije samo su potvrdile ova opažanja. No, u bolesnika podvrgnutih laparoskopskoj operaciji, utvrdili smo i postojanje pozitivne korelacije između CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica i CD19<sup>+</sup> stanica (nakon laparoskopske operacije), što potvrđuje hipotezu o regulacijskom učinku IL-4 izlučenom iz ovih stanica na B limfocite (sl. 59). Usto, u ovoj grupi smo utvrdili i postojanje dodatne pozitivne korelacije između sindroma kolestaze i P+ NK stanica, te između koncentracije glukoze u krvi i P+ NK stanica (Sl. 53 i 54). Hiperglikemija nakon operacija je obično odraz operacijom-izazvanih hormonskih učinaka u kojima postoji veće lučenje

adrenalina, kortizola i glukagona uz inzulinsku rezistenciju. Ona je obično veća i dugotrajnija nakon klasične operacije, no većoj stimulaciji NK stanica nakon pneumoperitonuma možda pogoduje višak glukoze, što bi stimulacijom inzulinskih receptora možda moglo stimulirati sintezu perforina u ovim stanicama. Opaženo je, naime da suprafiziološke doze inzulina mogu povećati aktivnost individualnih NK stanica, ali i smanjiti broj NK stanica, limfocita i aktiviranih monocita (192). Na funkcije NK stanica mogu utjecati i promjene u mediju poput pO<sub>2</sub>, pH, ili koncentracije glukoze (193), što sugeriraju i naši rezultati. Dapače, slike 56, 57 i 58 pokazuju da koncentracija K<sup>+</sup> i Na<sup>+</sup> u plazmi mogu vrlo značajno pozitivno, odnosno negativno regulirati prosječan sadržaj perforina u NK stanicama. Rezultati su preliminarni, no sugeriraju da bi hiperkalijemija mogla biti vezana uz veće razaranje tkiva, koje bi potaknulo sintezu perforina u regulacijskim NK stanicama. Budući da je citolitičko djelovanje perforina i stvaranje transmembranskih pora ovisno o Ca<sup>++</sup>, vrlo je vjerojatno da plazmatske promjene u koncentraciji Na<sup>+</sup> utječu na Ca<sup>++</sup>/Na<sup>+</sup> kanale i na membrani limfocita i NK stanica, no ove hipoteze zahtijevaju dodatna istraživanja. Ipak, treba istaknuti, da u mnogim stanicama, proteini toplinskog stresa izazivaju porast koncentracije slobodnih Ca<sup>++</sup> unutar stanice, što dovodi do aktivacije niza staničnih reakcija. U T limfocitima, tako stimulacija HSP aktivira apoptotičke puteve na ovim stanicama uz veću produkciju NO. Toplinski stres povećava [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, smanjujući aktivnost Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivača za vanstanični Ca<sup>2+</sup>. Pretpostavlja se da to nastaje zbog toga što toplina povećava fosforilaciju cNOs, vezanog za Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivač, smanjujući njegovu aktivnost. Ovaj proces, zatim povećava ekspresiju Fas/CD95 na staničnoj površini, čineći stanice osjetljivijima na apoptozu (194), a regulacijski učinci Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivača opisani su i na brojnim drugim stanicama (195, 196). Slični regulacijski učinci Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivača opaženi su i na aktiviranim T limfocitima (197, 198), te na aktiviranim makrofazima, gdje izgleda prevlada djelovanje crpka, koje izbacuju Ca<sup>++</sup>, nakon njegovog nakupljanja u stanicama (199). Osim toga, poznato je da o aktivnosti

Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivača izravno ovisi i NK stanicama posredovana citoliza, pa svako stanje koje blokira izbacivanje Ca<sup>++</sup> iz stanice, kao što je niska izvanstanična koncentracija Na<sup>+</sup>, potiče perforinom - posredovanu citolizu Yac-1 stanica (200, 201). Naši rezultati sugeriraju osim toga, da nakon klasične operacije suvišak neutrofila u krvi smanjuje ukupni broj cirkulirajućih P<sup>+</sup> stanica i CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica, a povećava njihov prosječni sadržaj perforina (Slike 35 i 36). To bi moglo značiti da mijeloperoksidaze i vodikov peroksid iz neutrofilna možda blokiraju aktivnosti citotoksičkih limfocita, kao što je to dokazano za NK stanice (202), no nije isključeno da se postotak ovih stanica u krvi smanjuje samo zbog velikog udjela granulocita u krvi čovjeka.

U postoperativnom periodu primijetili smo i vrlo značajnu korelaciju između broja trombocita i frekvencije P<sup>+</sup> stanica unutar CD8<sup>+</sup> subpopulacije stanica, uz negativnu korelaciju prema P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanicama, što bi se možda moglo vezati uz opažanje da u žutici aktivirani mononuklearni makrofazi više secerniraju prokoagulantne faktore (203, 204, 205).

U zaključku bismo istaknuli da dobiveni rezultati sugeriraju da laparoskopjska operacija izaziva manju postoperativnu upalu i imunosupresiju, kao i ekspanziju CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> NK stanica u perifernoj krvi, no u obje grupe bolesnika, veći broj uočenih promjena u staničnoj imunosti mora se promatrati u sklopu kolestaze i kronične upale, koja je uzrokovana žučnim kamencima, te u sklopu metaboličkih i elektrolitnih promjena, koje su nastale kao posljedica osnovne bolesti. Pritom, regulacijski djeluju ne samo postoperativni stres i aktivacija neuroendokrinog sustava, već i brojne promjene koje se induciraju zbog primarnog oštećenja jetre, koja je glavno mjesto stvaranja ili djelovanja regulacijskih NKT stanica, odnosno CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> citotoksičnih T limfocita, koji sudjeluju u imunološkom nadzoru.

## **6. ZAKLJUČNI PREGLED**

*U radu su uspoređene imunološke i biokemijske promjene u perifernoj krvi bolesnika sa žučnim kamencima, prije i nakon klasične kolecistektomije (KK), odnosno laparoskopske kolecistektomije (LK). Nalazi, dobiveni u pojedinoj grupi uspoređivali su se međusobno, te sa nalazima zdrave grupe ispitanika. Osim toga izvršeno je i ispitivanje međuodnosa biokemijskih i imunoloških varijabli u svakog pojedinog bolesnika sa žučnim kamencima prije operacije, te nakon dviju različitih operacija.*

Dobiveni su sljedeći rezultati:

## **RAZLIKE MEĐU GRUPAMA**

### **Metaboličke promjene u serumu**

1. Preoperativne vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina, alkalne fosfataze, aminotferaza i GGT bile su veće u bolesnika podvrgnutih klasičnoj kolecistektomiji, nego li u bolesnika, izabranih za laparoskopsku operaciju, upućujući na veći stupanj kolestaze u prvoj grupi ispitanika.
  - Nakon LK lagano su porasle koncentracija bilirubina, ATL i AST.
2. U bolesnika prve grupe utvrđene su i više preoperativne vrijednosti CRP, IL-6 i TNF-alfa.
  - Nakon obje vrste operacija dodatno su porasle CRP, a nakon KK i vrijednosti IL-6 i TNF-alfa.
3. Vrijednosti glukoze, ureje i kreatinina u obje grupe bolesnika nisu odstupale od kontrola u zdravih osoba.
  - Nakon LK opaženo je veće smanjenje koncentracije ureje.

## Hematološke promjene

1. Preoperativne vrijednosti leukocita, eritrocita i trombocita bile su unutar normalnih vrijednosti.
  - Nakon obje vrste operacija opažena je leukocitoza sa neutrofilijom i monocitozom, a nakon KK i značajna trombocitoza.
  - Nakon LK značajno se smanjio broj limfocita.
2. Preoperativne proporcije T limfocita ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  i  $CD8^+$  stanica) i B limfocita ( $CD19^+$  stanica) bile su unutar normalnog raspona.
  - Nakon KK porasla je proporcija  $CD19^+$  stanica.
3. Preoperativne proporcije NK stanica ( $CD16^+$ ,  $CD56^+$ ) bile su unutar normalnog raspona, no vrijednosti  $CD16^+$  stanica, bile su više u prvoj grupi bolesnika.
  - Nakon KK značajno se smanjio postotak  $CD56^+$  stanica

### Perforin+ stanice

1. U bolesnika I grupe pre-operativno bilo je prisutno značajno više perforin<sup>+</sup> stanica i to prvenstveno  $CD4^+P^+$  stanica, koje su imale i veći prosječni sadržaj perforina. U obje grupe bolesnika preoperativno, bio je veći i udio  $P^+$  stanica unutar  $CD3^+$  populacije.
2. Nakon LK smanjio se postotak  $CD8^+P^+$  stanica.
3. Objе grupe bolesnika imale su pre-operativno manje vrijednosti  $CD16^+$  i  $CD56^+$  izražene u postotku, no u grupi II preoperativno je opažen veći postotak  $P^+$  stanica unutar  $CD56^+$  populacije stanica.
  - Nakon LK značajno se povećao postotak  $CD16^+P^+$  i  $CD56^+P^+$  stanica, kao i udio  $P^+$  stanica, unutar  $CD56^+$  populacije. Osim, toga u ovoj subpopulaciji porastao je i prosječni intenzitet fluorescencije za perforin.



## MEĐUSOBNİ ODNOSI POJEDINIHI VARIJABLI

Analizom uzoraka krvi prije operacije utvrđeno je slijedeće:

- U bolesnika sa žučnim kamencima postoji vrlo značajna pozitivna korelacija između koncentracija ukupnog i direktnog bilirubina u krvi i koncentracija AP, AST i GGT, CRP, što je tipično za sindrom kolestaze.
- Razina AP u plazmi je u pozitivnoj korelaciji sa postotkom CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica, i relativnim postotkom P<sup>+</sup> stanica, unutar CD4 subpopulacije. Sličan odnos utvrđen je i između ALT i postotka CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica.
- Razina CRP je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim brojem P<sup>+</sup> stanica, te sa postotkom CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica i relativnim postotkom P<sup>+</sup> stanica unutar CD4 subpopulacije. Razina CRP je, međutim, u negativnoj korelaciji sa postotkom CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica.
- Monociti u perifernoj krvi su u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim postotkom P<sup>+</sup> stanica, te sa CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama.
- Trombociti u perifernoj krvi su u pozitivnoj korelaciji sa postotkom CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica, a u negativnoj korelaciji sa postotkom CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica.

## MEĐUSOBNİ ODNOSI NAKON KLASIČNE I LAPAROSKOPSKE

### KOLECISTEKTOMIJE

Klasična kolecistektomija, odnosno laparoscopska kolecistektomija

- Ukupni bilirubin, AP i GGT su u pozitivnoj korelaciji sa postotkom CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica.
- UB i AP su u pozitivnoj korelaciji ukupnom brojem P<sup>+</sup> stanica, CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama, relativnim postotkom P<sup>+</sup> unutar CD4<sup>+</sup> stanica, te sa CD56<sup>+</sup> stanicama.

- GGT je u pozitivnoj korelaciji sa prosječnim sadržajem perforina u CD16<sup>+</sup> stanicama
- *UB i AP, te AST i GGT su u pozitivnoj korelaciji sa CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama.*
- Neutrofili u krvi su u negativnoj korelaciji sa postotkom CD8<sup>+</sup> stanica, ukupnim brojem P<sup>+</sup> stanica i sa postotkom CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica. Istovremeno u neutrofiliji raste prosječan sadržaj perforina u CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima, a sličnu ushodnu regulaciju perforina u CD3 i CD8 limfocitima, te u CD56 i CD16 stanicama izazivala je i monocitoza u perifernoj krvi.
- *Broj neutrofila i monocita je u negativnoj korelaciji sa brojem CD19<sup>+</sup> stanica.*
- *Monociti su u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem u CD3, CD8 i CD16 stanicama.*
- *Razina CRP u krvi pozitivno korelira sa postotkom CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica u krvi, izazivajući isto i nishodnu regulaciju perforina u CD4 i CD8 stanicama*
- Broj eritrocita je u negativnoj korelaciji sa ukupnim postotkom P<sup>+</sup> stanica, CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama, a u pozitivnoj korelaciji sa postotkom CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama.
- *Razina glukoze u krvi je u postotkom CD16<sup>+</sup> P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama, a u negativnoj korelaciji sa postotkom CD3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> stanica.*
- Razina natrija u krvi je u negativnoj korelaciji sa prosječnim intenzitetom fluorescencija za perforin u CD3<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima, te na CD16<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> NK stanicama.
- *Razina natrija u krvi je u negativnoj korelaciji sa prosječnim intenzitetom fluorescencije perforina u CD3<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima, te na CD16<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> NK stanicama.*

- Razina kalija u krvi je u pozitivnoj korelaciji sa brojem CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanicama, a dovela je i do porasta sadržaja perforina u CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima, te u CD16<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> stanicama.
- *Razina kalija u krvi je u pozitivnoj korelaciji sa postotkom CD56<sup>+</sup> stanica.*

## SUMARNI ZAKLJUČAK

U bolesnika sa kolelitijazom dio promjena u imunološkom sustavu nastaje zbog kolestaze, koja povećava prvenstveno broj CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica. Dodatni učinak imaju upala (CRP, proupalni citokini, monociti) i trombociti.

Laparoskopska operacija ima, čini se, veći stimulacijski učinak na NK stanice, jer značajno povećava postotak CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica, te udio P<sup>+</sup> stanica, unutar CD56<sup>+</sup> populacije, kao i prosječni intenzitet fluorescencije za perforin u ovoj subpopulaciji, no na imunološki status nakon operacije utječu i promjene u elektrolitnom statusu, odnosno u koncentracijama Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>, kao i promjene u koncentraciji glukoze u krvi (LK), pa je konačna interpretacija zbivanja moguća jedino uz razmatranje složenog međuodnosa svih varijabli.

## 7. LITERATURA

1. Pixley F, Wilson D, McPherson K, Mann J. Effect of vegetarianism on development of gallstones in women. *BMJ* 1985; 291: 11-2.
2. Bateson MC. Gallbladder disease and cholecystectomy rate are independently variable., *Lancet* 1984;2:621-4.
3. Grodstein F, Colditz GA, Hunter DJ, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ. A prospective study of symptomatic gallstones in women: relation with oral contraceptives and other risk factors. *Obstet Gynaecol* 1994;82:207-14.
4. Rim AA, Werner LH, Van Yserloo B, Bernstein RA. Relationship of obesity and disease in 73,532 weight-conscious women. *Public Health Rep* 1975;90: 44-51.
5. Maclure KM, Hayes KC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC. Weight, diet and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *N Engl J Med* 1989;9:563-9.
6. Liddle RA, Goldstein RB, Saxton J. Gallstone formation during weight reduction dieting. *Arch Intern Med* 1989;149:1750-3.
7. Pastides H, Tzonou A, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Trichopoulou A, Kefalogiannis N, Manousos O. A case control study of the relationship between smoking, diet and gallbladder disease. *Arch Intern Med* 1990;150:1409-1412.
8. De Santis A, Attili AF, Ginanni Corradini S, Scafato E, Cantagalli A, De Luca C, Pinto G, Lisi D, Capocaccia L., Gallstones and diabetes: a case-control study in a free-living population sample, *Hepatology* 1997;4:787-90.
9. Maggi A, Solenghi D, Panzeri A, Borroni G, Cazzaniga M, Sangiovanni A, De Fazio C, Salerno F., Prevalence and incidence of cholelithiasis in patients with liver cirrhosis., *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;4:330-5.
10. Malcolm C Bateson, Gallbladder disease, *BMJ* 1999;318:1745-8.

11. Heaton KW, Braddon FEM, Mountford RA, Hughes AO, Emmett PM. Symptomatic and silent gallstones in the community. *Gut* 1991;32:316-20.
12. Attili AF, Carulli N, Roda E, Barbara B, Capocaccia L, Menotti A, et al. Epidemiology of gallstone disease in Italy: prevalence data of the multicentre Italian study on cholelithiasis. *Am J Epidemiol* 1995;141:158-65.
13. Vibert E; Azoulay D Alithiasic cholecystitis in the adult: etiologies, diagnosis and treatment *Chir* 2002;127:330-6.
14. Bateson MC. Gallstones and cholecystectomy in modern Britain. *Postgrad Med J* 2000 901:700-3.
15. Lam C-M, Murray FE, Cuschieri A. Increased cholecystectomy rate after the introduction of laparoscopic cholecystectomy in Scotland. *Gut* 1996;38:282-4.
16. Gurleyik G, Gurleyik E, Ozturk A, Unalmiser S. Gallbladder carcinoma associated with gallstones, *Acta Chir Belg* 2002;3:203-6.
17. Perissat J, Collet D, Belliard R. Gallstones: laparoscopic treatment-cholecystectomy, cholecystostomy and lithotripsy. Our own technique. *Surg Endosc* 1990;4:1-5.
18. McSherry CK. Cholecystectomy: the gold standard. *Am J Surg* 1989;158:174-8.
19. Waldhausen JH; Benjamin DR. Cholecystectomy is becoming an increasingly common operation in children. *Am J Surg* 1999;177:364-7.
20. Kumar R; Nguyen K; Shun A, Gallstones and common bile duct calculi in infancy and childhood, *Aust N Z J Surg* 2000;70:188-91.
21. Rescorla FJ. Cholelithiasis, cholecystitis, and common bile duct stones, *Curr Opin Pediatr* 1997;9:276-82.
22. Mouret G. From the first laparoscopic cholecystectomy to the frontiers of laparoscopic surgery. The prospective futures. *Dig Surg* 1991;8:124-5.
23. Duhois F, Icard P, Berthelot G i sur. Coelioscopic cholecystectomy: preliminary report

- of 36 cases. *Ann Surg* 1989;191:271-5.
24. Reddick EJ, Olsen DO. Laparoscopic cholecystectomy. A comparison with mini-lap cholecystectomy. *Surg Endos* 1989;3:131-3.
  25. Bercy G. Coelioscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 1990;212:649-51.
  26. Zucker KA, Bailey RW, Gadacz TR, Imbembo AL. Laparoscopic guided cholecystectomy. *Am J Surg* 1991;161:36-44.
  27. Cusehieri A, Terblanche J. Laparoscopic cholecystectomy: evolution, not revolution. *Surg Endosc* 1990;4:125-6.
  28. Perissat J, Collet D, Belliard R. Gallstones: laparoscopic treatment. Intracorporeal lithotripsy followed by cholecystostomy or cholecystectomy. A personal technique. *Endoscopy* 1989;21:373-4.
  29. Perissat J, Collet D, Belliard R, Dost C, Bikandou G. Cholecystectomie par laparoscopie. La technique operateure. Les resultats des 100 premieres observations. *J Chir (Paris)* 1991;127:347-55.
  30. Del Pin CA, Arthur KS, Honig C, Silverman EM. Laparoscopic cholecystectomy: relationship of pathology and operative time. *JLS* 2002;6:149-54.
  31. Ubiali P, Invernizzi R, Prezzati F. Laparoscopic surgery in very acute cholecystitis. *JLS* 2002;6:159-62.
  32. Chahin F, Dwivedi A, Chahin C, Agrawal S, Alnajjar S, Silva YJ. The laparoscopic challenge of cholecystitis. *JLS* 2002;6:155-8.
  33. Nyarwaya JB, Samii K. Anesthesie pour la chirurgie digestive coelioscopique. In: *Chirurgie digestive par voie coelioscopique*. Maloine. Paris. 1991;17-26.
  34. Uemura N, Nomura M, Inoue S, Endo J, Kishi S, Saito K, Ito S, Nakaya Y. Changes in hemodynamics and autonomic nervous activity in patients undergoing laparoscopic

cholecystectomy: differences between the pneumoperitoneum and abdominal wall-lifting method. *Endoscopy* 2002;34:643-50.

35. Korkmaz A, Alkis M, Hamamci O, Besim H, Erverdi N., Hemodynamic changes during gaseous and gasless laparoscopic cholecystectomy, *Surg Today* 2002;32:685-9.
36. Holcomb GW; Morgan WM; Neblett WW; Pietsch JB; O'Neill JA; Shyr Y, Laparoscopic cholecystectomy in children: lessons learned from the first 100 patients, *J Pediatr Surg* 1999;34:1236-40.
37. Clements RH; Holcomb GW, Laparoscopic cholecystectomy, *Curr Opin Pediatr* 1998;10:310-4.
38. Al-Fozan H, Tulandi T., Safety and risks of laparoscopy in pregnancy, *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002;14:375-9.
39. McMahon AJ, Fischbacher CM, Frame SH, MacLeod MC., Impact of laparoscopic cholecystectomy: a population-based study, *Lancet* 2000;356:1632-7.
40. Perissat J, Collet D, Belliard R. La lithotritie des calculs vésiculaires. In: *Chirurgie digestive par voie endoscopique*. Maloine. Paris. 1991;103-12.
41. Reddick EJ, Olsen DO. Outpatient laparoscopic laser cholecystectomy. *Am J Surg* 1990;160:485-9.
42. Thomas Lamont J. Post operative jaundice. *Surg Clin North Am* 1974;54:637-45.
43. Lygidakis NY, Tytgat GNJ: Postoperative jaundice. In: Theime G (Ed.). *Hepatobiliary and pancreatic malignancies*. New-York: Verlag-Stuttgart, 1989; pp.399-402.
44. Halevy A, Gold-Deutch R, Negri M, Lin G, Schelmokovich N, Evans S, Cotarin D, Scapa E, Behar M, Sacier J: Are elevated liver enzymes and bilirubin levels significant after laparoscopic cholecystectomy in the absence of bile duct injury? *Ann Surg* 1994; 219:362-4.



45. Holub Z., Impact of laparoscopic surgery on immune function, *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002;29:77-81.
46. Petrocelli P, Giannessi S, Corsale I, Colugnat D, Lucherini M, Cerone M, Matocci G. A modified technique of gallbladder dissection from the liver during laparoscopic cholecystectomy. *Minerva Chir* 2002;57:521-5.
47. Regoly-Merei J; Ihasz M, Bile duct injuries in laparoscopic cholecystectomy. A computerized analysis of 148 lesions in 24,440 operations in 89 Hungarian institutes
48. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1996;113:600-2.
49. Testas P, Delaitre B. *Chirurgie digestive par voie coelioscopique*. 1991;Maloine, Paris
50. Delaitre B, Fontes-Disler I, Collet D. Les complications de la chirurgie digestive par coelioscopie. In: *Chirurgie digestive par voie coelioscopique*. 1991;Maloine. Paris, pp 187-97.
51. Mintz M. Les accidents de la coelioscopie et leur prophylaxie. *Contracept Fertil Sexual* 1984;12:927-8.
52. Kane MG, Kreis GJ. Complication of diagnostic laparoscopy in Dallas. A 7 year prospective study. *Gastrointest Endosc* 1984;30:237-41.
53. Yuzpe AA. Pucumoperitoneum needle and trocar injuries in laparoscopy. A survey on possible contributing factors and prevention. *J Reprod Med* 1990;5 485-90.
54. Moossa AR, Easter DW, Van Sonnenberg E, Casola G, D'Agostino H., Laparoscopic injuries to the bile duct. A cause for concern, *Ann Surg* 1992;215:203-8.
55. Ludwig K, Bernhardt J, Steffen H, Lorenz D. Contribution of intraoperative cholangiography to incidence and outcome of common bile duct injuries during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2002;16:1098-104.
56. De Palma GD, Galloro G, Iuliano G, Puzziello A, Persico F, Masone S, Persico G., Leaks from laparoscopic cholecystectomy, *Hepatogastroenterology* 2002;49:924-5.

57. Dashkovsky I; Cozacov JC, Spillage of stones from the gallbladder during laparoscopic cholecystectomy and complication of a retroperitoneal abscess, *Surg Endosc* 2002;16:717.
58. Perissat J. Gallstone laparoscopic treatment: cholecystostomy - holecystectomy and lithotripsy. *Dig Surg* 1991;8:86-91.
59. Kanaan SA, Murayama KM, Merriam LT, Dawes LG, Prystowsky JB, Rege RV, Joehl RJ., Risk factors for conversion of laparoscopic to open cholecystectomy, *J Surg Res* 2002;106:20-4.
60. Cuschieri A. Minimal access surgery and the future of interventional laparoscopy. *Am J Surg* 1991;161:404-7.
61. Schoenfield LJ, Marks JW, Oral and contact dissolution of gallstones., *Am J Surg* 1993;165:427-30.
62. Baum, A., Cohen, L., & Hall, M. Control and intrusive memories as possible determinants of chronic stress. *Psychosomatic Medicine* 1993;55:274-86.
63. Baum, A., O'Keefe, M. K., & Davidson, L. M. Acute stressors and chronic response: The case of traumatic stress. *Journal of Applied Social Psychology* 1990;20:1643-54.
64. Matthews, K. A., Gump, B. B., Block, D R., & Allen, M. T. Does background stress heighten or dampen children's cardiovascular responses to acute stress? *Psychosomatic Medicine* 1997;59:488-96.
65. Delahanty DL, Raimonde AJ, Spoonster E, Cullado M. Injury severity, prior trauma history, urinary cortisol levels, and acute PTSD in motor vehicle accident victims. *J Anxiety Disord.* 2003;17:149-64.

66. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Anderson G, Newcomer JW, Charney DS. Effects of glucocorticoids on declarative memory function in major depression. *Biol Psychiatry*. 2004;55:811-5.
67. Webster JI, Sternberg EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J Endocrinol*. 2004;181:207-21.
68. Glass JM, Lyden AK, Petzke F, Stein P, Whalen G, Ambrose K, Chrousos G, Clauw DJ. The effect of brief exercise cessation on pain, fatigue, and mood symptom development in healthy, fit individuals. *J Psychosom Res*. 2004;57:391-8.
69. Khansari DN, Murgu AJ, Faith RE. Effects of stress on the immune system. *Immunol Today*. 1990;11:170-5.
70. Boscarino, J. A., & Chang, J. C. Higher abnormal leukocyte, and lymphocyte counts 20 years after exposure to severe stress: Research and clinical implications. *Psychosomatic Medicine* 1990;61:378-86.
71. Laudenslager, M. L., Aasal, R., Adler, L., Berger, C. L., Montgomery, P. T., Sandberg, E., Wahlberg, L. J., Wilkins, R. T., Zweig, L., & Reite, M. L. Elevated cytotoxicity in combat veterans with long-term post-traumatic stress disorder: Preliminary observations. *Brain, Behavior, and Immunity* 1998;12:74-9.
72. McKinnon, W., Weisse, C. S., Reynolds, C. P., Bowles, C. A., & Baum, A. Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. *Health Psychology* 1989;8:389-402.
73. Delahanty, D. L., Dougall, A. L., Hawken, L., Trakowski, J. H., Schmitz, J., Jenkins, F. J. & Baum, A. Time course of natural killer cell activity and lymphocyte proliferation in response to two acute stressors in healthy men. *Health Psychology* 1996;15:48-55.

74. Delahanty, D. L., Dougall, A. L., Browning, L. J., Hyman, K. B., & Baum, A. Duration of stressor and natural killer cell activity. *Psychology and Health* 1998;13:1121-34.
75. Wang, T., Delahanty, D. L., Dougall, A. L., & Baum, A. Responses of natural killer cell activity to acute laboratory stressors at different times of day. *Health Psychology* 1998;17:428-35.
76. Irwin, M., Daniels, M., Smith, T. L., Bloom, E., & Weiner, H. Impaired natural killer cell activity during bereavement. *Brain, Behavior, and Immunity* 1987;1:98-104.
77. Delahanty, D. L., Dougall, A. L., Craig, K. J., Jenkins, F. J., & Baum, A. Chronic stress and natural killer cell activity after exposure to traumatic death. *Psychosomatic Medicine* 1997;59:467-76.
78. Burges Watson, I. P., Muller, H. K., Jones, I. H., & Bradley, A. J. Cell-mediated immunity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Medical Journal of Australia* 1993;159: 513-6.
79. Benschop, R. J., Schedlowski, M., Wienecke, H., Jacobs, R., & Schmidt, R. E. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. *Brain, Behavior, and Immunity* 1997;11:321-32.
80. Yehuda, R., Southwick, S., Giller, E. L., Ma, X., & Mason, J. W. Urinary catecholamine excretion and severity of PTSD symptoms in Vietnam combat veterans. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 1992;180:321-5.
81. Heim, C., Ehlert, U., Hanker, J. P., & Hellhammer, D. H. Abuse-related posttraumatic stress disorder and alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in women with chronic pelvic pain. *Psychosomatic Medicine* 1998;60:309-18.

82. Goenjian, A. K., Yehuda, R., Pynoos, R. S., Steinberg, A. M., ; Tashjian, M., Yang, R. K., Najarian, L. M., & Fairbanks, L. A. Basal cortisol, dexamethasone suppression of cortisol, and MHPG in adolescents after the 1988 earthquake in Armenia. *American Journal of Psychiatry* 1996;153:929-34.
83. Blanchard, E. B., Kolb, L. C., Prins, A., Gates, S., & McCoy, G. C. Changes in plasma norepinephrine to combat-related stimuli among Vietnam veterans with post traumatic stress disorder. *Journal of Nervous and Mental Disease* 1991;179:377-83.
84. Navsaria PH, Shaw JM, Zellweger R, Nicol AJ, Kahn D. Diagnostic laparoscopy and diverting sigmoid loop colostomy in the management of civilian extraperitoneal rectal gunshot injuries. *Br J Surg* 2004;91:460-4.
85. Burpee SE, Kurian M, Murakame Y, Benevides S, Gagner M. The metabolic and immune response to laparoscopic versus open liver resection. *Surg Endosc* 2002;16:899-904.
86. Cabin, D. E., & Buchman, T. G. Molecular biology of circulatory shock. III. Human hepatoblastoma (HEPG2) cells demonstrate two patterns of shock-induced gene expression that are independent, exclusive, and prioritized. *Surgery* 1990;108:902-12.
87. Gamulin S., Marušić M., Kovač Z (2002) *Patofiziologija*, Medicinska naklada, Zagreb.
88. Janeway C.A., Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 1996;Stamford Press.
89. Zellweger R., Schwacha M.G., Chaudry I.H. *Immunological Sequelae of Surgery and Trauma*. *Psychoneuroimmunology* 2001; Third edition, vol.2

90. Faist E. Perioperative immunomodulation in patients with major surgical trauma. Immune consequences of trauma, shock, and sepsis edited by Springer – Verlag 1997; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 509 – 17.
91. Zellweger, R., Ayala, A., Schmand, J. F., Morrison, M. H., & Chaudry, I. H. PAF-antagonist administration after hemorrhage-resuscitation prevents splenocyte immunodepression. *Journal of Surgical Research* 1995;59:366-70.
92. Jaeschke, H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chemical-Biological Interactions* 1991;79:115-36.
93. Neligan P, Bateson MC, Trash DB, Ross PE, Bouchier IA., Ursodeoxycholic acid for the dissolution of radiolucent gall bladder stones, *Digestion* 1983;28:225-33.
94. Blalock JE, Smith E. A Complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. *Federation Proceedings* 1995;44:108-11.
95. Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 2001;22:432-7.
96. Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 1988;31:337-42.
97. Okuyama R, Abo T, Seki S i sur. Estrogen administration activated extrathymic T cell differentiation in the liver. *J Exp Med* 1992;175:661.
98. Abe M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors: role of these progenitors as immunogenic resident antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol* 2001;34:61-7.
99. They C, Amigorena S. Curr. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Opin Immunol* 2001;13:45-51.

100. Clark GJ, Angel N, Kato M i sur. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection* 2000;2:257-72.
101. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The Toll of Innate Immunity on Microbial Pathogens. *New Engl J Med*. 1999;340:1834-5.
102. Clark GJ, Angel N, Kato M i sur. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection* 2000;2:257-72.
103. Takayama E, Seki S, Ohkawa T i sur. Mouse CD8+ CD122+ T cells with intermediate TCR increasing with age provide a source of early IFN-gamma production. *J Immunol* 2000;164:5652-8.
104. Lenzen S, Panten U. Alloxan:history and mechanism of action. *Diabetologia* 1988;31:337-42.
105. Shimamura M, Ohteki T, Launois P, Garcia AM, MacDonald HR. Thymus-independent generation of NK 1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J Immunol* 1997;158:3682-89.
106. Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. Bacteria in the blood stream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J Immunol* 1996;157:2514-20.
107. Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol*. 2001;22:432-7.
108. Aterman K. The stem cells of the liver - a selective review. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118:87-115.
109. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:783-836.
110. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34.

111. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of Cytokines Secretion Patterns and Function of Helper T Cells. *Adv Immunol* 1989;46:111-142.
112. Laskin DL. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 1996;24:112-8.
113. Bouwens L. Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Revis Biol Celular* 1988;16:69-94.
114. Takezawa R, Watanabe Y, Akaike T. Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of Kupffer cells. *J Biochem Tokyo* 1995;118:1175-83.
115. Armburst T, Ramadori G. Functional characterizat on of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J Hepatol* 1996;25:518-28.
116. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cell (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996;54:S39-S45.
117. Van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on the rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 1995;22:1538-46.
118. Horejsi V. Surface Antigens of Human Leukocytes. *Advances in immunology* 1991;49:75-147.
119. Takei Y, Kawano S, Nishimura Y, Goto M, Nagai H, Chen SS, Omae A, Fusamoto H, Kamada T, Ikeda K. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:S65-67.
120. Knolle P, Lohr H, Treichel U, Dienes HP, Loshe A, Schlaack J, Gerken G. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in local immune response. *Z-Gastroenterol* 1995;33:613-20.
121. Bendelac A, Medzhitov R. Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J Exp Med.* 2002;195:F19-23.



122. Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology* 1990;12:70-75.
123. Knolle PA, Eckardt AJ, Protzer-Knolle U i sur. Circulating ICAM-1 (sCD54) and LFA-3 (sCD58) in chronic hepatitis B—a longitudinal study in patients treated with interferon-alpha. *Z Gastroenterol.* 1997;35:459-67.
124. Lohse AW, Knolle PA, Bilo K i.sur. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology.* 1996;110:1175-81.
125. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34.
126. Gupta Sudhir Md. Immune response following surgical trauma. *Critical Care Clinics* 1987;2:405-15.
127. Blalock Je, Smith E. A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. *Federation Proceedings* 1985; 44:108-11.
128. Weigent Da, Blalock Je Structural and functional relationships between the immune and neuroendocrine systems. *Bull Inst Pasteur* 1989;87:61-92.
129. Devoino L, Idova G, Alperina E et al. Distribution of immunocompetent cells underlying psychoneuroimmunomodulation. *Ann NY Acad Sci* 1986;496:292-300.
130. Bruce Dl Effect of halothane anesthesia on experimental *Salmonella* peritonitis in mice. *J. Surg Res* 1967;7:180-5.
131. Saba Tm Mechanism mediating retikuloendothelial system depression after surgery. *Proc Soc Exp Med Biol* 1970;133:1132-6.
132. Cullen Bf, Duncan Pg, Ray-Keil L Ihibition of cell-mediated cytotoxicity by halothane and nitrous oxide. *Anesthesiology* 1976;44:386-90.

133. Leclerc C, Bahr Gm, Chedid L. Marked enhancement of macrophage activation included by synthetic muramyl dipeptide (MDP) conjugate using monoclonal anti – MDP antibodies. *Cell Immunol* 1984;86:269-77.
134. Bruce Dl. Halothane inhibition of PHA–induced transformation of lymphocytes. *Anesthesiology* 1972;36:201-5.
135. Bruce Dl. Halothane effect on nuclear volume of PHA treated human lymphocytes. *J. Reticuloendot Soc* 1974;15:497.
136. Brown Br, Gandolfi AJ. Adverse effects of volatile anaesthetics. *British Journal of Anaesthesia* 1987;59:14-23.
137. Hussey Aj, Aldrige Lm, Paul D, Ray Dc, Beckett Gj, Allan Lg. Plasma glutathione S – transferase concentration as a measure of hepatocellular integrity following a single general anesthetic with halotane, enflurane or isoflurane. *British Journal of anaesthesia* 1988; 60:130-5.
138. Ray Dc, Beckett Gj, Hayes Jd, Drummond Gb. Effect of nicardipine infusio on the release of glutathione S- transferase following halothane anaesthesia. *Br J Anaesth* 1989; 62:553-9.
139. Allan Lg, Hussey Aj, Howie L, Beckett Gj, Smith Af, Hayes Jd, Drummond Gb. Hepatic glutathione S-transferase release after halothane anesthesia: Open randomised comparison with isoflurane. *Lancet* 1987;1:771-4.
140. Cheung Jy, Bonventre Jv, Malis Cd, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *New England Journal of Medicine* 1986;314:1670-6.
141. Gelman S, Van Dyke R. Mechanism of halothane–induced hepatotoxicity : another step on a long path. *Anesthesiology* 1988;68:479-82.
142. Garay Gl, Annesley P, Burnette M. Prevention of experimental liver injury in rats by nicardipine, a calcium entry blocker. *Gastroenterology* 1984;86:1319.

143. Cousins Mj, Gourlay Gk, Knights Km, Hall P De La M, Lunam Ca, O'Brien P. A randomised prospective controlled study of the metabolism and hepatotoxicity of halothane in humans. *Anesthesia and Analgesia* 1987;66:299-308.
144. Vergani D, Mieli – Vergani G, Albeoti A, Neuberger J, Adrian L, Addleston A, Davis M, Williams R. Antibodies to the surface of halothane – altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothan associated hepatitis. *N Engl J Med* 1980;303:66.
145. Udović – Širola M, Radošević – Stašić B, Ribarić Lj, Rukavina D. The effect of general endotracheal and epidural anaesthesia on the immune status. *Periodicum biologorum* 1983;3:115-7.
146. Udović – Širola M. Anestezija i imunološki odgovor. Doktorska disertacija 1984;. Medicinski fakultet, Rijeka
147. Udović – Širola M, Radošević – Stašić B, Ribarić L, Rukavina D. Comparison of the effects of general endotracheal and epidural anesthesia on the immune functions. *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis*, edited by Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris Tokyo, Hong Kong 1989;411-419.
148. Thomas L. Alanine aminotransferaze (ALT), Aspartate aminotransferaze (AST). In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH+Books Verlagsgesellschaft, 1998:55-65.
149. Moss DW, Henderson RA. Clinical Enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; 676-84.
150. Lorentz K.  $\alpha$ -Amylase In: Thomas L. ed. *Clinical laboratory diagnostics. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH+Books Verlagsgesellschaft, 1998:46-50.

151. Whicher J. C-reactive protein (CRP). In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH+Books Verlagsgesellschaft, 1998:700-6.
152. Radošević – Stašić B, Polić L, Mrakovčić I, Pahor Đ, Rukavina D. Modulation of circadian rhythms in antibody and cell-mediated immunity by chemical sympathectomy. *Ann New York Academy of Sciences* 1987;496:388-94.
153. Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg.* 1999;177:55-60.
154. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:290-303.
155. Zellweger R, Schwacha MG, Chaudry IH. Immunological sequelae of surgery and trauma U *Psychoneuroimmunology*, Ed. Ader R, Felten, DL, Cohen N, Academic press, 2001;291-317.
156. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53:865-71.
157. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication *Immunology Today* 1994;15:504-11.
158. Horst Ibelgauf's COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia; <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?000229>
159. Kupfer SR, Underwood LE, Baxter RC, Clemmons DR. Enhancement of the anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I by use of both agents simultaneously. *J Clin Invest.* 1993 Feb;91:391-6.

160. Baker DG, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Zoumakis E, Dashevsky BA, Chrousos GP, Geraciotti TD Jr. Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations in posttraumatic stress disorder. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9:209-17.
161. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun*. 1997;65:2283-91.
162. Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression *Langenbecks Arch Surg*. 2004;28
163. Sido B, Teklote JR, Hartel M, Friess H, Buchler MW. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004;18:439-54.
164. Haq Z, Rahman M, Siddique MA, Roy RK, Rahman AM, Khatun M. Interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- in open and laparoscopic cholecystectomy. *Mymensingh Med J*. 2004;13:153-6.
165. Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, Meijer DW, Bonjer HJ, Bouvy ND. Stress response to laparoscopic surgery: a review. *Surg Endosc*. 2004;18:1022-8.
166. Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, Meijer DW, Bonjer HJ, Bouvy ND. Stress response to laparoscopic surgery: a review. *Surg Endosc*. 2004;18:1022-8.
167. Sido B, Teklote JR, Hartel M, Friess H, Buchler MW. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004;18(3):439-54.
168. Podack ER et al Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1). *Immunological Reviews* 1998;103:203-11.
169. Lowrey DM et al Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine (interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Research* 1988;48:4681-8.

170. Lu P I sur. Perforin expression in human peripheral blood mononuclear cells. Definition of an IL2-independent pathway of perforin induction in CD8 + T cells. *Journal of Immunology* 1992;148:3354-60.
171. Smyth MJ et al. IL2 and IL6 synergise to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *Journal of Immunology* 1990;145:1156-66.
172. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, Saiki I. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood*. 2002;100:1728-33.
173. Snyder MR, Weyand CM, Goronzy JJ. The double life of NK receptors: stimulation or co-stimulation? *Trends Immunol*. 2004;25:25-32.
174. Doc Kaiser's Microbiology Home Page, 2003.  
<http://www.cat.cc.md.us/%7Egkaiser/goshp.html>
175. Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, Maecker HT, Wormsley SB, Picker LJ, Moss RB, Maino VC. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol*. 2001;31:2512-20.
176. Hahn S, Erb P. The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol*. 1999;18:449-64.
177. Appay V. The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail *Clin Exp Immunol*. 2004;138:10-3.
178. Abo T, Kawamura T, Watanabe H: Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:135-49.
179. Bendelac A: Mouse NK1+ T cells. *Curr Opin Immunol* 1995;7:367-74.

180. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21:573-83.
181. Coles MC, Raulet DH. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *Immunol* 2000;164:2412-8.
182. Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol*. 2003;15:683-9.
183. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev*. 2000;174:5-20.
184. Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46.
185. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
186. Srivastava P: Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol* 2002;2:185-94.
187. Mrakovcic-Sutic I, Radosevic-Stasic B, Simin M, Muhvic D, Rukavina D. Augmentation of NKT and NK cell-mediated cytotoxicity by peptidoglycan monomer linked with zinc. *Mediators Inflamm*. 2002;11:129-35.
188. Nakamura T, Sonoda KH, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Streilein J. CD4+ NKT cells, but not conventional CD4+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J Immunol*. 2003;171:1266-71.

189. Galli, Grazia; Nuti, Sandra; Tavarini, Simona; Galli-Stampino, Luisa; De Lalla, Claudia; Casorati, Giulia; Dellabona, Paolo; Abrignani, Sergio *The Journal Of Experimental Medicine* 2003;197:1051-7.
190. Askenase PW, Szczepanik M, Itakura A, Kiener C, Campos RA. Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells. *trends Immunol.* 2004;25:441-9.
191. Mrakovcic-Sutic I, Simin M, Radic D, Rukavina D, Radosevic-Stasic B. Syngeneic pregnancy induces overexpression of natural killer T cells in maternal liver. *Scand J Immunol.* 2003;58:358-66.
192. Kappel M, Dela F, Barington T, Galbo H, Pedersen BK. Immunological effects of a hyperinsulinaemic euglycaemic insulin clamp in healthy males. *Scand J Immunol.* 1998;47:363-8.
193. Loeffler DA, Juneau PL, Heppner GH. Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. *Int J Cancer.* 1991;48:895-9.
194. Kiang JG, McClain DE, Warke VG, Krishnan S, Tsokos GC. Constitutive NO synthase regulates the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in human T cells: role of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biochem.* 2003;89:1030-43.
195. Alfonso A, Lago J, Botana MA, Vieytes MR, Botana LM. Characterization of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger on rat mast cells. Evidence for a functional role on the regulation of the cellular response. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9:53-71;
196. Praetorius HA, Friis UG, Praetorius J, Johansen T. Evidence for a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism in rat peritoneal mast cells. *Pflugers Arch.* 1998;437:86-93.
197. Wacholtz MC, Cragoe EJ Jr, Lipsky PE. Delineation of the role of a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in regulating intracellular Ca<sup>2+</sup> in T cells. *Cell Immunol.* 1993;147:95-109;



198. Balasubramanyam M, Rohowsky-Kochan C, Reeves JP, Gardner JP. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange-mediated calcium entry in human lymphocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:2002-8.
199. Donnadieu E, Trautmann A. Is there a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in macrophages and in lymphocytes? *Pflugers Arch.* 1993;424:448-55.
200. Kraut RP, Bose D, Cragoe EJ Jr, Greenberg AH. The influence of calcium, sodium, and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiport on susceptibility to cytolytic/perforin-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1990;144:3498-505.
201. Kraut RP, Bose R, Cragoe EJ Jr, Greenberg AH. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger regulates cytolytic/perforin-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> and susceptibility to cytotoxicity. *J Immunol.* 1992;148:2489-96.
202. El-Hag A, Clark RA. Down-regulation of human natural killer activity against tumors by the neutrophil myeloperoxidase system and hydrogen peroxide. *J Immunol.* 1984;133:3291-7.
203. Semeraro N, Montemurro P, Chetta G, Altomare DF, Giordano D, Colucci M. Increased procoagulant activity of peripheral blood monocytes in human and experimental obstructive jaundice. *Gastroenterology.* 1989;96:892-8.
204. Feng WM, Bao Y, Fei MY, Chen QQ, Yang Q, Dai C. Platelet activation and the protective effect of aprotinin in hepatolithiasis patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003;2:602-4.
205. Schietroma M, Carlei F, Mownah A, Franchi L, Mazzotta C, Sozio A, Amicucci G. Changes in the blood coagulation, fibrinolysis, and cytokine profile during laparoscopic and open cholecystectomy. *Surg Endosc.* 2004;18:1090-6.

## ŽIVOTOPIS

### DAN I MJESTO ROĐENJA

29. travnja 1963. Rijeka, Republika Hrvatska

### ADRESA

Mihanovićeva 11, 51000 Rijeka, Hrvatska

### E-MAIL

[harry.grbas@ri.htnet.hr](mailto:harry.grbas@ri.htnet.hr)

### ZAPOSLENJA

Dom Zdravlja Rijeka, 1988.

SHMP (Stanica za hitnu medicinsku pomoć), 1990.-1992.

KBC Rijeka, Kirurška klinika, 1992.

### ŠKOLOVANJA

Osnovna škola u Rijeci, 1970.

CUO za kadrove u zdravstvu, 1978.

Medicinski fakultet Rijeka, 1982.

Pripravnički staž u Domu Zdravlja, 1988.

Stomatološki fakultet Rijeka, 1990.

Poslijediplomski znanstveni studij na Medicinskom fakultetu, 1990.

Specijalizacija iz Opće kirurgije, 1993.

### STRUČNI TEČAJEVI I USAVRŠAVANJA

Klinični oddelek za abdominalno kirurgiju, Klinični Center Ljubljana, Slovenia (1998)

Laparoscopic Upper GI Tract Surgery, Dept. of Experimental Surgery, University of Pecs, Hungary (2001.)

### AKADEMSKI STUPNJEVI:

Doktor medicine, Medicinski fakultet Rijeka

Doktor stomatologije, Medicinski fakultet Rijeka

## ZNANSTVENI STUPNJEVI

Magistar medicinskih znanosti, Medicinski fakultet Rijeka

## NASTAVNA DJELATNOST

Student-demonstrator, Zavod za farmakologiju, Medicinski fakultet Rijeka, 1985.-87.  
Od 1997. aktivno sudjelujem u izvođenju nastave (predavanja, seminari, vježbe) za predmete Opća kirurgija i Ratna kirurgija za studente sveučilišnih studija opće medicine i stomatologije, te za studente VI stupnja: više medicinske sestre i inženjeri medicinske radiologije

## SUDJELOVANJE U DOMOVINSKOM RATU:

Gospić            23.06.-19.07.1993.  
                      10.06.-17.06.1994.  
Velebit           20.06.-09.07.1994.  
Brinje            15.05.-25.05.1995.  
D.Lapac          27.08.-10.09.1995.  
                      19.11.-03.12.1995.

## Znanstveni radovi objavljeni u časopisima citiranim u tercijarnim publikacijama:

1. Depolo A., Dobrila-Dintinjana R., Uravić M., **Grbas H.**, Rubinić M.  
DIE OBERE GASTROINTESTINALE BLUTUNG – EIN ÜBERBLICK ÜBER  
UNSERE 10-JAHRES ERGEBNISSE  
(UPPER GASTROINTESTINAL BLEEDING - REVIEW OF OUR TEN YEARS  
RESULTS)  
Zentralbl Chir 2001; 126: 1-5 © J. A. Barth Verlag in MVH Medizienverlage  
Heidelberg · ISSN 0044-409X
2. Uravic M, Depolo A, Dobrilla-Dintinjana R, Petrosic N, **Grbas H**, Miletic D, Tomse  
Z, Kastelan Z.  
ERGEBNISSE DER CHIRURGISCHEN THERAPIE BEI 268 PATIENTEN MIT  
EINEM PANKREASKARZINOM  
(OUTCOME OF 268 PATIENTS WITH PANCREATIC CARCINOMA TREATED  
SURGICALLY)  
Zentralbl Chir. 2004 Apr;129(2):125-9. PMID: 15106045 [PubMed - in process]

## PROJEKTI:

- "Raširenost uzimanja sredstava ovisnosti u školske djece i omladine" (3-01-508)
- "Lokoregionalni pristupi u terapiji kolorektalnog karcinoma" (533-02-98-2)
- "Odnos kvalitete života i preživljavanja u bolesnika s karcinomom" (0062035)

## SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA:

### Sudjelovanje na međunarodnim skupovima:

1. Stančić M., Eškinja N., Massari D., Stošić A., **Grbas H.**, Ebubedike A.  
CORRELATION BETWEEN NERVE INJURY AND PROJECTILE ENERGY  
7th International Symposium of Weapons Traumatology and Wound Ballistics, St. Petersburg, Russia, September 20-23, 1994.
2. Gudelj M., Depolo A., Rahelić V., Bačić G., **Grbas H.**  
PRIMJENA ABSORBIRAJUĆEG KLIPSA TIJEKOM LAPAROSKOPSKE  
KOLECISTEKTOMIJE  
IV Hrvatski kongres endoskopske kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 21.-22. studenog 1997.
3. EAES 9th International Congress, Maastricht, The Netherlands (2001.)
4. Petrošić N., Uravić M., Depolo A., Rahelić V., **Grbas H.**, Tomše Z., Bačić Z.  
OLAKŠANO PRAŽNJENJE ŽELUCA NAKON  
PANKREATODUODENEKTOMIJE DISTENZIJOM PILORIČNOG MIŠIĆA  
III Hrvatski kirurški kongres sa međunarodnim učešćem, Pula, 15.-18. svibnja 2002.
5. Strčić M., Depolo A., Dobrila F., **Grbas H.**  
LIJEČENJE INGVINALNE KILE PHS MREŽICOM  
III Hrvatski kirurški kongres sa međunarodnim učešćem, Pula, 15.-18. svibnja 2002.

6. Milotić F., Rahelić V., Bačić G., Gudelj M., Petrošić N., Šuljić N., **Grbas H.**, Uravić M., Depolo A.  
KIRURŠKO LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA  
III Hrvatski kirurški kongres sa međunarodnim učešćem, Pula, 15.-18. svibnja 2002.
7. Lovasić F, Dobrila F, Jurišić D, Strčić M, Popović B, Lukanović M, Rahelić V, Gudelj M, **Grbas H.**  
OPERACIJSKO LIJEČENJE PREPONSKE KILE PREPERITONEALNIM  
POSTAVLJANJEM PROLENSKE MREŽICE PREKO MIOPEKTINEALNOG  
OTVORA  
5. kongres Hrvatskog Društva za Digestivnu Kirurgiju s međunarodnim  
sudjelovanjem, Rijeka, Opatija, 15.-17. svibanj 2003.
8. Belac I, Petković M, Depolo-Šarunić Lj, Bobuš T, Lovasić F, Bačić G, **Grbas H.**  
RIJETKI PRIMARNI MALIGNI TUMOR PREDNJE TRBUŠNE STIJENKE-  
SINOVIJALNI SARKOM  
5. kongres Hrvatskog Društva za Digestivnu Kirurgiju s međunarodnim  
sudjelovanjem, Rijeka, Opatija, 15.-17. svibanj 2003.
9. **Grbas H.**, Depolo A, Dobrila-Dintinjana R, Uravić M, Štimac D.  
UPPER GASTROINTESTINAL BLEEDING-Review of our thirteen years result  
5. kongres Hrvatskog Društva za Digestivnu Kirurgiju s međunarodnim  
sudjelovanjem, Rijeka, Opatija, 15.-17. svibanj 2003.
10. Gudelj M, Uravić M, Depolo A, Rahelić V, Bačić G, Petrošić N, **Grbas H**, Milotić F,  
Frković M.  
LAPAROSKOPSKI ZAHVATI NA DEBELOM CRIJEVU - ISKUSTVA KBC  
RIJEKA  
7. Hrvatski kongres endoskopske kirurgije s Međunarodnim sudjelovanjem Šibenik,  
Hrvatska  
6.-8. svibnja 2004

11. Mrakovčić-Šutić I., **Grbas H.**, Depolo A., Rukavina D., Radošević-Stašić B.  
CHOLESTASIS-RELATED EXPANSION OF PERFORIN-EXPRESSING CD4<sup>+</sup> T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH GALLSTONES  
Annual meeting 2004, Croatian immunological society, Opatija, October 7-9, 2004.
  
12. Mrakovčić-Šutić I., **Grbas H.**, Depolo A., Rukavina D., Radošević-Stašić B.  
COMPARATIVE EVALUATION OF CIRCULATING CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE AND NATURAL KILLER CELLS AFTER LAPAROSCOPIC AND OPEN CHOLECYSTECTOMY  
Annual meeting 2004, Croatian immunological society, Opatija, October 7-9, 2004.

#### **Sudjelovanje na domaćim skupovima:**

1. Uravić M., Gudelj M., **Grbas H.**, Depolo A., Rahelić V., Petrošić N., Frković M.  
KRVARENJA IZ GORNJEG DIJELA PROBAVNOG SUSTAVA  
II. Hrvatski kirurški kongres, Zagreb (Sheraton ), 5.-7. studeni 1998.
  
2. Petrošić N., Uravić M., **Grbas H.**, Rahelić V.  
ZAMJENA JEDNJAKA NAKON RESEKCIJE RADI KARCINOMA, TE NEKROZA TRANSPLANTATA KAO RIJETKA I OZBILJNA KOMPLIKACIJA  
III kongres Hrvatskog Društva za Digestivnu Kirurgiju, Rijeka, Opatija, svibanj 1999.
  
3. **Grbas H.**, Uravić M., Petrošić N.  
EZOFAGOGASTRIČNA PREMOSNICA S VELIKOM KRIVINOM ŽELUCA  
III kongres Hrvatskog Društva za Digestivnu Kirurgiju, Rijeka, Opatija, svibanj 1999.