

# ČIMBENIK NEKROZE TUMORA KAO RIZIČNI ČIMBENIK U ALKOHOLNOJ CIROZI JETRE

---

**Karajić, Matija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*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:184:118712>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matija Karajić

ČIMBENIK NEKROZE TUMORA KAO  
RIZIČNI ČIMBENIK U ALKOHOLNOJ CIROZI JETRE

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matija Karajić

ČIMBENIK NEKROZE TUMORA KAO  
RIZIČNI ČIMBENIK U ALKOHOLNOJ CIROZI JETRE

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 35 stranica, 9 slika, 8 tablica, 23 literaturna navoda.

*Zahvala*

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr.sc. Nadi Starčević Čizmarević na predloženoj temi, stručnoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i laborantici Ivani Pleši na velikoj pomoći pri laboratorijskom dijelu rada.*

*Također se zahvaljujem roditeljima, kolegama i prijateljima na potpori za vrijeme studiranja.*

## **Sažetak**

Ciroza jetre je ireverzibilna kronična bolest jetre koju karakterizira oštećenje jetrenog tkiva te progresivno propadanje jetrene funkcije. Najčešći uzrok bolesti je pretjerana konzumacija alkohola. Razvoj i opseg alkoholnog oštećenja jetre ovisi o količini konzumiranog alkohola, načinu i duljini konzumacije, socijalnim uvjetima, spolu te o genetskim faktorima. Najnoviji dokazi upućuju na povezanost čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) s nastankom ciroze jetre.

Cilj ovog rada bio je istražiti utječe li polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 na podložnost i razvoj alkoholne ciroze jetre. U istraživanju je sudjelovalo 123 bolesnika s alkoholnom cirozom jetre dok je kontrolnu skupinu činilo 246 zdravih ispitanika. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 G u A utvrđivan je metodom lančane reakcije polimeraze nakon koje je slijedila restrikcija s restrikcijskim enzimom (*Nco* I) te provjera elektroforezom na agaroznom gelu.

Frekvencija TNF- $\alpha$ -308 genotipova i alela nije se značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ) između ispitanika s alkoholnom cirozom jetre i kontrolne skupine. Distribucija genotipova među spolovima također se nije značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ). U radu su prikazani i biokemijski parametri ( $\gamma$ -GT, AST, alkalna fosfataza, albumini) koji se koriste pri dijagnozi alkoholne bolesti jetre. Njihove vrijednosti nisu se značajno razlikovale obzirom na genotip bolesnika.

Na osnovi rezultata možemo zaključiti da polimorfizam-308 TNF- $\alpha$  gena nema ključnu ulogu u etiopatogenezi alkoholne ciroze jetre u naših ispitanika.

**Ključne riječi:** alkohol, ciroza jetre, čimbenik nekroze tumora, genski polimorfizam

## Summary

Cirrhosis is irreversible chronic liver disease characterized by damage of liver tissue, and progressive deterioration of liver function. The most common cause of the disease is excessive alcohol consumption. Development and level of alcoholic liver damage depends on the amount of alcohol consumed, the length of consumption, social status, gender, and genetic factors. Recent evidence suggests an association between tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) with the development of liver cirrhosis.

The aim of this study was to investigate the influence of the polymorphism of TNF- $\alpha$ -308 on the occurrence of cirrhosis. The study included 123 patients with cirrhosis and the control group consisted of 246 healthy subjects. Polymorphism of TNF- $\alpha$ -308 G to A was determined by polymerase chain reaction followed by digestion with the restriction enzyme Nco I and checks by agarose gel electrophoresis.

The frequency of TNF- $\alpha$ -308 genotypes and alleles did not differ significantly ( $p>0,05$ ) between patients with alcoholic liver cirrhosis and the control group. The distribution of genotypes between the sexes also were not significantly different ( $p>0,005$ ). The paper also presents some biochemical parameters ( $\gamma$ -GT, AST, alkaline phosphatase, albumin) that are used in the diagnosis of alcoholic liver disease. There was no significant correlation ( $p>0,05$ ) between TNF- $\alpha$ -308 genotypes and biochemical parameters.

Based on the results, we can conclude that the polymorphism of TNF-308- $\alpha$  gene doesn't have a key role in pathogenesis of alcoholic liver cirrhosis in our patients.

**Key words:** alcohol, liver cirrhosis, tumor necrosis factor, gene polymorphism.

## Sadržaj

<u>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</u> .....	1
<u>1.1. Ciroza jetre</u> .....	1
<u>1.1.1. Dijagnostika bolesti jetre</u> .....	3
<u>1.2. Metabolizam alkohola</u> .....	4
<u>1.3. Genetske predispozicije za alkoholizam i alkoholnu bolest jetre</u> .....	6
<u>1.4. Citokini</u> .....	9
<u>1.4.1. Gen za čimbenik nekroze tumora</u> .....	11
<u>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</u> .....	15
<u>3. ISPITANICI I METODE</u> .....	16
<u>3.1. Ispitanici</u> .....	16
<u>3.2. Metode molekularno-genetičke analize</u> .....	16
<u>3.2.1. Izolacija DNA</u> .....	17
<u>3.2.2. Analiza TNF-<math>\alpha</math> 308 polimorfizma</u> .....	17
<u>3.3. Statistička obrada rezultata</u> .....	22
<u>4. REZULTATI</u> .....	23
<u>4.1. Identifikacija polimorfizma -308 u TNF-<math>\alpha</math> genu</u> .....	23
<u>4.2. Analiza TNF-<math>\alpha</math>-308 polimorfizma u genu bolesnika s alkoholnom cirozom jetre ...</u> .....	23
<u>4.3. Korelacija TNF-<math>\alpha</math>-308 polimorfizma i biokemijskih parametara u alkoholnoj cirozi jetre ...</u> .....	25
<u>5. RASPRAVA</u> .....	29
<u>6. ZAKLJUČCI</u> .....	32
<u>7. LITERATURA</u> .....	33
ŽIVOTOPIS.....	36



## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

### 1.1. Ciroza jetre

Biokemijski gledano jetra je najsloženiji organ u tijelu čovjeka. Uključena je u sintezu i katabolizam proteina, lipida i ugljikohidrata, aktivaciju i pohranjivanje vitamina, pohranjivanje i ekskreciju elemenata u tragovima, biotransformaciju i inaktivaciju steroida i peptidnih hormona te lijekova i egzogenih toksina, kao i u ekskreciju mnogih tipova lipida i nepostojanih supstanci u žuči.

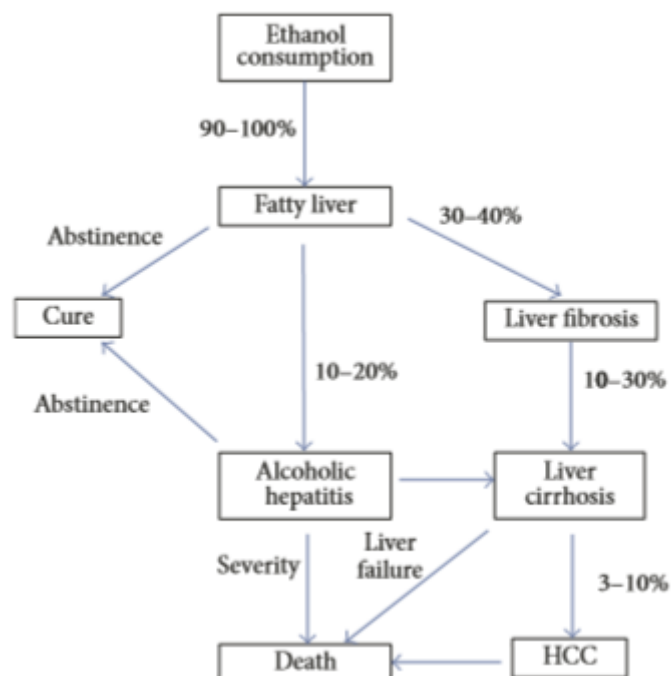
Ciroza jetre je završna faza alkoholne bolesti jetre, obilježena potpunim poremećajem njezine strukture i funkcije. Iako uzroci ciroze mogu biti i druge jetrene bolesti (hepatitis B i C, hemokromatoza, Wilsonova bolest, cistična fibroza, itd.), najčešći je uzrok pretjerana konzumacija alkohola. Alkoholna bolest jetre dijeli se na tri stadija: masnu infiltraciju („masna jetra“), alkoholni hepatitis i cirozu.

Masna jetra javlja se uslijed akumulacije masnih kiselina u jetri. Često se pojavljuje kod teških alkoholičara, a po prekidu konzumiranja alkohola regredira i ne mora nužno prethoditi alkoholnom hepatitisu i cirozi. Nakupljanje masti u jetri posljedica je poremećaja oksidacije masnih kiselina, povećanog unosa masnih kiselina i esterifikacije u trigliceride te snižene sinteze i sekrecije lipoproteina.

Alkoholni hepatitis je upalna lezija s infiltracijom jetre leukocitima, nekrozom hepatocita i alkoholnim hijalinom (Malloryeva tjelešca). U SAD-u se kod 10 do 35% teških alkoholičara razvije alkoholni hepatitis i on se smatra se glavnim prethodnikom ciroze. Stopa smrtnosti osoba s alkoholnim hepatitisom je 15 do 20%. Jedini način zaustavljanja napretka bolesti je apstinencija od alkohola, a u mnogim se slučajevima unatoč apstinenciji razvija ciroza jetre. (1)

Ciroza jetre je kronična bolest jetre koju karakterizira oštećenje jetrenog tkiva, stvaranje fibroznih ožiljaka i čvorića te progresivno propadanje jetrene funkcije. Obilježena je i nakupljanjem tekućine u abdomenu (ascites), krvarenjima (koagulopatija), povišenim tlakom u portalnim krvnim žilama (portalna hipertenzija) i poremećajem određenih mozgovnih funkcija (hepatička encefalopatija). (2)

Ciroza je ireverzibilna bolest. Liječenje se uglavnom temelji na zaustavljanju napredovanja bolesti potpunim prestankom konzumacije alkohola no štetu koju jetra pretrpi nemoguće je izliječiti. U kasnijim fazama bolesti jedino rješenje je transplantacija jetre. Ciroza jetre vodeći je uzrok smrti među alkoholičarima. Kod osoba s dijagnosticiranim i alkoholnim hepatitisom i cirozom jetre stopa smrtnosti kroz razdoblje od 4 godine je čak 60%. (1)



Slika 1: Tijek alkoholne bolesti jetre.

Kronična konzumacija alkohola u više od 90% slučajeva vodi do masne jetre, ali samo oko 40% bolesnika razvije teže oblike bolesti, fibrozu i hepatitis. Daljnja konzumacija alkohola dovodi do ciroze jetre ili hepatocelularnog karcinoma te naposljetku smrti (slika 1) (3).

Kronična prekomjerna uporaba alkohola uzrokuje između 70% i 80% ciroza, dok na sve ostale uzroke otpada 20% do 30%. Prema podacima SZO, kronični alkoholizam treća je bolest po učestalosti, odmah iza bolesti srca i krvnih žila te malignih tumora. Oko 140 milijuna ljudi u svijetu ovisno je o alkoholu, a godišnje 1,8 milijuna ljudi umire od bolesti povezanih s alkoholom. Smatra se da su 2 do 4% svih odraslih muškaraca u svijetu kronični alkoholičari. U Hrvatskoj se alkoholizam pojavljuje u 15% svih odraslih muškaraca. U Sjedinjenim Američkim Državama od alkoholne bolesti jetre boluje oko 2 milijuna ljudi, od čega oko 300 000 od ciroze.

Smatra se da je za razvoj alkoholne ciroze jetre potrebna konzumacija 80 g etanola na dan kroz 10 do 20 godina kod muškaraca te 60 g etanola dnevno za isto razdoblje kod žena (1).

#### 1.1.1. Dijagnostika bolesti jetre

Klinička slika jetrenih bolesti vrlo često je nespecifična pa se samo na temelju bolesnikovih simptoma ne može postaviti točna dijagnoza. Stoga se u postavljanju dijagnoze najčešće koriste laboratorijski pregledi krvi, tzv. jetreni testovi. To je zajednički naziv za biokemijske pretrage krvi koje služe za otkrivanje ili potvrdu bolesti jetre, odnosno za procjenu postojanja i težine oštećenja jetrenih stanica.

Bilirubin je razgradni produkt koji nastaje razgradnjom eritrocita, odnosno hemoglobina te drugih proteina koji u svojoj strukturi sadrže hem. Povišenu koncentraciju bilirubina nalazimo u slučajevima parenhimnih bolesti jetre, no može se javiti i kod niza drugih bolesti koje ne zahvaćaju jetru. Jetra sadrži i mnoštvo enzima koje prilikom oštećenja hepatocita otpušta u krv. Vrijednosti aspartat aminotransferaze, AST, i alanin aminotransferaze, ALT, povišene su kod svih vrsta hepatitisa i obično su proporcionalne sa stupnjem oštećenja jetrenih stanica. Kod alkoholnog hepatitisa povećanje vrijednosti AST je značajno veće nego povećanje ALT, dok je kod virusnog hepatitisa obrnut slučaj. Alkalna fosfataza je enzim čije visoke vrijednosti u krvi ukazuju prvenstveno na smetnje u žučnim vodovima, odnosno da je protok žuči u jetri blokiran. Gama-glutamil transpeptidaza ( $\gamma$ -GT) se smatra najosjetljivijim pokazateljem jetrenog oštećenja jer i mali poremećaji u funkciji hepatocita dovode do značajnog porasta koncentracije ovog enzima u serumu.

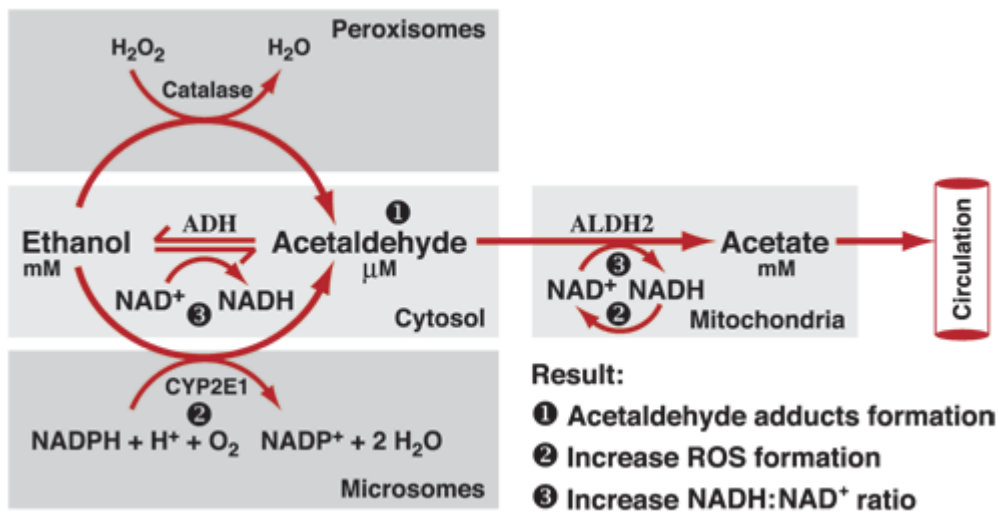
Funkciju jetre procjenjujemo određivanjem koncentracije albumina, proteina krvne plazme koji se sintetizira samo u jetri. Zdrava jetra sintetizira oko 12 g albumina dnevno dok se kod bolesnika s cirozom jetre sintetizira oko 4 g (4).

Potvrda dijagnoze ciroze jetre uz postojeće kliničke manifestacije bolesti i laboratorijske analize slijedi na osnovu histološkog nalaza koji je jedan od najsigurnijih dijagnostičkih parametara.

## 1.2. Metabolizam alkohola

Kako ne postoji mogućnost skladištenja alkohola u organizmu, većina unesenog alkohola metabolizira se u jetri. Manji dio metabolizira se u drugim organima, primjerice u mišićima, crijevima i bubrezima dok se preostali dio izlučuje iz organizma

u nepromijenjenom obliku, preko bubrega, pluća i kože. Metabolizam alkohola prikazan je na Slici 2.



Slika 2: Metabolizam alkohola

Nakon što je unesen u tijelo, alkohol apsorpcijom kroz želudac i crijeva ulazi u krv te portalnom venom dolazi do jetre. Tamo se oksidacijom preko alkoholne dehidrogenaze (ADH) etanol prevodi u acetaldehid koji je supstrat acetaldehid dehidrogenaze (ALDH) te je konačni produkt u tom lancu acetatna kiselina. Stanice uz pomoć enzima (dehidrogenaza i katalaza) metaboliziraju alkohol preko acetaldehida sve do vode i ugljičnog dioksida. Oksidacijom etanola nastaje višak reduciranog nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH). Acetaldehid, koji nastaje u ovoj reakciji, konvertira se u acetat što je također povezano s konverzijom nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) u NADH. Povećani omjer NADH prema NAD rezultira promjenama u metabolizmu jetre.

Acetaldehid je toksičan spoj koji dovodi do oštećenja jetre. Kovalentno se veže za bjelančevine jetre i oštećuje prijenos proteina te koči neke stanične enzimske aktivnosti vezujući se za plazmatske membrane u jetri, za druge hepatičke

makromolekule, cirkulirajuće proteine (serumski albumin) i hemoglobin te za citoskeletne proteine (npr. tubulin) (3).

Iako je glavni put eliminacije alkohola iz organizma preko alkoholne dehidrogenaze, dio alkohola može se metabolizirati preko mikrosomalnog etanol oksidacijskog sistema, uz enzim citokrom P450 2E1 (CYP2E1). CYP2E1 najveću ekspresiju pokazuje u hepatocitima, ali se nalazi i u drugim organima poput mozga i crijeva. Uglavnom je smješten u endoplazmatskom retikulumu i u mitohondrijima. Povišeni nivoi CYP2E1 zamijećeni su kod kroničnih alkoholičara dok kod umjerenih konzumenata alkohola ne igra značajnu ulogu u metabolizmu alkohola. Istraživanja na modelu štakora hranjenih alkoholom pokazala su da CYP2E1 inhibira oksidaciju masnih kiselina i sudjeluje u razvoju alkoholne bolesti jetre (5).

Treći enzim koji sudjeluje u metabolizmu alkohola je katalaza. Katalaza se nalazi u sitnim vezikulama unutar stanice koje se nazivaju peroksisomi i rasprostranjena je po čitavom organizmu. Katalaza prevodi alkohol u acetaldehid, pritom otpuštajući vodik koji se veže za molekulu vodikovog peroksida pri čemu nastaje voda. Iako se može naći u čitavom tijelu, katalaza je posebno zanimljiva znanstvenicima jer metabolizira alkohol u mozgu te se pretpostavlja da igra ulogu u nastanku ovisnosti o alkoholu.

### 1.3. Genetska predispozicija za alkoholizam i alkoholnu bolest jetre

Razvoj i opseg alkoholnog oštećenja jetre ovisi o količini konzumiranog alkohola, načinu i duljini konzumacije, socijalnim uvjetima, spolu te o genetskim faktorima.

Utjecaj okoliša i interakcija između okolišnih i genetskih čimbenika značajni su u etiologiji alkoholizma. Brojne studije obuhvatile su istraživanja rasne i etničke

pripadnosti kao podloge za razvoj bolesti, istraživanja učestalosti bolesti unutar obitelji, adoptivne studije te pokušaje identificiranja gena podložnosti za alkoholizam. Smatra se da su za razvoj ciroze jetre neke etničke ili rasne skupine predisponirane, a druge rezistentnije. Tako se u američkih Indijanaca i Iraca ciroza razvija češće, dok su pripadnici crne rase rezistentniji (6). Alkoholna ciroza jetre prilično se rijetko javlja i u Židova. Međutim, pouzdanih podataka o takvoj predispoziciji odnosno rezistentnosti još nema.

Genetski faktori zasigurno imaju određenu ulogu u razvoju alkoholizma jer je fenomen da se alkoholizam javlja u pojedinim obiteljima poznat još od davnina. Statistika pokazuje da svaki treći alkoholičar ima barem jednog roditelja alkoholičara. Također je dokazano da su alkoholičari s povijesti alkoholizma unutar obitelji skloni ranijem početku konzumacije alkohola i imaju više problema povezanih s alkoholom nego oni s negativnom obiteljskom anamnezom (7). Studije na blizancima pokazuju veću konkordantnu stopu u monozigotnih nego u dizigotnih blizanaca, što također sugerira značenje genetskih faktora u nastanku alkoholizma, iako se pritom ne može isključiti utjecaj okolišnih čimbenika (8).

Adoptivne studije razdvajaju genetske od okolišnih faktora. U jednoj Danskoj studiji objavljeno je da je 18 % posvojene djece s pozitivnom obiteljskom povijesti za alkoholizam razvilo alkoholizam kasnije tijekom života naprema 5 % posvojene djece s negativnom obiteljskom anamnezom (9).

Najuvjerljiviji dokazi koji podržavaju ulogu gena u razvoju alkoholizma dobiveni su na životinjskim modelima selektivnim križanjima. Današnja istraživanja alkoholizma temelje se uglavnom na identifikaciji različitih gena kandidata i genetskih biljega koji bi bili odgovorni za povećanu sklonost alkoholu. Smatra da su DRD2 gen, aktivnost

monoamino oksidaze, ALDH2\*2 alel neki od genetskih faktora uključenih u nastanak alkoholizma (7).

Za razliku od većeg broja studija koje su istraživale moguće genetske faktore kao predispoziciju za alkoholizam, manji je broj onih koje su se bavile istraživanjem genetskih čimbenika odgovornih za pojavu alkoholne bolesti jetre. Dvije kliničke studije zabilježile su povećanje učestalosti ADH3\*1 genske varijante u bolesnika s alkoholnom cirozom u usporedbi s kontrolom (7, 10). Manje istraživanje na japanskoj populaciji ukazalo je na to da alkoholičari s ALDH2\*2 alelom tijekom konzumacije alkohola razviju alkoholnu bolest jetre pri nižim kumulativno unesenim količinama etanola nego kontrolna skupina (11). Grove i suradnici utvrdili su značajnu povezanost alkoholne bolesti jetre i polimorfizma CYP2E1 gena u populaciji bijelaca. Ista skupina utvrdila je povezanost alkoholne bolesti jetre i tumorskog faktora nekroze (12).

Oksidativni stres ima značajnu ulogu u razvoju alkoholne ciroze. U metabolizmu alkohola nastaju slobodni radikali koji oštećuju stanice jetre oksidacijom lipida, proteina i nukleinskih kiselina. U dosadašnjim istraživanjima ispitivani su geni koji definiraju nivo oksidansa i čiji su enzimski produkti uključeni u metabolizam alkohola. Kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre u jetrenim je stanicama povišena razina željeza. I alkohol i željezo uzrokuju oksidativni stres i peroksidaciju lipida. Dokaz tome je ekspresija 4-hidroksi nonenala, koji je produkt lipidne peroksidacije i marker za oštećenje stanica, u hepatocitima prezasićenim željezom (13). Suzuki i sur. istraživali su povećanu ekspresiju transferin receptora koji sudjeluje u staničnoj apsorpciji željeza kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre za razliku od zdravih osoba (14). Istraživani su i geni kao što su HFE gen čije mutacije doprinose nakupljanju željeza u jetri (15). Provedena istraživanja gena i njihove ekspresije



unatoč nekonzistentnim rezultatima ukazuju na značaj željeza u etiopatogenezi alkoholne bolesti jetre.

Rizik za nastanak alkoholne ciroze jetre veći je kod ženskog spola nego li kod muškog što također može biti genetski uvjetovano. Poznato je da žene razviju cirozu jetre pri unosu manje količine alkohola (otprilike 60 grama etanola dnevno, naprama 80 grama kod muškaraca), moguće zbog manjeg volumena distribucije alkohola odnosno manjeg indeksa tjelesne mase i većeg udjela masnog tkiva. Međutim, nova istraživanja na modelu štakora pokazuju da estrogen povećava apsorpciju endotoksina u crijevima čime se potiče izlučivanje čimbenika nekroze tumora alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) u Kupfferovim stanicama u jetri što ukazuje na genetsku povezanost spola s alkoholnom cirozom.

#### 1.4. Citokini

Citokini su polipeptidi ili glikopeptidi koji prenose informacije između stanica te su važni medijatori upalnih bolesti (16). Na temelju njihovih specifičnih funkcija razlikujemo proinflamatorne ili proupalne citokine, antiinflamatorne ili imunoregulatorne citokine te kemocitokine. Proinflamatorni citokini (npr. TNF- $\alpha$ , transformirajući čimbenik rasta beta - TGF- $\beta$ , interleukini IL-1 i IL-6) potiču rast i razvoj raznih imunskih stanica, aktiviraju makrofage koji potom otpuštaju još citokina te induciraju produkciju drugih molekula potrebnih za upalni odgovor. Antiinflamatorni citokini (npr. IL-4, IL-10, IFN) pomažu regulirati imunološki odgovor inhibicijom proliferacije određenih imunskih stanica i poticanjem proizvodnje drugih, primjerice smanjenjem proizvodnje proupalnih citokina te poticanjem izlučivanja

antitijela koja se vežu i i deaktiviraju specifične strane molekule. Kemokini (npr. IL-8) privlače određene vrste imunskih stanica (npr. neutrofile) na mjesto infekcije.

Gotovo sve stanice u tijelu, uključujući i većinu stanica jetre, proizvode i luče citokine. Otpušteni citokini zatim komuniciraju sa stanicama čije funkcije modificiraju, tzv. ciljnim stanicama. Ciljna stanica može biti ista ona koja je izlučila citokin (autokrini učinak) ili susjedna stanica (parakrini efekt) (17). Bez obzira koja je ciljna stanica u pitanju, interakcija s citokinom odvija se preko molekule receptora. Interakcija između citokina i receptora rezultira promjenama u strukturi receptora što izaziva signal za pokretanje biokemijskih reakcija i promjenu aktivnosti stanice. Većina citokina ima više od jednog učinka i može utjecati na više od jedne vrste stanica. Također, mnogi citokini imaju isto ili slično djelovanje. Primjerice, na receptore koji sadrže protein koji se naziva gama lanac citokinskih receptora može se vezati šest različitih citokina iz skupine interleukina te će njihova aktivacija iako je rezultat vezanja različitih citokina imati slične učinke na ciljnim stanicama. Iako imaju nebrojene efekte u tijelu čovjeka, glavna uloga citokina je zaštita organizma od vanjskih utjecaja (virusa, bakterija, gljivica), štete uzrokovane toksičnim tvarima poput alkohola i njegovih razgradnih produkata te stanica koje uzrokuju bolesti (stanice raka) (16).

Citokini sudjeluju u mnogim procesima povezanim s metabolizmom alkohola te nastankom alkoholne bolesti jetre. Pomoću različitih mehanizama reguliraju biokemijske procese u stanicama koje ih proizvode kao i u susjednim stanicama. Primjerice, u slučaju infekcije citokini privlače bijele krvne stanice u tkiva pokrećući upalni odgovor. Dugotrajno izlučivanje citokina u jetri rezultira kroničnom upalom što uzrokuje stanja poput hepatitisa, fibroze i ciroze. Citokini također reguliraju i proces programirane smrti stanice ili apoptoze koji je djelomično odgovoran za alkoholom inducirano razaranje tkiva jetre, a tu se posebno ističu dva citokina: TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ .

Djelovanje citokina primjećeno je i u negativnim učincima bakterijskih proteina, endotoksina na jetru. Zbog svog širokog spektra djelovanja i moguće značajne uloge u prevenciji i liječenju alkoholne bolesti jetre, citokini privlače sve veću pažnju znanstvenika te su već dobiveni ohrabrujući rezultati u mnogim istraživanjima (15).

#### 1.4.1. Gen za čimbenik nekroze tumora

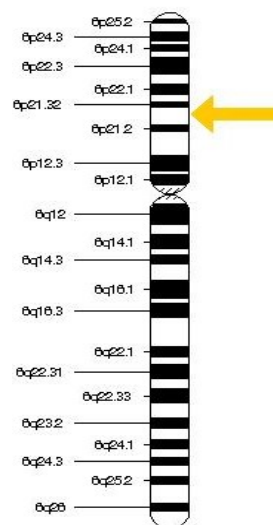
Čimbenik nekroze tumora alfa je protein od 185 aminokiselina glikoziliran na pozicijama 73 i 172. To je jak citokin koji nastaje u makrofazima, fibroblastima, monocitima, endotelnim stanicama, limfocitima T i B, itd. u određenim uvjetima. Fiziološki stimuli za sintezu TNF- $\alpha$  su IL-1, bakterijski endotoksini, čimbenik rasta trombocita, oncostain M, IFN- $\beta$ , IL-17 i virusne infekcije. TNF- $\alpha$  može stimulirati ili inhibirati vlastitu sintezu, ovisno o tipu stanica, a aktivira i produkciju drugih citokina. Aktivnost mu je proinflamatorna i antitumorska, a opisana je i njegova sposobnost da potakne smrt stanice ili apoptozu. Zbog proupalnog i prooksidativnog djelovanja, TNF- $\alpha$  dovodi do komplikacija u patogenezi mnogih bolesti, kao što su hepatitis i ciroza jetre, ateroskleroza, reumatoidni artritis, psorijaza, upalna bolest crijeva, Alzheimerova bolest i mnoge bolesti pluća. Osim toga, TNF- $\alpha$  je indirektno uključen i u regulaciju metabolizma željeza. Pastorino i Hoek u svojim su istraživanjima dokazali značajno povećanje razine TNF- $\alpha$  kod bolesnika s akutnom i kroničnom bolesti jetre u odnosu na zdravu jetru gdje je produkcija TNF- $\alpha$  bila minimalna (18).

Na učinak TNF- $\alpha$  u hepatocitima čovjeka ili životinja snažno utječe prisutnost drugih citokina u tkivu jetre. Kod normalnih miševa, TNF- $\alpha$  je neophodan za regeneraciju jetre. Ako je dio jetre životinje uklonjen, TNF- $\alpha$  pomaže regeneraciju jetre promoviranjem proliferacije hepatocita. Ako u tkivu miša nedostaje proupalni citokin

IL-6, povećana proizvodnja TNF- $\alpha$  kao rezultat djelomičnog uklanjanja jetre dovodi do smrti hepatocita. Slično tome, uništavanje gena regulatornog citokina IL-10, koji pomaže prekinuti upalni odgovor, uzrokuje pogoršanje oštećenja jetre uzrokovano TNF- $\alpha$ . Miševi koji su pak imali smanjene razine drugih citokina, poput IL-18 i interferona gama koji promoviraju aktivaciju TNF- $\alpha$ , bili su zaštićeni od apoptoze stanica uzrokovanih TNF- $\alpha$  (19).

Konzumacija alkohola ubrzava apsorpciju endotoksina u crijevima što potiče nastanak TNF- $\alpha$  u Kupfferovim stanicama, jetrenim makrofagima. Obzirom na važnu ulogu TNF- $\alpha$  u nastanku alkoholnog hepatitisa, različite studije proučavaju upotrebu anti-TNF lijekova u njegovom liječenju. Anti-TNF antitijela sprječavaju upalu i nekrozu u modelu štakora hranjenih alkoholom. Također, liječenje pentoksifilinom, inhibitorom sinteze TNF- $\alpha$  smanjuje smrtnost kod osoba s alkoholnim hepatitisom (14).

Humani gen TNF nalazi se na p kraku kromosoma 6 i mapiran je u području 6p21.3 HLA (eng. *Human leukocyte antigen*) sustava (slika 3), gdje zauzima oko 3000 parova baza genomske DNA.



Slika 3: Lokacija TNF gena na kromosomu 6p21.3

Sastoji se od 4 eksona koji kodiraju nastanak TNF- $\alpha$  proteina. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP) predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA i javlja se jednom na svakih 1000 baza. Danas je poznato mnogo polimorfizama TNF- $\alpha$  gena, a utvrđeno je i 8 SNP-ova unutar TNF- $\alpha$  promotorske regije. Na položaju -308, adenin zamjenjuje gvanin što dovodi do bialelskog polimorfizma gdje se učestaliji alel (G) označava kao TNF- $\alpha$  1, a rjeđi alel (A) kao TNF- $\alpha$  2. Dokazano je da ovaj polimorfizam ima direktan učinak na regulaciju TNF- $\alpha$  gena tako što je alel (A) više transkripcijski aktivan nego li alel (G) i čini se udružen s povećanom transkripcijom i višom razinom TNF- $\alpha$  u krvi.

Zbog različitih rezultata istraživanja kod istih bolesti nastala je hipoteza da polimorfizmi gena TNF- $\alpha$  nisu povezani s aktivnošću pojedine bolesti, već s podložnosti da se razviju uvjeti za nastanak bolesti. Rezultati ispitivanja tako pokazuju predisponirajuću ili protektivnu ulogu polimorfizama u odnosu na zdravu populaciju.

Funkcionalni polimorfizmi gena TNF- $\alpha$  mogli bi objasniti razlike u genetskoj predispoziciji za nastanak ciroze jetre kod teških alkoholičara. Pastor i suradnici su u istraživanjima među španjolskom populacijom dokazali da je zamjena -238 G u A u TNF- $\alpha$  gen promotoru povezana s razvojem alkoholnog hepatitisa i alkoholne ciroze jetre. Učestalost heterozigotnog genotipa bila je značajno viša kod alkoholičara s cirozom, nego kod alkoholičara bez ciroze jetre (20). Kod ostalih funkcionalnih polimorfizama TNF- $\alpha$  nije dokazana izravna povezanost s oštećenjima jetre no poznato je da zamjena -308 G u A utječe na osjetljivost za infektivne i autoimune bolesti, te da zamjena -857 C u T povezana s različitim upalnim procesima.

U svojim istraživanjima Gonzalez – Quintela i suradnici (21) zamijetili su povišene koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu alkoholičara s cirozom jetre u odnosu na ostatak populacije (alkoholičari bez ciroze, umjereni konzumenti alkohola i osobe koje ne konzumiraju alkohol) što također ukazuje na povezanost TNF- $\alpha$  s nastankom ciroze jetre.

## **2. Cilj istraživanja**

Prekomjerna konzumacija alkohola jedan je od glavnih uzroka smrtnosti u svijetu. Količina alkohola koja može izazvati oštećenja na jetri varira od osobe do osobe pa su u istraživanjima proučavane genetske predispozicije za nastanak i razvoj ciroze. Najnoviji dokazi upućuju na povezanost čimbenika nekroze tumora s nastankom ciroze jetre. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 u etiopatogenezi alkoholne ciroze jetre. Ispitivano je postoji li značajna razlika u distribuciji genotipova između bolesnika s cirozom i zdravih ispitanika kao i korelacija polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 s biokemijskim parametrima.

### **3. Ispitanici i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

U ovom istraživanju obuhvaćene su slijedeće skupine ispitanika:

- 1) Bolesnici s alkoholnom cirozom jetre kod kojih je klinički i laboratorijski potvrđena dijagnoza bolesti. Ovu skupinu činilo je 123 bolesnika, 100 muškaraca i 23 žene, primljenih na odjel Interne klinike Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Svi bolesnici konzumirali su alkohol u količinama većim od 80 g/dan kroz razdoblje od 5 i više godina.
- 2) Kontrolna skupina koju je činilo 246 ispitanika (200 muškaraca i 46 žena) dobrovoljnih darivatelja krvi na Zavodu za transfuziju KBC Rijeka koji nisu u srodstvu, klinički su zdravi i nemaju bolest jetre ili anemiju. Kontrolna skupina usklađena je prema spolu s bolesnicima s alkoholnom cirozom. Njihovi DNA uzorci uzeti su iz DNA baze koju pohranjuje Laboratorij za molekularnu genetiku Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su poštujući bioetičke principe te je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje. Svi su ispitanici bili upoznati s istraživanjem te su dali pismeni pristanak odobren i od etičke komisije ustanova u kojima su prikupljeni uzorci.

#### **3.2. Metode molekularno-genetičke analize**

Najprije smo izolirali DNA iz krvi ispitanika kako bismo ispitali -308 polimorfizam u TNF- $\alpha$  genu lociranom na kromosomu 6p21 pomoću PCR-RFLP (engl. polymerase



chain reaction - restriction fragment length polymorphism) analize u kojoj nakon umnažanja PCR produkta slijedi njegova restrikcija s odgovarajućom endonukleazom.

### 3.2.1. Izolacija DNA

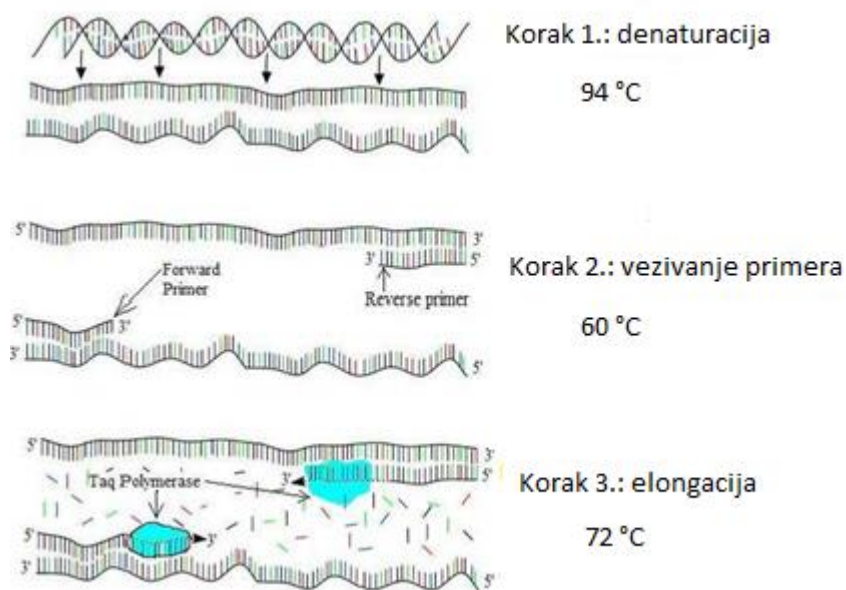
Ispitanicima je izvađeno po 3 ml periferne krvi. Krv je do DNA izolacije zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom (EDTA) na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Za molekularno-genetičku analizu izolirali smo genomsku DNA iz periferne krvi ispitanika pomoću komercijalnog kita za izolaciju (Qiagen), prema uputama proizvođača. Izolirana DNA pohranjena je na  $-20^{\circ}\text{C}$  na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

### 3.2.2. Analiza TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma

Prisutnost pojedinog polimorfizma u promotorskoj regiji gena za TNF- $\alpha$  utvrđena je PCR metodom. To je metoda kojom se dio DNA obično veličine nekoliko stotina parova baza umnožava u veliki broj identičnih kopija bez korištenja živog organizma. Ciljni dio DNA molekule koju se želi umnožiti okružuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama zvanim početnice ili primeri, koji su komplementarni krajevima ulomka DNA od interesa. Na ovim primerima počinje niz reakcija pomoću enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac. Veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrani primeri. PCR reakcija se odvija u termocikleru, uređaju koji zagrijava i hladi reakcijske posudice na preciznim temperaturama u točno određenom trajanju

programiranih ciklusa. Pošto se sinteza odvija na oba lanca, u jednom će se ciklusu amplifikacije broj DNA udvostučiti te se ponavljanjem ciklusa broj novonastalih DNA molekula povećava geometrijskom progresijom. Prosječni PCR protokol odvija se u 30 do 40 ciklusa. Nakon 40 ciklusa pojavljuje se tzv. fenomen platoa, kada dolazi do zasićenja ili potroška reaktanata tako da se gubi efikasnost reakcije.



Slika 4: Koraci PCR reakcije

Prilikom reakcije dvostruki lanac DNA molekule se razdvoji zagrijavanjem na 94°C kroz 1 minutu (početna denaturacija traje 5 minuta). Tijekom hlađenja na 60°C primeri se komplementarno vežu (eng. *annealing*) i Taq polimeraza započinje elongaciju, sintezu komplementarnih lanaca (eng. *extension*) dodavanjem komplementarnih baza (slika 4) (20).

Nakon umnožavanja DNA, provodi se restrikcija PCR produkta s restikcijskim enzimima. Dobiveni fragmenti provjeravaju se gel elektroforezom. U neutralnom ili bazičnom mediju fosfatne grupe u DNA su negativno nabijene pa sve molekule DNA u električnom polju putuju prema anodi. Razdvajanje molekula različite veličine (koja

se izražava brojem parova baza - bp) u električnom polju postiže se provođenjem elektroforeze u agaroznom (ili akrilamidnom) gelu određene veličine pora koji pruža otpor prolazu molekula. Brzina putovanja je obrnuto proporcionalna veličini molekula, a ovisi i o konformaciji molekula DNA, veličini pora gela, jakosti električnog polja i svojstvima pufera u kojem se provodi elektroforeza.

Nakon provedene elektroforeze molekule DNA u gelu se najčešće vizualiziraju bojenjem s etidij-bromidom koji se veže za DNA i fluorescira pod UV svjetlom. Određivanje veličine fragmenata radi se uspoređivanjem s markerom poznatih veličina.

Prilikom analize TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u volumenu od 15  $\mu$ L u Eppendorf termocikleru. Uzorci su analizirani u serijama od 10 do 24 uzorka uz negativnu kontrolu bez uzorka DNA i poznati marker (100 bp).

Slijed početnih oligonukleotida za analizu TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazani su u sljedećim tablicama.

Tablica 1: Sekvenca početnih oligonuklotida za analizu TNF- $\alpha$ -308 lokusa

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida
TNF- $\alpha$ -308-F	5` AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3`
TNF- $\alpha$ -308-R	5` TCC TCC CTG CTC CGA TCC CG 3`

Tablica 2: Reakcijska smjesa u volumenu od 15  $\mu$ L

	<b>Količina (za 1 uzorak)</b>
10x PCR pufer	1,71 $\mu$ L
50 mM MgCl	0,51 $\mu$ L
10 mM dNTP	0,34 $\mu$ L
10x primer TNF- $\alpha$ -308F	1,71 $\mu$ L
10x primer TNF- $\alpha$ -308R	1,71 $\mu$ L
Formamid	0,86 $\mu$ L
bidestilirana voda	7 $\mu$ L
<i>Taq</i> polimeraza	0,17 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ L

Tablica 3: PCR temperaturni ciklusi

<b>Korak PCR postupka</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Vrijeme</b>	<b>Broj ciklusa</b>
1.	94 °C	5 min	1 x
2.	94 °C	1 min	38 x
	60 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
3.	72 °C	10 min	1x

Produce lančane reakcije polimeraze provjerili smo elektroforezom u trajanju od 20 do 30 minuta pri 80 V. Po 4  $\mu$ L PCR produkta i 2  $\mu$ L boje BPB nanosili smo na 1%-tni agarozni gel u koji smo prethodno dodali 2,5  $\mu$ L etidiumbromida. PCR produkte analizirali smo pod UV lampom na transluminatoru. Veličinu PCR produkta utvrdili

smo primjenom standardnog DNA markera od 25 bp. Očekivana veličina PCR produkta bila je 107 bp.

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *Nco* I restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 4.

Tablica 4: Restrikcijska smjesa za analizu TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma

	<b>Količina</b> (za 1uzorak)
PCR produkt	10 $\mu$ l
10 x pufer REact 3	2 $\mu$ l
enzim <i>Nco</i> I	0,2 $\mu$ l
bidestilirana voda	7,8 $\mu$ l

Restrikcijska smjesa inkubirana je 16 – 20 sati u vodenoj kupelji na 37°C. Restrikcijske fragmente (8  $\mu$ L restikcijskog fragmenta + 2  $\mu$ L boje BPB) provjerili smo elektroforezom 60 minuta pri 80 V na 3%-tnom agaroznom gelu u koji smo dodali etidumbromid. Restrikcijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (25bp DNA marker). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i homozigote za naveden polimorfizam. Očekivana veličina restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 5.

Tablica 5: Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi TNF 308 polimorfizma

<b>Genotip</b>	<b>PCR produkt (bp)</b>	<b>Restrikcijski fragment (bp)</b>		
TNF- $\alpha$ -308 G/G	107		87	20
TNF- $\alpha$ -308 A/A		107		
TNF- $\alpha$ -308 G/A		107	87	20

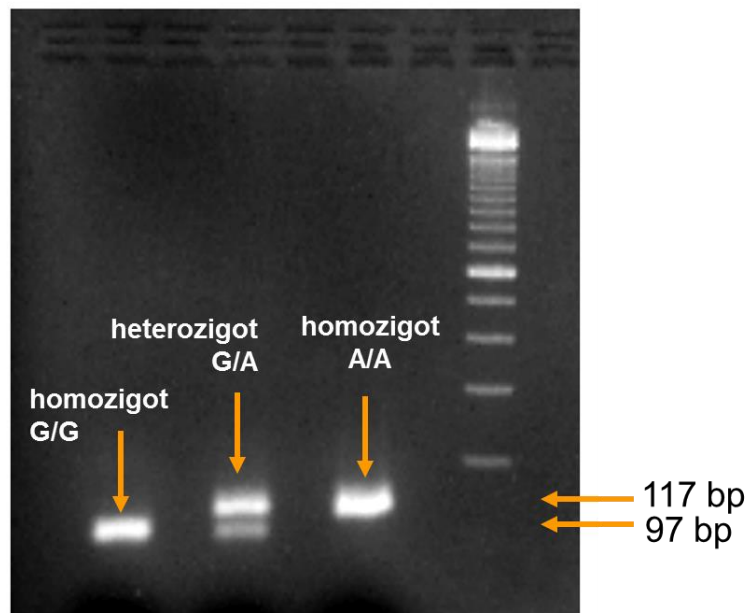
### 3.3. Statistička obrada rezultata

Usporedba učestalosti alela i genotipova između bolesnika s alkoholnom cirozom i skupinom kontrolnih ispitanika izvršena je  $X^2$  testom. Korelacija biokemijskih parametara bolesti ( $\gamma$ -GT, AST, ALP, albumin) u bolesnika s različitim TNF- $\alpha$ -308 alelima izvršeno je ANOVA testom. Značajna razlika izražena je na statističkoj razini 0,05. Statistička obrada podataka napravljena je korištenjem računarskih programa Statistica 10.0 i MedCalc.

## 4. Rezultati

### 4.1. Identifikacija polimorfizma -308 u TNF- $\alpha$ genu

U prisustvu polimorfizma TNF- $\alpha$  -308 dolazi do promjene adenina u gvanin na poziciji 308 u promotorskoj regiji TNF- $\alpha$  gena. Češći alel G označava se kao TNF- $\alpha$  1, a rjeđi alel A kao TNF- $\alpha$  2. Obzirom na TNF- $\alpha$  1 i 2 alele postoje tri moguća genotipa (slika 5): TNF- $\alpha$  -308 G homozigoti (TNF- $\alpha$  -308 G/G), TNF- $\alpha$  -308 heterozigoti (TNF- $\alpha$  -308 G/A) i TNF- $\alpha$  -308 A homozigoti (TNF- $\alpha$  -308 A/A).



Slika 5. Analiza TNF- $\alpha$ -308 genotipova

### 4.2. Analiza TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre

Učestalost TNF- $\alpha$ -308 G u A zamjene u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (N = 123) i kontrolne skupine (N = 246) prikazana je u tablici. U uzorku od 123 ispitanika s cirozom jetre genotip GG pronađen je u 97 osoba (78,9 %), genotip GA u 25 osoba (20,3 %), a genotip AA kod jedne osobe (0,8 %). Nije zamijećena statistički značajna

razlika u distribuciji genotipova između bolesnika s alkoholnom cirozom jetre i kontrolne skupine zdravih ispitanika ( $p > 0,05$ ).

Tablica 6: Distribucija TNF- $\alpha$ -308 genotipova u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (N = 123) i u kontrolnoj skupini (N = 246)

TNF- $\alpha$ -308 Genotipovi	Bolesnici s cirozom N (%)	Kontrola N (%)	OR (95% CI)	p
<b>GG</b>	97 (78,9)	190 (77,2)	1,10 (0,65 – 1,86)	0,723
<b>GA</b>	25 (20,3)	51 (20,7)	0,97 (0,57 – 1,66)	0,927
<b>AA</b>	1 (0,8)	5 (2,0)	0,40 (0,05 – 3,41)	0,399
<b>Ukupno</b>	123	246		

U slijedećoj tablici 7. prikazana je frekvencija TNF- $\alpha$ -308 alela u bolesnika s alkoholnom cirozom izračunata na 246 kromosoma i u kontrolnoj skupini izračunata na 492 kromosoma. Frekvencija alela nije se značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ) između ispitivanih skupina.

Tablica 7: Frekvencija TNF- $\alpha$ -308 alela u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (N=123) i u kontrolnih ispitanika (N=246)

TNF- $\alpha$ -308 Aleli	Bolesnici s cirozom (%)	Kontrola (%)	OR (95% CI)	p
<b>G</b>	219 (89,0)	431 (87,6)	1,15 (0,71 – 1,86)	0,574
<b>A</b>	27 (11,0)	61 (12,4)	0,87 (0,54 – 1,41)	0,574



U tablici 8. prikazana je učestalost TNF- $\alpha$ -308 genotipova kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre prema spolu. U uzorku bolesnika s cirozom jetre muškaraca je više (N=100) nego li žena (N=23) a i frekvencija nosioca A alela (genotipovi AA i GA) veća je u muškaraca (23,0%) nego li u žena (13,0%) ali razlika nije bila značajna ( $p>0,299$ ).

Tablica 8: Učestalost TNF- $\alpha$ -308 genotipova kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre prema spolu

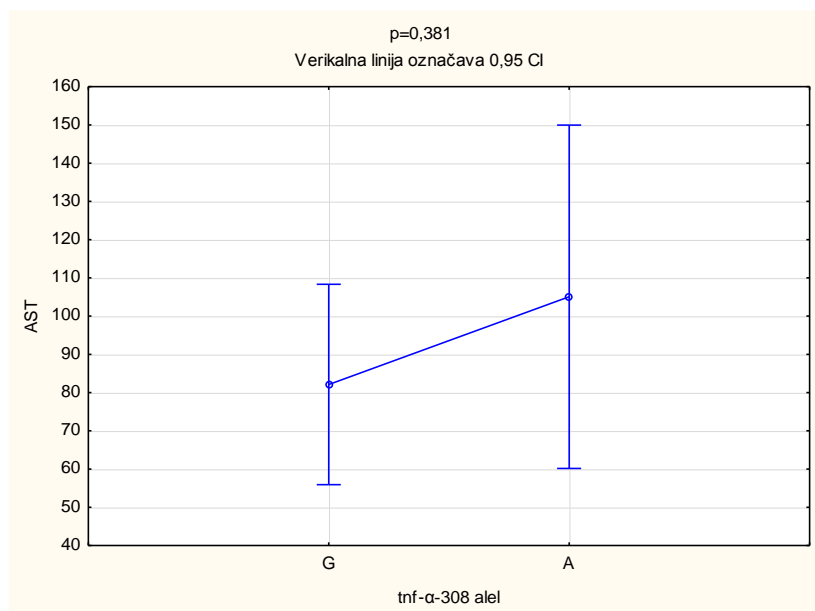
<b>Genotipovi</b>	<b>Muškarci N (%)</b>	<b>Žene N (%)</b>	<b>P</b>
<b>GG</b>	77 (77,0)	20 (87,0)	0,299
<b>AA + GA</b>	23 (23,0)	3 (13,0)	0,299
<b>Ukupno</b>	100	23	123

#### 4.3. Korelacija TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma i biokemijskih parametara u alkoholnoj cirozi jetre

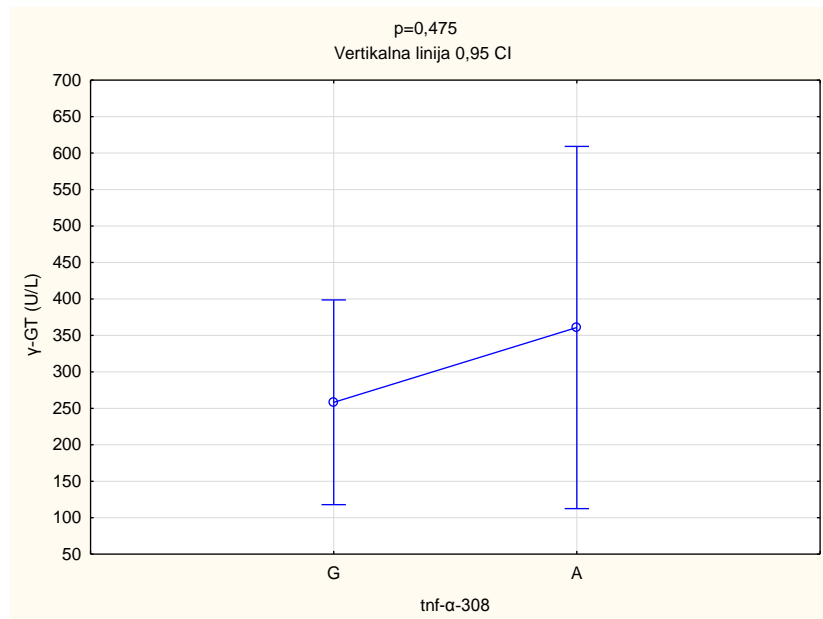
Na slijedećim slikama prikazane su prosječne vrijednosti nekih od biokemijskih parametara u dijagnozi bolesti jetre uključujući aspartat aminotransferazu,  $\gamma$ -glutamil transpeptidazu, alkalne fosfatazu i albumine u serumu bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. Korelacija s navedenim biokemijskim parametrima prikazana je ovisno o prisustvu TNF- $\alpha$ -308 alela, i to u nosioca A alela (GA ili AA genotip) i u onih bez A alela (genotip GG). Broj bolesnika s alkoholnom cirozom jetre u ovim analizama

kretao se od 59 do 63 budući da nam vrijednosti biokemijskih parametara nisu bile dostupne za sve bolesnike.

Razine  $\gamma$ -GT (slika 6.) i AST (slika 7.) u serumu bile su povišene kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (N=61) u odnosu na referentne vrijednosti. U bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom (genotip G/A ili A/A) u odnosu na one bez A alela (genotip GG) prisutan je trend viših vrijednosti oba parametra (AST: 105 vs. 81 U/L;  $\gamma$ -GT 360 vs. 255 U/L) ali razlike nisu bile statistički značajne (p=0,381 i p=0,475).



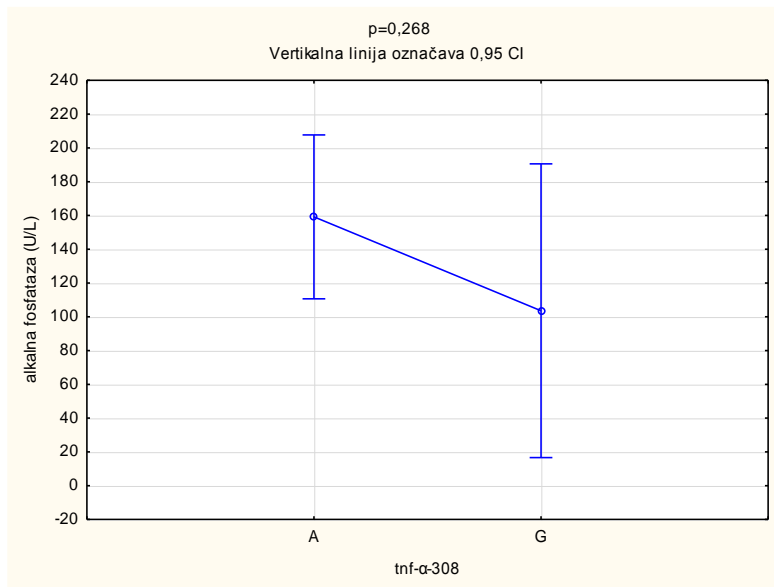
Slika 6. Srednja vrijednost AST kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre koji imaju TNF- $\alpha$ -308 GG genotip (N=47) i onih s GA ili AA genotipom (N=16)



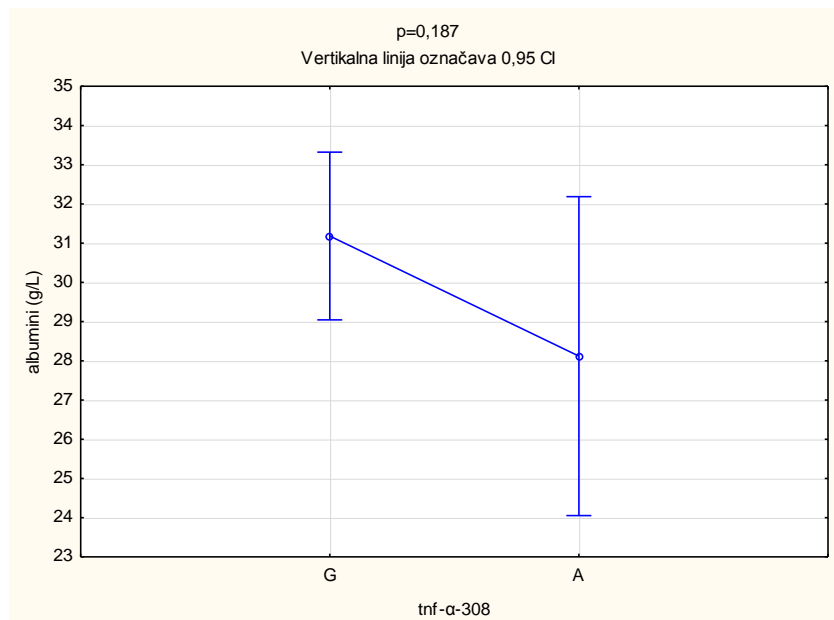
Slika 7. Srednja vrijednost  $\gamma$ -GT kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre koji imaju TNF- $\alpha$ -308 GG genotip (N=47) i onih s GA ili AA genotipom (N=15).

Srednje vrijednosti alkane fosfataze (slika 8) i albumina (slika 9) u serumu bolesnika s alkoholnom cirozom jetre niže su u onih bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -308 GA ili AA genotip (106 U/L i 28g/L) u odnosu na bolesnike s GG genotipom (160 U/L i 31,2 g/L), ali opaženi trend nije dosegnuo statističku značajnost ( $p=0,268$  i  $p=0,187$ ).

Nadalje, srednja vrijednost albumina (g/L) u serumu kod svih bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (N=60) niža je od referentne vrijednosti za ovu bjelančevinu.



Slika 8. Srednja vrijednost alkalne fosfataze kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre koji imaju TNF-α-308 GG genotip (N=45) i onih s GA ili AA genotipom (N=14).



Slika 9: Srednja vrijednost albumina kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre koji imaju TNF-α-308 GG genotip (N=47) i onih s GA ili AA genotipom (N=13).

## 5. Rasprava

Sve veći broj činjenica ukazuje na to da su genetski faktori uključeni u etiologiju kroničnih bolesti jetre. I kod ciroze jetre dolazi do interakcije većeg broja genetičkih i okolišnih čimbenika. Unatoč pozitivnoj korelaciji između unosa alkohola i oštećenja jetre, postoje velike razlike među pojedinim konzumentima alkohola. Tako niz studija istražuje polimorfizme gena kandidata koji potencijalno utiču na razvoj ciroze jetre u bolesnika s alkoholnom bolesti jetre. Genetski faktori mogu objasniti širok spektar odgovora na istu konzumaciju alkohola u različitim osoba i rasvijetliti činjenicu da tek 10% - 20% alkoholičara razvije alkoholnu cirozu jetre.

Mnogi čimbenici uključujući upalu, oksidativni stres, urođenu imunost, fibrozu rezultiraju razvojem i progresijom alkoholne bolesti jetre. Izgleda da inflamatorni citokini ili kemokini imaju važnu ulogu u razvoju ciroze jetre. Varijante u TNF- $\alpha$  genu tako mogu naglasiti individualnu predispoziciju za alkoholnu bolest jetre. Stoga je u ovom radu istraživana je utjecaj TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma kao genetskog čimbenika za nastanak i razvoj alkoholne ciroze. U uzorku od 123 ispitanika s alkoholnom cirozom jetre, njih 97 (78,9%) imalo je TNF- $\alpha$ -308 GG genotip, u 25 ispitanika (20,3%) pronađen je GA genotip dok je AA genotip posjedovala samo jedna osoba (0,8%). Takva distribucija genotipova (tablica 6) ne razlikuje se značajno ( $p > 0,05$ ) od distribucije genotipova kod zdravih ispitanika u kontrolnoj skupini. U skladu s tim, nije bilo značajne razlike ( $p = 0,574$ ) niti u frekvenciji TNF- $\alpha$ -308 G i A alela (tablica 7). Ovi rezultati upućuju na to da polimorfizam gena TNF- $\alpha$ -308 nije bitan čimbenik u podložnosti za razvoj ciroze jetre kod alkoholičara. U prijašnjim istraživanjima dobiveni su slični rezultati (19, 21) gdje različiti polimorfizmi TNF- $\alpha$  nisu izravno povezani s nastankom i razvojem alkoholnog hepatitisa i ciroze. Međutim, Richardet i sur. su zamijetili povezanost frekvencije A alela kod polimorfizama TNF- $\alpha$ -308

odnosno TNF- $\alpha$ -238 s polimorfizama u promotoru IL-10-539 i IL-10-1082 gena s predispozicijom za nastanak alkoholnog hepatitisa (23). Ti rezultati samo potvrđuju kompleksnost mehanizma upalnog odgovora s mogućnosti različitog djelovanja citokina u različitim situacijama. U ovom radu ispitivan je samo jedan polimorfizam jednog citokina i potrebna su opširnija istraživanja s većim brojem ispitanika na većem broju polimorfizama različitih gena da bi se bolje shvatili genetski čimbenici upleteni u alkoholnu bolest jetre. Naime razvoj alkoholne ciroze jetre je kompleksan i u skladu s time teško je utvrditi značajan pojedinačni utjecaj nekog gena na ograničenom broju bolesnika. Osim toga istraživanjem bi svakako valjalo istovremeno obuhvatiti i TNF- $\alpha$ -238 polimorfnu varijantu koja je već pokazala utjecaj u pojedinim istraživanjima (18).

S obzirom da u razvoju alkoholne ciroze jetre, kao i u samom metabolizmu alkohola, postoje razlike između muškaraca i žena usporedili smo pojedine genotipove TNF- $\alpha$ -308 gena i prema spolu. Naime genske varijabilnosti također bi mogle doprinjeti razlici u patogenezi ciroze ovisno o spolu zbog već spomenutog učinka estrogena u izlučivanju TNF- $\alpha$  u Kupfferovim stanicama. Iako je kod muškaraca njih 23,0% nosioca TNF- $\alpha$ -308 A alela u odnosu na 13,0% žena razlika nije bila značajna ( $p=0,299$ ) (tablica 8), pri čemu ograničavajući čimbenik u našoj analizi predstavlja mali broj žena ( $N=23$ ) koji ujedno ukazuje na veće konzumiranje alkohola kod muškaraca ( $N=100$ ) u našoj populaciji.

U radu su prikazani i različiti biokemijski parametri koji se koriste u dijagnozi bolesti jetre (AST,  $\gamma$ -GT, alkalna fosfataza i albumini) te njihove vrijednosti prema genotipovima TNF- $\alpha$ -308. Ovisno o tipu jetrenog oštećenja dolazi do poremećaja jetrenih enzima i parametara u krvi od kojih su pojedini više ili manje specifični.

Zamijećen je tako porast vrijednosti AST i  $\gamma$ -GT kod bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A polimorfizmom (genotip GA i AA) u odnosu na GG genotip (slika 6, slika 7), ali razlika nije bila značajna ( $p > 0,05$ ). Razina AST u naših bolesnika (81 – 105 U/L) tako odstupa (veća je) od referentnih vrijednosti, što je pokazatelj patogenih stanja uključujući upalne bolesti jetre i alkoholni hepatitis. Parametar koji je uz AST od posebnog značaja u dijagnostici je i ALT za kojeg nažalost nismo imali podatke u dovoljnom broju bolesnika. U alkoholnoj bolesti jetre indikativan je omjer AST i ALT, pri čemu su vrijednosti AST više nego li ALT. Povišene vrijednosti  $\gamma$ -GT (255 – 360 U/L) kod naših bolesnika u skladu su nalazom koji između ostalog upućuje na povećanu konzumaciju alkohola i alkoholom uzrokovano oštećenje jetre.

S druge strane opažen je trend opadanja vrijednosti alkalne fosfataze i albumina kod bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A polimorfizmom (genotip GA i AA) u odnosu na GG genotip (slika 8, slika 9) ali razlike također nisu dosegle značajnost ( $p = 0,268$  i  $p = 0,187$ ). Snižene razine albumina u naših bolesnika (28 – 31 g/L) u odnosu na referentne vrijednosti mogu ukazati na kroničnu bolest jetre.

Obzirom da razlike biokemijskih parametara nisu dosegle značajnost možemo zaključiti TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizam ne utječe na razvoj alkoholne ciroze jetre u naših bolesnika. Ipak, da bi rezultati bili konačni potrebna su istraživanja na većem brojem ispitanika od 60ak za koliko smo imali podatke o praćenim parametrima.

Ukupni rezultati našeg istraživanja ne pokazuju značajnu ulogu TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma u podložnosti i razvoju alkoholne ciroze jetre . Međutim, s obzirom na opažene trendove predlažemo proširiti istraživanje na druge funkcionalne polimorfizme TNF- $\alpha$ -308 gena te u istraživanje uključiti veći broj ispitanika kao i kontrolnu skupinu ispitanika koji konzumiraju alkohol ali nisu razvili cirozu jetre.

## 6. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja u kojem smo analizirali utjecaj TNF- $\alpha$ -308 G u A polimorfizma kao genetskog čimbenika u nastanku ciroze jetre kod alkoholičara došli smo do slijedećih zaključaka:

1. Distribucija TNF- $\alpha$ -308 genotipova i alela nije se značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ) kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Nisu uočene značajne razlike ( $p = 0,299$ ) niti u distribuciji TNF- $\alpha$ -308 genotipova između muškaraca i žena s alkoholnom cirozom jetre.
3. Vrijednosti biokemijskih parametara aspartat aminotransferaze,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaze, alkalne fosfataze i albumina u serumu bolesnika s alkoholnom cirozom jetre nisu se značajno razlikovale ( $p > 0,05$ ) u bolesnika koji imaju odnosno nemaju TNF- $\alpha$ -308 A alel.
4. Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 G u A ne utječe značajno na podložnost za razvoj ciroze jetre kod alkoholičara, ali za konačne zaključke valjalo bi analizirati veći broj ispitanika i proširiti istraživanje na druge regije TNF- $\alpha$  gena.



## 7. Literatura

1. Johnson BA. Addiction Medicine: Science and Practice. Springer Science & Business Media, 2010.
2. <http://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/139/ciroza-jetre.html> (citirano, 3. rujna 2015.).
3. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A i sur. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. Mediators of Inflamm. 2013; ID 495156. doi: 10.1155/2013/495156.
4. <http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=12420> (citirano, 3. rujna 2015.).
5. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 Contributes to Ethanol-Induced Fatty Liver in Mice. Hepatology. 2008 May;47(5):1483-94. doi: 10.1002/hep.22222.
6. Conn HO. Natural history of complications of alcoholic liver disease. Acta Med Scand Suppl. 1985;703:127-34.
7. Lumeng L, Crabb DW. Genetic aspects and risk factors in alcoholism and alcoholic liver disease. Gastroenterology. 1994 Aug;107(2):572-8.
8. Hrubec Z, Omenn GS. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. Alcohol Clin Exp Res. 1981 Spring;5(2):207-15.
9. Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. Arch Gen Psychiatry. 1973 Feb;28(2):238-43.

10. Poupon RE, Nalpas B, Coutelle C, Fleury B, Couzigou P, Higuieret D. Polymorphism of alcohol dehydrogenase, alcohol and aldehyde dehydrogenase activities: implication in alcoholic cirrhosis in white patients. *Hepatology*. 1992 Jun;15(6):1017-22.
11. Enomoto N, Takase S, Takada N, Takada A. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. *Hepatology*. 1991 Jun;13(6):1071-5.
12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):143-6.
13. Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K i sur. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Nov;29(11 Suppl):189S-93S.
14. Suzuki Y, Saito H, Suzuki M i sur. Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26:26S-31S.
15. Jin F, Qu LS, Shen XZ. Association between C282Y and H63D mutations of the HFE gene with hepatocellular carcinoma in European populations: a meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010. 2;29:18. doi: 10.1186/1756-9966-29-18.
16. Neuman MG. Cytokines - central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003;27(4):307-16.
17. Čulić S. Citokini i autoimune bolesti. *Paediatrica Croatica (1330-1403)* 49 (2005), Supplement 1; 148-161.
18. Pastorino JG, Hoek JB. Ethanol potentiates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 2000 May;31(5):1141-52.

19. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2000 Nov 16;343(20):1467-76.
20. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, Gonzalez-Sarmiento R. -238 G>A polymorphism of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene (TNFA) is Associated with Alcoholic Liver Cirrhosis in Alcoholic Spanish Men. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Nov;29(11):1928-31.
21. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Loidi L, Quintero C, Perez LF, Gude F. Serum TNF- $\alpha$  levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms. *Alcohol.* 2008 Sep;42(6):513-8. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.04.008. Epub 2008 Jun 24.
22. Iimuro Y, Gallucci R M, Luster M, Kono H, and Thurman R G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology.* 1997 Dec;26(6):1530-7.
23. Richardet JP, Scherman E, Costa C, Campillo B and Bories PN. Combined polymorphisms of tumour necrosis factor alpha and interleukin-10 genes in patients with alcoholic hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jun;18(6):673-9.

## Životopis

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Matija Karajić
Adresa	Trampi 16
E-mail	matijakarajic@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum, mjesto i država rođenja	16.03.1989. Rijeka, Hrvatska

### ŠKOLOVANJE

2008 – 2012. Medicinski Fakultet u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno Inženjerstvo

2003. – 2007. Srednja škola „Prva sušačka hrvatska gimnazija“, Rijeka, smjer prirodoslovno-matematički

1995. – 2003. Osnovna škola „Pehlin“ Rijeka