# Koncentracija endotelina-1 i serumska aktivnost angiotenzin konvertirajućeg enzima u serumu uz Doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika

**Kardum, Duško**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2005**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:344448

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**




*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository








**Središnja medicinska knjižnica**

Kardum , Duško (2005) *Koncentracija endotelina-1 i serumska aktivnost angiotenzin konvertirajućeg enzima u serumu uz Doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

http://medlib.mef.hr/184

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Duško Kardum

# Koncentracija endotelina –1 i serumska aktivnost angiotenzin konvertirajućeg enzima u serumu uz Doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2005.

Rad je izrađen u Zavodu za gastreneterologiju Klinike za unutrašnje bolesti KB Dubrava i Kliničkom Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava Farmaceutsko biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj: doc.dr.sc. Mladen Buljevac

*Učitelju i Prijatelju, doc.dr.sc. Mladenu Buljevcu za predivne trenutke susreta...*

**POPIS KRATICA**

| | |
|---|---|
| **ACE** | **angiotenzin konvertirajući enzim** |
| **ACTH** | **adrenokortikotropni hormon** |
| **ADH** | **antidiuretski hormon** |
| **AGT** | **angiotenzinogen** |
| **ANG** | **angiotenzin** |
| **ANP** | **atrijski natriuretski peptid** |
| **AT** | **angiotenzinski receptor** |
| **BTEB 1** | **osnovni transkripcijski vežući protein 1** |
| **CI** | **indeks kongestije** |
| **ECE** | **enzim konvertor endotelina** |
| **ECM** | **ekstracelularni matriks** |
| **ET** | **endotelin** |
| **HSC** | **stelatna stanice jetre** |
| **IL** | **interleukin** |
| **KS** | **Kupfferove stanice** |
| **NO** | **dušikov monoksid** |
| **NOS** | **sintetaza dušikovog monoksida** |
| **eNOS** | **endotelna sintetaza dušikovog monoksida** |
| **MCP-1** | **monocitni kemotaktični protein 1** |
| **MMP** | **matriks metaloproteinaze** |
| **MT-MMP** | **membranski tip metaloproteinaza** |
| **OSM** | **onkostatin M** |
| **PDGF** | **čimbenik rasta iz trombocita** |
| **PGI** | **prostanglandini** |
| **RAS** | **renin angiotenzin sustav** |
| **RI** | **indeks rezistencije** |
| **ROI** | **reaktivni oksidativni intermedijatori** |
| **RTKs** | **tirozin kinaza receptori** |
| **TIMP** | **tkivni inhibitori metaloproteinaza** |
| **TNF** | **čimbenik nekroze tumora** |
| **TGF** | **transformirajući čimbenik rasta** |

**S A D R Ž A J**


**1. UVOD**..... 8

1.1. Renin-angioteznin sustav..... 9

1.1.1. Angiotenzinogen..... 13

1.1.2. Prorenin..... 14

1.1.3. Renin..... 14

1.1.4. Angiotenzin I..... 17

1.1.5. Angiotenzin konvertirajući enzim..... 17

1.1.5.1. Klinički značaj ACE..... 21

1.1.5.2. Značaj angiotenzin konvertirjućeg enzima u nekim patofiziološkim stanjima..... 22

1.1.5.3. Aktivnost ACE u bolestima jetre..... 24

1.1.6. Angiotenzin II..... 25

1.1.7. Angiotenzin (1-7)..... 27

1.2. Endotelini..... 28

1.2.1. Sinteza endotelina..... 28

1.2.2. Receptorski sustav za endoteline i njihov signalni sustav... 33

1.2.3. Izvanjetreni učinci ET-1 ..... 35

1.2.3.1. Učinci na kardiovaskularni sustav..... 38

1.2.3.2. Neuroendokrini učinci..... 38

1.2.3.3. Učinci na stanični rast..... 38

1.2.4. Učinci ET-1 na jetru..... 39

1.2.4.1. Endotelinski receptori u jetri..... 39

1.2.4.2. Učinci ET-1 na regulaciju protoka u jetri..... 40

1.2.4.3. Učinci ET-1 na Kupfferove stanice i na endotelne stanice sinusoida..... 41

1.2.4.4. Učinci ET-1 na protok žuči..... 42

1.2.4.5. Glikogenolitički učinci ET-1..... 42

1.3. Patofiziologija jetrene fibroze..... 43

**2. OBRAZLOŽENJE TEME i CILJEVA ISTRAŽIVANJA**..... 55

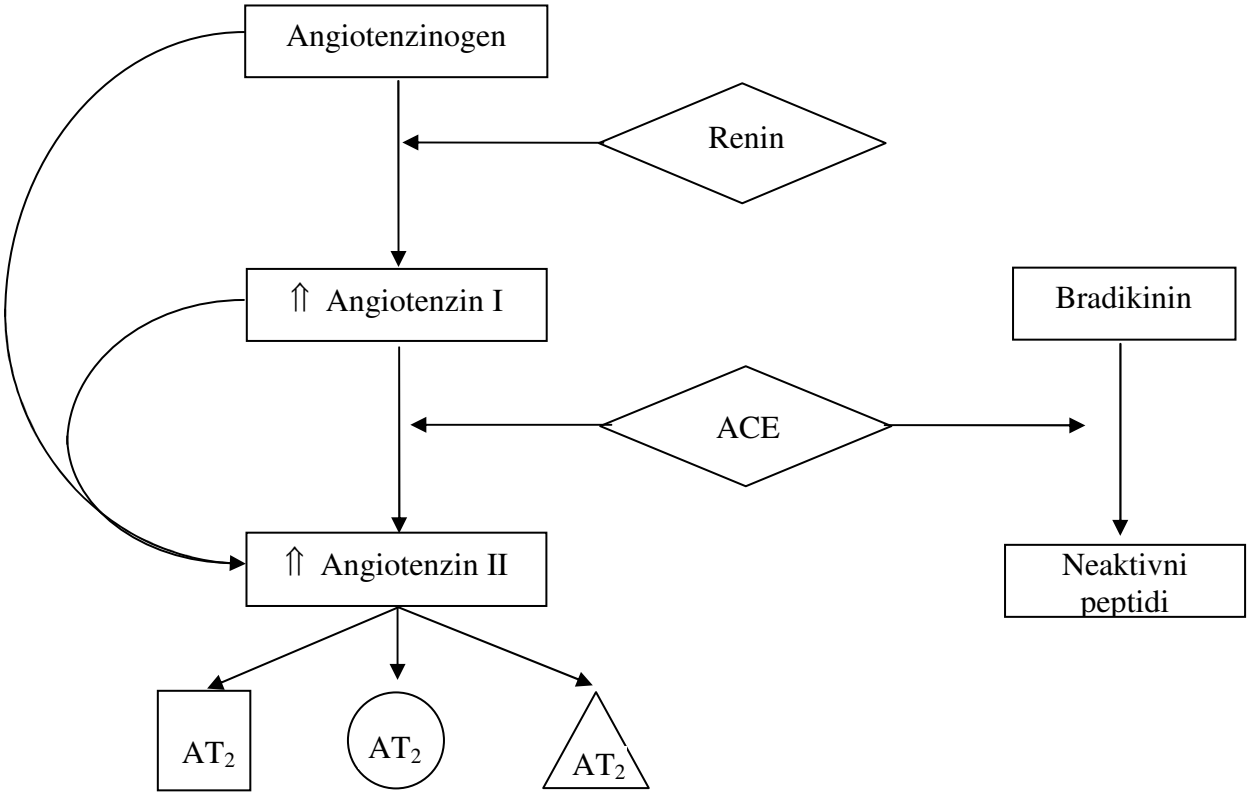
**3. ISPITANICI i METODE**..... 59
3.1. Ispitanici..... 60
3.2. Metode rada..... 61
3.2.1. Hematološke i biokemijske analize..... 61
3.2.2. Ultrazvučna pretraga i dopler analiza..... 62
3.2.3. Određivanje serumske aktivnosti ACE..... 64
3.2.4. Određivanje serumske koncentracije ET-1..... 65
3.2.5. Statistička obrada podataka..... 65
**4. REZULTATI**..... 66
**5. RASPRAVA**..... 84
**6. ZAKLJUČCI**..... 96
**7. SAŽETAK**..... 98
**8. SUMMARY**..... 102
**9. LITERATURA**..... 105
**10. ŽIVOTOPIS**..... 129

# 1. UVOD

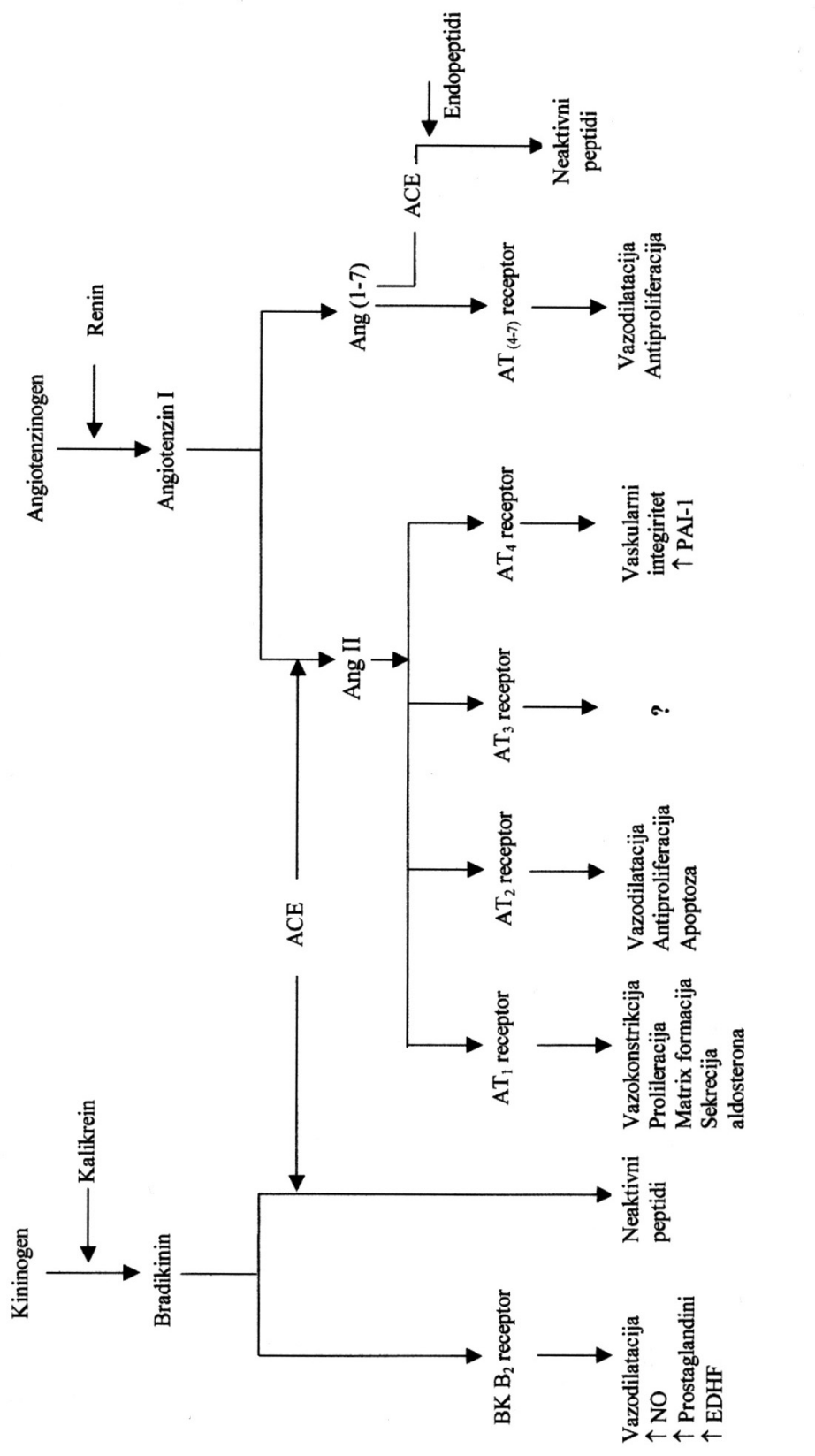
## 1.1. RENIN ANGIOTENZIN SUSTAV (RAS)

Istraživanja Tigerstedta i Bergmana (1) još krajem 19. stoljeća ukazala su na ulogu bubrega u regulaciji krvnog tlaka. Ovi autori, izvodeći eksperimente na psima, pokazali su da intravenska aplikacija sirovog ekstrakta kore bubrega, kojoj su dali naziv "renin", rezultira značajnim porastom krvnog tlaka. Kasnija istraživanja Goldblatta i suradnika (2) pokazala su da suženje renalne arterije u psa dovodi do kronične arterijske hipertenzije. Nakon niza bezuspješnih pokušaja da se pasivnom imunizacijom životinja to stanje korigira, opada interes za dalja istraživanja RAS-a. Tek nakon otkrića angiotenzin konvertirajućeg enzima i uvođenja radioimunološke analize renina ponovo je poraslo zanimanje za istraživanja uloge bubrega u razvoju arterijske hipertenzije. To je dovelo do otkrića čitavog niza enzima, peptida i kofaktora koji su izgradili koncept *klasičnog renin-angiotenzin sustava ( RAS )* (3) (Slika 1.) kao niza međusobno ovisnih reakcija koje počinju s *proreninom i* završavaju nastankom *angiotenzina.* Tijekom vremena, bilo je sve više dokaza o povezanosti ovog sustava sa simpatičkim živčanim sustavom, prostaglandinskim sustavom i kalikrein-kinin sustavom (3). Rezultati novijih istraživanja ukazuju na postojanje potpuno novih peptida, enzima koji tvore te peptide, novih receptora i novih funkcija, već ranije detektiranih receptora unutar ovog sustava stvarajući tako *novi koncept klasičnog RAS-a* (4-11) (slika 2.).

**Slika 1.** *Koncept "klasičnog" renin-angiotenzin sustava*



**Slika 2. "***Novi***"** *koncept klasičnog renin agitenzin sustava*



Danas RAS nije više poznat samo kao cirkulirajući hormonalni sustav koji regulira promet elektrolita, tekućine i arterijski tlak, sudjelujući tako u patofiziologiji kardiovaskularne i bubrežne bolesti. Tijekom posljednjih nekoliko godina sve je veći naglasak na RAS kao poseban parakrini/autokrini sustav na razini tkiva, poznat kao *lokalni, tkivni RAS,* koji funkcionira potpuno neovisno o komponentama RAS-a u sustavnoj cirkulaciji. Studije su pokazale važnost tkivnih RAS-a u mozgu, srcu, bubrezima, perifernim krvnim žilama (12-18), reproduktivnim organima, fibroblastima i makrofagima (19) te u retini i cilijarnom tijelu oka (20). Bitan preduvjet ovog koncepta jest da se od svih komponenti kaskade lokalnog RAS-a, angiotenzin II mora stvarati isključivo lokalno, u tkivu, i u njemu se vezivati na ANG II receptore membrana stanica u kojima se stvara (autokrino djelovanje) ili na receptore susjednih stanica (parakrino djelovanje) (l6). Iako još puni proturječnosti, posljednjih su godina objavljeni radovi koji ukazuju na mogućnost postojanja cijelovitog intracelularnog RAS-a, tzv. *intrakrinog RAS-a,* čije se komponenete ne trebaju izlučivati u izvanstanični prostor da bi započele biološko djelovanje (21).

Klinička istraživanja klasičnog renin-angiotenzin sustava ukazala su na promjene aktivnosti razine pojedinih komponenti ovog sustava u različitim patofiziološkim stanjima. Posljedica toga su značajni pomaci u dijagnostici i terapiji različitih bolesti (22-25).

### 1.1.1. Angiotenzinogen

Supstrat renina, *angiotenzinogen (AGT)*, je glukoprotein plazme, molekularne mase oko 61000, koji sadrži oko 14% ugljikohidrata (3). Biosinteza ovoga $\alpha_2$-globulina se zbiva u jetri, odakle dospijeva u plazmu (3). Ovaj slijed je potvrđen znatnim smanjenjem koncentracija AGT u serumu nakon parcijalne hepatektomije ili trovanja kloroformom. Biokemijska istraživanja su dokazala postojanje dva oblika angiotenzinogena, koji se razlikuju u molekularnoj masi, Michaelisovoj konstanti i elektroforeznoj migraciji (3).

Postojanje cijelovitih lokalnih, tkivnih RAS-a ukazuje i na lokalno stvaranje AGT nezavisno o procesu njegova nastajanja u klasičnom, cirkulacijskom RAS-u (12-18).

Mehanizam koji kontrolira razinu AGT u plazmi još nije poznat. Pretpostavlja se da bi angiotenzin II mehanizmom pozitivne povratne sprege mogao poticati biosintezu angiotenzinogena u jetri. Neki autori ukazuju na postojanje plazmatskog čimbenika nazvanog *y-globulin*, koji potiče sintezu AGT kod nefrektomiranih životinja. Eskperimentalno je dokazano da razina glukokortikoida u plazmi pozitivno djeluje na proizvodnju AGT u jetri (3).

Klinička istraživanja su pokazala da je razina AGT u plazmi smanjena u bolesnika s cirozom jere, nefrotskim sindromom i Addisonovom bolešću (3) Smanjenje koncentracije AGT u plazmi zapaženo je kod životinja i nakon adrenektomije i hipofizektomije (3). Porast razine tog glukoproteina utvrđen je u trudnoći, u Cushingovu sindromu, malignoj hipertenziji te poslije davanja ACTH, hormona kore nadbubrežne žlijezde, ekstrogena i poslije bilateralne nefroktomije (3).

### 1.1.2. Prorenin

Prorenin je prethodnik aktivnog renina, a nastaje u jukstaglomerularnim stanicama odakle se može izlučiti u cirkulaciju ili pak deponirati u staničnim granulama. Omjer renin-prorenin je u tim stanicama i do 1:10 (26-27). Prevođenje neaktivne molekule prorenina u aktivnu molekulu renin, odvija se izvan cirkulacije, u endoplazmatskoj mrežici jukstaglomernih stanica bubrega djelovanjem *aktivirajućeg enzima sličnog tripsinu* (3).

Još uvijek nema dovoljno podataka o ulozi prorenina u fiziološkim i patofiziološkim zbivanjima u ljudskom organizmu (27). Sealy i suradnici (28) su prvi ukazali na mogućnost akitvne vazodilatacijske uloge prorenina kao protuteže vazokonstrikcijskom učinku angitenzina II. Visoke količine prorenina nađene su u tekućini folikula ovarija (29), ali moguća uloga u reprodukciji još je uvijek nepoznata. Visoke vrijednosti nađene su i u plazmi bolesnika s dijabetesom tipa I, osobito u onih s krvožilnim komplikacijama (30). Snižene vrijednosti prorenina Sealy je dokazao u plazmi hipertenzivnih bolesnika u odnosu na normotenzivne (28).

### 1.1.3. Renin

Renin klasičnog, cirkulirajućeg RAS-a, je visokospecifični proteolitički enzim molekularne težine 42000 – 49000 koji se stvara i pohranjuje u citoplazmatskim zrncima specijaliziranih mioepitelnih stanica jukstaglomerularnog aparata (31). Te su stanice smještene u zidu renalnih aferentnih arteriola na mjestu njihovog ulaska u glomerul (31). Renin odvaja od N-terminalnog kraja AGT dekapeptid, nazvan *angiotenzin i* (31). Reakcija renin - angiotenzin zbiva se u cirkulaciji, a brzina te reakcije zavisi neposredno od količine AGT u plazmi. Poluživot renina u plazmi iznosi oko 15 minuta (31). Manje količine prorenina

i renina nađene su i u neferktomiranih bolesnika (32), što ukazuje na njihovo izvanbubrežno podrijetlo.

Kontrola izlučivanja renina bila je dugi niz godina predmet opsežnih istraživanja pa se znanja o tom mehanizmu dopunjuju i mijenju (31). Danas prevladava stav da izlučivanje renina klasičnog cirkulirajućeg RAS-a kontrolira nekoliko sustava, a zavisno od fizioloških uvjeta jedna od njih obično preuzima dominantnu ulogu. Tobian i suradnici (32) prvi su iznijeli pretpostavku da jukstaglomerularne stanice bubrega djeluju kao mehanoreceptori, koji reagiraju na promjenu perifernog tlaka u bubrezima. Van Dongen i Peart (33) su upozorili na mogućnost da inhibicija sekrecije renina agiotenzinom II nije posljedica renalne vazokonstrikcije, već da predstavlja mehanizam zavisan o ulasku izvanstaničnog kalcija u jukstaglomerularne stanice.

Velik broj radova pokazuje da *makula densa*, koja djeluje kao osjetljiv senzor za $Na^+$ i $Cl^-$, reagira na promjenu koncentracije elektrolita u tubularnoj tekućini i na oslobađanje renina iz jukstaglomerularnih stanica. Vander i Miller (34) su pokazali da se povećano oslobađanje renina zbiva u odgovoru na smanjeno opterećenje $Na^+$ u tubularnoj tekućini na razini makule dense. Slične rezultate dobili su i drugi autori (35-36).

Važno mjesto u regulaciji lučenja renina zauzima simpatički živčani sustav, jer stimulacija bubrežne inervacije ili infuzija kateholamina povećava sekreciju renina (37). Pretpostavlja se da simpatička inervacija bubrega može mijenjati oslobađanje renina u različitim uvjetima, ali da ona nije nužna za oslobađanje renina iz jukstaglomerularnih stanica. Daljnja istraživanja su pokazala da podraživanje adrenergičkih β receptora potiče oslobađanje renina, dok najnoviji podaci pokazuju da aktivacija unutrastaničnih α receptora koči oslobađanje renina iz jukstaglomerularnih stanica.

Promjena koncentracije elektrolita, posebno $Na^+$, $K^+$ i $Ca^{++}$, ima određeni utjecaj na sekreciju renina (38). Nedavna istraživanja su pokazala da prostaglandinski sustav ima značajnu ulogu u kontroli izlučivanja renina. Prostaglandini $PGE_2$ i $PGI_2$ povećavaju aktivnost renina u plazmi i neposredno utječu na njihovo oslobađanje iz jukstaglomerularnog aparata mehanizmom pozitivne povratne sprege (39). Potvrđeno je i inhibitorno djelovanje angiotenzina II i antidiuretskog hormona na mehanizam sekrecije renina.

Za renin se dugo mislilo da osim pretvorbe AGT u angiotenzin i sam po sebi nema direktnog fiziološkog djelovanja. Međutim, nedavna su istraživanja (12-18) u sklopu koncepta lokalnih, tkivnih RAS-a, po prvi put pokazala da se ovaj enzim vezuje na reninske receptore memebrana mezangijskih stanica u kulturi izazivajući staničnu hipertofiju i povećanje razine *inhibitor-1 aktivatora plazminogena* (9,10). Receptori su građeni od 350 aminokiselina s jednom transmembranskom domenom koja specifično veže prorenin i renin. Osim na mezangijskim stanicama u bubregu, pronađeni su i na membranama glatke muskulature koronarnih i bubrežnih arterija (11).

U kliničkoj praksi, određivanje plazmatske aktivnosti renina poslužilo je kao pouzdan parametar prilikom postavljanja dijagnoze nekih vrsta sekundarnih hipertenzija.

Bolesnici s esencijalnom hipertenzijom mogu se podijeliti u grupe s niskom, normalnom i visokom plazmatskom reninskom aktivnošću, što je značajno u liječenju i prognozi bolesti. U gotovo u 90% bolesnika koji su imali povećanu plazmatsku aktivnost renina u sklopu renovaskularne hipertenzije, nakon operativnog zahvata došlo je do normalizacije krvnog tlaka (25). Nađeno je značajno povećanje plazmatske aktivnosti renina u krvi bubrežnih vena sa zahvaćene strane u bolesnika s hemangiopericitomom ili nefroblastomom. Povećanje aktivnost renina u plazmi dokazano je kod ciroze jetre (40), kongestivne srčane bolesti (16), nefrotskog sindroma u tijeku normalne trudnoće i tijekom primjene estrogenskih kontracepcijskih sredstava (40).

Snižena plazmatska aktivnost renina određena u bolesnika s primarnim aldosteronizmom značajan je diferencijalno-dijagnostički nalaz (41).

### 1.1.4.Angiotenzin I

*Angiotenzin i (ANG I)* je dekapeptid koji nastaje kao proizvod reakcije renin – angiotenzinogen (3. *Angiotenzin i* utječe na povećanje proizvodnje kateholamina u meduli nadbubrežne žlijezde izaziva perifernu vazokonstrikciju djelovanjem na središnji živčani sustav, dok direktnim učinkom izaziva vazokonstrikciju u bubrežnoj cirkulaciji (3). Sudjeluje i u autoregulaciji protoka kroz bubrege (3).

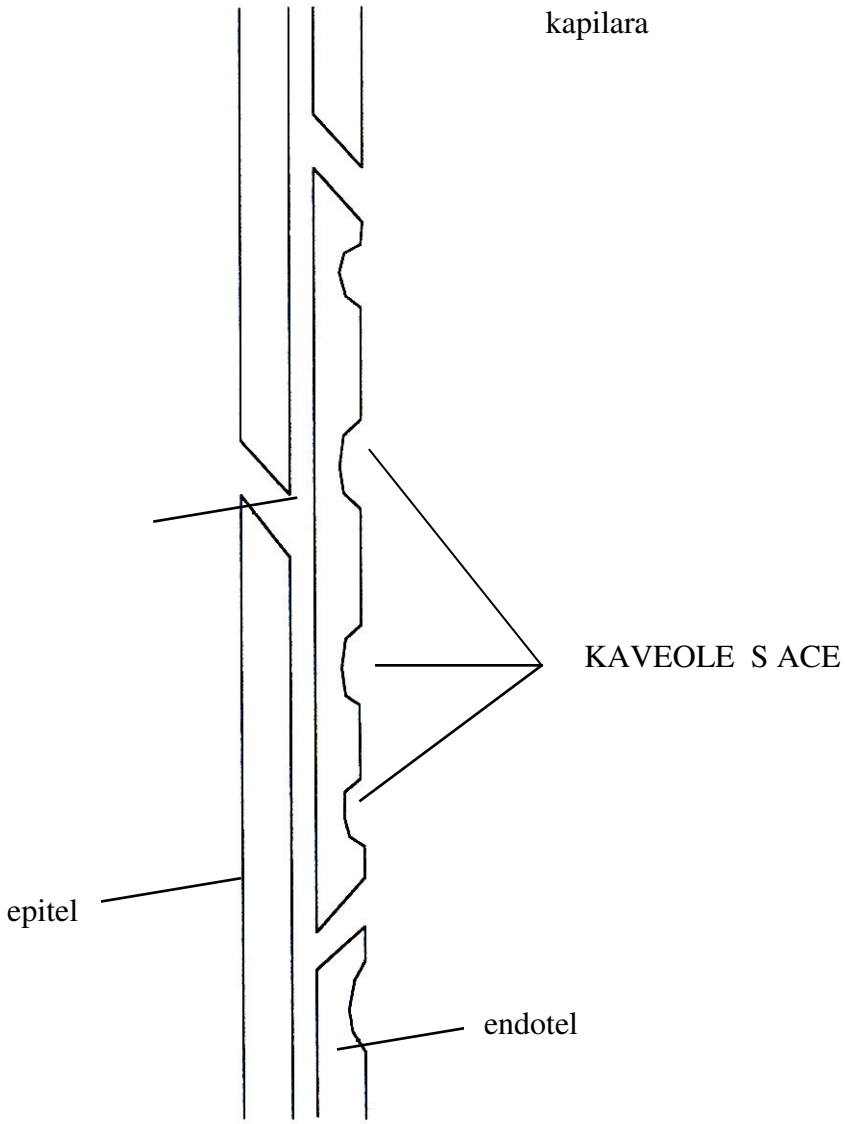
### 1.1.5. Angiotenzin konvertirajući enzimi

Angiotenzin konvertirajući enzim (ACE, prema engl. *angiotensin corverting enzyme*), poznat i pod nazivima peptidil-dipeptid hidrolaza, kininaza II, peptidaza P ili karboksikatepsin, jedan je od ključnih enzima sustava RAS-a koji ima značajnu ulogu u metabolizmu vazoakitvnih peptida (42). Javlja se u tri izoenzimska oblika: *α – izoenzim* koji se nalazi u krvi i potiče iz endotela plućnih krvnih žila, dok su *β i y – izoenzimi* prisutni u različitim strukturama bubrežnoga tkiva (42). Većina ACE-a se javlja u *membranski vezanom oblik*u (42) na plazma membranama različitih tipova stanica kao što su endotelne stanice krvnih žila, mikrovilozna četkasta strana epitelnih stanica poput stanica proksimalnih kanalića u bubregu ili na membranama neuroepitelnih stanica (42). Znatno manja količina ACE-a javlja se u *topivom obliku* (42).

ACE je kiseli glukoprotein s 8-12% ugljikohidrata, molekularne težine oko 150000 i izoelektrične točke oko 4,5 (42). U aktivnom središtu, ACE sadrži ion cinka koji je veoma važan za aktiviranje enzima (42). ACE se može aktivirati i pomoću Co, Mn i Cl (42), a inhibiraju ga kompetitivno razni peptidi iz otrova južnoameričke zmije Bothrops jaruraca, razni sulfhidrini spojevi i EDTA (42). Katalitička esencijalna funkcionalna grupa, aktivno mjesto ACE, sadrži arginin, tirozin, lizin, glutaminsku kiselinu i kompleksno vezan ion cinka. Optimalni pH za ACE je nešto iznad neutralne sredine (pH 7-8), ali mu enzimska aktivnost naglo opada u kiseloj sredini. Pad aktivnosti se događa zbog disocijacije cinka, odnosno njegova udaljavanja iz aktivnog centra. Metodama molekularne biologije ustanovljen je redoslijed aminokiselina u ovom enzimu. ACE izoliran iz endotelnih stanica čovjeka pokazuje dvije homologne domene C i N koje su aktivni centri ACE, ali je kinetika njihove inhibicije različita (42).

Aktivnost ACE je prisutna u gotovo svim krvožilnim tkivima (42). Otkrivene su znatne razlike u aktivnosti ovog enzima kod različitih životinjskih vrsta. Pomoću imunofluorescentnih antitijela Caldwell i sur. (43) su proučavali distribuciju ACE u organizmu. Najveća prisutnost ACE nađena je u plućima. gdje je smješten u kaveolama membrana na luminalnoj površini endotelnih stanica (slika 3) za koji je vezan elektrostatskim silama (43). Visoka aktivnost ACE utvrđena je i u epitelnim stanicama proksimalnih i sabirnih tubula bubrega, kao i u epitelnim stanicama tankog crijeva (19). Nađena je i znatna akitvnosti ACE u testisima te epididimisu, kao i u spermi (44).

**Slika 3**. *Shematski prikaz krvožilne lokalizacije ACE u plućima*



Istraživanja su pokazala da se u ljudskom i životinjskom mozgu nalaze sve komponente renin – angiotenzin sustava pa i sam ACE, osobito u neurohipofizi, korpus striatumu i u supstanci nigri, a kasnije i u drugim područjima mozga (45). Utvrđeno je da krvno-moždana barijera sprječava prijelaz ACE-a iz plazme u moždano tkivo (45).

Visoka specifična aktivnost ACE određena je i u krvnim žilama nadbubrežne žlijezde (45), retine i pleksus korioideusa (20). Smatra se da sustav renin-angiotenzi u oku ima važnu ulogu u regulaciji očnog krvotoka (20).

Eksperimentalno je potvrđeno da frakcija serumskog ACE potječe iz kaveola membrana endotelnih stanica krvnih žila pluća, ali manjim dijelom i iz drugih tkiva (46).

ACE je prilično nespecifičan metaloenzim, koji uglavnom odvaja dipeptide i tripeptide od različitih peptidnih supstrata. Supstrati za tu peptidazu su angiotenzin I, bradikinin, enkefalin, supstancija P, faktor koji oslobađa luteinizirajući hormon, hemoregulatorni peptid, kemotaktični peptid, lanac B inzulina i čitav niz drugih supstrata (47). Ipak, glavna fiziološka uloga ACE je odvajanje dipeptida *histidil-leucin* od C-terminalnog kraja angiotenzina i i stvaranje snažnog vazokonstriktornog oktapeptida, angiotenzina II (47).

Ovaj enzim također inaktivira vazodilatatorni nonapeptid *bradikinin* u sustavnoj cirkulaciji, odvajanjem dipeptida *fenilalanin-arignina* od C-terminalnog kraja peptidnog lanca (48). Prilikom prolaska kroz sustav plućnih kapilara, supstrat angiotenzin i i bradikinin, dolaze u izravan kontakt s ACE-om smještenim u kaveolama krvožilnog endoteola. Neki istraživači ukazuju da se u tijeku prolaza kroz plućnu cirkulaciju, samo 20-40% angiotenzina prevede u angiotenzin II (49). Ipak, smatra se da je proces prevođenja angiotenzina i u angiotenzin II tako učinkovit da se u fiziološkim granicama oko 80% angiotenzina i tijekom jednog prolaska krvi kroz krvožilno korito pluća prevede u angiotenzin II (49).

Izvanplućna konverzija angiotenzina i je prilično brza čemu u prilog govori podatak da intravenska primjena angiotenzina i u arteriju ekstremiteta dovodi do trenutne vazokonstrikcije distalno od mjesta davanja (49).

Novi tip ACE-a označen kao *ACE-2* je po prvi put opisan 2000. godine (50,51), a smješten je na membranama stanica različitih tkiva, prvenstveno na membranama srčanih miocita, endotelnihi i epitelnih stanica bubrega te stanica testisa (50,51). Radi se o cink-metaloproteinazi koja se sastoji od 805 aminokiselina, građom i biokemijskim osobina vrlo sličnoj ACE-u. Kao i ACE, ACE-2 prevodi bradikinin u inaktivni [des-Arg$^9$] bradikinin. Za razliku od njega, ACE-2 ne prevodi ANG i u ANG II (51) već hidrolizira ANG i u angiopeptidazu ANG (1-9), a ANG II u angiopeptidaze (1-7) (50,51), koje imaju posebne, novootkrivene biološke aktivnosti. Ovi učinci ACE-2 na potpuno nov način osvjetljavaju patofiziološke mehanizme kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti, poglavito hipertenzije (50,51).

*1.1.5.1. Klinički značaj ACE*

Ispitivanja serumske aktivnosti ACE u zdravih osoba nisu pokazala dosljednost rezultata. Lieberman i sur. utvrdili su veću serumsku aktivnost ovog enzima u žena nego u muškaraca (52). Drugi autori nisu zapazili spolne i rasne razlike serumske aktivnosti ACE u zdravih osoba (53,54). Prema nekim autorima, serumska aktivnost ACE se ne mijenja u žena tijekom trudnoće, dok su drugi istraživači utvrdili sniženje aktivnosti toga enzima u tijeku prva dva tromjesečja trudnoće (55).

U razdoblju od rođenja do petnaeste godine života serumska aktivnost ACE prilično je ujednačena (56). Utvrđene su znatno veće vrijednosti serumske aktivnosti enzima u odraslih u odnosu na vrijednosti određene u djece (56). U adeloscenata starosne skupine od 15-18

godina, vrijednosti serumske aktivnosti ACE su između vrijednosti određenih u djece i odraslih (56). Nasuprot tome, neka su istraživanja pokazala da je serumska aktivnost ACE obrnuto proporcionalna u odnosu na starost ispitanika (42).

Ispitivanjem dnevnih varijacija serumske aktivnosti ACE u zdravih osoba, tijekom dvanaest tjedana, utvrđeno je da nema značajnijih promjena serumske aktivnosti ovog enzima (51).

*1.1.5.2. Značaj angiotenzina konvertirajućeg enzima u nekim patofiziološkim stanjima*

Serumska aktivnost ACE-a se mijenja u različitim patofiziološkim stanjima (tablica 1.). Lieberman i suradnici (57) prvi su zapazili značajan porast serumske aktivnosti ACE u bolesnika s plućnom sarkoidozom što je kasnije potvrđeno i u drugim istraživanjima (58,59). Stoga je određivanje serumske aktivnosti ACE u ovih bolesnika postala rutinska pretraga u klinikama diljem svijeta, jer se taj parametar potvrdio kao veoma dobar pokazatelj za postavljanje dijagnoze bolesti (59). Njegovim određivanjem dobiva se uvid u tijek bolesti i praćenje učinka primjenjene terapije. Silverstein i suradnici su utvrdili povećanje serumske aktivnosti ACE u skupini od 9 bolesnika oboljelih od Gaucherove bolesti (60). Lieberman i Rea su početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća ukazali na porast serumske aktivnosti enzima u 15 od 26 neliječenih bolesnika oboljelih od lepre (61). Daljnja istraživanja su pokazala porast serumske aktivnosti ACE u bolesnika s oboljelih od akutne ili subakutne milijarne tuberkuloze (62) i u osoba oboljelih od silikoze i azbestoze (63). Schweisfurth i suradnici odredili su povećanu serumsku aktivnost ovog enzima u 50% bolesnika s esencijalnom arterijskom hipretenzijom (64). Ti autori su zapazili pozitivnu korelaciju između serumske aktivnosti ACE-a i sistoličkog, srednjeg arterijskog i dijastoličkog krvnog tlaka, kao i negativnu koleraciju između serumske aktivnosti ACE-a i plazmatske reninske aktivnosti,

Radovi Osborna i Studera (65,66) i suradnika nisu pokazali značajan porast serumske aktivnosti ACE u bolesnika s aterijskom hipertenzijom. Istraživanja su pokazala da i u hipertireozi dolazi do povećanja serumske aktivnosti ACE-a (67). Porast serumske aktivnosti ACE-a zapažen je i u bolesnika sa šećernom bolešću (68). Raff i suradnici otkrili su porast serumske aktivnosti ACE-a kod nekih kožnih bolesti, kao što su psorijaza i lihen planus (69).

Sniženje serumske aktivnosti ACE zapaženo je u djece s akutnim respiratornim distresnim sindromom (70), u bolesnika s bronhalnom astmom, kroničnim bronhitisom i plućnim emfizemom (71) te u bolesnika s cističnom fibrozom pluća i s karcinomom pluća (72), bolesnika s Hodgkinovom bolesti nekim limfomima (73), a postoje i podaci da je serumska aktivnost ACE značajno snižena i u bolesnika s hipotireozom (74).

Navedene činjenice pokazuju da su istraživanja serumske aktivnosti ACE u različitim bolestima predemt velikog zanimanja. znanstvenika.

**Tablica 1.** *Promjene serumske aktivnosti ACE u nekim bolesnim stanjima*

| Povećana aktivnost ACE | Smanjena aktivnost ACE |
|---|---|
| aktivna sarkoidoza | fibroza pluća |
| silikoza | emfizem pluća |
| azbestoza | bronhijalna astma |
| Morbus Gaucher | kronični obstruktivni bronhitis |
| lepra | opstruktivni ikterus |
| Morbus Hodgkin | karcinom pluća |
| virusni hepatitis | multipli mijelom |
| ciroza jetre | leukemije |
| hipertireoza | maligni limfomi |
| psorijaza | hipotireoza |
| lihen planus | |

*1.1.5.3. Aktivnost ACE u bolestima jetre*

Uloga sustava renin-angiotenzin u nastanku jetrene bolesti malo je poznata usprkos činjenici da se u jetri stvara angiotenzinogen, polazni peptid ovog sustava.

Dosadašnja istraživanja serumske aktivnosti ACE-a su pokazala da se aktivnost ovog enzima mijenja u različitim bolestima jetre. Prve podatke o promjeni serumske aktivnosti ACE-a u bolestima jetre dali su Schweisfurth i Wenze (75). Oni su našli porast serumske aktivnosti ACE-a u bolesnika s virusnim hepatitisom i u bolesnika s cirozom jetre, što su kasnije potvrdili i drugi autori (76,77). Daljnja istraživanja u ovom području su pokazala da se serumska aktivnost ACE-a povećava u bolesnika s akutnim hepatitisom, kroničnim perzistentnim i kroničnim aktivnim hepatitisom a da se smanjuje u bolesnika s opstrukcijskom žuticom (77).

Sakata i suradnici (78) su određivali serumsku aktivnost ACE-a u 76 zdravih ispitanika i 107 bolesnika s kroničnim bolestima jetre i uspoređivali dobivene rezultate s rezultatima konvencionalnih testova karakterističnih za kronične bolesti jetre. Dokazali su da je određivanje serumske aktivnosti ACE-a jedan od najboljih pokazatelja aktivnosti kroničnih bolesti jetre. Istraživanja Podwysockog i sur. (79) pokazala su značajno povećanje serumske aktivnosti ACE-a u skupinama bolesnika s akutnim i kroničnim virusnim hepatitisom, s cirozom jetre i s intrahepatičkom kolelitijazom. Istodobno, nisu zapazili promjenu serumske aktivnosti ACE-a u bolesnika s ekstrahepatičkom kolelitijazom. Stoga su zaključili da određivanje serumske aktivnosti ACE-a može poslužiti kao pouzdan test u diferencijalnoj dijagnozi žutice pri bolestima parenhima jetre u odnosu na žuticu uzrokovanu ekstrahepatičkom patologijom.

Naša su istraživanja pokazala da je serumska aktivnost ACE-a statistički značajno povišena u bolesnika s cirozom jetre, a statistički značajno snižena u bolesnika s cirozom jetre i HCC u odnosu na aktivnost ovog enzima određene u zdravih ispitanika (80). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost kliničke primjene određivanja serumske aktivnosti ACE kao jednog od tumorskih obilježivača za ranu detekciju HCC, posebice u skupini bolesnika s cirozom jetre. Posljednjih godina sve je više radova koji pokazuju da lokalni RAS u jetri, odnosno ANG II, sudjeluje u procesu nastanka jetrene fibroze započinjući proliferaciju i kontrakciju stelatnih (Ito) stanica u jetrenim sinusima (81,82,83).

### 1.1.6. Angiotenzin II

Angiotenzin II (ANG II), oktapeptid po strukturi, glavni je izvršni hormon renin-angiotenzin sustava (slike 1. i 2.) (14). Svoje fiziološke učinke pokazuje već pri koncentraciji od 100 pg/ml plazme, a u organizmu se veoma brzo razgrađuje djelovanjem grupe peptidaza, nazvanih *angiotenzinaze* (14). Poluživot ANG II određen in vivo traje 1,5 – 3 minute. Za njegovu fiziološku aktivnost od naročitog je značaja nazočnost fenil – alanina u položaju 8, kao i prisutnost slobodne karboksilne skupine na C-terminalnom kraju peptidanog lanca (84). Na temelju ovih zapažanja, sintetizirani su mnogobrojni kompetetivni inhibitori angiotenzina II, koji su dali nove mogućnosti za bolja i potpunija istraživanja renin-angiotenzin sustava, kao i za neke terapijske primjene u kliničkoj praksi (85,86).

Učinci ANG II (tablica 2; slika 2.) ovise o vrsti receptora na koje ovaj enzim djeluje. Metodama molekularne biologije dokazana su četri tipa receptora za angiotenzin II: tip1 ($AT_1$), tip 2 ($AT_2$), tip 3 ($AT_3$) i tip 4 ($AT_4$) (sl.2.) (87).

Istraživanja $AT_1$ receptora su znatno olakšana nedavnim otkrićem njihovih selektivnih antagonista (48). Spadaju u grupu sedam-transmembranskih receptora vezanih za G proteine i javljaju se u dva oblika: - $AT_{1a}$ i $AT_{1b}$ (87). Izravnim učinkom ANG II na $AT_1$ receptore glatkih mišića krvnih žila izaziva snažnu vazokonstrikciju (88-92), a na $AT_1$ receptore kore nadbubrežne žlijezde potiče stvaranje i lučenje aldosterona (93). U srži nadbubrežne žlijezde preko AT1 receptora pojačava lučenje kateholamina (94). ANG II preko $AT_1$ receptora sprječava ponovno upijanje noradrenalina na simpatičkim živčanim završecima što dovodi do povećane aktivnosti simpatikusa (94). Aktivacijom AT-1 receptora, ANG II stimulira staničnu proliferaciju i stvaranje ekstracelularnog matriksa (87).

Donedavno se malo znalo o strukturi i funkciji $AT_2$ receptora. Pripadaju grupi od sedam transmembranskih receptora vezanih za G proteine s niskim postotkom istovjetnosti u aminokiselinskim sekvencama s $AT_1$, svega oko 35% (95). Jako su izraženi u fetalnim tkivima, a u odraslih u bubrezima, nadbubrežnim žlijezdama, srcu, mozgu, miometriju i ovarijalnim folikulima koji su u atreziji (96,97). Izravnim djelovanjem na $AT_2$ receptor u membranama glatkih mišićnih stanica krvnih žila, ANG II izaziva vazodilataciju (98,99). Isti učinak ANG II ostvaruje stimuliranjem nastanka bradikinina i dušičnog oksida posrednim djelovanjem na ovoj receptor (100,101). Preko $AT_2$ receptora,u krvnim žilama ANG II izražava antiproliferativne i apoptotičke učinke na stanice glatke muskulature što ukazuje na značaj $AT_2$ receptora za rast i razvoj (102).

Uloga $AT_3$ receptora još nije do kraja istražena, dok stimulacijom $AT_4$ receptora ANG II potiče vaskularni integritet (87).

### 1.1.7. Angiotenzin (1-7)

Angiotenzin (1-7) – ANG (1-7), heptapeptidni fragment ANG II, jedan je od glavnih peptidnih produkata kako cirkulirajućeg tako i tkivnog RAS-a (103). Nastaje iz ANG i djelovanjeme različitih peptidaza uključujući *neutralnu endopeptidazu (NEP) i prolil-endopeptidazu (PEP)* ili iz ANG II djelovanjem ACE-2 (50,51) (slika 2.). Iako specifični ANG (1-7) receptor nije kloniran, postoji niz fizioloških dokaza njegova postojanja i nedavna izvješća ukazuju da se najvjerojatnije radi o endogenom ligandu vezanom za G proteine stanice (103).

ANG (1-7) reagira i sa $AT_1$ i $AT_2$ receptorima tako što se može blokirati s antagonistima ova dva receptora (103). Glavni učinci ANG (1-7) su uglavnom suprotni učincima koje ANG II ima vezujući se za $AT_1$ receptore. ANG (1-7) djeluje vazodilatacijski potičući vezivanje bradikinina na njegov receptor (104,105) i oslobađanjem dušikovog oksida iz endotelnih i glatkih mišićnih stanica krvnih žila (106-108). Koči proliferaciju endotelnih stanica u krvnim žilama (107). Novija istraživanja su pokazala značajne učinke ANG (1-7) u središnjem živčanom sustavu, kao što su polidipsija, pojačano lučenje antidiuretskog hormona i ACTH, oslobađanje acetilholina iz moždane kore aktivacija neurona u supraoptičkim jezgrama (109).

## 1.2. ENDOTELINI

### 1.2.1. Sinteza endotelina

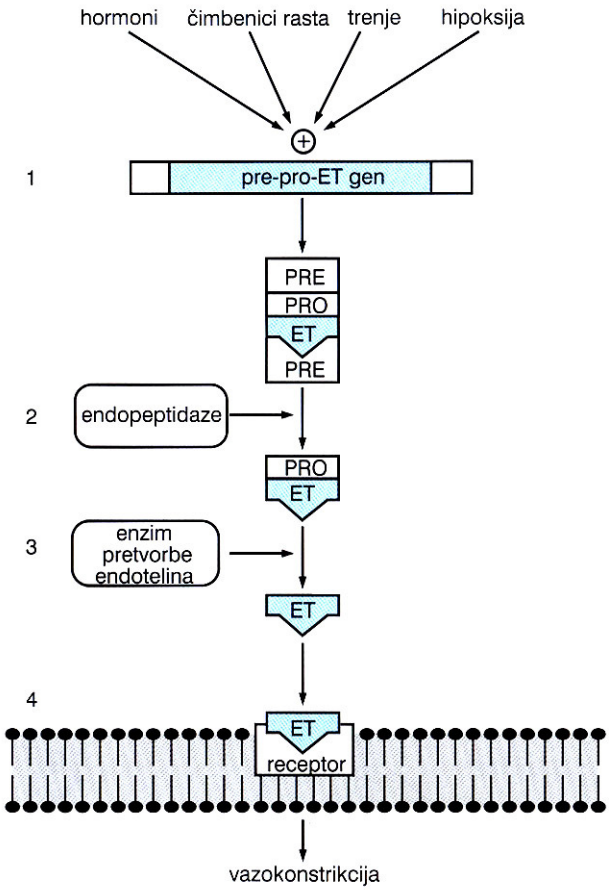
Endotelini čine skupinu endogenih peptida, slične su građe te imaju snažno i dugotrajno vazokonstrikcijsko djelovanje. Razlikuju se tri peptida građena od 21 aminokiseline: *endotelin 1 (ET-1*), *endotelin 2 (ET-2)* i *endotelin 3 (ET-3)* (110). Prvotno su izolirani iz kulture endotelnih stanica svinjske aorte (111). Kasnija istraživanja su pokazala da je sinteza endotelina rasprostranjena u brojnim tkivima. Tako je mRNA za ET-1 nađena u srcu, plućima, jetri, slezeni, želucu, tankom i debelom crijevu, mišićima i testisima (112,113). ET-3 ima najviše u središnjem živčanom sustavu osobito u anteroventralnom dijelu periventrikularne zone treće komore te u supraoptičkim neuronima (112,113). Za ET-2 mRNA je nađena u želucu, tankom i debelom crijevu, gušterači te u mišićima (113).

Svaka od izoformi endotelina kodirana je zasebnim genom. Ljudski gen za ET-1 nalazi se na kromosomu 6, za ET-2 na kromosomu 20, a za ET-3 na kromosomu 1 (110).

Biosinteza endotelina (slika 4.) počinje stvaranjem *pre-pro-endotelina (pre-pro-ET),* koji se u čovjeka sastoji od 212 aminokiselina, a gen za njegovo kodiranje smješten je na kromosomu 6. i sadržava 5 egzona. U endoplazmatskoj mrežici se pod djelovanjem specifičnih endopeptidaza pre-pro-endotelin hidrolizom pretvara u *pro-endotelin (pro-ET)* koji ima 38 aminokiselina (110). Njegova daljnja sudbina je dvojaka: dio pro-endotelina nastalog u stanici se već intrastanično prerađuje u *zreli endotelin (ET),* a dio se izlučuje u nepromjenjenom obliku te se u perifernim tkivima pretvara u zreli oblik (110). Pretvorbu *pre-ET* u *ET* obavlja neutralna peptidaza, ovisna o metalima i smještena je na staničnoj membrani i u endoplazmatskoj mrežici (114,115). Ta peptidaza nazvana i *enzim pretvorbe endotelina (Endothelin Converting Enzyme-ECE)* katalizira samo hidrolizu pro-ET, ali ne i drugih peptida (114,115). Njenim djelovanjem uz zreli ET nastaje i biološki nedjelatni C-ulomak

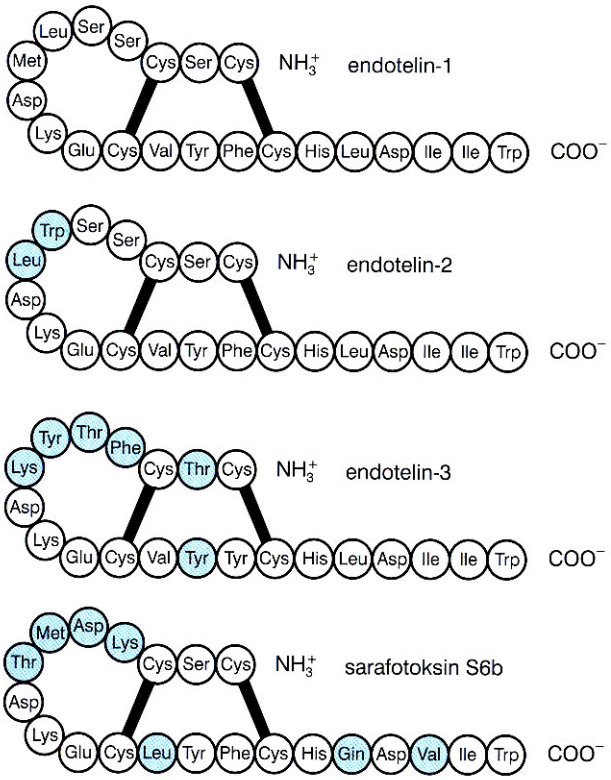
(114,115). Sve je više dokaza za postojanje različitih formi ECE koje se međusobno razlikuju prema afinitetu za pojedine endoteline (116). Mnogi čimbenici koji induciraju ili koče sintezu endotelinske mRNA u endotelnim stanicama prikazani su u tablici 3. (117-124).

**Slika 4.** *Biosinteza i lučenje ET*



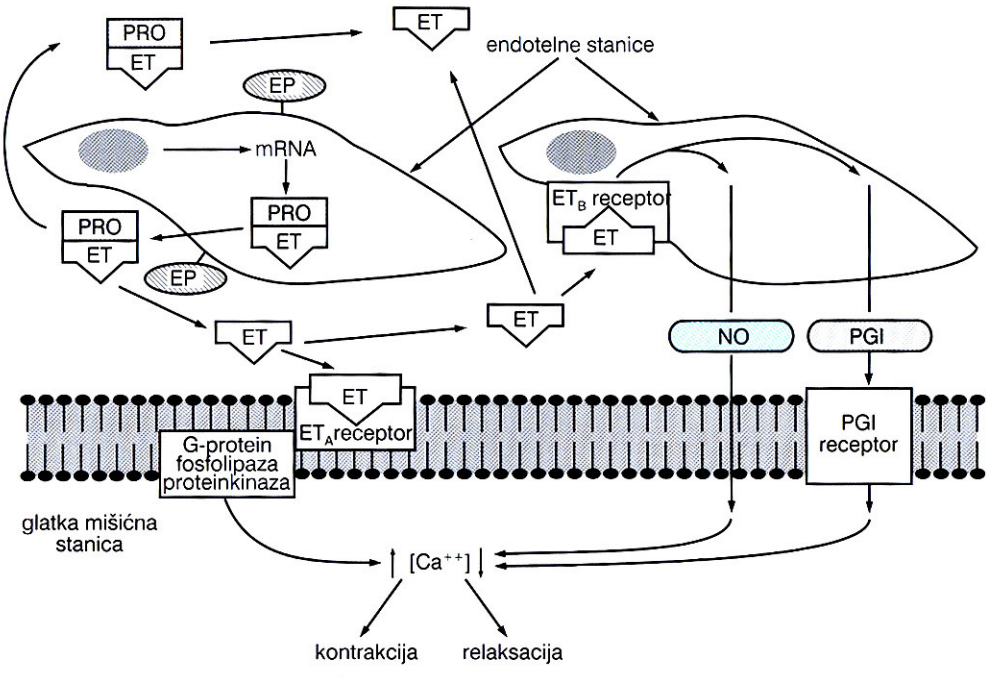

(1) Neposredni proizvod transkripcije jest pre-pro-endotelin. (2) Odcjepljenjem peptida s njegovih krajeva nastaje pro-endotelin. (3) Enzim pretvorbe, koji se nalazi na membrani endotelin stanica, pri lučenju pro-endotelina odcjepljuje njegov završni peptid i tako ga pretavara u endotelin, (4) koji se veže na membranske receptore glatkih mišićnih stanica krvnih žila i uzrokuje vazokonstrikciju.

**Slika 5.** *Struktura molekule ET-1,ET-2 i ET-3*




ET1 i ET2 međusobno se razlikuju u samo dvije aminokiseline a ET1 i ET3 u 6 aminokiselina

**Slika 6.** *Mehanizam djelovanja endotelina*




Endotelne stanice luče pro-endotelin (PRO-ET), koji djelovanjem enzima pretvorbe (EP) prelazi u endotelin. Endotelin se veže na endotelinske A-receptore na membranama glatih mišićnih stanica krvnih žila. Djelujući putem fosfoinozitolskog glasničkog sustava povećava unutarstaničnu koncentraciju Ca $^{++}$ i izaziva kontrakciju mišićnih stanica i vazokonstrikciju. Vezajući se na endotelinske B-receptore na membranama endotelnih stanica, endotelin potiče lučenje dušikovog monoksida (NO) i prostaciklina (PGI) koji izazivaju vazodilataciju.

**Tablica 3.** *Čimbenici koji utječu na lučenje endotelina*

| | Potiču lučenje ET-1 | Koče lučenje ET-1 |
|---|---|---|
| HORMONI | inzulin<br>adrenalin<br>ADH<br>angiotenzin II | |
| MJESNI ČIMBENICI | trombin<br>citokini (interleukin 1)<br>čimbenici rasta (TGF-α i TGF-β)<br>endotksini<br>slobodni radikali | atrijski natriuretički peptid (ANP)<br>dušikov monoksid (NO) |
| FIZIKALNI UTJECAJI | hipoksija<br>hipovolemija<br>viskozno povlačenje(trenje) endotela | pojačano strujanje krvi (*fluid shear stress* ) |

Osnovna strukturna značajka molekule ET-a su dva disulfidna mosta između 4 cisteinska ostatka ($Cys_1$ i $Cys_{15}$ te $Cys_3$ i $Cys_{11}$) zbog čega se stvara petlja koja uključuje 15 aminokiselina (slika 5.) (110). U petlji se nalazi i skupina od 6 do 8 polarnih aminokiselinskih ostataka. Ostatak molekule ET-a je linearan, hidrofilan i čini najsačuvaniji dio molekule u različitih izoformi ET-a. ET-2 se od ET-l razlikuje samo u 2 a ET-3 u 6 aminokiselinskih ostataka potvrđujući tako veliku sličnost među pojedinim izoformama ET u čovjeka (110).

Strukturno vrlo sličan ljudskim endotelinima je *sarafotoksin S6b*, zmijski otrov vrste Actraspis engaddensis, koji u žrtve izaziva koronarnu vazokonstrikciju i smrt zbog ishemije i infarkta miokarda (112). Ta izrazita međusobna podudaranost u strukturi i aminokiselinskim slijedovima kao i podudarnost pojedinih izoformi ET-1 u različitih životinjskih vrsta odražavaju jake selekcijske utjecaje tijekom evolucije kojima su ET bili izloženi, što opet upućuje na važnost biološke uloge endotelinskog sustava.

Endotelini se izlučuje na dva načina: konstitutivno i regulatorno (112). Konstitutivnom lučenju je svojstvena sporija promjena veličine lučenja nakon primjene odgovarajućeg podražaja (125). Ovaj, za ET najčešći tip nadzora nad izlučivanjem, podrazumijeva prepisivanje gena za *pre-pro-ET* ili povećanje stabilnosti mRNA za *pre-pro-ET* (112). Primjer regulatornog načina izlučivanja je ET pohranjen u sekretornim zrncima neurohipofize iz kojih se vrlo brzo prazni nakon odgovarajućeg podražaja (125). Jednom stvoren ET-1 u endotelnim stanicama krvnih žila secernira kroz bazolateralnu membranu potvrđujući pri tomu svoju polarnost sekrecije. Od početka primjene podražaja za lučenje ET do promjene u veličini njegove sekrecije potrebno je 3 i više sati (110).

### 1.2.2. Receptorski sustav za endoteline i njihovi signalni sustavi

Receptori za endoteline otkriveni su u brojnim tkivima i organima poput krvnih žila, srca, nadbubrežnih žlijezda, bubrega, mozga, pluća, jetre i drugim organima (126).

Otkrivena su tri endotelinska receptora: vazokonstrikcijski $ET_A$ *receptor* i vazodilatacijski $ET_B$ *receptor* (sl.6) (126). Oba pripadaju superporodici G protein-ovisnih receptora. Nešto kasnije je otkriven i $ET_C$ *receptor* čija je funkcija i distribucija još uvijek u potpunosti nejasna (127).

Prema aminokiselinskom slijedu i osjetljivosti na agoniste i antagoniste dokazana je selektivnost i različitost u funkcijama navedenih receptora za pojedine izoforme ET (l26). $ET_A$ receptor veže ET-1 i ET-2 s većim afinitetom nego ET-3. S druge strane, $ET_B$ receptor pokazuje jednake afinitete za sve tri izoforme endotelina, dok se $ET_C$ receptor selektivno aktivira samo vezanjem ET-3 (127). Posljednjih godina, opisuju se već i podtipovi $ET_B$ receptora: $ET_{B1}$ i $ET_{B2}$ (128), koji se razlikuju u selektivnosti pokazujući pri tomu i odgovarajuće specifične biološke efekte. Podudarnost aminokiselinskih slijedova između različitih podtipova ET receptora unutar iste biološke vrste iznosi oko 50% (128), dok za istu podvrstu receptora u različitih vrsta iznosi 80-90% (107).

Osobitost endotelinskih receptora je dug N-početak. On sadrži signalni slijed koji omogućuje pravilni smještaj molekule u staničnoj membrani i podložan je glikozilaciji za koju se smatra da je važna u određivanju osjetljivosti receptora na njegove ligande. Pojedine podvrste ET receptora se najviše razlikuju u aminokiselinskim slijedovima u području N početka i izvanstaničnih petlji, dok je najveća sličnost izražena u slijedovima transmembranskih područja (130). N-početak s izvanstaničnim petljama tvori vezno mjesto za ligande (131). Tako je u slučaju $ET_A$ receptora, za vezivanje ET-1 uz N-početak i to njegov dio uz memebranu, bitan i C-kraj drugog transmembranskog odsječka (132). Na $ET_B$ receptoru vezno mjesto za ET-3 tvore druga i treća izvanstanična petlja kao i C-kraj drugog transmembranskog odsječka receptora (133,134). Podatci o veznom mjestu $ET_C$ nisu poznati.

Unutarstanični dijelovi molekule su citoplazmatske petlje i C-kraj. Za prijenos poruke dobivene vezanjem ET glavna je sprega receptora s G proteinima. Vezno mjesto za G proteine tvori treća citoplazmatska petlja koja je kod ET receptora kratka u usporedbi s drugim receptorima ove vrste. C-kraj sadrži nekoliko serinskih i treoninskih ostataka koji mogu biti fosforilirani pod uticajem proteinkinaza, što je ujedno i jedan od vidova nadzora nad brojem i

afinitetom receptora (135). Cisteinski ostatci C-kraja mogu biti palmitoilirani što je važno za ukotvljenje receptora u staničnu membranu (135).

Danas je posve jasno da su razni biološki učinci endotelina posredovani aktivacijom različitih puteva prijenosa signala koji vjerojatno doprinose i različitosti odgovora na njihove podražaje. Djelovanje endotelina (slika 6.) preko $ET_A$-receptora na membrani glatkih mišćnih stanica krvnih žila aktivira *sustav fosfolipaze C* ovisne o fosfatidilinozitol 4,5-bisulfatu (136) koja povisuje koncentraciju slobodnog unutarstaničnog $Ca^{++}$ i koči njegovo izbacivanje iz stanice s posljedičnom vazokonstrikcijom (137). Ovom učinku endotelina prethodi kratkotrajni vazodilatacijski učinak. Njega izaziva autokrino povratno djelovanje endotelina preko $ET_B$-receptora na membranama endotelnih stanica što onda prolazno potiče stvaranje prostaciklina i dušikovog monoksida (NO) koji izazivaju vazodilataciju (slika 6.). U jetrenim stanicama, srčanim mišićnim stanicama, glatkim mišićnim stanicama krvnih žila kao i stanicama malog mozga aktivaciju sustava fosfolipaze C endotelinom posreduju G proteini razreda $G_q$ (138-140) dok u astrocitima, glatkim mišićnim stanicama nekih krvnih žila i mezangijskim stanicama sustav fosfolipaze C aktiviraju G proteini razreda $G_i$ (141,142).

U epitelnim stanicama bubrega, ovarija i nekim drugim stanicama, endotelini preko $ET_A$ ili $ET_B$ receptora aktiviraju *fosfolipazu A2* stvarajući pri tome arahidonsku kiselinu s posljedičnim oslobađanjem različitih eikozanoida kao što su prostaglandini, leukotrijeni i tromboksan (143).

Nedavne su studije pokazale da endotelini mogu aktivirati *membranski povezane proteine kao što su Grb2 ili pp60* za koje se zna da započinju kaskadu fosforilacije, dovodeći do izravne rane genske ekspresije i stanične proliferacije (l44).

### 1.2.3. Izvanjetreni učinci ET-1

Raznovrsnost učinaka ET-1 omogućena je njegovim pretežno parakrinim, ali manjim dijelom i autokrinim načinom djelovanja, što potkrepljuje činjenica da su na membranama stanica koje proizvode ET-1 vrlo često smješteni i receptori za ET-1 ili u njihovoj neposrednoj blizini (145,146). Osim toga, koncentracije ET-1 u plazmi su vrlo malene, izražene u pikomolarnim vrijednostima koje su puno manje od nanomolarnih kocentracija koje su potrebne za poticanje različitih bioloških efekata ET-1 (145), što ističe važnost autokrinog djelovanja ET-1. Poluživot ET-1 je kratak, svega oko jedne minute nakon čega se odstranjuje plućima, jetrom i ostalim organima procesom koji je djelomično ovisan o internalizaciji s $ET_B$ receptorom (147).

Učinci ET-1 na organe i organske sustave (tablica 4.) mogu se podijeliti na *kratkoročne* (sekrecija, mišićna kontrakcija, upravljanje staničnim transportom i slično), te *dugoročne* koji uključuju nadzor nad ekspresijom gena (hipertrofija stanica, mitogeneza i slično) (112).

Uloga endotelina u patofiziologiji nekih poremećaja prikazani su u tablici 5.

**Tablica 4.** *Učinci endotelina na organe i organske sustave*

| Organ ili organski sustavi | Učinak endotelina |
|---|---|
| **krvne žile** | neposredan vazokonstrikcijski učinak |
| **stanične kulture** | mitogeni učinak |
| **kardiovaskularni sustav** | vazokonstrikcija koronarnih žila<br>pozitivno kronotropno djelovanje<br>pozitivno inotropno djelovanje |
| **bubrezi** | vazokonstrikcija aferentne i eferentne arteriole<br>smanjenje bubrežnog protoka plazme<br>smanjenje glomerularne filtracije |
| **dišni sustav** | vazokonstrikcija krvnog žilja pluća i bronhiola |
| **središnji živčani sustav** | vazokonstrikcija cerebralnih arterija |
| **endokrini sustav** | povećanje lučenja renina, aldosterona i adrenalina<br>poticaj stvaranja ANP |

**Tablica 5.** *Uloga endotelina u nastajanju nekih poremećaja*

| **Poremećaji za koje postoje čvrsti eksperimentalni dokazi o ulozi endotelina** |
|---|
| **infarkt miokarda** |
| **akutno zatajenje bubrega** |
| **ciklosporinska nefrotoksičnost** |
| **Raynaudova bolest** |
| **koronarni vazospazam** |
| **astma** |
| **primarna plućna hipertenzija** |
| **fibroza u bolestima jetre** |
| **Poremećaji za koje postoje slabiji eksperimentalni dokazi o ulozi endotelina:** |
| **esencijalna hipertenzija** |
| **bubrežna hipertenzija** |
| **hipertrofija lijeve klijetke** |

*1.2.3.1. Učinci na kardiovaskularni sustav i respiratorni sustav*

ET-1 je najsnažniji trenutno poznat vazokonstriktor. Izaziva kontrakciju arterija i vena što povećava ukupni periferni otpor i srednji arterijski tlak (148). Kontrakciji često prethodi prolazna vazodilatacija. Vazokonstrikcija izazavana ET-2 trajnija je od one izazvane ET-1 i ET-3, dok ET-3 izaziva snažniju vazodilataciju u odnosu na ET-1. Vazokonstrikcija je posredovana pretežno $ET_A$ receptorima, a vazodilatacija većinom $ET_B$ receptorima smještenim na glatkim mišićnim stanicama stjenki krvnih žila (149). Na srce djeluje pozitivno inotropno i kronotropno.

ET-1 preko $ET_A$ i $ET_B$ receptora u bronhima i dušniku djeluju bronhokonstriktorno (150).

*1.2.3.2. Neuroendokrini učinci*

ET-3 je najzastupljeniji endotelin u središnjem živčanom sustavu. Lokalno oslobođeni endotelini utječu na lučenje hormona hipofize (151). Tako ET-3 koči lučenje prolaktina, a ET-1 djelujući preko $ET_A$ receptora potiče lučenje gonadotropina, hormona rasta, tireotropina i vazopresina (151).

*1.2.3.3. Učinci na stanični rast*

ET-1 je najsnažniji poznati mitogen za mezangijske stanice (152,153). Potiče proliferaciju glatkih mišićnih stanica, fibroblasta i kardiomiocita pa je moguće da sudjeluje u razvoju aterosklerotičnog plaka i hipertrofije srca (153,154). ET-3 je snažan mitogen za endotelne stanice krvnih žila (156). Mitogeno djeluje i na neke stanične tumorske linije (157).

### 1.2.4. Učinci ET-1 na jetru

#### *1.2.4.1. Endotelinski receptori u jetri*

Dosadašnja su istraživanja pokazala različitu rasprostranjenost receptora za ET-1 na membranama jetrenih stanica, ponajviše tipa $ET_B$ (137). Dokazani su na membranama endotelnih stanica sinusoidnih kapilara, jetrenih stelatnih stanica (*HSC*, prema engl. *Hepatic stellate cells*, Ito stanice, stanice skladišta masti-lipociti), epitelnih stanica žučnih kanala te endotelnih stanica portalnih vena (158). Istraživanja na kulturama stanica su pokazala da je najgušća mreža receptora za ET-1 na membranama HSC (159,160) gdje su nađene obje vrste receptora - $ET_A$ i $ET_B$. U manjem obimu oba ova receptora nađena su i na membranama hepatocita (159,160), dok je na membranama Kupfferovih i endotelnh stanica sinusoidnih kapilara dokazan samo $ET_B$ receptor (159).

Mjesta sinteze ET-1 u jetri su različita i uključuju endotelne stanice sinusoidnih kapilara, HSC te epitelne stanice žučnih vodova (161,162,163,164). U bioptatu zdrave jetre čovjeka, imunohistokemijski i in situ hibridizacijom zabilježena je vrlo slaba ekspresija ET-1 u mezenhimalnim stanicama sinusoidnih kapilara kao i u epitelnim stanicama žučnih vodova (161,163). Nasuprot tomu, u cirozi jetre porast sinteze ET-1 u endotelnim stanicama sinusoidnih kapilara i HSC je izrazito velik, čemu u prilog govore i povišene vrijednosti mRNA za ET-l izolairane iz HSC u bioptatu cirotične jetre štakora (159).

*1.2.4.2. Učinci ET-1 na regulaciju protoka u jetri*

Danas su na eksperimentalnim modelima i staničnim kulturama dobro proučeni učinci ET-1 na protoke krvi u jetri, u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima .

*Endotelinom inducirana kontrakcija HSC*

U normalno građenoj jetri, HSC su smještene u Disseovom prostoru ponašajući se prema endotelnim stanicama sinusoidnih kapilara kao neka vrsta jetrenih pericita s velikom sposobnošću pretvorbe u druge stanice(165-167). Ovo potkrepljuje činjenica da u kroničnim bolestima jetre, HSC prolaze fenotipsku aktivaciju i postižu svojstvo glatkog mišića kao što je stvaranje α-aktina glatkog mišića. Nekoliko je studija pokazalo da ET-1 potiče reverzibilnu kontrakciju aktiviranih HSC u kulturama posredovano intrastaničnim povišenjem $Ca^{++}$ preko sustava receptora koji do sada još uvjek nisu sa sigurnošću točno identificirani (168,169). Povišenje intracelularnog $Ca^{++}$ i posljedična kontraktilnost HSC ljudskog podrijetla znatno slabi primjenom BQ-123 NT antagonista $ET_A$ receptora (161).

Iz svega navedenog proizlazi da tijekom kroničnih bolesti jetre ET-1 regulira protok sinusoidama stimulirajući kontrakciju aktiviranih HSC.

*ET-1 kao regulator jetrene mikrocirkulacije*

Na modelu izolata jetre perfudirane kratkotrajnom infuzijom ET-1 u portalnu cirkulaciju, izazvan je značajan i dugotrajan porast portalnog tlaka (170-172). Na istom modelu i infuzija etanola potiče porast tlaka u veni porte koji se smanjuje nakon injiciranja

anti-ET-1 antiseruma (173). Ovaj eksperiment potvrđuje da upravo lokalno oslobađanje ET-1 potiče konstrikciju jetrene vaskulature.

Nedavna su istraživanja videomikroskopijom koja omogućava direktno mjerenje širine sinusoidalnih prostora pokazala da se u zdravih eksperimentalnih životinja infuzijom ET-1 u venu porte, uz konstrikciju sinusoidnih kapilara koja rezultira preraspodjelom sinusodalnog protoka događa i presinusoidalna konstrikcija portalnih venula (174). Zanimljiva je činjenica da je maksimalno suženje lumena sinusoidnih kapilara segmentalno i to na mjestima gdje se međusobno dodiruju endotelne stanice i HSC, što upućuje na to da se inaktivine HSC normalne jetre, pod uticajem ET-1 aktiviraju i kontrahiraju (171). Sinusoidalna kontrakcija posredovana je $ET_{A,}$ a presinusoidalna kontrakcija portalnih venula $ET_B$ receptorima (175).

*Uloga ET-1 u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju jetre*

Ishemijsko-reperfuzijska oštećenja jetre koja se javljaju tijekom transplantacije jetre povezana su s promjenama mikrocirkulacije u jetrenom tkivu kada se u uvjetima hipoksije pojačano stvara ET-1 u endotelnim stanicama (176). Naime, u eksperimetalno induciranom ishemijsko-reperfuzijskom oštečenju jetre, prekidom portalnog krvotoka, bilježi se veoma brzi porast ET-1 u hepatalnoj i portalnoj venskoj krvi ukazujući na porast sinteze ovog peptida i u jetri i u splahničnom području (176,177).

*1.2.4.3. Učinci ET-1 na Kupfferove stanice i na endotelne stanice sinusoida*

Vezanje ET-1 za $ET_B$ receptor membrane Kupfferove stanice uzrokuje njihovu relaksaciju, aktivirajući membransku fosfolipazu A2 s posljedičnim povećanjem stvaranja prostaglandina E2 i trombocit-aktivirajućeg čimbenika rasta (178-179). Vazodilatacijskim

učinkom prostaglandin E2 relaksira aktivirane HSC (180), što ukazuje na moguću kontrolu negativnom povratnom spregom (180).

Funkcija $ET_B$ receptora endotelnih stanica sinusoida još uvijek u cijelosti nije istražena. Na temelju vazodilatacijskog učinaka ovog receptora na drugim vaskularnim lokalizacijama, može se pretpostaviti da, oslobađanjem NO, poznatog snažnog vazodilatatora, $ET_B$ receptor sudjeluje u relaksaciji aktiviranih HSC (181,182).

*1.2.4.4. Učinci ET-1 na protok žuči*

Nekoliko radova je pokazalo da visoke koncentracije ET-1 usljed smanjivanja jetrenog protoka krvi reduciraju protok žuči (172,174,183) što vjerojatno ima ulogu u patogenezi kolestatske bolesti jetre. Za razliku od toga, niže koncentracije ET-1 povećavaju protok žuči ovisno o količini žučnih kiselina u hepatocitima, vjerojatno stimulirajući vezikularne transportne mehanizme hepatocita (184).

*1.2.4.5. Glikogenolitički učinci ET-1*

Vezanje ET-1 za $ET_B$ receptor membrane hepatocita aktivira se fosfolipaza C što dovodi do IP3-potaknutog oslabađanja $Ca^{++}$ uz istovremeno inhibiranje kalcijeve pumpe i blokiranja izbacivanje $Ca^{++}$ iz stanice (137). Konačni rezultat navedenih zbivanja je snažna i dugotrajna aktivacija glikogenolize (185).

## 1.3. PATOFIZIOLOGIJA JETRENE FIBROZE

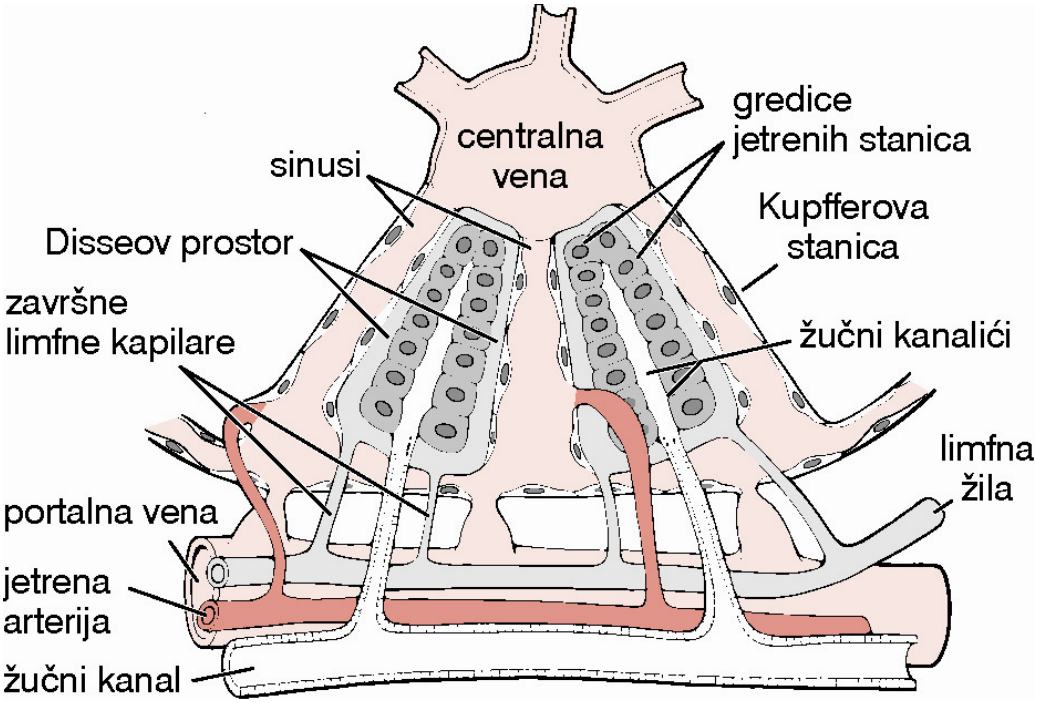
Stanična arhitektura zdrave jetre uključuje epitelne stanice - hepatocite, endotelne stanice sinusoidnih kapilara obilježene fenestrama ili porama, tkivne makrofage-Kupfferove stanice(KC) te perivaskularne mezenhimalne stanice nazvane stelatne stanice koje su ključne fibrogene stanice. Ovi su stanični elementi organizirani unutar *mikrovaskularne jedinice* sa subendotelnim *Disseovim prostorom* odvajajući hepatocite od sinusoidalnog endotela (slika 7. i 8.) (186-189). U zdravoj jetri ovaj prostor sadži ekstracelularni matriks (ECM) sličan bazalnoj membrani. Osim njegove dobro poznate funkcije osiguravanja turgora mekih tkiva i čvrstoće skeletnih tkiva, ECM osigurava supstrate za koje se stanice mogu vezivati, migrirati i proliferirati utječući tako izravno na oblik i funkciju stanica(190). Kao i većina ECM-a, i jetreni je ECM građen od četri komponenete: *kolagena*, pretežito fibriliranog kolagena tip i (36%) i tipa III (36%), *elastina, adhezivnih glikoproteina* uključujući fibronektin, lamninin, trombospondin, tenascin i undulin te *proteoglikana* koji se sastoje od glikozaminoglikana (heparin sulfat, dermatan sulfat, hondroitin) vezanih kovalentnom vezom za proteinsku jezgru (191). Mogu se naći i glikozaminoglikani bez proteinske jezgre kao što je hijaluronska kiselina ili mogu biti i sastavni proteini membrane i tako modulirati stanični rast i diferenciranje (191). Na primjer, *sindekan* integralni protein memebrane, veže kolagen, fibronektin, trombospodin i neke faktore rasta.

Faktori uključeni u procese fibroze jetre obuhvaćaju najmanje dva signala, jedan topljivi i drugi netopljivi (190). Topljive su molekule većinom polipeptidni faktori rasta i inhhibitori rasta. Netopljivi su prethodno navedeni faktori ECM-a koji zajednički djeluju kao regulatori staničnog rasta i diferencijacije. Tijekom procesa fibroze dolazi do kvantitativnih i kvalitativnih promjene u sastavu jetrenog ECM-a. Cjelokupni se sadržaj kolagenih i nekolagenih komponenti uveća trostruko do peterostruko uz popratnu promjenu tipa ECM-a u

subendotelijalnom prostoru. Naime, matriks niske gustoće, sličan bazalnoj membrani, prelazi u intersticijski tip matriksa koji sadrži obilje fibriliranih kolagena (190).

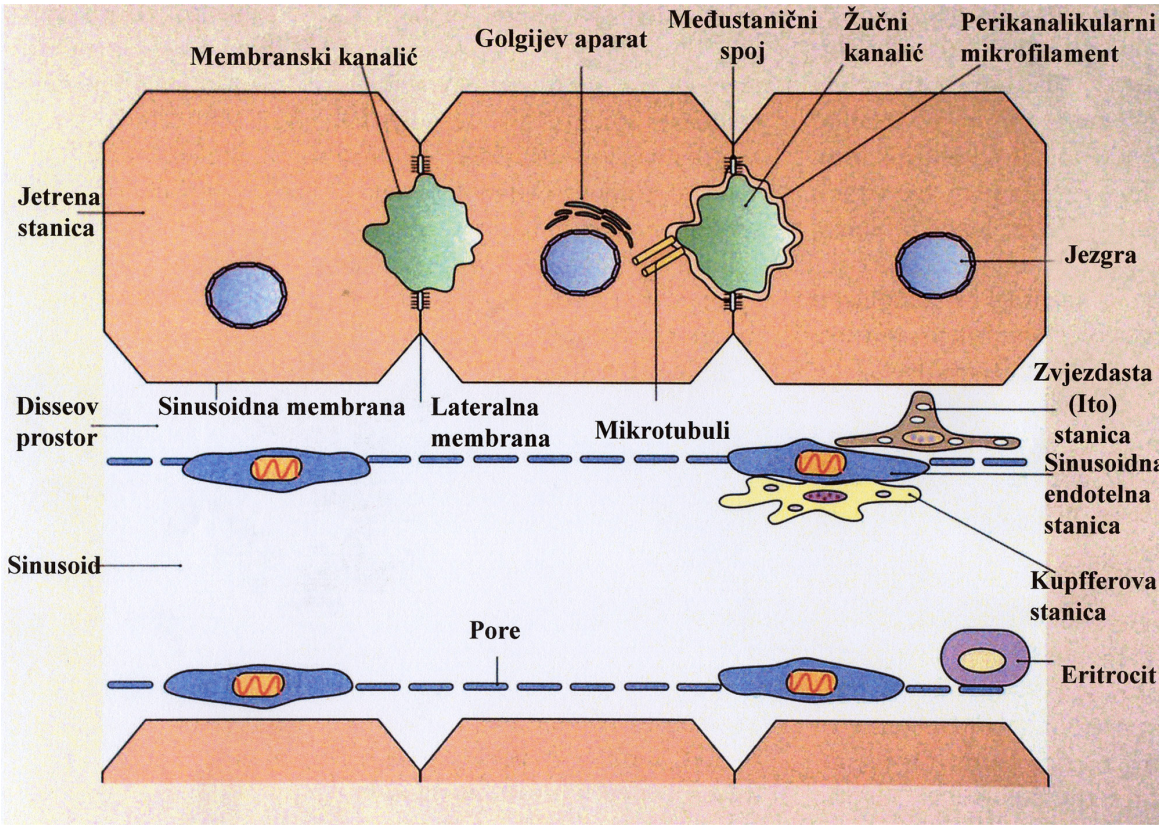
Fibrogena se kaskada uvjetno može podijeliti u više faza: aktivacija KC i HSC, migracija i proliferacija, HSC, snteza i odlaganje komponeneti ECM, remodeliranje ožiljnog tkiva, kontrakcija ožiljnog tkiva te apoptoza HSC (187).

**Slika 7.** *Shematski prikaz načela građe jetre.*




Prikazan je jetreni režnjić: gredice jetrenih stanica, žučni vodovi, krvne žile, krvne i limfne žile te Disseovi limfni prostori (prema Guyton AC, TaYLOR ae, Granger HJ: Circulatory Physiology, 1. sv.: Dynamycs and Control of the Body Fluids, Phyladelphia: WB Saunders Co, 1975).

**Slika 8**. *Mikroanatomija jetrnih stanica*




*1. Aktivcija KC stanica*

Aktivirane KC u oštećenoj jetri proizvode citokine i faktore rasta koji potiču proliferaciju HSC i hepatocita i/ili su kemotaktični za upalne stanice i HSC (189,192). Njihova je izlučivanje potaknuto endotoksinima, toksinima, imunim kompleksima i različitim upalnim procesima. Svoje učinke usmjeruju u dva smjera: mogu djelovati na istu stanicu *(autokrini efekt)* i na stanice u neposrednoj blizini *(parakrini efekt)*. KC proizvode glavni regulator fibrogeneze - *transformirajući faktor rasta β1 (TGF-β1)*. Njegovo se povećano stvaranje u KC održava autokrinim a u inicijalnoj fazi aktivacije HSC, parakrinim efektom što rezultira održavanjem visokih razina citokina u oštećenoj jetri (192).

U *in vivo* uvjetima, neaktivne KC zdrave jetre između ostalog sprječavaju porast endotoksina. Stoga su u bolesnika s oštećenom jetrom i aktivnim KC, razine endotoksina u krvi znatno veće (193).

KC se aktiviraju i u alkoholom induciranom oštećenju j etre. Sve je više dokaza da su ovako aktivirane KC uključene u poticanju enzimatskog sustava citokrom P-450 u hepatocitima, uključujući i CYP 2E1 što rezultira njegovom aktivacijom (194,195). Ovaj enzim metabolizira etanol i ubrzava njegovu eliminaciju uz stvaranje acetaldehida i slobodnih radikala (195). Postoje tvrdnje da etanol potiče CYP 2E1 i u KC (194) što ukazuje na mogućnosti da KC sudjeluju u metabolizmu etanola, povećanom formiranju lipoperoksida i reaktivnih kisikovih radikala koji oštećuju hepatocite i/ili aktiviraju HSC. One imaju znatno jaču moć fagocitoze u odnosu na KC zdrave jetre.

Svi navedeni mehanizi aktivacije KC za posljedicu imaju povećanje sekrecije citokina kao što su tumor nekrotizirajući faktor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) , interleukin-1(IL-1) i onkostatin M (OSM) (193. Ovi citokini imaju glavnu ulogu u inicijalnoj aktivaciji HSC i/ili u povećanju njihovog kapaciteta u proizvodnji komponenti ekstracelularnog matriksa. Naime, upravo oni regukiraju ekspresiju mRNA za α1 kolagen u HSC čime se ubrzava promjena normalnog ECM u ECM s obiljem fibriliarnog kolagena (196).

Oslobađanje citokina i faktora rasta koji su vezani uz komponente ECM-a, dovoljni su za otpočinjanje i održavanje aktivacije KC i HSC. Citokini i kemokini, kao što su *IL-8, faktor stimulacije kolonije, monocitni kemotaktivni protein-1 i leukotrieni,* igraju ključnu ulogu u privlačenju neutrofila i monocita na oštećeno mjesto (197-199). Ove upalne stanice, zajedno s aktiviranim KC, nastavljaju stvaranje citokina i faktora rasta koji su potrebni za održavanju fibrogenskog odgovora.

U nekim kroničnim bolestima jetre nema jasnog upalnog odgovora jetre na oštećenje.

2. Aktivacija HSC

U normalnoj jetri, HSC su pronađene unutar Disseovog prostora i ispod endotelnih stanica i čine 15% svih jetreni stanica. HSC tvore heterogenu grupu stanica koje su funkcionalno i anatomski slične, ali su različite u ekspresiji citoskeletnih filamenata, u retinoidnom sadržaju i svojim potencijalima u stvaranju ECM-a (200). One šalju brojne zvjezdolike nastavke i uspostavljaju direktni kontakt putem čvrstih veza s drugim HSC i hepatocitima i vjerojatno isto tako s endotelnim stanicama (201). U HSC su u obliku masnih kapljica zajedno pohranjeni vitami A i trigliceridi (188). HSC tijekom oštećenja jetre prolaze fenotipsku transformaciju poznatu kao *aktivacija HSC* (188). Aktivacija HSC je složen proces koji uključuje transkripcijske i posttranskripcijske događaje koji još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. Ovaj proces je karakteriziran ispražnjenjem skladišta vitamina A i smanjenjem *retinol-vezujućeg proteina* u HSC. Prisutne su morfološke i funkcionalne promjene u aktiviranim HSC koje su obilježene povećanom ekspresijom miogenih i neurogenih proteina i transformacijom u visoko kontraktilne miofibroblaste (188).

Incijalnu fazu aktivacije HSC-a, kao što je već prije rečeno, pokreću KC stvaranjem citokina akutne faze upale – TNF-α, IL-6, IL-1 i OSM te reaktivnih oksidativnih intremidijatora (ROI) (193), s posljedičnom prekomjernom ekspresijom enzima citokrom P450 i CYP 2E1 u HSC i povećanom ekspresijom TGF-β1 u HSC parakrinim procesima (202).

Endotelne stanice igraju dvostruku ulogu u ranoj aktivaciji HSC. Oštećenje sinusoidalnih endotelnih stanica potiče stvaranje *posebnog oblika staničnog fibronektina (EIIIA izoforma*) (203) koji ima aktivirajući učinak na HSC. Uz to, endotelne stanice tijekom povećanja ekspresije i aktivnosti *aktivatora urokinaznog plazminogena* pretvaraju neaktivni *transformirajući faktor rasta-β1 (TGF-β1)* u aktivni**,** fibrogeni oblik (204).

Molekularnim pristupom u istraživanju genske regulacije HSC tijekom rane aktivacije, identificirana je posebna skupina gena koji reguliraju njihovu aktivaciju: *transkripcijski faktor-ICAM-1, prionski protein, KLF6 i osnovni elementarni transkripcijski vežući protein 1 (BTEB1*) (205-207).

*3. Migracija HSC*

Aktivirane HSC usmjereno migriraju na mjesta oštećenja vođene PDGF-BB i *monoctnim kemotaktičnim proteinom-1 (MCP-1)* (192,208). Proces kemotaktičkog kretanja HSC zahtjeva prisutnost aktivatora plazminogena, vjerojatno zbog pojačane degradacije matriksa za vrijeme prolaženja aktiviranih HSC kroz ECM (204).

*4. Fenotipski odgovori aktiviranih HSC*

Odgovor aktiviranih stelatnih stanica na oštećenje jetre uključuje: proliferaciju, kontraktilnost, fibrogenezu, degradaciju matriksa, kemotaksiju, gubitak retinoida, oslobađanje citokina i kemotaksiju bijelih krvnih stanica.

***Proliferacija*** - povećanje broja HSC u oštećenoj jetri javlja se dijelom lokalnom proliferacijom kao posljedica vezivanja faktora rasta na tirozin kinaza receptore (RTKs). *Faktor rasta proizveden iz trombocita (PDGF)* je najsnažniji među faktorima rasta građen od dvaju lanaca (A i B). Uskladišten je u α-granulama trombocita odakle se oslobađa njihovom aktivacijom. Međutim, PDGF proizvode i aktivirane HSC na kojima autokrinim efektom stimuliraju povećanje količina α i β oblika PDGF kao i broja njihovih α i β receptora, koji imaju aktivnost protein kinaze. Rezultat je pojačana proliferacija HSC (192,208) koju prati neprekidni unos ekstracelularnog $Ca^{++}$ i povišen unutarstanični pH (209).

***Kontraktilnost*** - kontraktilnost HSC predstavlja važan mehanizam povećanja portalne rezistencije tijekom oštećenja jetre. Ključni kontraktilni podražaj za HSC je endotelin-1 (ET-1), koji je dijelom autokrino deriviran. Uz svoj snažni kontraktilni učinak, također regulira proliferaciju HSC. ET-1 djeluje preko dva tipa receptora na staničnoj membrani: ETA i $ET_B$ receptora koji su izraženi kako na HSC u mirovanju tako i na membranama aktiviranih HSC. Kontraktilnost aktiviranih HSC odvija se preko $ET_A$ receptora (161). Proliferacijski učinak ET-1 na HSC u mirovanju korelira s povišenom Ras/ERK aktivnošću, koja je blokirana s $ET_A$ agonistima (210). Nasuprot tomu, učinak inhibicije rasta ET-1 u aktiviranim HSC je posredovan $ET_B$ receptorom preko prostaglandin/cAMP puta (211), koji vodi do silazne regulacije ERK-a i c-Jun kinaze (JNK) (211).

**Fibrogeneza -** *Transformirajući faktor rasta (TGF,* prema engl. *transforming growth factor*) je obitelj većeg broja strukturno sličnih citokina koji imaju brojna biološka djelovanja i igraju važnu ulogu tijekom razvoja, diferencijacije i remodeliranja tkiva (212). U početku su bili izolirani iz virusno transformiranih stanica sarkoma, a smatralo se da su bili uključeni u transformaciju normalnih stanica u karcinom(212). *TGF-*$\alpha$ je mitogen za različite epitelne stanice i fibroblaste in vitro i uzrokuje diobu jetrenih stanica in vivo (112). Staničnu diobu stimulira vezanjem za specifični tirozin kinaza c-erb $\alpha$-1 receptor na staničnoj membrani. *TGF-*$\beta$ je prototip ove obitelji citokina s raznolikim i često puta suprotnim djelovanjima. *TGF-*$\beta$ luče različiti stanični tipovi, uključujući endotel, makrofage, T limfocite i trombocite (112). U zdravoj je jetri mRNA za *TGF -*$\beta 1$ i *TGF -*$\beta 2$ prisutna pretežno u KC, dok je mRNA za *TGF -*$\beta 3$ dokazana jedino u HSC (202). Hepatociti sadrže veće količine *latentnog TGF -*$\beta 1$*,* ali ne i mRNA za *TGF -*$\beta 1$*,* što ukazuje da *TGF -*$\beta 1$ nije proizveden u hepatocitima već unesen u njih. Tijekom fibrogeneze, razina *TGF -*$\beta 1$ je izrazito povišena u HSC i endotelnim stanicama, s napomenom značajne razlike s obzirom na vrijeme proteklo od nastanka oštećenja (202). Naime, mRNA za *TGF -*$\beta 1$ se značajno povećava nakon 24 sata od oštećenja

s maksimumom nakon 48 sati (nakon glavnog vala stanične diobe hepaticita i pojave mitoze) i vraća se na normalne vrijednosti za 72 sata (202). Snažan je aktivator HSC (213) i inhibitor rasta većine epitelnih stanica pa i hepatocita zaustavljajući ih u G1 fazi staničnog ciklusa (214). Čini se da je ovaj njegov učinak posredovan transkripcijom gena *c-myc* najvjerojatnije aktivacijom produkata supresorskog gena retinoblastoma. *TGF-β1* također inhibira ekspresiju faktora rasta hepatocita (*HGF*, prema engl. *hepatocyte growth factor*), inače važnog stimulatora hepatocitne proliferacije tijekom regeneracije te potiče apoptozu u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (215,216). Povećava odlaganje ECM dvama mehanizmima: povećavanjem sinteze proteina ECM, prvenstveno kolagena i fibronektina i povećanim stvaranjem inhibitora proteaza te smanjivanjem ekspresije gena za razne metaloproteinaze (217,218). Svi ovi učinci zajedno pospješuju proces fibrogeneze u jetri.

Molekularna zbivanja kojima *TGF -β1* potiče proliferaciju HSC su većim dijelom poznata. Prvi korak uključuje dimerizaciju dva tipa transmemebranskih receptora nazvanih *tip i i tip II receptori* sa serin/treonin fosforilacijom receptora tipa i (217). Fosforilacija uključuje aktivaciju i/ili inaktivaciju brojnih kinaza i drugih proteina omogućujući tako nastanak drugog glasnika (217). Članovi tzv. *Smad obitelji proteina*, posebno *Smad 2, 3 i 4* su osnovne komponente *TGF -β1* signalnog puta u HSC. Nakon fosforiliranja, *Smad 2 i 3* sa *Smad 4* tvore heterooligomere pri čemu tako stvoren *Smad kompleks* regulira transkripciju vežući se direktno na definirane DNA sekvence ili bez vezivanja na njih (217), s posljedičnom diobom HSC. U njima *TGF -β1* stimulira stvaranje kolagena na transkripcijskoj razini mehanizmom koji ne zahitjeva de novo sintezu proteina (219).

Među novijim citokinima koji potiču fibrogenezu jetre posebno su značajni *fibrozin*, te CTGF (prema engl. *conective tissue growt factor).*

*Fibrozin*, zvan još i *fibroblast stimulirajući faktor 1* je citokin kojeg proizvode CD4+ limfociti (220) i snažan je stimulator proliferacije HSC i fibroblasta te povećava ekspresiju

mRNA za fibronektin u alkoholom oštećenoj jetri (221). Činjenica da ovaj čimbenik rasta povećava produkciju kolagena u fibroblastima bez učinka na razinu ekspresije mRNA za α1(I) kolagen, ukazuje da fibrozin djeluje na posttranskripcijskoj razini (222).

*CTGF* je cisteinom bogat faktor rasta izoliran iz ljudske kulture endotela umbilikalne vene (223). Snažan je stimulator proliferacije fibroblasta i sinteze ECM i njegova je ekspresija povišena u bolestima prekomjernog odlaganja vezivnog tkiva kao što je u slučaju sklerodermije, plućne i bubrežne fibroze (224-226). Ovaj je faktor također izražen i u fibrotičnoj jetri gdje mu je glavno mjesto stavaranja HSC (227). Ekspresija CTFG je pojačana u fibrobalstima tretiranima TGF -β, a inhibirana je s TNF-α (228).

*5. Remodeliranje jetrenog tkiva*

Jetra sadrži relativno male količine komponenata vezivnog tkiva, od kojih su najzastupljeniji kolageni. Jetreni kolageni su uglavnom lokalizirani u portalnim i perivenularnim segmentima mikrocirkulacije naspram sinusoida koje su omeđene fenestriranim endotelnim stanicama.

U cirozi jetre nalazi se 5 do10 puta više jetrenog kolagena tipa I, III, i IV s formiranjem fibrila i fibronektina (187). Sinusoide se mijenjaju u kapilare uz gubitak endotelnih fenestracija, čime se smanjuje metabolička izmjena tvari između krvi i hepatocita (187). Ove promjene u jetrenom ekosistemu mogu biti odgovorne za mnoge funkcionalne poremećaje.

Jetra se od ostalih tkiva razlikuje po svojem odgovoru na oštećenje. Ako je oštećenje tako velikog intenziteta da odstranjuje značajnu masu funkcionalnog parenhima, prisutna je regeneracija s potpunim obnavljanjem strukture i funkcije. Oštećenja malog intenziteta koja se ponavljaju i dovoljno su jaka da potaknu regenerativni odgovor, dovode do stvaranja

ožiljka. U oba tipa odgovora prisutno je povećanje sinteze, i odlaganja kolagena (229). Ipak, odgovori se razlikuju po tipu stvorenog kolagena, mjestima odlaganja i intenzitetu remodelirajućeg procesa. Dok se u regenerativnom odgovoru stvaraju kolageni potrebni za stvaranje novih sinusoida i obnove ekosistema, u fibrotičnoj jetri, glavni kolagen prisutan u ožiljnom tkivu je uglavnom kolagen tipa i (229). U regenerativnom odgovoru, prisutno je aktivno remodeliranje a u cirotičnoj je jetri remodeliranje ekstracelularnog matriksa limitirajućeg karaktera (299). Progresija fibroze mijenja hepatičnu arhitekturu i dovodi do ciroze i portalne hipertenzije.

*6. Metaloproteinaze*

Fibroza je aktivan proces i rezultat je poremećene ravnoteže između povećane produkcije ECM i stvaranje fibroznog ožiljka s jedne te razgradnje proteina matriksa regulirane *metaloproteinazama* s druge strane.

Glavni izvor metaloproteinaza su HCS, iako i KC doprinose povećanoj ekspresiji mRNA pojedinih metloproteinaza.

6.1. Matriks metaloproteinaze (MMP)

Tri su glavne podgrupe matriks metaloproteinaza: ***kolagenaze*** – *MMP-1 i MMP-13* (kolagenaza i i III), ***gelatinaze*** – MMP-2 i MMP 9 (kolagenaz IV ili gelatinaza A i gelatinaza B) i ***stromelizini*** – *MMP-3 i MMP-10* (stromelizin-1 ili tranzin i stromelizin-2) (230). Kolagenaze razgrađuju intersticijske kolagene (tip I, III i V) (230). Gelatinaze djeluju na

kolagen bazalne membrane (tip IV) i gelatine, a stromelizini degradiraju niz suspstrata, uključujući proteoglikane, laminin, gelatine i fibronektin (231).

6.2. Membranski tip metaloproteinaza (MT–MMP)

U jetri su od osobitog značaja dva oblika memebranskih metaloproteinaza: *MT1-MMP i MT2-MMP*. U kroničnom hepatitisu, u manjem stupnju i u cirozi jetre, povećava se ekspresija mRNA za MT1-MMP uglavnom u HSC, a u manjoj mjeri u KC, endotelnim stanicama i hepatocitima (232). Glavno mjesto stvaranja MT2-MMP su hepatociti i epitelne stanice bilijarnog sustava (233). Glavna uloga MT1-MMP u remodeliranju ECM očituje se na dva načina – aktivacijom MMP-2 i MMP-3 te direktnim cijepanjem nekih proteina matriksa kao što je kolagen tipa i i III, fibronektin, laminin, gelatin i drugi (234).

*7. Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP)*

Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) mogu vrlo brzo inhibirati aktivirane metaloproteinaze. *TIMP-1* luče aktivirane HSC i njegova se ekspresija povećava pod utjecajem nekoliko citokina kao što su TNF-α, TGF-β i OSM (235-237). Povećanje njegove ekspresije i do nekoliko puta zabilježeno je u uzorcima jetrenog tkiva bolesnika s primarnom bilijarnom cirozom, primarnim sklerozirajućim kolangitisom i cirozom jetre (238). Razina TIMP-1 u ovih bolesnika usko korelira sa stupnjem periportalne nekroze, portalne upale i stupnjem fibroze jetre (239). Time HSC imaju primarnu ulogu u regulaciji i degradacji ECM i u produkciji fibroznog tkiva. *TIMP-2* luče aktivirane HSC i KC, a *TIMP-3* isključivo hepatociti (235). Ova

dva inhibitora metaloproteinaza se u odnosu na TIMP-1 javljaju u kasnijem vremenskom periodu nakon jetrenog oštećenja (235).

*8. Oporavak jetre i sudbina HSC*

Tijekom oporavka jetre od akutnog oštećenja, broj aktiviranih HSC se intenzivno smanjuje kako se obnavlja integritet tkiva. Ovo postavlja zanimljivo pitanje: što se događa s aktiviranim HSC tijekom oporavka jetre i prekida procesa fibroze? Vraćaju li se u prijašnji, neaktivni oblik ili odumiru?

Moguća *inverzija* aktivne HSC u inaktivnu stanicu u posljednje vrijeme dobiva na težini otkrićem pojačane indukcije interleukina 10 (IL-10) tijekom aktivacije HSC (240) odnosno njegove sposobnosti smanjenja jačine upale i povećavanja aktivnosti intersticijskih kolagenaza (240,241). S druge strane, regresija aktivnih HSC može biti ostvarena uspostavom normalnog subendotelnog ECM, jer je dokazano da HSC ostaju u stadiju mirovanja ako rastu na podlozi supstrata bazalne membrane endotelnih stanica sinusoida (242).

*Apoptoza* je moguća sudbina aktiviranih HSC tijekom oporavka jetre i povezana je s reduciranom ekspresijom TIMP-1 (243). S druge strane, HSC prolaze apoptozu tijekom spontane aktivacije, usporedno s povišenom ekspresijom CD95, Bcl-2 i p53 (244).

# 2. OBRAZLOŽENJE TEME i CILJEVA ISTRAŽIVANJA

Kao što je već prethodno istaknuto, ET-1 dovodi do značajnih hemodinamskih promjena u jetrenoj cirkulaciji. Objavljeni su rezultati nekoliko istraživanja u kojima je utvrđen porast koncentracije ET-1 u cirkulaciji bolesnika s cirozom jetre (245), poglavito u bolesnika s ascitesnim oblikom ciroze udruženom s hepato-renalnim sindromom (246). Novija su istraživanja na životinjskim modelima dokazala porast serumske koncentracije ET-1 i kod opstrukcijske žutice (247).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da se aktivnost ACE mijenja u različitim bolestima jetre. U bolesnika s cirozom jetre kao i u onih s akutnim i kroničnim hepatitisom utvrđen je porast serumske aktivnosti ovog enzima (25) a smanjenje u bolesnika s opstrukijskom žuticom (26). Skupina japanskih istraživača utvrdila je da je serumska aktivnost ACE jedan od najpouzdanijih pokazatelja aktivnosti kroničnih bolesti jetre (27). U nedavno objavljenim rezultatima naše istraživačke skupine pokazali smo statistički značajan pad serumske aktivnosti ACE u skupini bolesnika s cirozom jetre i hepatocelularnim karcinomom (HCC) u odnosu na skupinu bolesnika s cirozom jetre u kojih je potvrđen porast serumske aktivnosti ovog enzima (28).

U procjeni stanja jetre, poglavito u cirozi s posljedičnom portalnom hipertenzijom, ultrazvuk je jedan od bitnijih komponenti dijagnostičkog postupka. Dvodimenzionalna B-slika daje uvid u morfološke karakteristike, a procjena obojenim i power-doplerom omogućuje i funkcionalnu analizu protoka krvi u krvnim žilama jetre. U bolesnika s cirozom jetre promjer zajedničke jetrene arterije je veći a brzina protoka u veni porti je manja nego u zdravih ispitanika (29). Mjerenje volumnog protoka u jetrenoj arteriji i veni porte (umnožak brzine prototoka i površine presjeka promatrane žile daju volumen protoka krvi) je praćeno značajnom mogućnošću objektivnih i subjektivnih pogrešaka, stoga se u procjeni protoka sve više rabe razni hemodinamski indeksi. U najčešćoj su uporabi *indeks otpora (RI, resistance index)*, TAMV portalne vene (od engl. *time averaged maximal velocity*), *indeks pulsatilnosti*

*(PI, pulsatility index).* Indeks otpora se izračunava iz razlike sistoličke vršne brzine i enddijastoličke brzine podijeljene sa sistoličkom vršnom brzinom.

Hemodinamski odnos između jetrene arterije i portalne vene moguće je prosuditi pulsirajućim doplerom uzorkovanjem desne jetrene arterije i portalne vene 2 cm od ulaska žile u jetru. Temeljem doplerskog spektra određuje se *APVR (aterio-portal velocity ratio )* koji je indikativan za cirozu ukoliko je veći od 3 (30).

Navode se i druge mogućnosti objektivizacije hemodinamskog stanja u bolestima jetre. *Jetreni vaskularni indeks* je omjer brzine protoka portalnom venom i indeksa pulsatilnosti jetrenom arterijom koji se smanjuje u ciroze, a granična mu je vrijednost 12 cm/s (31). *Indeks kongestije (CI)* je omjer površine presjeka portalne vene i brzine protoka u njoj, a u cirozi je značajno viši nego u zdravih (32,33). *Doplerski perfuzijski indeks* je omjer volumena protoka arterijom hepatikom i venom portom, a vrijednosti preko 0,3 indikativne su za stanja «arterijalizacije» organa, među inim i za cirozu (34).

Iz do sada navednog proizlazi bitna tvrdnja da je ET-1 najsnažniji endogeni vazokonstriktor koji u jetri dovodi do povišenja portalnog tlaka. Ovaj autokrini/parakrini hormon uzrokuje vazokonstikciju preko sinusoida zbog kontrakcije HSC, ali u patogenezi portalne hipertenzije važno je djelovanje ET-1 na portalne venule centralne vene te povećana fibrinogeneza uzrokovana ovim peptidom. Porast koncentracije ET-1 nije zabilježen u kroničnom hepatitisu, a porast u cirozi je u direktnoj korelaciji sa stupnjem težine bolesti: viši je u cirozi sa ascitesom nego bez ascitesa. Najviši porast je zabilježen u cirozi s razvojem hepatorenalnog sindroma.

Sintezu ET-1 među ostalim podstiče i angiotenzin II, a suprimira ju dušični monoksid (NO) i atrijski natriuretski peptid (ANP). Sinteza angiotenzina II odvija se pod kontrolom ACE kao ključnog čimbenika RAS-a. ACE je kao i ET-1 povišen u cirozi jetre, ali je za razliku od ET-1 povišen i u kroničnom hepatitisu.

U literaturi nema podataka o međusobnoj povezanosti ACE i ET-1, niti njihove povezanosti s doplerski određenim parametrima hemodinamskog stanja u krvnom optoku jetrenih bolesnika.

Činjenice navedene u prethodnom obrazloženju odredile su ciljeve istraživanja:

1. u tri različite skupine jetrenih bolesnika - steatoza, kronični hepatitis i ciroza, odrediti serumsku koncentraciju ET-1 i serumske aktivnosti ACE,
2. u definiranim skupinama bolesnika doplerski odrediti parametre jetrenih protoka: RI i TAMV,
3. istražiti korelaciju između serumske koncentracije ET-1 i serumske aktivnosti ACE u navednim skupinama,
4. istražiti korelaciju između serumske koncentracije ET-1 u skupinama bolesnika s navedenim doplerskim parametrima jetrenih protoka (RI, TAMV),
5. istražiti korelaciju između serumske akitivnosti ACE u skupinama bolesnika s navedenim doplerskim parametrima jetrenih protoka (RI, TAMV),
6. istražiti korelaciju između serumskih koncentracija ET-l i ACE i stupnja fibroze jetrenog parenhima.

# 3. ISPITANICI i METODE

### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 70 odraslih ispitanika različitog spola i životne dobi, različite profesije, prosječnog bavljenja fizičkim aktivnostima u profesiji i izvan nje. Ispitanici su na temelju vrste bolesti od koje boluju podjeljeni u tri skupine. Prvu skupinu ispitanika činilo je 20 bolesnika s jetrenom steatozom (9 žena i 11 muškaraca); drugu skupinu je činilo 20 bolesnika s kroničnim hepatitisima (8 žena i 12 muškaraca), a treću 30 bolesnika s cirozom jetre (11 žena i 19 muškaraca) (tablica 6.).

Dijagnoze navedenih bolesti su postavljene temeljem anamneze, fizikalnog pregleda, laboratorijskih nalaza krvi i urina, ultrazvučnog pregleda trbuha, CT jetre, biopsije jetre pod kontrolom ultrazvuka uz patohistološk pregled uzorka jetrenog tkiva.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici oboljeli od bakterijskog peritonitisa i ostalih infekcijskih bolesti, zbog eventualnog prisustva bakterijskih toksina koji imaju značajan utjecaj na koncentraciju ET-1 u krvi. Nisu obuhvaćeni ni bolesnici sa šećernom bolešću, izraženom esencijalnom hipertenzijom, sarkoidozom, silikozom i hipertireozom jer ta stanja povećavaju serumsku aktivnosti ACE. Također nisu bili uključeni ni bolesnici s karcinomom pluća, HCC, multiplim mijelomom, bronhalnom astmom, opstrukcijskim ikterusom i hipotireozom jer navedene bolesti snižavaju serumsku aktivnost ACE.

Bolesnicima je objašnjena svrha i metodologija istraživanja te su bili zamoljeni potpisati pismeni pristanak sudjelovanja u istraživanju.

## 3.2. Metode rada

### *3.2.1. Hematološke i biokemijske analize*

U svih bolesnika uključenih u istraživanje učinjene su slijedeće hematološke i biokemijske pretrage: SE, broj eritocita i leukocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, čimbenici koagulacije II, VII i X, željezo i bakara u serumu, bilirubin, transaminaze, gama-GT, alkalna fosfataza, ukupni proteini, albumini, kreatinin, urea, K, Na, GUK, kolesterol i trigliceridi, šećer u krvi, mokraćna kiselina, trijodtironin (T3), tiroksin (T4), tireotropni hormon (TSH), markeri virusnih hepatitisa, biljezi autoimunih bolesti jetre, koncentracija AFP u serumu. U svih ispitanika je određena serumska koncentracija ET-1 i serumska aktivnost ACE.

Kod određivanja stadija kronične bolesti jetre, patohistološkim pregledom uzorka jetrenog tkiva dobivenog biopsijom jetre pod kontrolom UZ-a, analizirana je fibroza i poremećaj arhitekture. Promjene su prema svojoj težini opisivane kao o*skudne, umjerene i ciroza.* Vodeći se numeričkim indeksom Ishaka i suradnika (248), u oskudne promjene uključili smo bolesnike s fibrozom stadija 0-1 , u umjerene promjene bolesnike s fibrozom stadija 2-5. Na kraju ove ljestivce nalazila se ciroza kao 6., završni stadij fibroze.

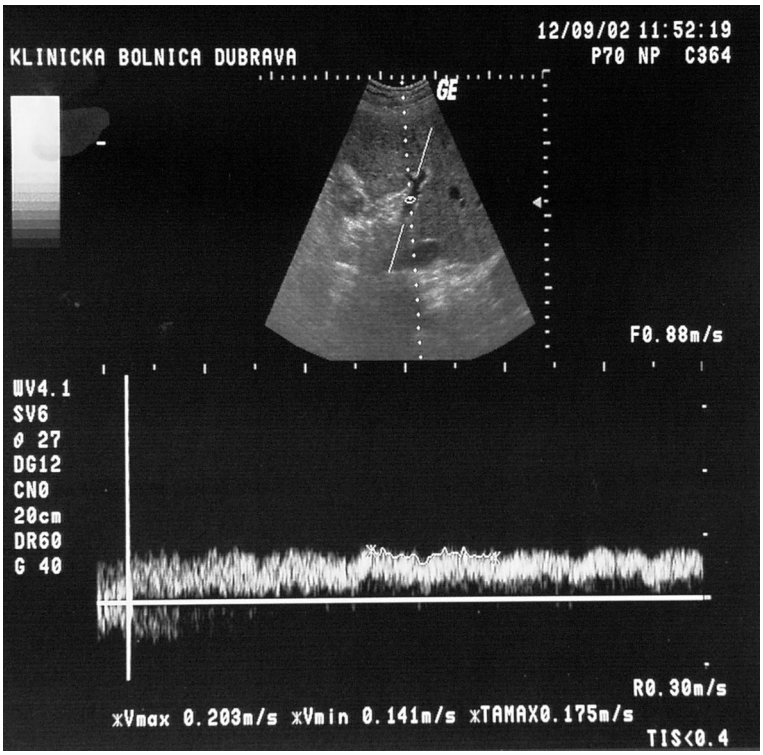
### *3.2.2.Ultrazvučna pretraga i dopler analiza*

Ultrazvučni pregled ispitanika učinjen je obojenim-doplerskim aparatom tvrtke General Electric (GE-Logic 500 MD). Koristio se B-prikaz, obojeni i power dopler te dupleks dopler. Pretrage su vršene elektronskom sondom temeljne frekvencije 3,3 MHz, a za pulsirajući doplerski spektralni prikaz frekvencije od 2,5 MHz.

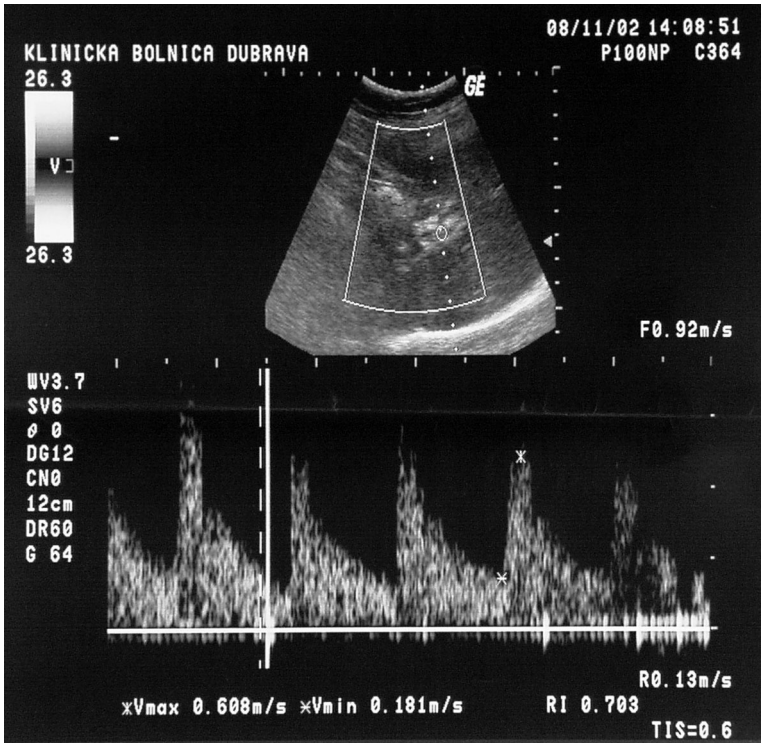
Doplerski pokazatelji u hepatalnoj arteriji i veni porte su se izračunavali na temelju tri mjerenja u svakoj žili. Za mjerenje se koristo postojeći software. Mjerenja su se uvijek vršila pri najmanjim pulsirajućim opetovanim frekvencijama koje ne izazivaju frekvencijsko prebacivanje, uz minimalni wall-filter od 50 Hz i obveznu kutnu korekciju, uvjek pod kutem manjim od 60°. Doplerski spektralni uzorak pokrivao je obično 2/3 promjera ispitivane žile.

Rezultati su se snimali na video vrpcu ili papir (crno-bijeli i/ili color video printer) (Slika 9. i 10.).

**Slika 9.** Brzina potoka venom portom izražena vrijednošću TAMV (time –averaged maximal velocity) iznosi 17,5 cm/s a doplerski kut (Q) je 27º.



**Slika 10.** Indeks otpora (RI) protoka u jetrenoj arteriji iznosi 0,70.




3.2.3. *Određivanje serumske aktivnosti ACE*

Serumska aktivnost ACE je određena na uređaju Olympus AU 2700 upotrebom kita *«Infnity$^{TM}$ ACE Liquid Stable Reagent»* za određivanje angiotenzin konvertirajućeg enzima tvrtke *Thermo Electron Corporation*. Ovaj se postupak određivanja serumske aktivnosti ACE temelji na reakciji koju su opisali Holmquist i suradnici (249).

$$\textbf{FAPGG} \xrightarrow{\text{ACE}} \textbf{FAP + glicilglicin,}$$

u kojoj je FAPGG skraćeni prikaz za N-[3-(2-furil)-akriloil]-L-fenil-alanilglicilglicin. Hidroliza FAPGG-a angiotenzin konvertirajućim enzimom dovodi do smanjivanja

absorbancije na valnoj duljini 340 nm. Aktivnost ACE izračunava automatski sam uređaj prema formuli:

$$\text{ACE} = \frac{\Delta\text{Abs/min uzorka}}{\Delta\text{Abs/min kalibrator}} \times \text{kalibrirana vrijednost.}$$

Rezultati su izraženi u jedinicama po litri (U/L).

*3.2.4. Određivanje serumske koncentracije ET-1*

Serumska koncentracija ET-1 određena je ElLISA metodom uz uporabu reagensa ASBUF (Assay buffer), Biomedica, Švicarska (250).

Rezultati su izraženi u pg/ml seruma.

3.2.5. *Statistička obrada podataka*

Raspodjela skupnih pokazatelja prikazana je apsolutnim i relativnim frekvencijama. Budući da su testiranja pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa pokazala da raspodjele brojčanih pokazatelja nisu normalne, brojčani pokazatelji su prikazani medijanom i rasponom. Granične vrijednosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 između skupina bolesnika određene su analizom krivulja ROC (prema engl. receiver operating characteristic). Povezanost brojčanih pokazatelja je određena Spearmanovim testom korelacije rangova. Jednadžbe pravaca ucrtanih na točkaste grafikone koji prikazuju povezanost dva brojčana pokazatelja izračunate su linearnom regresijskom analizom. Za razinu statističke značajnosti odabrali smo $p<0,05$.

# 4. REZULTATI

U prvom dijelu istraživanja je u svih ispitanika laboratorijski određena serumska aktivnost angiotenzim konvertirajućeg enzima (ACE) i serumska koncentracija endotelina-1 (ET-1), te je svakom bolesniku ultrazvučno određen indeks otpora (RI) u jetrenoj arteriji i vremenski uprosječena maksimalna brzina protoka (TAMV) u portalnoj veni.

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 70 odraslih bolesnika, 27 žena i 43 muškaraca, u dobi od 19 do 75 godina. Epidemiološke, kliničke i laboratorijske osobine bolesnika prikazane su u tablicama 6. i 7.

Bolesnici su, na temelju patohistološkog pregleda biopsijom dobivenog uzorka jetrenog tkiva, bili podijeljeni u tri skupine. U *skupinu i* su bili uključeni bolesnici s masnom promjenom jetre, koja pokazuje oskudnu fibrozu; *skupina II*, obuhvaćala je bolesnike oboljele od alkoholnog i kroničnih virusnih hepatitisa te primarne bilijarne ciroze (PBC), bolesti koje pokazuju umjerenu fibrozu; a *skupinu III,* činili su ispitanici s alkoholnom bolesti jetre na čijim je uzorcima jetrenog tkiva prevladavala ciroze. (Tablica 8.).

**Tablica 6.** *Epidemiološke i kliničke i osobine bolesnika uključenih u istraživanje serumske koncentracije ET-1 i aktivnosti ACE uz doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika.*

| | ***Skupina i*** | ***Skupina II*** | ***Skupina III*** |
|---|---|---|---|
| ***Starost (god)*** | 51,53±4,75 | 49,35±5,75 | 53,76±5,30 |
| ***Spol (m/ž)*** | 9/11 | 8/12 | 10/20 |
| ***Visina (cm)*** | 171,25±8,27 | 172,88±7,65 | 174,11±6,35 |
| ***Težina (kg)*** | 69,71±3,75 | 71,11±5,25 | 85,08±4,75 |
| ***Krvni tlak (mmHg)*** | 135/75±6,25 | 120/67±10,05 | 118/67±13,75 |
| ***Puls (br/min)*** | 75,10±8,13 | 73,60±6,55 | 80,15±11,26 |

skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

**Tablica 7.** *Značajniji laboratorijski nalazi bolesnika uključenih u istraživanje serumske koncentracije ET-1 i aktivnosti ACE uz doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika.*

| PARAMETAR | *SKUPINA I* | *SKUPINA II* | *SKUPINA III* |
|---|---|---|---|
| **Eritrociti (x$10^{12}$ / L)** | 4,12±0,45 | 3,75±0,65 | 2,86±0,34 |
| **Hemoglobin (g/L)** | 119,75±14,45 | 118,23±7,35 | 89,55±6,75 |
| **Trombociti (x$10^{9}$/L)** | 275,15±5,55 | 210,53±7,53 | 81,10±6,52 |
| **Leukociti (x$10^{9}$/L)** | 6,5±2,32 | 6,8±2,02 | 5,3±2,75 |
| **PV (%)** | 82±2 | 79±3 | 35±1 |
| **Fibrinogen** | 3,7±0,40 | 3,4±1,25 | 2,1±2,02 |
| **Željezo (µmol/L)** | 19,7±2,63 | 17,2±2,05 | 7,5±2,55 |
| **AST (U/L)** | 32±9 | 41±5 | 39±5 |
| **ALT (U/L)** | 51±3 | 59±2 | 69±2 |
| **GGT (U/L)** | 65±9 | 45±4 | 289±7 |
| **AP (U/L)** | 40±2 | 48±4 | 91±3 |
| **Amonijak** | 32±3 | 37±4 | 69±4 |
| **Bilirubin (µmol/L)** | 23,45±4,55 | 28,65±2,05 | 43,93±2,35 |
| **Ukupni proteini (g/L)** | 72±6 | 69±5 | 58±5 |
| **Albumini (g/L)** | 49±3 | 47±5 | 31±3 |
| **Urea (mmol/L)** | 5,35±1,05 | 5,30±1,22 | 11,25±1,55 |
| **Kreatinin (µmol/L)** | 57±9 | 65±7 | 115±4 |
| **GUK (mmol/L)** | 12,1±0,5 | 5,3±0,2 | 8,9±0,7 |
| **TSH (mlU/L)** | 1,38±0,13 | 1,07±0,09 | 0,98±0,04 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Na (mmol/L)** | 142±13 | 140±9 | 131±7 |
| **K (mmol/L)** | 4,3±0,9 | 4,4±0,6 | 3,7±0,2 |
| **Cu (µmol/L)** | 7,3±0,3 | 19,9±2,1 | 10,7±1,05 |
| **Kolesterol (mmol/L)** | 11,72±2,35 | 5,25±1,02 | 3,23±0,95 |
| **Trigliceridi (mmol/L)** | 8,98±1,23 | 1,25±0,95 | 0.75±0,55 |

skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina II - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

**Tablica 8**. *Stadiji kronične bolesti jetre te težina fibroze u bolesnika uključenih u istraživanje serumske koncentracije ET-1 i aktivnosti ACE uz doplersku procjenu jetrenih protoka krvi u kroničnih jetrenih bolesnika.*

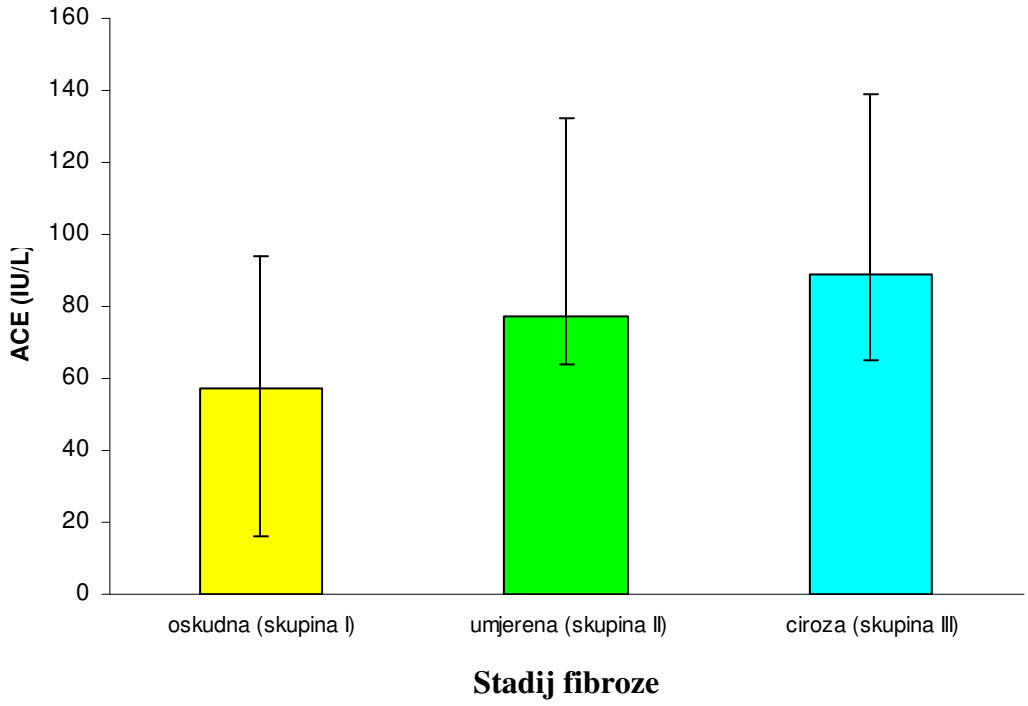
| Fibroza | (stadij) | Dijagnoza | Broj (%) bolesnika n=70 |
|---|---|---|---|
| | | ***skupina i*** | ***n=20 (29)*** |
| oskudna | (0-1) | Steatosis hepatis | 20 ( 29 ) |
| | | ***skupina II*** | ***n=20 (29)*** |
| umjerena | (2-5) | Hepatitis B | 6 (9) |
| | | Hepatitis C | 4 (6) |
| | | Hepatitis alcoholica | 6 (9) |
| | | PBC | 3 (4) |
| | | Hepatitis B i C | 1 (1) |
| | | ***skupina III*** | ***n=30 (42)*** |
| ciroza | (6) | Cirrosis hepatis aethylica | 30 (42) |

skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

**Serumske aktivnosti ACE, serumske koncentracije ET-1 i jetrena fibroza**

Određivanje serumske aktivnosti ACE po Holmquistu i suradnicima pokazalo je porast aktivnosti ACE koji je proporcionalan težini jetrene bolesti (Slika 11.): najniže su aktivnosti zabilježene u serumu bolesnika u skupini i - medijan, raspon: 57, 16-94 IU/L, dok je u serumu bolesnika s najtežim oblikom fibroze – cirozom (skupina III) aktivnost ACE bila najveća - medijan, raspon: 89, 65-139 IU/L.

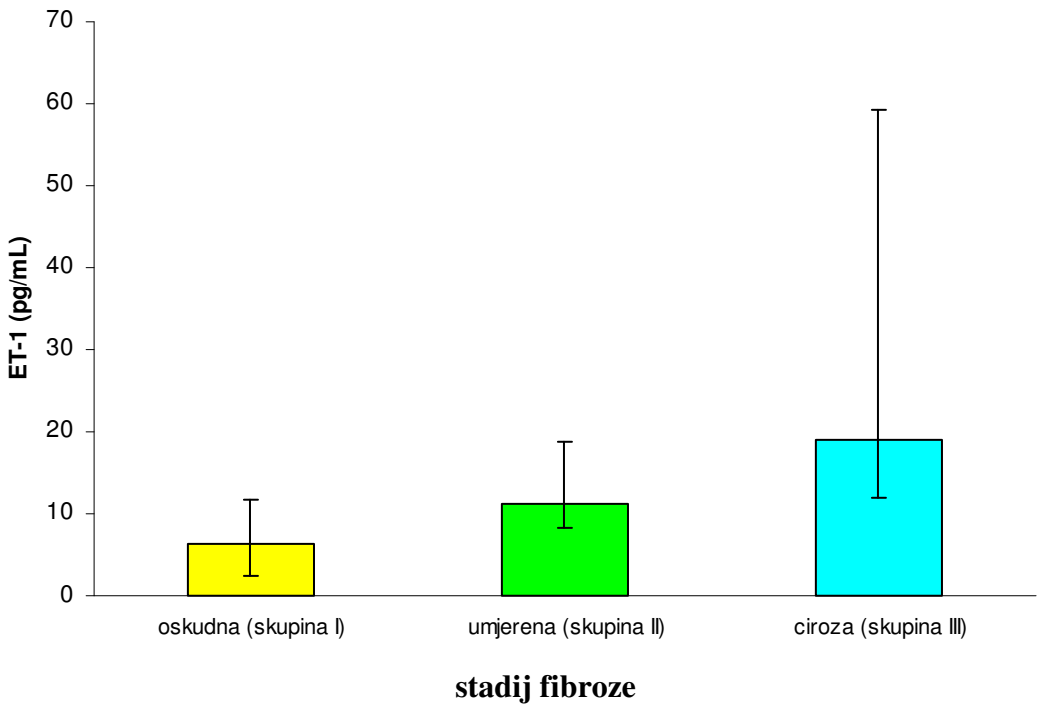
**Slika 10.** *Prikaz serumske aktivnosti ACE u odnosu na stupanj fibroze u kroničnih jetrenih bolesnika*




skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

Serumska koncentracija ET-1, određena postupkom ELISA, pokazuje raspodjelu koja prati težinu bolesti, slično kao i serumska aktivnost ACE (Slika 12.). Najniže koncentracije ET-1 zabilježene su u serumu bolesnika iz s oskudnom i umjerenom fibrozom (skupina I) - medijan 6,25 pg/mL, raspon 2,38-11,80 pg/mL, dok su najviše koncentracije određene kod bolesnika u skupini III - medijan, raspon: 18,95, 12,05-59,38 pg/mL.

**Slika 12.** *Prikaz serumske koncentracije ET-1 u odnosu na stupanj fibroze u kroničnih jetrenih bolesnika.*



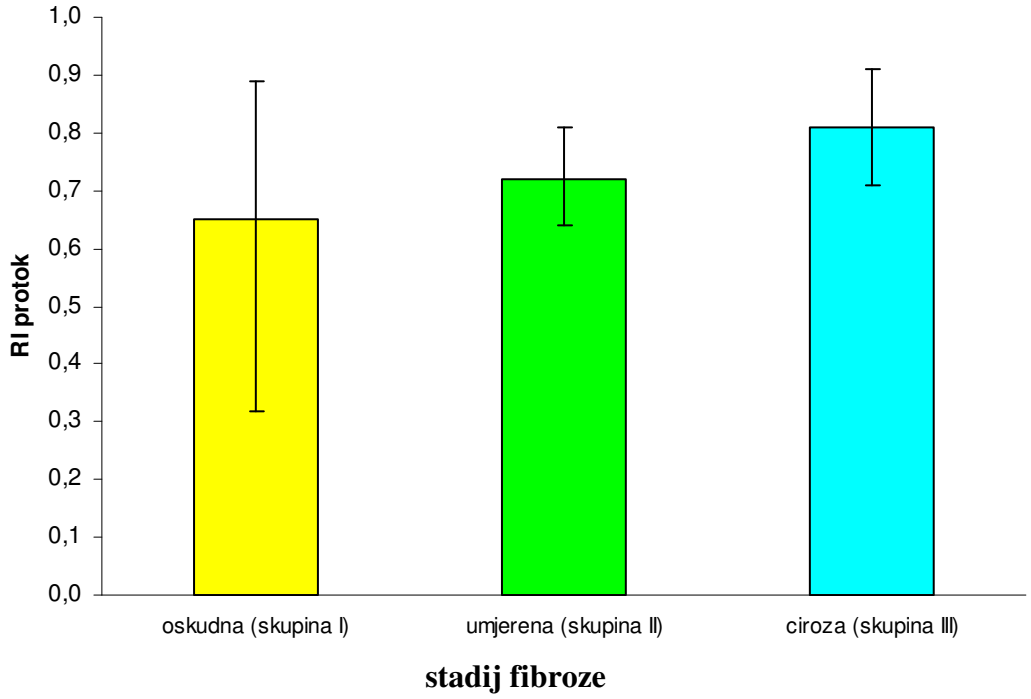

skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

**Indeks otpora (RI) u jetrenoj arteriji, vremenski uprosječena maksimalna brzina protoka (TAMV) u portalnoj veni i jetrena fibroza**

Parametri jetrenih protoka, RI i TAMV, određeni su tijekom ultrazvučne pretrage jetre obojenim-doplerskim aparatom, power doplerom i dupleks doplerom, u tri mjerenja, pri najmanjim pulsirajućim opetovanim frekvencijama.

Mjerenje indeksa otpora (RI) u jetrenoj arteriji je pokazalo da se i ova vijednost mijenja ovisno o težini jetrene bolesti, to jest stupnju fibroze: RI je najniži kod bolesnika s lakšim oblicima bolesti, kod oskudne jetrene fibroze (skupina I): - medijan, raspon: 0,65, 0,32-0,89 ; a najviši kod bolesnika s jetrenom cirozom, skupina III -medijan, raspon: 0,81, 0,71-0,91 (Slika 13.).

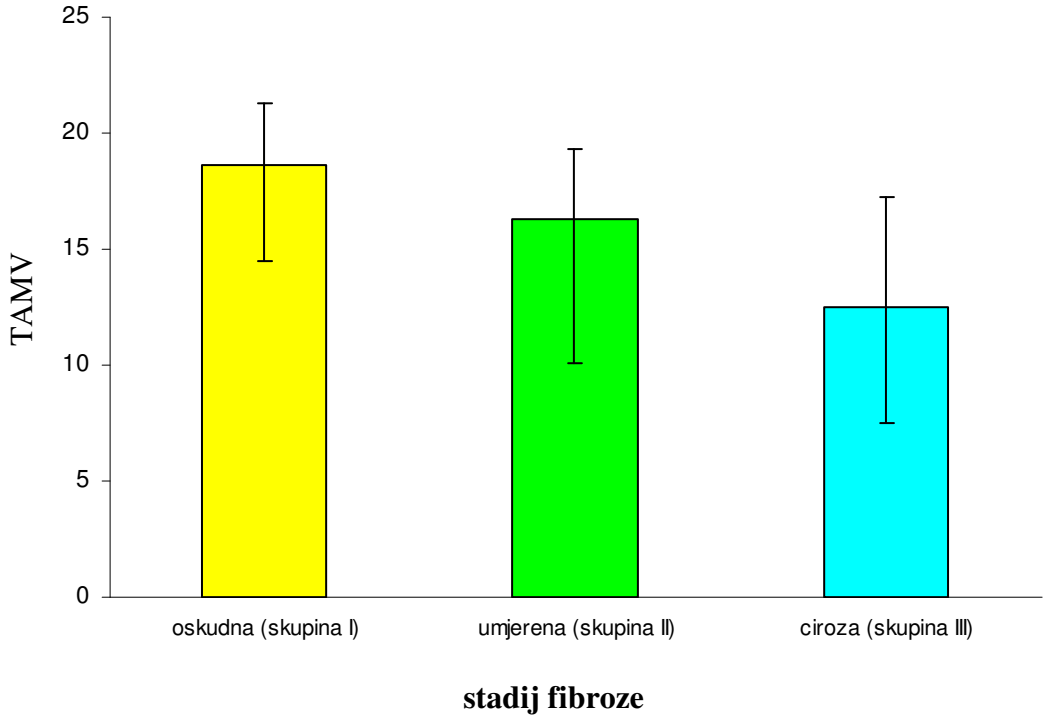
**Slika 13.** *Prikaz indeksa otpora (RI, od engl.resistence indeks) u odnosu na sadij fibroze u kroničnih jetrenih bolesnika*




skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

Za razliku od serumske aktivnosti ACE, serumske koncentracije ET-1 i RI, vremenski uprosječena maksimalna brzina protoka u portalnoj veni (TAMV) pokazuje vrijednosti obrnuto proporcionalne težini jetrene bolesti (Slika 14.): u skupini i određene su najviše vrijednosti TAMV-a - medijan, raspon: 18,60, 14,50-21,30 cm/s; dok su kod bolesnika s težim oblikom jetrene bolesti, cirozom, (skupina III), određene vrijednosti TAMV-a bile najniže - medijan, raspon: 12,50, 7,50-17,20 cm/s.

**Slika 14.** *Prikaz vremenski uprosječenih maksimalnih brzina protoka (TAMV, od.engl. time averaged maximal velocity) u portalnoj veni u odnosu na stadij fibroze u kroničnih jetrenih bolesnika..*




skupina i - bolesnici s jetrenom steatozom (n=20); skupina II - bolesnici s kroničnim hepatitisima (n=20) i skupina III - bolesnici sa cirozom jetre (n=30).

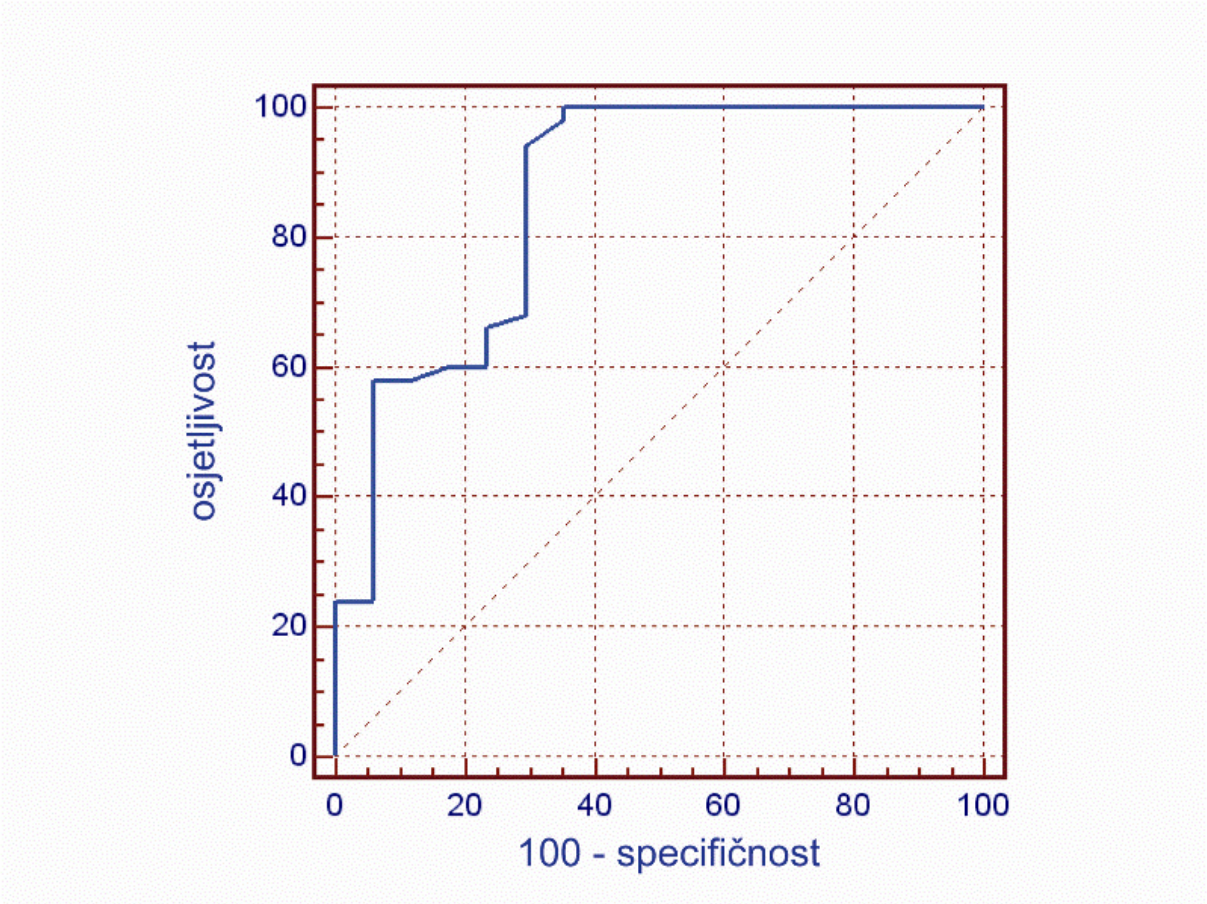
**Granične vrijednosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 između skupina bolesnika s različitim stupnjevima fibroze**

Nakon što smo odredili serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1, primijetili smo da njihov porast linearno ne prati povećanje jetrene fibroze. Naime, serumska aktivnost ACE pokazuje naglašen porast pri prijelazu jetrene fibroze iz oskudne u umjerenu (Slika 11), dok serumska koncentracija ET-1 pokazuje naznačen porast pri nastajanju jetrene ciroze iz umjerene fibroze (Slika 12.). Stoga smo pokušali odrediti vrijednosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 koje bi predstavljale granicu prijelaza spomenutih stupnjeva jetrene fibroze jedan u drugi.

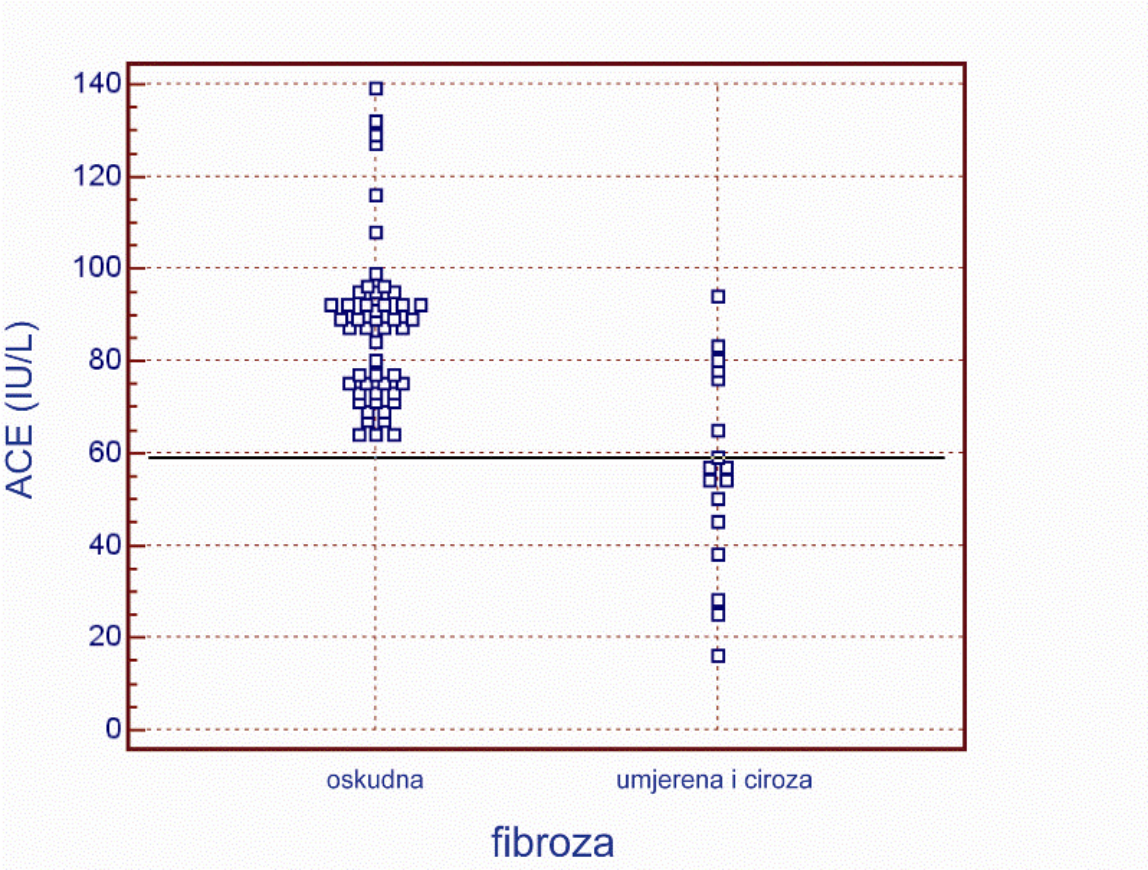
Analizom krivulje ROC za serumske aktivnosti ACE (Slika 15.) u naših ispitanika, izračunali smo da je granična vrijednost koja odvaja bolesnike s oskudnom jetrenom fibrozom od bolesnika s umjerenom jetrenom fibrozom i cirozom 59,0 IU/L. Uz tu graničnu vrijednost osjetljivost je bila 100,0%, a specifičnost 64,7 %. Točkasti dijagram (Slika 16.) prikazuje položaj granične vrijednosti serumske aktivnosti ACE u odnosu na izmjerene vrijednosti serumske aktivnosti ACE između ispitanih skupina bolesnika.

Graničnu vrijednost serumske koncentracije ET-1 koja odvaja bolesnike s oskudnom i umjerenom jetrenom fibrozom od bolesnika s jetrenom cirozom smo također izračunali analizom krivulje ROC (Slika 17.), a iznosila je 12,4 pg/mL, uz osjetljivost 96,8% i specifičnost 94,4 %. Položaj granične vrijednosti serumske koncentracije ET-1 u odnosu na izmjerene vrijednosti serumske koncentraije ET-1 između ispitanih skupina bolesnika prikazana je točkastim dijagramom (Slika 18.).

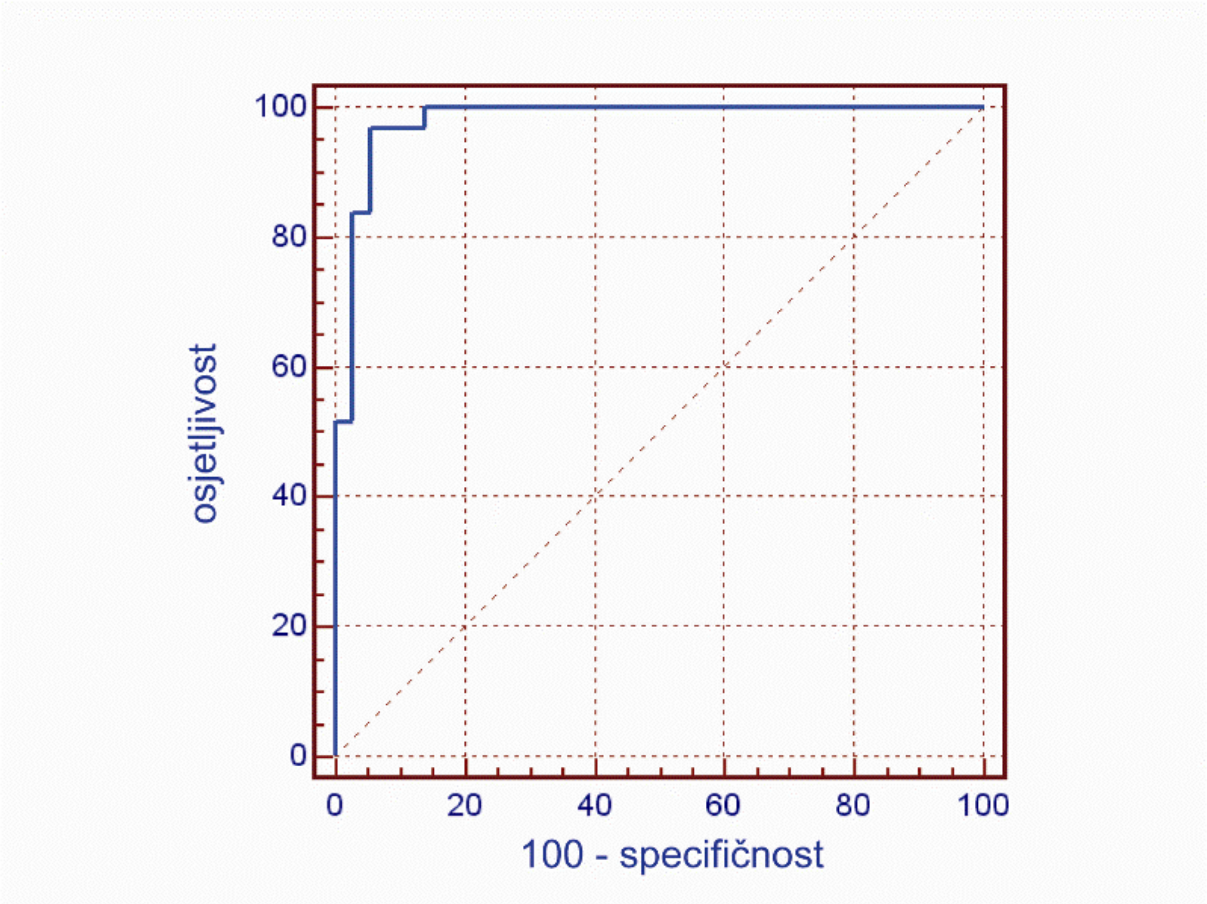
**Slika 15.** *Prikaz krivulje ROC za graničnu vrijednost serumske aktivnosti ACE između skupina s oskudnom jetrenom fibrozom u odnosu na bolesnike s umjerenom jetrenom fibrozom i jetrenom cirozom.*



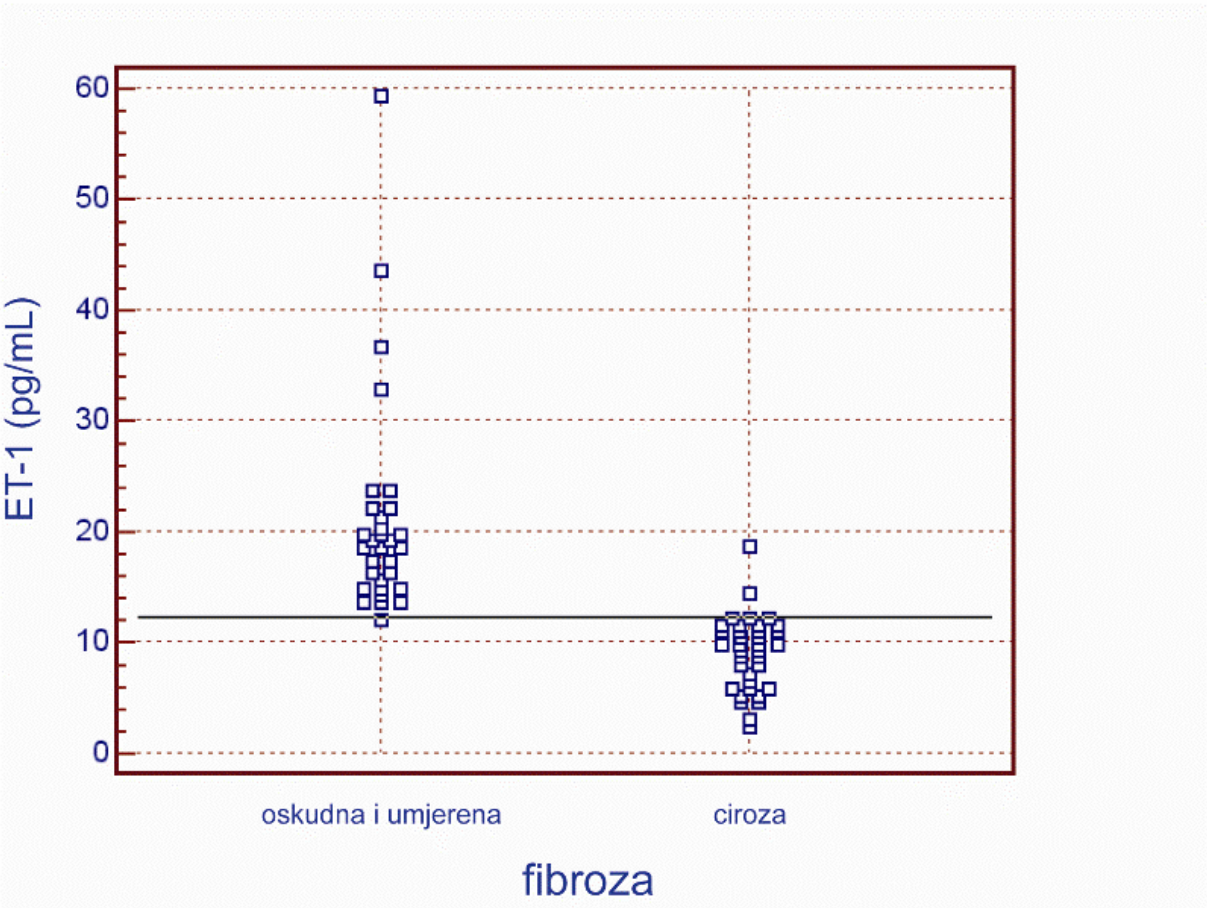
**Slika 16.** *Prikaz granične vrijednosti serumske aktivnosti ACE između skupina s oskudnom jetrenom fibrozom u odnosu na bolesnike s umjerenom jetrenom fibrozom i jetrenom cirozom.*



***Slika* 17.** *Prikaz krivulje ROC za graničnu vrijednost serumske koncentracije ET-1 između skupina s oskudnom i umjerenom jetrenom fibrozom u odnosu na bolesnike s jetrenom cirozom.*



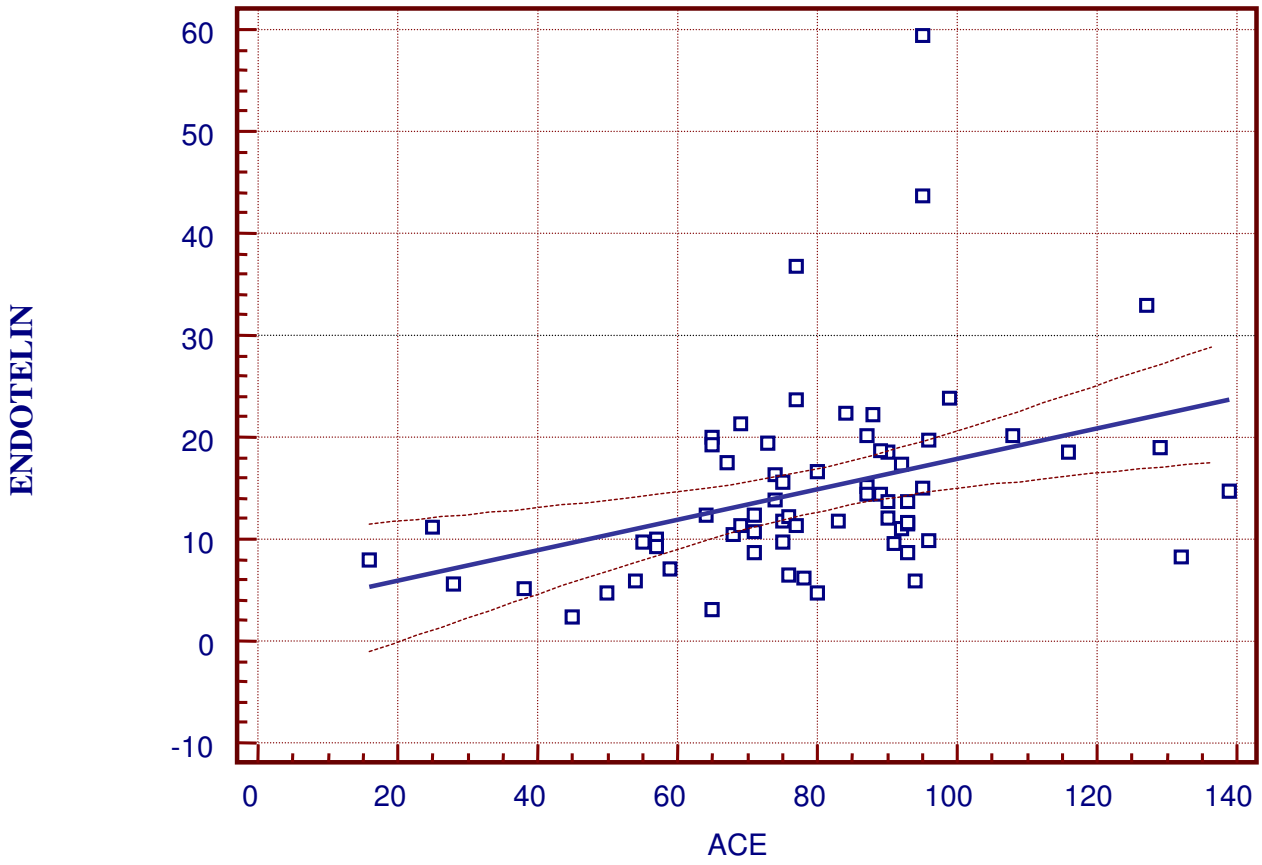
**Slika 18.** *Prikaz granične vrijednosti serumske koncentracije ET-1 između skupina s oskudnom i umjerenom jetrenom fibrozom u odnosu na bolesnike s jetrenom cirozom.*




**Povezanost serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1**

Povezanost serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 ispitana je Spearmanovim testom korelacije rangova. Analiza je pokazala pozitivnu povezanost ove dvije varijable: uz povećanje serumske aktivnosti ACE pronađeno je i povećanje serumske koncentracije ET-1, Spearmanov $\rho$=0,438, p=0,004 (Slika 19.).

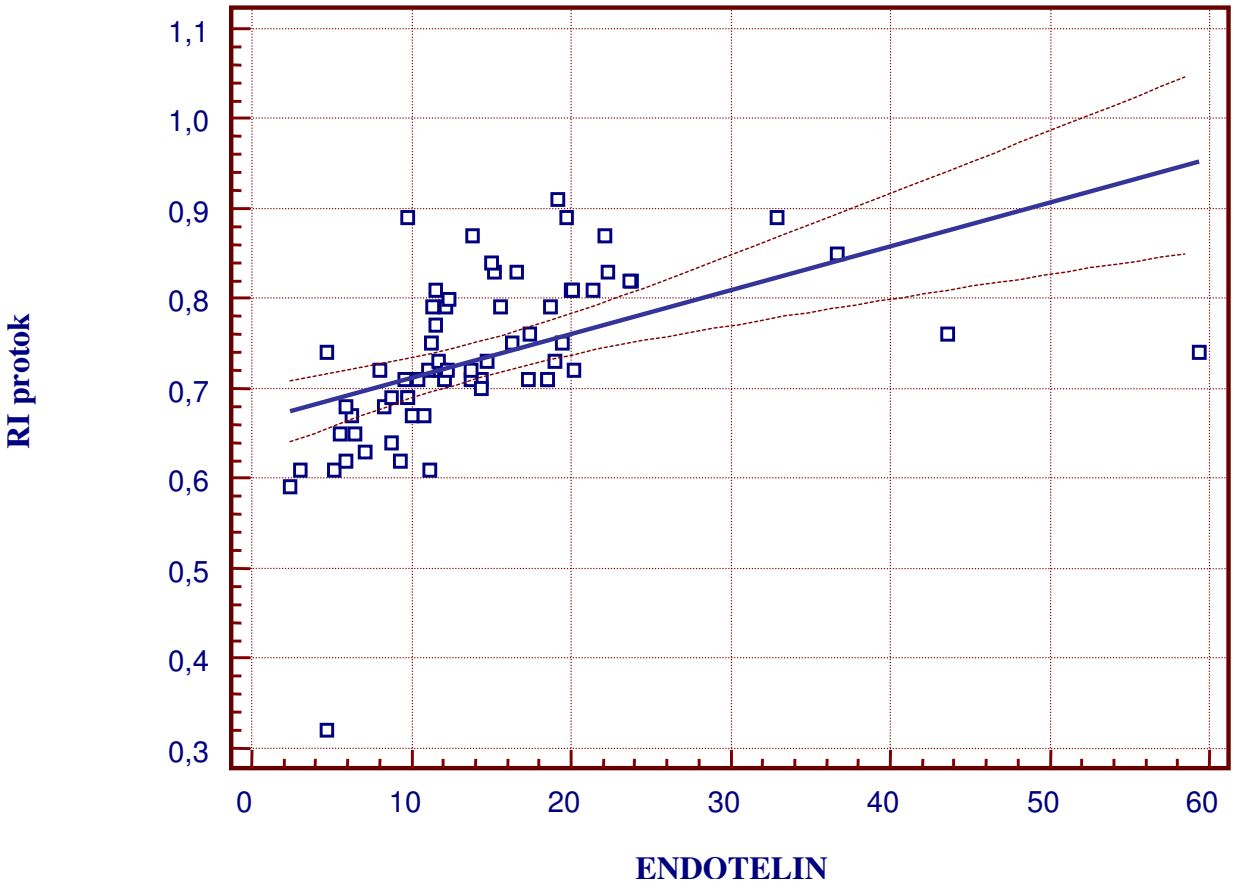
**Slika 19.** *Prikaz povezanosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 u kroničnih jetrenih bolesnika.*



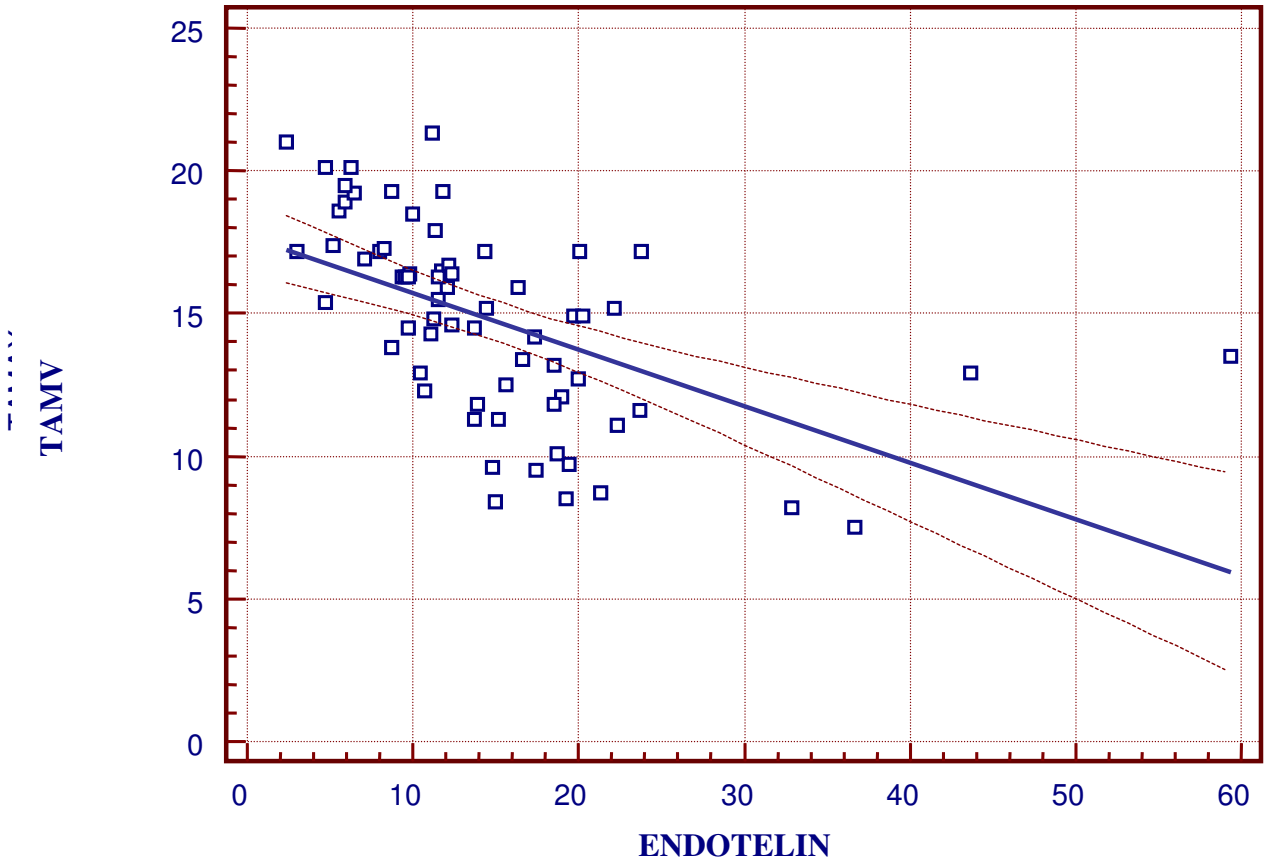

**Povezanost serumske koncentracije ET-1 i parametara jetrenih protoka, RI i TAMV**

Povezanost serumske koncentracije ET-1 i parametara jetrenih protoka također je istražena Spearmanovim testom korelacije rangova, koji je pokazao značajnu pozitivnu povezanost serumske koncentracije ET-1 i RI, Spearmanov $\rho$=0,727, p<0,001 (Slika 20.), dok je povezanost serumske koncentracije ET-1 TAMV-a bila jednako značajna, ali obrnuto proporcionala: povećanje serumske koncentracije ET-1 bilo je popraćeno smanjivanjem TAMV-a (Spearmanov $\rho$=–0,683, p<0,001) (Slika 21.)

**Slika 20.** *Prikaz serumske koncentracije ET-1 i indeksa otpora (RI) u jetrenoj arteriji u kroničnih jetrenih bolesnika.*



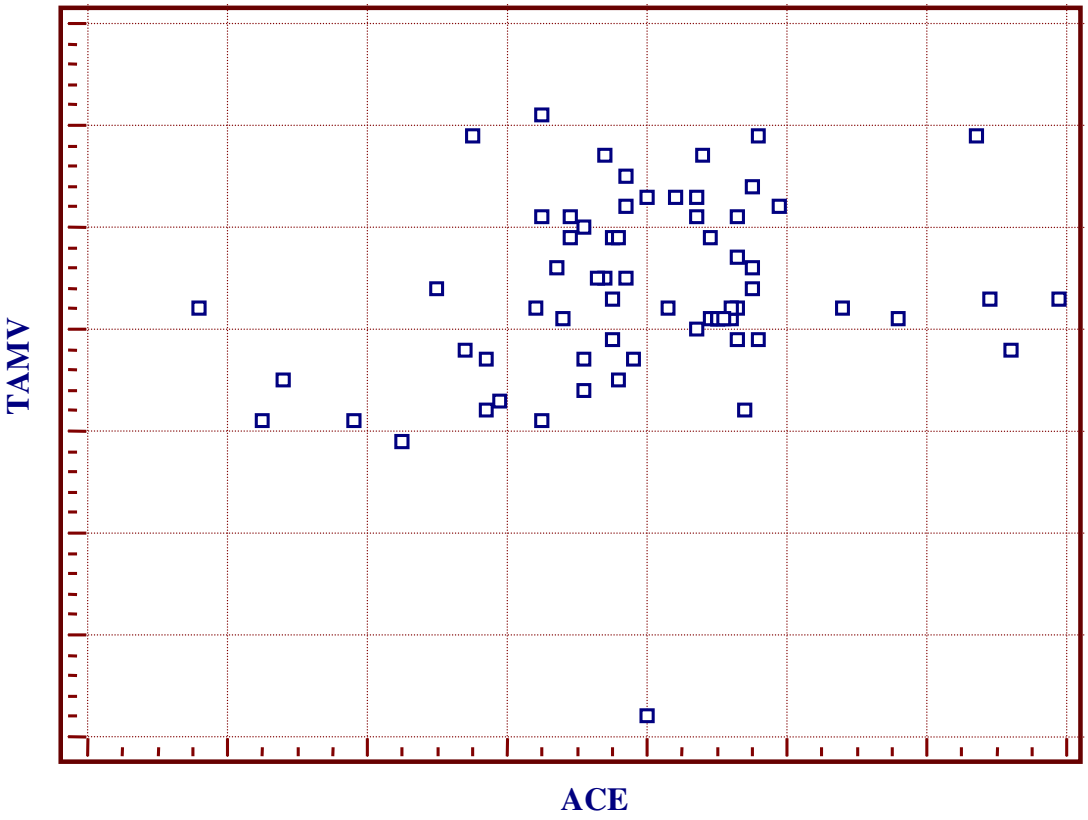
**Slika 21.** *Prikaz serumske koncentracije ET-1 i vremenski uprosječenih maksimalnih brzina protoka (TAMV ) u portalnoj veni.*



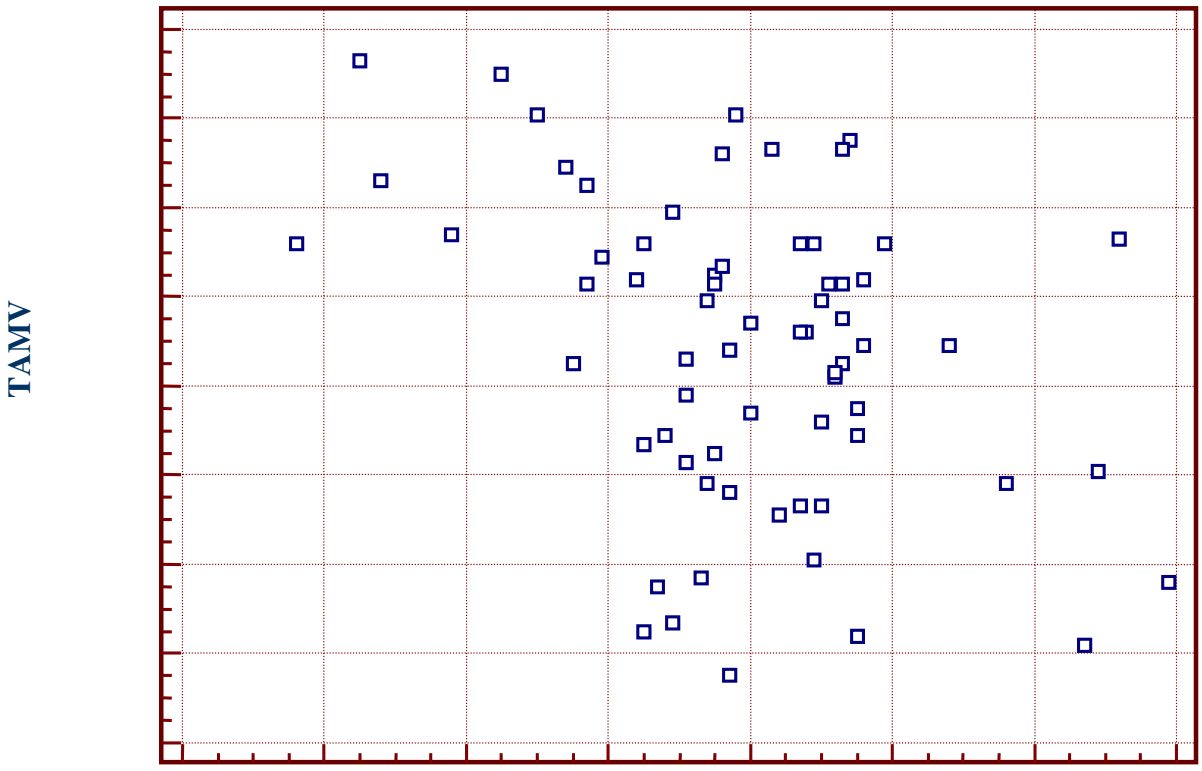

**Povezanost serumske aktivnosti ACE i parametara jetrenih protoka, RI i TAMV**

Osim povezanosti serumske koncentracije ET-1 i parametara jetrenih protoka, Spearmanovim testom korelacije rangova također je istražena i povezanost serumske aktivnosti ACE i parametara jetrenih protoka. Analiza korelacije nije pokazala povezanost serumske aktivnosti ACE s RI u jetrenoj arteriji; Spearmanov ρ=0,219, p=0.0757 (Slika 22.), dok je povezanost serumske aktivnosti ACE s TAMV-om bila obrnuto proporcionalna, ali mala, Spearmanov ρ=–0,272, p=0,0269 (Slika 23.).

**Slika 22.** *Prikaz serumske aktivnosti ACE i indeksa otpora (RI) u jetrenoj arteriji*



**Slika 23.** *Prikaz serumske aktivnosti ACE i vremenski uprosječenih maksimalnih brzina protoka (TAMV) u portalnoj veni.*



# 5. RASPRAVA

Kronična oštećenja jetre koja pokreću mehanizame fibroze javljaju se kao odgovor na različite štetne činitelje uključujući kronične B i C virusni hepatitis, akoholizam, metaboličke bolesti koje dovode do prekomjernog nakupljanja masti, željeza ili bakra u jetri, autoimuna oštećenja hepatocita i/ili epitela žučnih kanalića. Karakteristike kroničnih oštećenja jetre su njihova višemjesečna pa i višegodišnja prisutnost prije pojave fibroze. Rana je fibroza reverzibilna, dok je ciroza, kao završni stadij fibroze s formiranjem kolagena i regeneratornih nodula ireverzibilna i po učestalosti je u samom vrhu uzroka smrti u zapadnom svijetu u osoba mlađih od 60 godina. Upravo činjenica da je prosječna dob takvih bolesnika 50 godina, ističe velike društveno-gospodarstvene reperkusije ovog sindroma tim više što ovako poremećena jetrena arhitektura i vaskulatura rezultiraju portalnom hipertenzijom s dalekosežnim posljedicama.

Zbog toga se napori za razumijevanje fibroze kao složenog i mnogobrojnim čimbenicima uvjetovanog procesa, prvenstveno koncentriraju na zbivanja koja dovode do rane pojave fibrotičnih promjena u nadi pronalaska terapijskih mogućnosti za usporavanjem progresije.

Središnje mjesto u procesu fibrogeneze pripada HSC koje se nalaze u Disseovu prostoru između endotelnih stanica i sinusoidne površine hepatocita. U stanju mirovanja služe kao mjesto skladištenja retinoida. Tijekom kroničnog oštečenja jetre, HSC se *aktiviraju* uz povećanu ekspresiju za proliferativne i fibrogene citokine ( IL-1, TNF-$\alpha$, trombin, TGF-$\beta$ i dr.). Pri tom prolaze kroz korjenite morfološke i funkcionalne promjene koje se očituju gubitkom retinoidnih kapljica, povećavanjem i proliferacijom, povećanjem grubog endoplazmatskog retikuluma te ekspresijom $\alpha$-aktina specifičnog za glatko mišićje. Jedna od bitnih karaktristika aktivirane HSC je sposobnost kontrakcije, inače glavne karakteristike stanica glatke musklature. U posljednje vrijeme sve je veći broj dokaza kako je uz kontrakciju miofibroblasta i vaskularnih glatkomišićnih stanica i kontrakcija aktiviranih HSC dio

dinamičke sastavnice koja je modificirana različitim endogenim čimbenicima, uključivši i ET-1 i ANG II. To za posljedicu ima promjenu vaskularne rezistencije u mikrocirkulaciji kronično oboljele jetre i utječe na proces fibrogeneze. Dosadašnja istraživanja su pokazala povišene vrijednosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 u cirozi jetre . Za razliku od ET-1, istraživanja su dokazala povečanu serumsku aktivnost ACE-a i u kroničnom hepatitisu. U literaturi nema podataka o međusobnoj povezanosti ACE i ET-1, niti njihove povezanosti s doplerski određenim parametrima hemodinamskog stanja u krvnom optoku bolesnika s kroničnim bolestima jetre.

Rezultati našeg istraživanja su pokazala porast serumske aktivnosti ACE i ET-1 u svih ispitanika s kroničnim oštećenjima jetre različitog stadija što je u skladu s do sada objavljenim radovima. Porast serumske aktivnosti ACE u naših ispitanika je proporcionalan težini jetrene bolesti. Najniže su aktivnosti zabilježene u serumu bolesnika sa steatozom jetre i oskudnom fibrozom (skupina I) - medijan, raspon: 57, 16-94 IU/L, dok je u serumu bolesnika s najtežim oblikom fibroze – cirozom (skupina III) aktivnost ACE bila najveća - medijan, raspon: 89, 65-139 IU/L. Serumska koncentracija ET-1 također pokazuje raspodjelu koja prati težinu bolesti, slično kao i serumska aktivnost ACE. Najniže koncentracije ET-1 zabilježene su u serumu bolesnika s oskudnom i umjerenom fibrozom (skupina I) - medijan 6,25 pg/mL, raspon 2,38-11,80 pg/mL, dok su najviše koncentracije određene u bolesnika sa cirozom jetre (skupina III) - medijan, raspon: 18,95, 12,05-59,38 pg/mL.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da porast serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 ne prate linearno stadije jetrene fibroze. Naime, serumska aktivnost ACE pokazuje naglašen porast pri prijelazu jetrene fibroze iz oskudne u umjerenu dok se naglašen porast serumska koncentracija ET-1 bilježi pri nastajanju jetrene ciroze iz umjerene fibroze. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da bi promjene u vrijednostima serumske koncentracije ACE i serumske koncentracije ET-1 koje smo zabilježili u ispitivanim skupinama bolesnika

mogle biti rani pokazatelji progresije kronične jetrene bolesti. Trend izrazitog porasta serumske aktivnosti ACE razlikuje rani stadij fibroze od stadija umjereno izražene fibroze. Nasuprot tome, izraziti porast ET-1 razlikuje nastanak završnog stadija fibroze kao ireverzibilne promjene iz stadija umjereno izražene jetrene fibroze. Analizom krivulje ROC za serumsku aktivnosti ACE, izračun pokazuje graničnu vrijednost 59,0 U/L koja odvaja bolesnike s oskudnom jetrenom fibrozom od bolesnika s umjerenom jetrenom fibrozom i cirozom. Uz tu graničnu vrijednost osjetljivost je bila 100,0%, a specifičnost 65,7 %. Granična vrijednost serumske koncentracije ET-1 koja odvaja bolesnike s oskudnom i umjerenom jetrenom fibrozom od bolesnika s jetrenom cirozom izračunatom temeljem analize ROC krivulje za serumsku koncentraciju ET-1, iznosi 12,4 pg/mL, uz osjetljivost 96,8% i specifičnost 94,4 %. U navedenim skupinama zabilježena je pozitivna korelacija između serumske aktivnosti ACE-a i serumske koncentracije ET-1 (p=0,004). Navedene rezultate neophodno je sagledati u svijetlu broja uključenih ispitanika u ovoj studiji što će u nastavku istraživanja zahtjevati uključivanje većeg broja ispitanika uz mogućnost potrebite korekcije granične vrijednosti navedenih parametara.

RAS igra jednu od ključnih uloga u fibrogenezi i poremećaju jetrene mikrocirkulacije u kroničnim bolestima jetre. Glavno mjesto pripada ANG II nastalom djelovnjem ACE-1 na ANG I. Mehanizam porasta serumske aktivnosti ACE u bolesnika s kroničom bolesti jetre još uvijek nije dovoljno razjašnjen. Neki autori smataraju da je porast serumske aktivnosti ACE prouzročen oštećenjima plućne cirkulacije koja nastaju u okviru patogenetske slike ciroze jetre (251). Postoji mišljenje da hiperprodukcija ACE iz slezene, kao i u Gaucherovoj bolesti, može povećati serumsku aktivnost ACE u bolesnika s kroničnim bolestima jetre , osobito u cirozi jetre (60). Matsuki i Sakata (77) zastupaju hipotezu da je porast serumske aktivnosti ACE u cirozi jetre posljedica oslabljene inaktivacije ovog enzima u jetri koja nastaje u okviru smanjenja ukupne funkcije ovog organa tijekom patofizioloških zbivanja u cirozi jetre.

Poznato je da u ovih bolesnika raste razina histamina u serumu koji može djelovati na povećano oslobađanje ACE s endotela krvnih žila (252). Osim toga, hipoksija tkiva koja nastaje kao posljedica hemodinamskih poremećaja u okviru ciroze, može dovesti do porasta serumske aktivnosti ACE (253 ). Disbalans elektrolita koji nastaje u jetrenoj cirozi vjerojatno remeti elektrostatske sile kojima je enzim vezan za endotel krvnih žila te time povećava njegovo oslobađanje u serum. Paizis i suradnici su na modelu kroničnog jetrenog oštećenja u štakora izazavanog podvezivanjem žučnih vodova, dokazali povećanu produkciju ACE-a u području aktivne fibrogeneze porijeklom iz aktiviranih HSC i ostalih makrofagnih stanica te iz proliferativnih epitelnih stanica žučnih vodva (254).

Kao što je već poznato, glavni fiziološki učinak ACE-a je odvajanje dipeptida *histidil-leucin* od C-terminalnog kraja angiotenzina i i stvaranje snažnog vazokonstriktornog oktapeptida, angiotenzina II. Rezultati studije Batallera i suradnika (255) koji su proučavali učinke ANG II na HSC pokazali su da vezivanjem na AT-1 receptore membrana aktiviranih HSC, ANG II izaziva kontrakciju i proliferaciju aktiviranih HSC. Kontrakcija je posredovana povećanjem razine intracelularnog $Ca^{++}$ zbog dokazanog povećanja broja L-tipa kalcijevih kanala u aktiviranih HSC (256). ANG II ostvaruje mitogeni učinak na aktivirane HSC potencirajući tzv. mitogen-aktivirajuću protein kinazu (MAPK). Isti su autori istovremeno dokazali gotovo nezamjetan učinak ANG II na neaktivne HSC zdrave jetre što je vjerojatno posljedica odsutnosti AT-1 receptora na neaktiviranim HSC ili nepostojanja mehanizma potrebnog za staničnu kontrakciju. U nedavno objavljenom radu (257) autori su ukazali na ANG II kao snažni kemotaktični čimbenik za aktivirane HSC u oštećenoj jetri te na njegovu ulogu poticanja sekrecije IL-8 i monocitnog kemoatraktantnog proteina-1 (MCP-1; od engl. *monocyte chemoattractant protein-1*), u aktiviranim HSC. Radi se o dva kemokina koja su upletena u obnavljanje upalnih stanica. Krishna i suradnici (258) su u svom radu dokazali da ANG II inducira vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF; prema engl. *vascular endithelial*

*growth factor*) koji je jedan od glavnih čimbenika angiogeneze. VEGF stimulira aktivaciju HSC te sinusoidalnu kapilarizaciju potičući time jetrenu fibrozu. Razina jetrenog VEGF-a se povećava s progresijom kronične jetrene bolesti. Od velike su važnosti rezultati Batallera i suradnika objavljeni 2003. koji dokazuju da ANG II u aktiviranim HSC inducira NADPH oksidazu. Ona aktivira redoks osjetljive procese dovodeći do povećanog stvaranja slobodnih radikala kisika koji sudjeluju u patogenezi jetrene fibroze (259). Zamijećeno je da i drugi tipovi jetrenih stanica mogu pridonijeti ulozi NADPH oksidaze u stvaranju fibroze. U jetrenom oštećenju uzrokovanom alkoholom, Kupfferove stanice izražavaju fagocitnu NADPH oksidazu koja generira veće količine slobodnih radikala kisika i time potiče proces fibroze (260). ANG II je među ostalima, snažan stimulator stvaranja jednog drugog, vrlo snažnog i u kroničnim bolestima jetre ključnog vazoaktivnog peptida, ET-1 (261). Malobrojne su studije u kojima su se ispitivale koncentracije ET-1 u bolesnika s jetrenom cirozom prikazujući pri tom vrlo često nepodudarajuće rezultate. Nema podataka o međusobnoj povezanosti ACE i ET-1 u kroničnim bolestima jetre. Tako su početkom 90-tih prošlog stoljeća, Schraderb i suradnici (262) te Moor sa suradnicima (263) izvjestili o znatno višim koncentracijama ET u plazmi bolesnika s jetrenom cirozom u odnosu na kontrolnu, zdravu skupinu ispitanika. U isto vrijeme je Lerman sa suradnicima (264) ispitivao koncentraciju ET-1 u 12 bolesnika s terminalnim stadijem jetrene ciroze i u 10 bolesnika sa cirozom jetre koji su bili podvrgnuti transplantaciji jetre. Koncentracije ET-1 u plazmi prije transplantacije su bile normalne u odnosu na povišene verijednosti neposredno nakon transplantacije. Veglio i suradnici (265) su izvjestili o sniženim vrijednostima ET-1 u plazmi 23 bolesnika sa cirozom i u 18 sa ascitesom. Razlozi neslaganja rezultata ovih studija vjerojatno se između ostalog nalaze i u karakteristikama ispitanika koji su uključivani u studije kao i u različitim metodama kojima su se određivale koncentracije ET-1 u plazmi.

ET-1 preko $ET_A$ receptora smještenih na membranama glatkomišićnih stanica krvnh žila izaziva njihivu kontrakciju. Vezujući se na $ET_B$ receptore membrana endotelnih stanica krvnih žila povećava otpuštanje NO i prostaciklina s posljedičnom vazodilatacijom. S druge strane, ET-1 se veže za oba tipa receptora na membrani aktiviranih HSC izazivajući njihovu kontrakciju uz stimuliranje nastajanja profibrotičkog TGF-ß1 u tim stanicama. U jetrenoj cirozi povečana je produkcija ET-1 u endotelnim i glatkomišićnim stanicama splahničkog krvožilnog sustava i u stanicama crijevne mukoze kao odgovor na hipoksiju, oksidativni stres, bakterijsku endotoksemiju i povečanu aktivacuju sistemskog RAS-a ondosno ANG II (266-268).

Povećanje koncentracije ET-1 u plazmi bolesnika s kroničnim bolestima jetre može biti rezultat smanjene razgradnje i eliminacije ET-1 ili povećane sinteze i otpuštanja ovog peptida u cirkulaciju. Pluća imaju važnu ulogu u odstranjivanju ET-1 iz cirkulacije. U jetrenoj cirozi je moguće da poradi unutarjetrenih šantova dolazi do smanjivanja plućnog klirensa za ET-1 (269). S druge strane, mijenja se i bubrežni klirens za endotelin, između ostalog i zbog snižene aktivnosti enzima koji ga metaboliziraju kao što je neutralna endopeptidaza kojom obiluje bubreg. U bolesnika s hepatorenalnim sindromom i kroničnom jetrenom bolešću dokazane su nešto veće koncentracije ET-1 u plazmi renalih vena nego u plazmi renalnih aterija (246). Ti rezultati potkrepljuju hipotezu da porast cirkulirjućeg ET-1 i vjerojatno renalno stvaranje ET-1 mogu posredivati u vazokonstrikciji i smanjenu glomerularne filtracije koje su nađene u bolesnika s hepatorenalnim sindromom uz posljedično smanjenje eliminacije ET-1. Povećano stvaranje ET-1 u splahničkom bazenu u bolesnika sa cirozom jetre (245) predstavlja dodatno opterećenje za već usporenu eleminaciju putem jetre koja je zbog ciroze smanjene funkcionalne mase jetrenih stanica.

Navedene činjenice upućuju da ANG II koji nastaje djelovanjem ACE-1 i ET-1 ima dvije glavne uloge u kroničnoj jetrenoj bolesti – stimulaciju kontrakcije HSC uz posljedičnu

reglaciju intrahepatičnog toka krvi te izravnu regulaciju proizvidnje ECM uz posljedično poticanje fibrogeneze. Početni čimbenik u patofiziologiji portalne hipertenzije jest porast vaskularne rezistencije portalnom protoku krvi. ANG II pokreće taj porast vaskularne rezistencije utjecajem na postsinusoidalne venule. Studije su pokazale da je u oštećenom jetrenom tkivu prisutan progresivni porast broja aktivnih HSC smještenih oko postsinusoidalnih venula, vjerojatno kao odgovor na kemotaktičnu ulogu ANG II za ove stanice. Osim toga, ANG II preko AT-1 receptora izaziva kontrakciju i proliferaciju HSC te kontrakciju vaskularnih glatkomišićnih stanica, što sve zajedno rezultira poremećajma jetrene mikocirkulacije.

Napredovanjem jetrene bolesti prema cirozi sve se više povećava i vaskularna rezistencija u portalnom sustavu. Pozitivnom povratnom spregom povećava se serumska koncentracija ET-1 s posljedičnim vazokonstikcijskim učinkom na endotelne i aktivirane HSC sinusoida. U aktiviranim HSC, ET-1 potiče stvaranje ECM a time i razvoj jetrene fibroze. Endotoksin je također snažan stimulans sekrecije ET. Tako je dokazano da i.v. injekcija lipopolisaharida E.coli u ljudi i eksperimentalnih životinja značajno povećava serumsku koncentraciju ET l i to djelujući i na endotelne stanice jetrenih sinusoida i na makrofage (270). Kako su razine endoksina sve veće u težim jetrenim oštečenjima a osobito u bolesnika sa cirozom jetre, endotoksemija bi mogla biti još jedan alternativni mehanizam porasta ET u jetrenoj cirozi.

Na dalju progresiju kroničnog oštečenja jetre presudnu ulogu ima neravnoteža između vazodilatacijskih i vazokonstrikcijskih stimulansa. Dušični oksid (NO) je ključna vazodilatacijska molekula koja se stvara energijski ovisnim procesima u stanicama različih tkiva organizma. Taj je unutarstanični proces omogućen prisustvom enzima pod nazivom *sintetaza dušičnog oksida* (NOS, prema engl.*nitric oxide syntetase*). Među više izoformi ovog enzima, endotelna NOS (eNOS) igra važnu ulogu u relaksaciji endotela jetrenih sinusoida i

važan je modulator vaskularnog tlaka u sistemskoj cirkulaciji. Dokazano je da se u težim jetrenim oštečenjima i jetrenoj cirozi smanjuje enzimatska aktivnost eNOS s posljedičnim smanjivanjem nastajanja NO u endotelnim stanicama jetrenih sinusoida što rezultira povećavanjem tlaka u sinusoidama, naročito uz povišene vrijednosti ET-1 (271).

Portalna hipertenzija kao posljedica djelovanja svih navedenih čimbenika, označava definitivno pogoršanje kronične jetrene bolesti s predvidim razvojem mogućih komplikacija, primjerice varikoziteti jednjaka i krvarenje iz njih ili zbog pojave ascitesa razvoj spontanog bakterijskog peritonitisa ili hepatorenalnog sindroma.

U dijagnostičkom probiru bolesnika s mogućom portalnom hipertenzijom stremi se metodi koja je visoko senzitivna i specifična, jeftina, a izvođenjem lagana, prihvatljiva kako za bolesnika tako i ispitivača, liječnika. Uz serumsko određivanje ET-1 i ACE, ultrazvučna kombinacija dvodimenzionalne B-slike koja daje uvid u morfološke karakteristike i doplera koji omogućuje i funkcijsku analizu protoka u jetrenim krvnim žilama, svakako je jedna od tih metoda. Kombinacijom se smanjuje broj lažno negativnih nalaza, budući da je poznato kako fibrozna jetra može konvencionalnim B-modom izgledati praktično uredna. Fibroza jetre uzrokuje hemodinamske promjene u portalnom protoku lako uočljive i mjerljive dupleks dopler sonografijom. Već godinama su etablirane dvije osnovne značajke povezane za portalnu hipertenziju: porast promjera portalne vene uz istodobno smanjenje brzine protoka u toj žili (272-274).

Podaci o porastu indeksa otpora (RI) protoku krvi kroz jetrenu arteriju u fibroznoj jetri su recentnijeg datuma, indeks je viši u bolesnika s varikozitetim jednjaka i dekompenziranom cirozom nego u bolesnika bez varikoziteta i s kompenziranom bolešću (275-277).

Novija istraživanja vrijednosti doplerskih parametara u evaluacija kroničnih jetrenih bolesti ipak otkrivaju izvjesne kontroverze, više povezane s vjerodostojnošću brzine portalnog protoka u usporedbi s indeksom otpora protoku u jetrenoj arteriji. Piscaglia i sur. iznose podatke o nepostojanju korelaciji stupnja jetrene fibroze s brzinom portalnog protoka, ali utvrđuju povezanost indeksa otpora sukladno ekstenziji jetrene fibroze i životnoj dobi ispitanika (278). RI i životna dob u blagoj fibrozi iznose 0,638 ±0,084 i 39,0 ± 10,9 godina, a u izraženoj fibrozi 0,687 ± 0,060 i 49,4±14,4 godina, a za obe je varijable $p<0,05$. Ista skupina autora u nešto recentnijem radu navodi statistički značajnu razliku ($p<0,001$) u brzini portalnog protoka bolesnika s kroničnim hepatitisom, 29,2±9,2 cm/s i onih s cirozom jetre 21,8±5,2 cm/s (279). Ovakvi rezultati su konzistentni sa nešto ranijim rezultatima istih istraživača, koji u studiji uspoređuju indeks otpora (RI) i TAMV (time-averaged maximal flow velocity) portalnog protoka 26,2±7,9 u skupini kroničnih jetrenih bolesnika s i bez portalne hipertenzije, uzimajući kao distingvirajuće kriterije varikozitete jednjaka i/ili ascites (280). Nalaze vjerodostojnu razliku ($p<0,01$), za oba promatrana doplerska parametra: RI 0,733±0,064 i TAMV (cm/s) 20,3±4,9 za skupinu kronične jetrene bolesti s portalnom hipertenzijom nasuprot RI 0,670±0,076 i TAMV 26,2±7,9 u skupini bolesnika bez portalne hipertenzije. Annet i suradnici ne nalaze statistički značajne razlike u portalnoj brzini protoka između 12 ispitanika s kroničnim hepatitisom i 31 bolesnika s cirozom jetre - 22,62±5,97 naspram 21,14±10,06 cm/s (281). Indeks otpora je pak pokazao vjerodostojnu razliku ($p<0,001$) između kroničnog hepatitisa (0,689±0,011) i ciroze (0,749±0,098). O'Donohue i suradnici u studiji na 49 zdrava bolesnika, 22 bolesnika s kroničnim hepatitisom C i 23 bolesnika s primarnom bilijarnom cirozom ne nalaze statistički značajne razlike za indeks otpora i brzinu portalnog protoka kako izmedju bolesnika i zdravih tako i između dvije skupine bolesnih (282). Vrijednost RI u zdravih iznosi 0,639±0,053, u kroničnom hepatitisu 0,652±0,077, a u cirozi 0,678±0,071.

Nije jasan razlog ovakvim disonantnim rezultatima. Moguće ih je dijelom protumačiti inter- ili intraobserver varijabilnošću te mogućom razlikom u dijagnostičkoj opremi, tehnici istraživanja ili samoj populaciji ispitanika.

Vrijednosti brzine portalnog protoka u našoj skupini bolesnika s cirozom jetre su podudarne s rezultatima studije Kapicioglua i suradnika koji navode vrijednost 12,5±5,7 cm/s (283). Slične vrijednosti navode Sagard i suradnici koji u bolesnika s cirozom jetre i napetim ascitesom nalaze brzinu protoka venom portom 10,65±2,60 cm/s (284).

U našem istraživanju ispitali smo 20 bolesnika s oskudnom fibrozom, 20 bolesnika s umjerenom/obilnom fibrozom i 30 bolesnika s cirozom jetre. U ispitanika s početnom fibrozom RI iznosi 0,65 ± 0,11 a TAMV 18,32 ± 1,91 cm/s.U bolesnika s uznapredovalom fibrozom RI iznosi 0,73 ± 0,05 a TAMV 15,42 ± 2,12 cm/s. Bolesnici s cirozom jetre pokazuju RI koji iznosi 0,79 ± 0,06 a TAMV 12,46 ± 2,83 cm/s. Uspoređujući oba parametra između svake skupine bolesnika pokazuje se statistički vrlo značajna razlika, $p < 0,001$.

U literaturi nema podataka o međusobnoj povezanosti ET-1 i ACE s indeksima otpora i brzine portalnog protoka. Naša istraživanja ukazuju na značajnu pozitivnu povezanost serumske koncentracije ET-1 i RI, $p<0,001$ kao i obrnuto proporcionalnu povezanost serumske aktivnosti ACE i TAMV-a, $p=0,0269$. Ovi rezultati dopuštaju zaključak o opravdanosti korištenja ovih doplerskih parametara uz određivanje serumske aktivnosti ACE te serumske koncentracije ET-1 u neinvazivnoj prosudbi intenziteta razvoja jetrene fibroze i ciroze.

# 6. Z A K L J U Č C I

1. Serumska aktivnost ACE i serumska koncentracija ET-1 pokazuju porast proporcionalan težini jetrene bolesti.

2. Vjerodostojan porast serumske aktivnosti ACE nalazi se već pri prijelazu iz oskudne u umjerenu jetrenu fibrozu, dok se vjerodostajan porast serumske koncentracije ET-1 nalazi pri prijelazu umjerene fibroze u cirozu jetre.

3. Dokazana je pozitivna korelacija između serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1.

4. Vjerodostojan porast serumske aktivnosti ACE već u blažem obliku kronične jetrene bolesti prije vjerodostojnog porasta serumske koncentracije ET-1 koji se bilježi u težem obliku bolesti glede stadija fibroze, može implicirati zaključak o svrsishodnosti primjene ACE inhibitora u liječenju tih bolesnika.

5. Vrijednosti RI protoka jetrenom arterijom rastu usporedo s težinom jetrene bolesti.

6. Vrijednosti TAMV-a protoka venom porte smanjuju se proporcionalno težini jetrene bolesti.

7. Dokazana je pozitivna korelacija između ET-1 i RI protoka jetrenom arterijom a obrnuto proporcionalna korelacija između ET-1 i TAMV protoka portalnom venom.

8. Nije dokazana korelacija između serumske koncentracije ACE i RI dok je korelacija serumske koncentracije ACE i TAMV protoka venom porte obrnuto proporcionalna.

# 7. S A Ž E T A K

Dosadašnja istraživanja su pokazala povišene vrijednosti serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 u cirozi jetre. Za razliku od ET-1, istraživanja su dokazala povećnu serumsku aktivnost ACE-a i u kroničnom hepatitisu. U literaturi nema podataka o međusobnoj povezanosti ACE i ET-1, niti njihove povezanosti s doplerski određenim parametrima hemodinamskog stanja u krvnom optoku bolesnika s kroničnim bolestima jetre što je predmet ovog istražiavanja.

U istraživanje je uključeno ukupno 70 bolesnika koji su temeljem patohistološkog pregleda biopsijom dobivenog uzorka jetrenog tkiva podjeljeni u tri skupine. U *skupinu i* su bili uključeni bolesnici s masnom promjenom jetre, koja pokazuje oskudnu fibrozu; *skupina II*, obuhvaćala je bolesnike oboljele od alkoholnog i kroničnih virusnih hepatitisa te primarne bilijarne ciroze (PBC), bolesti koje pokazuju umjerenu fibrozu; a *skupinu III,* činili su ispitanici s alkoholnom bolesti jetre na čijim je uzorcima jetrenog tkiva prevladavala ciroza. Serumska aktivnost ACE je određena na uređaju Olympus AU 2700 upotrebom kita *«Infnity$^{TM}$ ACE Liquid Stable Reagent»* za određivanje angiotenzin konvertirajućeg enzima tvrtke *Thermo Electron Corporation*. Ovaj se postupak određivanja serumske aktivnosti ACE temelji na reakciji koju su opisali Holmquist i suradnici. Rezultati su izraženi u jedinicama po litri (U/L). Serumska koncentracija ET-1 određena je ELISA testom uz uporabu reagensa ASYBUF za određivanje ET-1.Rezultati su izraženi u pg/ml seruma.

Rezultati istraživanja su pokazala porast serumske aktivnosti ACE i ET-1 u svih ispitanika s kroničnim oštečenjima jetre različitog stadija što je u skladu s do sada objavljenim radovima . Porast serumske aktivnosti ACE i ET-1 u ispitanika je proporcionalan težini jetrene bolesti. Najniže su aktivnosti ACE zabilježene u serumu bolesnika sa steatozom jetre i oskudnom fibrozom (skupina I) - medijan, raspon: 57, 16-94 IU/L, dok je u serumu bolesnika s najtežim oblikom fibroze – cirozom (skupina III) aktivnost ACE bila najveća - medijan, raspon: 89, 65-139 IU/L. Serumska koncentracija ET-1 također pokazuje raspodjelu koja prati

težinu bolesti, slično kao i serumska aktivnost ACE. Najniže koncentracije ET-1 zabilježene su u serumu bolesnika s oskudnom i umjerenom fibrozom (skupina I) - medijan 6,25 pg/mL, raspon 2,38-11,80 pg/mL, dok su najviše koncentracije određene u bolesnika sa cirozom jetre (skupina III) - medijan, raspon: 18,95, 12,05-59,38 pg/mL. Serumska aktivnost ACE pokazuje naglašen porast pri prijelazu jetrene fibroze iz oskudne u umjerenu dok serumska koncentracija ET-1 pokazuje naznačen porast pri nastajanju jetrene ciroze iz umjerene fibroze.Granična vrijednost serumske aktivnosti ACE koja odvaja bolesnike s oskudnom jetrenom fibrozom od bolesnika s umjerenom fibrozom jetre i cirozom iznosi 59,0 U/I. Granična vrijednost serumske koncentracije ET-1 koja odvaja bolesnike s oskudnom i umjerenom fibrozom od bolesnika s jetrenom cirozom jetre 12,4 pg/ml. Povezanost serumske aktivnosti ACE i serumske koncentracije ET-1 ispitana je Spearmanovim testom korelacije rangova. Analiza je pokazala pozitivnu povezanost ove dvije varijable: uz povećanje serumske aktivnosti ACE pronađeno je i povećanje serumske koncentracije ET-1 ($p=0,004$). RI protoka jetrenom arterijom je najniži kod bolesnika s lakšim oblicima bolesti s oskudnm jetrenom fibrozom (skupina I): - medijan, raspon: 0,65, 0,32-0,89 a najviši kod bolesnika s jetrenom cirozom, (skupina III) -medijan, raspon: 0,81, 0,71-0,91. TAMV protoka u portalnoj veni pokazuje vrijednosti obrnuto proporcionalne težini jetrene bolesti : u skupini i određene su najviše vrijednosti TAMV-a - medijan, raspon: 18,60, 14,50-21,30 cm/s. U bolesnika s težim oblikom jetrene bolesti i cirozom (skupina III), određene vrijednosti TAMV-a bile su najniže - medijan, raspon: 12,50, 7,50-17,20 cm/s. Serumske koncentracije ET-1 pokazuje značajnu pozitivnu korelaciju s RI ( $p<0,001$) a obrnuto proporcionalnu povezanost s TAMV ($p<0,001$). Analiza korelacije nije pokazala povezanost serumske aktivnosti ACE s RI u jetrenoj arteriji ($p=0.0757$) dok je povezanost serumske aktivnosti ACE s TAMV-om bila obrnuto proporcionalna, ali mala ($p=0,0269$). Ovi rezultati dopuštaju zaključak o opravdanosti

korištenja ovih doplerskih parametara uz određivanje serumske aktivnosti ACE te serumske koncentracije ET-1 u neinvazivnoj prosudbi intenziteta razvoja jetrene fibroze i ciroze.

# 8. S U M M A R Y

Former research showed elevated values of ACE serum activity and ET-1 serum concentration in liver cirrhosis. Experiments also proved elevated ACE serum activity in chronic hepatitis, except for ET-1. There is no data in literature due to interaction between ACE and ET-1, neither their relationship with Doppler determined parameters hemodynamic status in blood circulation of patients with chronic liver diseases which was the subject of this investigation.

The research included all together 70 patients divided due to pathohistological examination of biopsy obtained liver tissue divided in three groups. In *Group I* were included *patients* with liver steatosis, which showed pore fibrosis; *group II*, contained patients with alcohol and chronic virus hepatitis and primary biliary cirrhosis (PBC), diseases which showed moderate fibrosis and *group III,* were patients with alcohol liver disease on which samples of liver tissue prevailated cirrhosis. ACE serum activity was determined by Olympus AU 2700, kit *«Infnity$^{TM}$ ACE Liquid Stable Reagent»* for determine angiotensin converting enzyme company *Thermo Electron Corporation* was used. This procedure of determing ACE serum activity was based on reaction described by Holmquist and associates.

Results were expressed in units per liter (U/L). ET-1 serum concentration was determined by ELISA test using reagens ASYBUF for ET-1. Results were expressed in pg/ml of serum.

Experiment results showed increase of ACE and ET-1 serum activity in all patients with various stages of chronic liver lesions what correlates with previous papers. Increase of ACE and ET-1 serum activity in patients is proportional to stage liver disease. The lowest ACE activity were found in patients with liver steatosis and poor fibrosis (group I) - median, range: 57, 16-94 IU/L, while in patients with most severe liver fibrosis – cirrhosis (group III) ACE activity was the highest - median, range: 89, 65-139 IU/L. ET-1 serum concentration also shows distribution which follows stage of illness, similar as ACE serum activity. The

lowest ET-1 concentration were noticed in u serum of patients with low and moderate fibrosis (group I) - median 6,25 pg/mL, range 2,38-11,80 pg/mL, while the highest concentration was determined in patients with liver cirrhosis (group III) - median, range: 18,95, 12,05-59,38 pg/mL. ACE serum activity shows emphasized increase in transition of liver fibrosis from poor to moderate while ET-1 serum concentration shows marked increase in emerging liver cirrhosis from moderate fibrosis. Border value of ACE serum activity which separates patients with poor liver fibrosis from patients with moderate liver fibrosis is 59,0 U/I. Border value of ET-1 serum activity which separates patients with poor and moderate liver fibrosis from patients with liver cirrhosis is 12,4 pg/ml. Correlation of ACE serum activity and ET-1 serum concentration was examined by Spearman test in correlation range. Analysis showed positive correlation of these two variables: with increase ACE serum activity there was also found increase of ET-1 serum concentration (p=0,004). RI flow through liver artery is the lowest among the patients with lighter form of poor liver fibrosis (group I): - median, range: 0,65, 0,32-0,89 among patients with liver cirrhosis, (group III) -median, range: 0,81, 0,71-0,91. TAMV flow in portal vein shows values reversed association to scale of liver disease: in group I the highest values of TAMV were found - median, range: 18,60, 14,50-21,30 cm/s. In patients with heavier form of liver illness and cirrhosis (group III), TAMV values were the lowest - median, range: 12,50, 7,50-17,20 cm/s. ET-1serum concentrations showed positive correlation with RI ( p<0,001) and reversed association to TAMV (p<0,001). Correlation analysis did not show correlation between ACE serum activity and RI in liver artery (p=0.0757) while correlation between ACE serum activity and TAMV was reversed association, but little (p=0,0269). These results allow us to conclude justification of using these Doppler parameters with determination of ACE serum activity and ET-1 serum concentration and in evaluation of noninvasive intensity of liver fibrosis and cirrhosis.

# 9. L I T E R A T U R A

1. Marx LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. Hypertension 1979;1:384-8.
2. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by mean of renal ishemica. J Exp Med 1984;59:347-79.
3. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Circulation 1993;87:1816-28.
4. van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, et al. Mannose-6-phosphate receptor mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. Hypertension 1997;30:1389-96.
5. Admiraal PJ, van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Sluiter W, Schalekamp MA. Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. J Hypertens 1999;17:621-9.
6. Mary I, Ohta Y, Muruta K, Tsukada Y. Molecular cloning and identification of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from paracrine kidney as renin-binding protein. J Biol Chem 1966;271:16294-9.
7. Campbell DJ, Valentin AJ. Identification of vascular renin binding proteins by chemical cross-linking inhibition of binding of renin by renin inhibitors. J Hypertens 1994;12:879-90.
8. Sealey JE, Catanzaro DF, Lavin TN, Gahnem F, Pitarresi T, Hu-LF, et al. Specific prorenin/renin binding (proBP). Identification and characterization of a novel membrane site. Am J Hypertens 1996;9:491-502.
9. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. Kidney Int 1996;50:1897-1903.
10. Nguyen G, Bouzhir L, Delarue F, Rondeau E, Sraer JD. Evidence of a renin receptor on human mesangial cells: effects onPAI1 and cGMP. Nephrologie 1998;19:411-6.
11. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest 2002;109:1417-27.
12. Muller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragnun D, Costerousse O, Menard J, et al. Vascular angiotensin converting enzyme expression regulates local angiotensin II. Hypertension 1997;29:98-104.

13. Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E, Wei CC, Palmer R, Hageman GR, at al. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart- Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. J Clin Invest 1997;100:253-8.
14. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. J Clin Invest 1987;79:1-6.
15. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. Hypertension 2000;35:1270-7.
16. Johnston CI. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. J Hypertens 1992; Suppl 10:513-26.
17. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. Hypertension 2002;39:316-22.
18. Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. Regul Pept 2000;91:1-11.
19. Matsubara H. Pathophysiological role angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal deseae. Cir Res 1998;83:1182-91.
20. Igić R, Kojović V. Angiotensin i converting enzyme (kininase II) in ocular tissues. Exp Eye Res 1980;30:299-303.
21. Re RN. Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;284:H751-7.
22. Yang Z, Bove CM, French BA, Epstein FH, Berr S, DiMaria JM, et al. Angiotensin II type 2 receptors over-expression preserves left ventricular function after myocardial infarction. Circulation 2002;106:106-11.
23. Su J-Z, Fukuda N, Jin X-Q, Lai Y-M, Suzuki R, Tahira Y, et al. Effect of $AT_2$ receptor on expression of $AT_1$ and TGF-β receptors in VSMC's from SHR. Hypertension 2002;40:853-8.
24. Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. Hypertension 2000;35:155-63.
25. AbdAlla S, Lother H et Massiery A, Quitterer U. Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. Nat Med 2001;7:1003-9.
26. Hsueh WA, Baxster JD. Human prorenin. Hypertension 1991;17:469-79.
27. Osmond DH, Sealey JE, McKenzie JK. Activation and function of prorenin: different viewpoints. Can J Physiol Pharmacol 1991;69:1308-14.

28. Sealey JE. Plasma renin activity and plasma prorenin assays. Clin Chem 1991;37:1811-19.
29. Itskovitz J, Rubattu S, Rosenwaks Z, Liu HC, Sealey JE. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome on in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab 1991; 72:165-71.
30. Wilson DM, Luetscher JA. Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. N Enl J Med 1990;323:1101-6.
31. Skott O, Jensen BL. Cellular and intravenal control of renin secretion. Clin Sci 1993;84:1-10.
32. Opshal JA, Smith KL, Murray RD, Abraham PA, Katz SA. Renin and renin inhibition in anephric man. Clin Exp Hypertens 1993;15:289-306.
33. Van Dongen R, Peart WS. Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. Br J Pharmac 1974;52:125-9.
34. Vandr AJ, Miller R. Control of renin secretion in the anesthetized dogs. Am J Physiol 1964;207:537-45.
35. Humphreys MH, Reid IA, Ufferman RG, Lieberman RA, Earley LE. The relationship between sodium excretion and renin secretion by the perfused kidney. Proc Soc Exp Biol Med 1975;150:728-34.
36. Blair-West JR, Brook AN, Simpson PA. On the question of body fluid volume or sodium status influencing renin release. J Physiol 1977;267:321-38.
37. Coote JH, Johns EJ, Macleod VH, Singer B. Effect of renal nerve stimulation, renal blood flow and adrenergic blockade on plasma renin activity in the cat. J Physiol 1972;226:15-9.
38. Sealey JE, Clark I, Bull MB, Laragh JH. Potassium balance and the control of renin secretion. J Clin Invest 1970;49:2119-27.
39. Henrich WL. Role of the prostaglandins in renin secretion. Kidney Int 1981;19:822-5.
40. Rosenthal J, Thurnreiter M, Plaschke M, Geyer M, Reiter W, Dahlheim H. Reninlike enzymes in human vasculature. Hypertension 1990;15:848-53.
41. Doi Y, Atarashi K, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Effects of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. Hypertension 1984;6:1124-9.
42. Soubrier F, Wei L, Hubert C, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology

of the angiotensin I-converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. J Hypertens 1993;11:599-604.

43. Caldwell PRB, Segall BC, Hsu KC Das M, Soffer RL. Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. Science 1976;194:1050-1.
44. Hohlbrugger G, Schweisfurth H, Dahlheim H. Angiotensin i converting enzyme in rat testis, epididymis and vas deferens under different conditions. J Reprod Fertil 1982;65:97-103.
45. Filipović N, Ostojić Lj, Hadžikarić N, Huskić J. Aktivnost enzima konvertora angiotenzina u nekim područjima ljudskog mozga - topografska distribucija. Folia Anatomica Iugoslav 1986;16:19-25.
46. Scholkens BA, Becker RHA, Linz W. Pharmakologische Beeinflussung des Konversions enzyms-lokale und systemische Efekte auf Herz und gefassen. Z Kardiol 1988; 77 Suppl 3:13-21.
47. Soffer RL. Angiotensin converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. Ann Rev Biochem 1976;45:73-94.
48. Tschope C, Schultheiss HP, Walther Z. Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and $AT_1$ receptor blockade. J Cardiovasc Pharmacol 2002;39:478-87.
49. Biron P, Compeau L. Pulmonary and extrapulmonary fate of angiotensin. i Rev Canad Biol 1971;30:27-34.
50. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE 2) converts angiotensin i to angiotensin. Circ Res 2000;87:1-9.
51. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, at al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature 2002;417:822-8.
52. Lieberman J, Sastre A. Angiotensin-converting enzyme activity in postmortem human tissues. Lab Invest 1983;48:717.
53. Erdos EG, Goffard JT. Human converting enzyme. Clin Exper Hypertens 1983;5:251-62.
54. Van Sande ME, Scharpe SL, Neels HM, Van Camp KO. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. Clin Chin Acta 1985;147:255-61.
55. Parente JV, Franco JG, Greene JL, Mierelles RS, Martinez AR. Angiotensin

converting enzyme: serum level during normal pregnancy. A J Obstet Gynecol 1979;135:586-9.

56. Rodriguez GE, Shin BC, Abernathy RS, Kendig EL. Serum angiotensin-converting enzyme activity in normal children and in those with sarcoidosis. J Pediatr 1981;99:68-72.
57. Lieberman J, Nosal A, Schlessner LA, Sastre-Foken A. Serum angiotensin-converting enzyme for diagnosis and therapeutic evaluation of sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1979;120:328-55.
58. Romer FK, Schmitz O. Angiotensin-converting enzyme in sarcoidosis. Acta Med Scand 1979;206:27-30.
59. Rohatgi PK, Ryan JW, Lindeman P. Value of serial measurement of serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis. Chest 1980;78:69-76.
60. Silverstein E, Pertschuk LP, Friedland J. Immunofluorescent detection of angiotensin-converting enzyme (ACE) in Gaucher`s cells. Am J Med 1980;69:408-10.
61. Lieberman J, Rea TH. Serum angiotensin-converting enzyme in leprosy and coccidiomycosis. Ann Intern Med 1977;87:422-5.
62. Thomas AV, Ansari A, Khurana M, Niden AH. Elevated serum angiotensin-converting enzyme in miliary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1979;83-119.
63. Gronhagen-Riska C, Kurppa K, Fydrguist F, Selroos O. Angiotensin-converting enzyme and lizosyme in silicosis and asbestosis. Scand J Respir Dis 1978;59:228-31.
64. Schweisfurth H, Kment A, Dahlheim H, Strauer BE. Elevated angiotensin converting enzyme (ACE) in patients with essential hypertension. Klin Wochensch 1982;60:49-50.
65. Osborn EC, Hodges NG, Pickens PT, Willicombe PR, Mahler RF. The conversion of ($^{35}$S) PTC-angiotensin i to PTC-angiotensin II in plasma of normotensive and hypotensive subjects. Clin Sci 1970;38:217-23.
66. Studer A, Luscher T, Sigenthaler W, Vetter W. Captopril in various forms of severe therapy-resistant hypertension. Klin Wochenschr 1981;59:59-67.
67. Yotsumoto H, Imai Y, Kuzuya N, Uchimura H, Matsuzaki F. Increased levels of serum angiotensin converting enzyme activity in hyperthyroidism. Ann Inter Med 1982;96:326-8.
68. Schernthaner G, Schwarzer CH, Kuzmits R, Muller M, Klemen U, Freyler H. Increased angiotensin converting enzyme activities in diabetes mellitus: analysis of

diabetes type, state of metabolic control and occurrence of diabetic vascular disease. J Clin Pathol 1984;37:307-12.

69. Raff M, Bardach M, Muller MM. Angiotensin-converting enzyme (ACE). Increased serum activities in patients with dermatological diseases. Arch Dermatol Res 1981;270 (3):341-5.
70. Bedrosian CWM, Woo J, Miller WC, Cannon DC. Decreased angiotensin-converting enzyme in the adult respiratory distress syndrome. Am J Clin Pathol 1978;70:244-7.
71. Anderson RG, Persson K. ACE inhibitors and their influence on inflammation, bronchial reactivity and cough. Eur Heart J 1994; 15(Suppl C):52-6.
72. Lauta VM. ACE: physiopathology and role in the diagnosis and prognosis of systemic granulomatosis, neoplasm and lung toxicity caused by antineoplastic agents. (Italian) Recenti Prog Med 1990; 81(9):601-13.
73. Tamura A, Hashimoto K, Tanoue M, Murota N, Ohdama S, Akagawa S, et al. A case of so-called Lennert´s lymphoma, suspected of sarcoidosis due to uveitis occurring first and elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE). (Japanese) Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 1984; 22(11):1033-9.
74. Brent GA, Hershman JM, Reed AW, Sastre A, Lieberman J. Serum angiotensin-converting enzyme in severe nonthyroidal illnesses associated with low serum thyroxin concentrations. Ann Intern Med 1984;100:680-3.
75. Schweisfurth H, Werntze H. Changes of serum angiotensin i converting enzyme in patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. Acta Hepatogastroenterol 1979;26:207-10.
76. Schweisfurth H. Serum angiotensin converting enzyme in patients with cirrhosis of the liver in orthostasis and recumbency. Wien Klin Wochenschr 1981;58:1981.
77. Matsuki K, Sakata T. Angiotensin-converting enzyme in disease of the liver. Am J Med 1982;73:549-51.
78. Sakata T, Takenaga N, Endoh T, Wada O, Matsuki K. Diagnostic significance of serum angiotensin converting enzyme activity in biochemical test with special reference of chronic liver diseases. Jpn J Med 1991; 30(5):402-7.
79. Podwzsocki B, Simon K, Gladysz A. Activity of angiotensin converting enzyme i and levels of acid alpha glycoprotein in selected liver and biliary tract diseases. Pol Tyg Lek 1993;48:268-70.
80. Kardum D; Huskić J, Fabijanić D, Banić M, Buljevac M, Kujundžić M, et al. Activity

of serum angiotensin-converting enzyme as a tumor marker of hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11(11)1209-13.

81. Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic liver; implications for regulation of portal pressure and resistance. Hepatology 1996;24:233-40.
82. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. Hepatology 1001;34 (4):745-9.
83. Jonsson J, Clouston A, Ando Y, Kelemen L, Horn M, Adamson M, et al. Angiotensin-Converting-Enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. Gastroenterology 2001;121:148-155.
84. Levens NR, Freedlender AE, Peach MJ, Carey RM. Control of renal function by intrarenal angiotensin II. Endocrinology 1983;112:43-9.
85. Siragy HM, Carey RM. Protective role of the angiotensin $AT_2$ receptor in renal vascular hypertension in conscious rats. Hypertension 1999;33:1237-42.
86. Siragy HM, de Gasparo M, Carey RM. Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. Hypertension 2000;35:1074-7.
87. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH. International Union of Pharmacology. XXIII The angiotensin receptors. Pharmacol Rev 2000;52:415-72.
88. Re RN, Fallon JT, Dzau VJ, Quay S, Haber E. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. Life Sci 1982;30:99-106.
89. Dzau VJ. Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis. Am J Med 1984;77:31-6.
90. Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. Circ Res 1987;60:422-8.
91. Campbell DJ. The site of angiotensin production. J Hypertens 1985;3:199-207.
92. Danser AHJ, Koning MMG, Admiraal PJJ, Sassen LMA, Derkx FHM, Verdouw PD, et al. Production of angiotensins i and II at tissue sites in intact pigs. Am J Physiol 1992;263:H429-37.
93. Mulrow PJ, Franco-Saenz R. The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. J Hypertens 1996;4:173-6.
94. Wang JM, Slembrouck D, Tan J, Archens L, Leenen FHH, Courtoy PJ, Depotter WP. Presence of cellular renin-angiotensin system in chromaffin cells of bovine adrenal

medulla. Am J Physiol 2002;283:H1811-18.

95. Mukoyanna M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type-2 angiotensin II receptor reveals a unique class of 7-transmembrane receptors. J Biol Chem 1993;268:24539-42.
96. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype-2 angiotensin II ($AT_2$) receptor protein in the rat kidney. Hypertension 1997;30:1238-46.
97. Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Cary RM. Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II ($AT_2$) receptor protein in rat heart. Hypertension 1998;32:78-83.
98. Matrougui K, Louframi L, Heymes C, Levy BI, Henrion D. Activation of $AT_2$ receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. Hypertension 1999;34:659-65.
99. Tamura M, Tukagi T, Howard EF, Landon EJ, Steimle A, Tanner M, Meyers PR. Induction of angiotensin II subtype-2 receptor-mediated blood pressure regulation in synthetic diet-fed rats. J Hypertens 2000;18:1239-46.
100. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 ($AT_2$) angiotensin II receptor regulates renal guanosine cyclic 3´, 5´ monophosphate and $AT_1$ receptor-mediated prostanglandine $E_2$ production in conscious rats. J Clin Invest 1996;97:1978-82.
101. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 ($AT_2$) angiotensin II receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. J Clin Invest 1997;100:264-9.
102. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct $AT_1$ at $AT_2$ receptors in neointimal formation. Circulation 2002;106:847-53.
103. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin (1-7): an update. Regul Pept 2000;91:45-62.
104. Paula RD, Lima CV, Khosla MC. Angiotensin (1-7) potentiates hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. Hypertension 1995;26:1154-9.
105. Broshinan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin (1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. Hypertension 1996;27:523-8.
106. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin (1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. J Phamacol Exp Ther

1998;284:388-98.

107. Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khasla MC, Ferrario CM. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. Hypertension 1992;21:900-5.

108. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Broshinan KB. Angiotensin (1-7) augments bradykinin-induced vasodilatation by competing with ACE and releasing nitric oxide. Hypertension 1997;29:394-400.

109. Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system by angiotensin (1-7) heptapeptide. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:4095-8.

110. Inoue A, Yanagisava M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2863-7.

111. Yanagisava M, Kurihara H, Kimura S, Tombe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature (London) 1988;332:411-5.

112. Simonson MS. Endothelins: Multifunctional renal peptides. Physiol Rev 1993;73:375-411

113. Firth JD, Ratclife PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. J Clin Invest 1992;90:1023-31.

114. Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. FASEB 1992;6:2653-9.

115. Shimada K, Takahashi M, Tansawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. J Bol Chem 1994;269:18275-8.

116. Marsen T, Schramek H, Dunn MJ. Renal action of endothelin: Linking cellular signaling pathways to renal disease. Kidney Int 1994;45:336-44.

117. Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Endothelin modulates the mitogenic effect of PDGF on glomerular mesangial cells. Am J Physiol 1994;266:F894-900.

118. Sakamoto H, Sasaki S, Nakamura Y, Fushimi K, Marumo F. Regulation of endothelin-1 production in cultured rat mesangial cells. Kidney Int 1992;41:350-5.

119. Kohno M, Ikeda M, Jonchi M, Horio T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. Am J Physiol 1993;265:E673-9.
120. Ong ACM, Jowett TP, Moorhead JF, Owen JS. Human highdensity lipoproteins stimulate endothelin-1 release by cultured human renal proximal tubular cells. Kidney Int 1994;46:1315-21.
121. Malek AM, Greene AL, Izumo S. Regulation of endothelin-1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5999-6003.
122. Bird JE, Waldron TL. Endogenous synthesis of endothelin-1 may mediate a delayed pressor response after injection of endothelin-1 in rats. J Cardiovasc Pharmacol 1995;25:307-13.
123. Morel DR, Lacroix JS, Hemsen A, Steinig DA, Pittet J-F, Lundberg JM. Increased plasma and pulmonary lymph levels of endothelin during endotoxin shock. Eur J Pharmacol 1989;167:427-8.
124. Zimmermann RS, Maymind M, Barbee RW. Endothelin blockade lowers total peripheral resistance in hemorrhagic shock recovery. Hypertension 1994;23:205-10.
125. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell signalling. In: Molecular biology of the cell. New York and London: Garland Publishing Inc., 1994:721-87.
126. Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. V. International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. Pharmacol Rev 1994;46:137-42.
127. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETc receptor) from Xenopus laevis dermal melanophores. J Biol Chem 1993;268:19126-33.
128. Douglas SA, Meek TD, Ohlstein EH. Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. Trends Biochem Sci 1994;15:313-6.
129. Masaki T. Endothelins: Homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. End Rev 1993;14:256-68.
130. Miller RC, Pelton JT, Huggins JP. Endothelin - from receptors to medicine. TiPS 1993;14:54-60.
131. Adachi M, Furuichi Y, Myamoto C. Identification of a ligand-binding site of the human endothelin-A receptor and specific regions required for ligand selectivity. Eur J

Biochem 1994;220:37-43.

132. Becker A, Haendler B, Hechler U, Schleuning W-D. Mutational analysis of human endothelin receptors $ET_A$ and $ET_B$. Eur J Biochem 1994;221:951-8.
133. Krystek, Jr SR, Patel PS, Rose PM, Fisher SM, Kienzle BK, Lach DA, et al. Mutation of peptide binding site in transmembrane region of a G protein-coupled receptor accounts for endothelin receptor subtype selectivity. J Biol Chem 1994;269:12383-6.
134. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature (London) 1990;348:730-2.
135. Sakurai T, Yanagisava M, Takuva Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. Nature (London) 1990;348:732-5.
136. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. FASEB J 1990;4:2989-3000.
137. Jouneaux C, Mallat A, Serradeil-Le Gal C, Goldsmith P, Hanoune J, Lotersztajn S. Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospolipase C via Gs and Gq in rat liver. J Biol Chem 1994;269:1845-51.
138. Jouneaux C, Goldsmith P, Hanoune J, Lotersztajn S. Endothelin inhibits the calcium pump and stimulates phosphoinositide phospholipase C in liver plasma membranes via two different G proteins, Gs and Gq. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22(Suppl 8):S158-60.
139. Sokolovsky M. Endothelin receptors in rat cerebellum: activation of phospho-inositide hydrolysis is transduced by multiple G-proteins. Cell Signall 1992;5:473-83.
140. Galron R, Bdolah A, Kloog Y, Sokolvsky M. Endothelin/ sarafotoxin receptor induced phosphoinositide turnover: Effects of pertussis and cholera toxins and of phorbol ester. Biochem Biophys Res Commun 1990;171:949-54.
141. Baldi E, Musial A, Kester M. Endothelin stimulates phosphatidylcholine hydrolysis through both PLC and PLD pathways in mesangial cells. Am J Physiol 1994;266:F957-65.
142. Kester M, Simonson MS, MxDermott RG, Baldi E, Dunn MJ. Endothelin stimulates phosphatidic acid formation in cultured rat mesangial cells: Role of a protein kinase C-regulated phospholipase D. J Cell Physiol 1992;150:578-85.
143. Schramek H, Wang Y, Konieczkowski M, Rose PM, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A2 in Chinese hamster ovary cells stably

expressing the human ETA or ETB receptor subtype. Biochem Biophys Res Commun 1994;199:992-7.

144. Herman WH, Simonson MS. Nuclear signaling by endothelin-1. J Biol Chem 1995,270:11654-61.
145. Lotersztajn S. Les endothelines. Medecine/Sciences 1993;9:1084-93.
146. Stephenson K, Gandhi CR, Olson M. Biological actions of endothen. In: Vitamins and Hormones, vol 48. New York: Academic Press., 1994:157-98.
147. Fukuda N, Soma M, Izumi Y, Minato M, Watanabe Y, Watanabe M, Hatano M. Low doses of endothelin-3 elicit endothelium dependent vasodilatation which accompanies with elevation of cyclic GMP. Jpn Circ J 1991;55:617-22.
148. Remuzzi G, Benigni A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. Lancet 1993;342:589-93.
149. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loeffler B-M, Burri K, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. J Pharmacol Exp Therap 1994;270:228-35.
150. Hay DWP, Henry PJ, Goldie RG. Endothelin and the respiratory system. TiPS 1993;14:29-32.
151. Masaki T, Yanigasawa M, Goto K. Physiology and pharmaclogy of endothelins. Med Res Rev 1992;12:391-421.
152. Badr KF, Murraz JJ, Brezer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. J Clin Invest 1989;83:336-42.
153. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, et al. Endothelin stimulates phospholipase C, Na+/H+ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. J Clin Invest 1989;83:708-12.
154. Wagner-Mann C, Sturek M. Endothelin mediates Ca influx and release in porcine coronary smooth muscle cells. Am J Physiol 1991;260(4PA 1):C771-7.
155. Zoja C, Orisio S, Perico N, Benigni A. Morigi M, Benatti L, et al. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cell and its modulation by transforming growth factor-beta thrombin, and thrombexane A2 analogue. Lab Invest 1991;64:16-20.
156. Emori T, Hirata Y, Marumo F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its mechanism of action. FEBS Lett 1990;263:261-4.

157. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, et al. Endothelin-secreting tumor. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17(Suppl 7):S398-401.
158. Gondo K, Ueno T, Sakamoto M, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. The endothelin-1 binding site in rat liver tissue: light- and electron-microscopic autoradiographic studies. Gastroenterology 1993;104:1745-9.
159. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin-1. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:9266-70.
160. Mallat A, Fouassier L, Preaux AM, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Rosenbaum J, et al. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells: an endothelin B receptor-mediated pathway. J Clin Invest 1995;96:42-9.
161. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, et al. Endothelin-1 is overexpressed in cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated human hepatic stellate cells. Gastroenterology 1996;110:534-48.
162. Riux KP, Sharkey KA, Wallace JL, Swain MG. Hepatic mucosal mast cell hyperplasia in rats with secondary billiary cirrhosis. Hepatology 1996;23:888-95.
163. Housset C, Carayon A, Housset B, Legendre C, Hannoun L, Poupon R. Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. Lab Invest 1993;69:750-5.
164. Rieder H, Ramadori G, Meyer Z, Meyer zum Bűschenfelde KH. Sinusoidal endothelial liver cells in vitro release endothelin: augmentation by transforming growth factor β- and Kupffer cell-conditioned media. Klin Wochenschr 1991;69:387-91.
165. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. New Engl J Med 1993;328:1828-35.
166. Rosenbaum J, Mallat A, Mavier P. La fibrose hėpatique une "itopathie"? Med/Sci 1994;10:1245-52.
167. Pinzani M. Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. J Hepatol 1995;22:700-6.
168. Sakamoto M, Ueno T, Kin M, Ohira H, Torimura T, Inuzuka S, et al. Ito cells contraction in response to endothelin-1 and substance P. Hepatology 1993;18:978-83.
169. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. Eur J Biochem 1993;213:815-23.

170. Gandhi CR, Stephenson K, Olson MS. Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. J Biol Chem 1990;265:17432-5.
171. Zhang JX, Pegoli WJ, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. Am J Physiol 1994;266:G624-32.
172. Tran-Thi TA, Kawada N, Decker K. Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver. FEBS Lett 1993;318:353-7.
173. Oshita M, Takei Y, Kawano S, Yoshihara H, Hijioka T, Fukui H, et al. Roles of endothelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. J Clin Invest 1993;91:1337-42.
174. Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. Am J Physiol 1994;267:G143-9.
175. Zhang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. Am J Physiol 1995;269:G269-77.
176. Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, et al. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. Hepatology 1994;19:675-81.
177. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. Hepatology 1995;21:1138-43.
178. Gandhi CR, Stephenson K, Olson MS. A comparative study of endothelin- and platelet-activating-factor-mediated signal transduction and prostaglandin synthesis in rat Kupffer cells. Biochem J 1992;281:485-92.
179. Mustafa SB, Gandhi CR, Harvey SAK, Olson MS. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. Hepatology 1995;21:545-53.
180. Kawada N, Klein H, Decker K. Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. Biochem J 1992;285-367-71.
181. Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. J Clin Invest 1994;95:1199-206.
182. Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide syntese activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. Gastroenterology 1999;117:1222-28.
183. Tanaka A, Katagiri K, Hoshino M, Hayakawa T, Tsukada K, Takeuchi T. Endothelin-

1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver. Am J Physiol 1994;266:G324-9.

184. Tanaka A, Katagiri K, Hoshino M, Hayakawa T, Tsukada K, Takeuchi T. Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver. Am J Physiol 1994;266:G324-9.

185. Serradeil-Le Gal C, Jouneaux C, Sanchez-Bueno A, Raufaste D, Roche B, Prėaux AM, et al. Endothelin action in rat liver. Receptors, free $Ca^{2+}$ oscillations, and activation of glycogenolysis. J Clin Invest 1991;87:133-8.

186. Rojkind M, Greenwel P. The liver as a bioecological system. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, eds. The Liver: biology and pathobiology. New York: Raven Press., 1988:707-16.

187. Greewell P, Geerts A, Ogata I, et al. Liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JI, Fausto N, eds. The liver: biology and pathobiology. New York: Raven Press., 1994;1367-81.

188. Hautekeete MI, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. Virchows Arch 1997;430:195-207.

189. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. Kidney Int Suppl 1996;54:539-45.

190. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 2000;275:2247-50.

191. Prockop DJ, Kivirikko KL. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995:64:403-434.

192. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. Semin Liver Dis 1999;19:129-140.

193. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 1999;19:205-19.

194. Koivisto T, Mishin VM, Mak KM, et al. Induction of cytochrome P-4502E1 by ethanol in rat Kupffer cells. Alcohol Clin Exp Res 1996;20:207-12.

195. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) - a review. Alcohol Clin Exp Res 1999;23:991-1007.

196. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rojkind M. Hydrogen peroxide: A link between acetaldehyde-elicited α1 (I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. Hepatology 2000;31:109-16.

197. Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Fannin R, Montuschi P, et al. Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. J Interferon Cytokine Res

1998;18:629-38.

198. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotactic activity in vitro. J Biol Chem 2000;275:10826-30.

199. Chapoval AI, Kamdar SJ, Kremlev SG, Evans R. CSF-1 (M-CSF) differentially sensitizes mononuclear phagocyte subpopulations to endotoxin in vivo: a potential pathway that regulates theKnittel T severity of gram-negative infections: J Leukoc Biol 1998;63:245-252.

200. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. Gastroenterology 1999;117(5):1205-21.

201. vom Dahl S, Bode JG, Reinehr RM, Monnighoff I, Kubitz R, Haussinger D. Release of osmolytes from perfused rat liver on perivascular nerve stimulation: alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and nonparenchymal liver cells. Hepatology 1999;29(1):195-204.

202. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type i expression in rat hepatic stellate cells. Hepatology 1999;30(4):987-96.

203. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. Journal of Cell Biology 1994;127(6 Pt 2):2037-48.

204. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. Seminars in Liver Disease 1999;19(2):129-40.

205. Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998;95(16):9500-5.

206. Hellerbrand, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. Hepatology 1996;24(3):670-6.

207. Hellerbrand, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. Hepatology

1996;24(3):670-6.

208. Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. Liver 1998;18:2-13.

209. Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. Liver 1998;18(1):2-13.

210. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. Gastroenterology 1996;110(2):534-48.

211. Mallat A, Preaux AM, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Gallois C, Brenner DA, et al. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. J Clin Invest 1996;98(12):2771-8.

212. Massague J. The transforming growth factor-β family. Annu Rev Cell Biol 1990;6:597-641.

213. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGF-β1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. J Hepatol 1999;30:77-87.

214. Roth S, Michel K, Gressner AM. (Latent) transforming growth factor-β in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. Hepatology 1998;27:1003-12.

215. Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwogler S, et al. The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-β. Biochem Biophys Res Commun 1992;183:739-42.

216. Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, et al. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor-β 1. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5408-12.

217. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-β/Smad signaling system. EMBP J 2000;19:1745-54.

218. Bugno M, Graeve L, Gatsios P, et al. Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter. Nucleic Acids Res 1995;23:5041-7.

219. Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early

response of α2(I) collagen to transforming growth factor-β1. J Biol Chem 1997;272:19738-45.

220. Prakash S, Wyler DJ. Fibroblast stimulation in schistosomiasis XI. Purification to apparent homogeneity of fibroblast-stimulating factor-1, an acidic heparin-binding growth factor produced by schistosomal egg granulomas. J Immunol 1991;146:1679-84.
221. Prakash S, Nanji AA, Robbins PW. Fibrosin: a novel lymphokine in alcohol-induced fibrosis. Exp Mol Pathol 1999;67:40-9.
222. Greenwel P, Wyler DJ, Rojkind M, Prakash S. Fibroblast-stimulating factor-1, a novel lymphokine produced in schistosomal egg granulomas, stimulates liver fat-storing cells in vitro. Inter Immun 1993;61:3985-7.
223. Bradham DM, Igarashi S, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol 1991;114:1285-94.
224. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. J Invest Dermatol 1996;107:404-11.
225. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-β in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. J Cell Physiol 1999;181:153-9.
226. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol 2000;27:149-54.
227. Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. J Hepatol 2000;32:754-61.
228. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF-β-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. FASEB J 1998;12:1151-61.
229. Rojkind M, Mourelle M. The liver as a bioecological system: Modifications during regeneration and repair: In: Nimni M, editor. Collagen: chemistry, biology and

technology. Boca Raton: CRC Press,1988:137-160.

230. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J 1999;13:781-92.

231. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. Hepatology 1995;21:787-95.

232. Preaux AM, Mallat A, Nhieu JT, et al. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. Hepatology 1999;30:462-8.

233. Theret N, Musso O, L`Helgoualc`h A, Campion JP, Clement B. Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP2 activation in injured human livers. Am J Pathol 1998;153:945-54.

234. Theret N, Musso O, L`Helgoualc`h A, Clement B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. Am J Pathol 1997;150:51-8.

235. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B. Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-α and TGF-β1. J Hepatol 1999;30:48-60.

236. Trim JE, Samara SK, Arthur MJ, Takahara T, Furui K, Watanabe A. Upstream tissue inhibitor of metalloproteinaze-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kd nuclear protein. J Biol Chem 2000;275:6657-63.

237. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechovsky HD, Bechstein WO, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expr4ession in rat and human liver fibrosis. Am J Pathol 1997;150:1647-59.

238. Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Watanabe A. Expression of matrix metal-loproteinase-13 and tissue of metalloproteinae-1 in acute liver injury. J Hepatol 1999;30:419-24.

239. Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Tissue inhibitors of metalloproteinases: srole in liver fibrosis and alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res 1999;23:940-3.

240. Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. J Biol Chem 1998;273(1):302-8.

241. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ et al.

Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. Hepatology 1998;28(6):1518-24.

242. Olaso E, Eng F, Lin C, Yancopoulos G, Friedman SL. Hepatology 1999;30:413.
243. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. J Clin Invest 1998;102(3):538-49.
244. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. Cell Tissue Res 1998;292(3):447-52.
245. Gerbes AL, Moller S, Gulberg V, Henriksen J.Endothelin-1 and -3 Plasma concentracion in patients with cirrhosis. Role of splanchnic and renal passage and liver function. Hepatology 1995;21:735-9.
246. Moore K, Wendon J, frazer M, Karani J, Williams R, Badr K. Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome. N Engl J Med 1992;327:1774- 8.
247. Cho J-J, Hocher B, Herbst H, Jia J-D, Ruehi M, Hahn EG,et al. An oral endothelin A-receptor antagonist block collagen syntesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. Gasroenterology 2000;118:1169-78.
248. Ishak K, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatology 1995;22:696-99.
249. Holmquist L., Mattern, F., Schiele, B., Alahuhta, P., Beigl, M., and Gellersen, H. Smart-its friends: A technique for users to easily establish connections between smart artefacts. In Proc. of UBICOMP 2001, Atlanta, GA, US,
250. Ando K, Hirata Y, Schichiri M, Emori T, Marumo F. Presence immunoreactive endothelin in human plasma.FEBS Let 1989;245:164-166.
251. Hourani JM, Bellamy PE, Taskin DP, Simmons MS. Pulmonary dysfunction in advanced liver cirrhosis: frequent occurence of an abnormal disffusing capacity. Am J Med 1991;90:693-700.
252. Karetzky MS, Mithofer JC. The cause of hiperventilation an arterila hypoxia in patients with cirrhosis of the liver. Am J Med Sci 1967;254:797-804.
253. Davis HH, Schwartz DJ, Lefrak SS, SusmanN, Schainker BA. Alveola-capyllary oxygen disequilibrium in hepatic cirrhosis. Chest 1978;73:507-11.

254. Paizis G, Cooper M, Schembri J, Tikellis C, Burrel L and Angus P. Regulation of components of the Renin-Angiotensin System bile duct-ligated rat liver. Gastroenterology 2002; 123:1667-76.
255. Bataller R, Nikolas JM, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. Gastroenterology 2000;118:1149-56.
256. Bataller R, Gasull X, Gines P, Nikolas JM, Garcia-Ramallo E, Gual A et al. Phenotypic transformation of rat hepatic stellate cells into myofibroblast results in an up-regulation of voltage-operated calcium channels. J Hepatol 1999;23: 345.
257. Marra F et al. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis:correlation with monocyte infiltration. Am. J. Pathol. 1998;152:423-30.
258. Krishna P, Nakata M, Nakajima T, Kitajima I, Maruyama I. Incresed production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by angiotensin II. Neurosci Res Commun 1997;25:913-17.
259. Bataller R, Schwabe R, Robert F, Choi Y, Yang L, Paik YH et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. J Clin Invest 2003; 112 9:1383-94.
260. Kono H, et al. NADPH oxidase-derived free radicals arekey oxidants in alcohol-induced liver disease. J Clin Invest 2000;106:867-72.
261. Gomezgarre D, Ruizortega M, Ortego M, Largo R, Lopezarmada MJ, Plaza JJ, et al. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. Hypertension 1996;27:885-92.
262. Schrader J, Tebbe U, Bornes M, Ruschitzka F, Schoel G, Kandt M, et al. Plasma endothelin in normal probands and patients with nephrologic-rheumatologic and cardiovascular diseases. Klin Wochenschr 1990;68:774-9.
263. Moore KP, Wendon J, Frazer M, Gimson AES, Karani J, Williams R, Badr KF. Plasma endothelin (ET) levels in acute and chronic renal failure, chronic liver disease and hepatorenal syndrome (HRS).J Am Soc Nephrol 1991;3:625.
264. Lerrman A, Click RL, Narr BJ, Wiesner RH, Korm RAF, Textor SC,Burrnet JC Jr. Elevation of plasma endothelin associated with systemic hypertension in humans following orthotopic liver transplantation.Transplantation 1991; 51:646-50.
265. Veglio F, Pinna G, Melchio R, Rabbia F, Panarelli M, Gagliardi B, Chiandusi L.

Plasma endothelin levels in cirrhotic subjects. J Hepatol 1992;15:85-7.

266. Moreau R, Braillon A, Roulto D, et al. Hypoxie ntissulaire et insuffisance hepatocellulaire chez les maladies attientis de cirrhosise. Gastroenteriol Clin Biol 1989;13:978-83.

267. Boaulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AWA, Werner A, luscher TF. Oxidized low densitylipoproteins induce mRNA expresion and release of endothelin from human and porcine endothelium. Circ Res 1992;70:1191-7.

268. Pernow J, Hemsen A, Lundberg JM.release of endothelin-like immunoreactivity in relation to neuropeptide Y and catecholamines during endotoxin shock and asphyxia in the pig. Acta Physiol Scand 1990;140:311-22.

269. Schraufnagel DE, Kay JM. Structural and pathologic changes in the lun vasculare in chronic liver disease. Clin Chest Med 1996;17:1-15.

270. Salo J, Francitorra A, Follo A, Navasa M, Gines A, Jimenez W, et al. Increased plasma endothelin in cirrhosis. Relationship with systemic endotoxemia and response to changes in effective blood volume. J Hepatology 1995;22:389-98.

271. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. Gastroenterology 1999;117:1222-8.

272. Bolondi L, Gandolfi L, Arienti V, et al. Ultrasonography in the diagnosis of portal hypertension: diminshed response of portal vessel to respiration. Radiology 1989;142.167-72.

273. Zoli M, Marchesini G, Cordiani M, et al. Echo-Doppler measurement of spancnic blood flow in control and in cirrhotic subjesct. J Clin Ultrasound 1989;14:429-35.

274. Zironi G, Gaiani S, Fenyves D, et al. Value of measurement of mean portal flow celocity by Doppler flowmetry in the diagnosis of portal hypertension. J Hepatol 1992;16:298-303.

275. Bolognes M, Sacerdoti D, Merkel C, et al. Splenic Doppler impedance indices: Influence of different portal hemodynamic conditions.Hypetaology 1996;23:1035-40.

276. Piscaglia F, gaiani S, Zironi GC, et al. Intra and extrahepatic arterial resistence in chronic hepatis and liver cirrhosis.Ultrasound Med Biol 1997;23:675-82.

277. Iwao T, Toyonaga A, Oho K, et al. Value of Doppler ultrasound parameters of portal vein and hepatic artery in the diagnosis of cirrhosis an portal hypertension. Am J Gastrenterol 1997;92:1012-17.

278. Piscaglia F, Gaiani S, Calderoni D, et al. Influence of liver fibrosis on hepatic artery Doppler resistence index in chronic hepatitis of viral origin. Scand J Gastroenterol 2001;36:647-52.

279 Piscaglia F, Donati G, Cecilioni L, et al. Influence of spleen on portal hamodynamics: a non-invasive study with doppler ultrasound in chronic liver dosease and haematological isordes. Scand J gastroenterol 2002;37:1220-27.

280. Piscaglia F, Donati G, serra C, et al.Value of splahnichnic Doppler ultrasound in the diagnosis of portal hypertension.Ultrasoun Med Biol 2001;27:893-99.

281. Annet L, Materne R, Danse E, Jamart J, Horsmans Y, Van Beers B. Hepatic flow parameters measured with MR imaging and doppler US: corelation with degree of cirrhosis and portal hypertension. Radiology 2003;229:409-14.

282. O´Donohue Ng C, Catnach S, farrant P, Williams R.diagnostic value of Doppler assessment of the hepatic and portal vessels and ultrasound of the spleen in liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16:147-52.

283. Kapicioglu S, Cihanyurudu N, Cilingri H, Baki AH, Dinc H, Tuncer C. Effect of cisapride on portal hamodinamycs in patients with liver cirrhosis using duplex Doppler ultrasonography. Eur J Ultrasound 2000;12:95-101.

284. Sagarad SV, Chawla YK, Yogesh K, Dhiman RK. Portal haemodynamics after large-volumen paracentesis inpatients with liver cirrhosis and tense ascites. Dig Dis Sci 1998;43:2470-2.

# 10. Ž I V O T O P I S

Rođen 5.rujna 1962. godine. Osnovnu i srednju školu završio u Biogradu na moru i Zadru. Diplomirao na Medicinskom fakuletetu Univerziteta u Banja Luci 1990. godine.
U lipnju 1999. godine po završetku poslijediplomskog studija iz Onkologije, pred Povjerenstvom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu obranio magistarski rad pod nazivom "*Serumska aktivnost enzima konvetora angiotenzina u bolesnika s primarnim karcinom jetre"* i stekao naslov magistra znanosti iz područja medicine.

Specijalistički ispit iz Interne medicine položio 2000.godine kao djelatnik Interne Klinike KB Dubrava.

Autor i koautor više znanstvenih i stručnih radova te sudionik na više znanstvenih projekata.