Određivanje serumske koncentracije L-selektina u osoba oboljelih od fibromialgije

Raščanec, Vanja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:242309

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Vanja Raščanec

ODREĐIVANJE SERUMSKE KONCENTRACIJE L-SELEKTINA U OSOBA OBOLJELIH OD FIBROMIALGIJE

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016 .

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na ukazanom povjerenju te svim savjetima i pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada kao i samog pisanja ovoga diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju koji su mi pomogli oko izvođenja eksperimentalnog dijela rada.
Zahvaljujem dr. sc. Mariu D. Corderu (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Deparment) na ustupanju uzoraka koji su korišteni u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada.

KRATICE

5-HTR	serotoninski receptor
ABC	kompleks avidin-biotin-peroksidaza
ACR	Odbor Američkog fakulteta za reumatologiju
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove, engl. Food and Drug Administration
HPA	hipotalamično-hipofizna-adrenalna os
HEV	post-kapilarne venule
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula 1, engl. intercellular adhesion molecule-1
IL-1	interleukin-1
MAPK	proteinske kinaze aktivirane mitogenima, engl. mitogen activated protein kinases
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih T limfocita, engl. nuclear factor of activated T lymphocytes
NMDA	receptor za N-metil-D-aspartat
NO	dušikov oksid
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SCR	kratki ponavljajući dijelovi
TNF	nekrotizirajući tumorski faktor, engl. tumor necrosis factor
VCAM-1	vaskularna adhezijska molekula, engl. vascular cell adhesion molecule-1
WPI	indeks boli

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. FIBROMIALGIJA 1
1.1.1. Općenito o fibromialgiji 1
1.1.2. Patofiziologija fibromialgije 2
1.1.3. Simptomi fibromialgije 2
1.1.4. Dijagnoza fibromialgije 4
1.1.5. Liječenje fibromialgije 5
1.2. L-SELEKTIN 6
1.2.1. Općenito o L-selektinu 6
1.2.2. Struktura L-selektina 6
1.2.3. Ligandi L-selektina 7
1.2.4. Biosinteza L-selektina 7
1.2.5. Funkcija L-selektina 8
2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. ISPITANICI 11
3.2. PRIBOR, KEMIKALIJE I APARATI 11
3.3. ODREĐIVANJE SERUMSKE KONCENTRACIJE L-SELEKTINA 12
3.3.1. Načelo metode 12
3.3.2. Postupak 12
3.3.3. Statistička analiza 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
4.1. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE L-SELEKTINA U SERUMU ISPITANIKA 15
4.2. RASPRAVA 17
5. ZAKLJUČAK 18
6. POPIS LITERATURE 19
7. SAŽETAK 21
8. SUMMARY 22
9. DODATAK 23

1. UVOD

1.1. FIBROMIALGIJA

1.1.1. Općenito o fibromialgiji

Fibromialgija odnosno fibromialgijski sindrom kronični je poremećaj kojeg prije svega karakterizira bol u koštano-mišićnom sustavu te češći simptomi poput umora i poremećaj spavanja. Patofiziologija fibromialgije nije u potpunosti razjašnjena, ali etiološki gledano ubraja se u reumatske poremećaje. Također, veća je prevalencija fibromialgije kao popratnog sindroma kod bolesti poput dijabetes mellitusa, psihičkih i neuroloških poremećaja te infekcija (Bellato i sur., 2012).

Fibromialgija se u prošlosti smatrala neurološkim poremećajem, a simptome bolesti prvi je puta opisao početkom 19. stoljeća Dr. Williama Balfoura. Krajem 19. stoljeća bolest se nazivala fibrozitisom jer se smatralo da je u pozadini bolesti upalni proces, a uloga živčanoga sustava bila je nepoznata u samoj patofiziologiji bolesti. 1976. godine Smythe i Moldofsky formuliraju novi naziv, fibromialgija.. Tada se počinje uviđati i uloga živčanoga sustava u nastanku bolesti te su u dijagnostiku bolesti uključene i takozvane „osjetljive točke“, odnosno mjesta na tijelu iznimne osjetljivosti na dodir. Fibromialgija je izvedenica koja dolazi od latinske riječi „*fibra*“ koja označuje vezivno tkivo i grčkih riječi „*myos*“ koja se odnosi na mišiće i „*algos*“ koja se odnosi na bol (Vincent i sur., 2013.).

Točni dijagnostički kriteriji određeni su tek 1990.godine, a postavio ih je Odbor Američkog fakulteta za reumatologiju (ACR). Ti su kriteriji najprije korišteni u znanstvene, a zatim su prihvaćeni i od strane kliničara za postavljanje dijagnoze fibromialgije. 2007. godine Američka agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) odobrila je prvi lijek za uporabu u liječenju fibromialgije (Bellato i sur., 2012).

Danas se procjenjuje da od fibromialgije boluje 2-4 % svjetske populacije, iako se smatra da je prevalencija i veća zbog ne postavljene dijagnoze ili nepravilno postavljenje dijagnoze bolesti. Smatra se da 3 od 4 slučaja ostaju nedijagnosticirani, pri čemu prosječno vrijeme za postavljanje dijagnoze je oko 5 godina. Češće obolijevaju žene, u čak 75-80 % slučajeva fibromialgije. Fibromialgija je kao reumatska bolest prema prevalenciji smještena odmah iza osteoartiritsa. Simptomi bolesti javljaju se najčešće u zreloj odrasloj dobi (između 30. i 50.-te godine života) iako se nespecifični simptomi, poput boli i umora, mogu javiti i u ranom djetinjstvu ili u ranim tinejdžerskim godinama. Pojavnost simptoma danas uvelike ovisi o načinu života pojedinaca, prevalencija je veća u ljudi koji su češće izloženi stresnim situacijama te sjedilačkom načinu života. Danas je također pokazano da je češća prevalencija u ljudi koji u obiteljskoj anamnezi imaju zabilježene slučajeve fibromialgije što implicira utjecaj genskih čimbenika na razvoj fibromialgijskoga sindroma u pojedinaca (Vincent i sur., 2013.).

1.1.2. Patofiziologija fibromialgije

Prema novijim saznanjima fibromialgiju klasificiramo na primarni oblik, pri kojem su izraženiji neurološki simptomi i genska podloga, i sekundarni oblik koji uvelike dijeli sličnost s ostalim reumatskim bolestima poput osteoartitrisa. Etiologija fibromialgije nije u potpunosti razjašnjena. Jednu skupinu etioloških čimbenika čine učinci djelovanja raznih infektivnih agenasa, poput virusa hepatitisa C, virusa HIV-a te virusa hepatitisa B (Queiroz, 2013.)

Zbog veće prevalencije kod ljudi kod kojih je prisutna pozitivna obiteljska anamneza na fibromialgiju uvelike se razmatra genska osnova kao čimbenik u nastanku bolesti. Do danas su otkrivena tri gena koji se povezuje s većim rizikom nastanka i razvoja fibromialgije. Povećena ekspresija tih gena utvrđena je u 35 % dijagnosticiranih slučajeva fibromialgije. To su geni koji određuju osjetljivost pojedinca na bolne podražaje, kvalitetu mehanizma koji sudjeluju u blokadi bolnih podržaja preko senzornih neurona te sudjeluju u kompleksnom sustavu osjeta boli. Jednim od mogućih uzroka fibromialgije smatra se polimorfizam u genu koji kodira za serotoninski receptor (5-HTR) (Vincent i sur., 2013.).

Povećana osjetljivost na bol može biti posljedica povećane aktivnosti središnjega živčanog sustava u percepciji boli ili posljedica smanjene aktivnosti sustava koji sudjeluje u inhibiciji bolnoga podražaja. Uloga središnjeg živčanoga sustava u patofiziologiji fibromialgije uključuje prije svega centralnu senzitizaciju koja se smatra glavnim mehanizmom u nastanku boli. Dolazi do spontane stimulacije živčanoga sustava pri čemu je svaki sljedeći bolni podražaj jači, odnosno izraženiji. Ova je pojava posljedica neuroplastičnosti, a u taj su proces uključeni prije svega receptori za N-metil-D-aspartat (NMDA) smješteni na postsinaptičkoj membrani u dorzalnom rogu kralježnične moždine. Važnu ulogu u patogenezi centralne senzitizacije kod pacijenata s fibromialgijom imaju i glija stanice. Glija stanice su aktivirane bolnim podražajima pri čemu dolazi do otpuštanja proupalnih citokina i drugih medijatora upale poput dušikovog oksida(NO), reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i prostanglandina, abolni se podražaj produžuje i još dodatno stimulira (Bradley, 2009).

Kod pacijenata s fibromialgijom često je prisutna anksioznost što bi upućivalo na poremećaje u dopaminergičnom sustavu. Dokazana je i smanjena razina serotonina i noradrenalina kod tih bolesnika, a to su upravo glavni neurotransmiteri uključeni u inhibitorne putove boli. Serotonin je također uključen i u regulaciju raspoloženja i spavanja čime se može objasniti povezanost fibromialgije i nesanice te psihičkih poremećaja (Arnold i sur., 2012.).

Psihički poremećaji uključuju i veću prevalenciju depresije kod pacijenata s fibromialgijom. Ta činjenica sugerira ulogu hipotalamično-hipofizno-adrenalne (HPA) osi u patofiziologiji fibromialgije. Hormoni koji se posebice ističu jesu kortizol, čije vrijednosti dokazano rastu navečer, i adrenokortikotropni hormon (ACTH), kojem dokazano rastu kako bazalne vrijednosti tako i vrijednosti uzrokovane stresom. Smatra se da je glavni razlog u hiposekreciji kortikotropin-oslobađajućega hormona uzorkovana nepravilnostima u serotoninskom sustavu koji ima bitnu ulogu u HPA-osi. Kod pacijenata s fibromialgijom dokazane su i nepravilnosti u lučenju hormona rasta, odnosno sniženo je lučenje hormona rasta za vrijeme spavanja kad se luči većina dnevne koncentracije ovoga hormona. Vjerojatni

uzroci su ili povišene razine somatostatina, inhibitora lučenja hormona rasta, ili nepravilnosti u lučenju hormona rasta tijekom četvrte faze spavanja (Neeck, 2000).

Kod pacijenata je primijećeno da slabije reagiraju na terapiju egzogenim opijatima, što se dovodi u svezu s hiperaktivnošću samih endogenih opijata, koji su, s druge strane, u nemogućnosti modulirati osjet boli (Harris i sur., 2007).

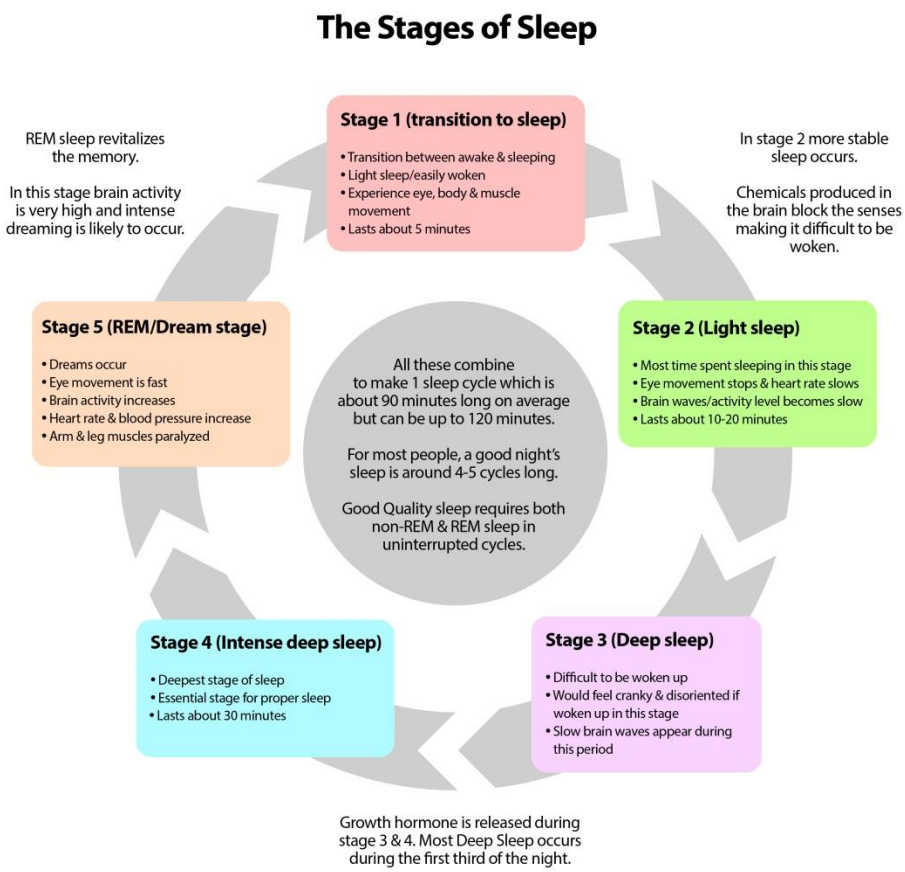
1.1.3. Simptomi fibromialgije

Primarni simptom fibromialgije jest kronična bol koja se širi po cijelom tijelu. Kod većine bolesnika uz kroničnu bol javlja se i umor, koji može biti srednje jaki do jaki, poremećaji spavanja, osjetljivost na dodir, svjetlo i zvuk te kognitivni deficit. Često se simptomi drugih bolesti i sindroma, poput iritabilnog kolona, artritisa i lupusa, preklapaju sa simptomima fibromialgije. To je jedan od razloga otežanog postavljanja dijagnoze kod fibromialgije. Bol, kao primarni simptom fibromialgije, je izrazita, kronična i može se proširiti po cijelom tijelu. Jačina boli ovisi od pacijenta do pacijenta. Bol se najčešće opisuje kao probadajuća bol. Uz bol često se veže i utrnuće mišića te osjećaj žarenja. Jači intenzitet boli mišića i kostiju te utrnuće mišića češće su izraženi ujutro. Umor, kao još jedan od izraženijih simptoma kod osoba oboljelih od fibromialgije, obuhvaća iscrpljenost cijelog tijela koja često onemogućuje normalno psihičko, socijalno i fizičko funkcioniranje (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Pojava i intenzitet boli kod bolesnica dodatno je pod utjecajem hormona koji reguliraju menstruacijski ciklus. S tim u svezi uočeno je da je kod mnogih pacijentica percepcija boli veća ako je koncentracija estrogena veća, odnosno ako nalaze se u folikularnoj fazi ciklusa, dok se kod nižih koncentracija estrogena smanjuje i intenzitet boli (Wolfe i sur., 2010.).

Drugi simptomi obuhvaćaju iritabilni mjehur ili iritabilna crijeva, sindrom nemirnih nogu, kognitivni deficit, osjetljivost kože i osip, anksioznost, depresiju, suha usta, probleme s vidom, vrtoglavicu i migrene koje se puno češće javljaju kod žena. (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Mnogi pacijenti imaju prisutne i poremećaje spavanja, odnosno nemogućnost postizanja dubokog sna, što zapravo još dodatno utječe na iscrpljenost organizma. Danas mnoga istraživanja ukazuju na to da je prisutan poremećaj u fazi 4. dubokoga sna kod pacijenata s fibromialgijom (Slika 1.). Prema tim istraživanjima mozak je u stanju koje više nalikuje budnom nego stadiju dubokoga sna (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

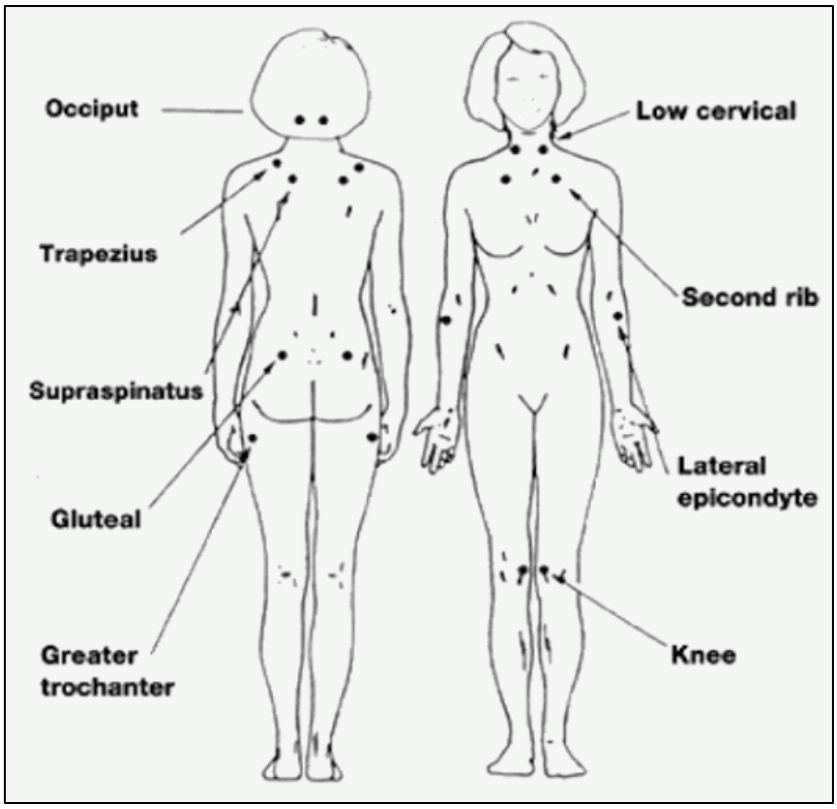


Slika 1. Faze spavanja, preuzeto iz Carskadon i Dement, 2005.

1.1.4. Dijagnoza fibromialgije

Dijagnostika same fibromialgije izrazito je teška upravo iz razloga da ne postoje točni biokemijski i klinički pokazatelji za tu bolest. Dijagnostika fibromialgije više se temelji na isključivanju bolesti sa sličnim simptomima ili pak bolesti sličnoga podrijetla. Kod pacijenata kod kojih postoji sumnja na fibromialgiju, prvo se isključuju bolesti poput reumatoidnog artritisa, multiplog mijeloma, adrenalne disfunkcije, raznih psihičkih poremećaja i hipotireoidizma (Wolfe i sur.,2011.).

Početkom 90.-tih godina napredovala je dijagnostika fibromialgije na način da su ustanovljene smjernice za dijagnostiku kad se na temelju kliničke slike i anamneze posumnja na fibromialgiju. Kriteriji za dijagnostiku fibromialgije koje je ustanovio ACR 1990. uključuju sljedeće: 1. prisutnost kronične boli koja se širi po cijelom tijelu od najmanje 3 mjeseca i 2. prisutnost boli na određeni pritisak u najmanje 11 od 18 definiranih „osjetljivih točaka“ na tijelu (prikazane na Slici 2). Bolni podražaj koji može zahvatiti cijelo tijelo dijeli se na aksijalnu, bol lijeve ili desne strane ili pak bol gornjeg ili donjeg dijela tijela (Wolfe i sur.,2011.).



Slika 2. Osjetljive točke za dijagnozu fibromialgije prema ACR-ovim kriterijima, preuzeto iz Wolfe i sur., 1990.

Kriteriji za dijagnozu fibromialgije modificirani su 2010. godine na način da se kod dijagnostike u obzir uzima i intenzitet ostalih simptoma, poput umora, psihičkih poremećaja i poremećaja spavanja. Uz osjetljive točke na tijelu, koje su činile glavni temelj dijagnostike, uveden je i indeks boli (WPI). WPI jest bolesnikov subjektivan doživljaj boli i njegova procjena ostalih simptoma. Uvedeni su i upitnici koji usmjeravaju pacijenta na određena područja i simptome. Ovim novim kriterijima dijagnostika bolesti znantno je unaprijeđena i olakšana(Wolfe i sur.,2011.).

1.1.5. Liječenje fibromialgije

Fibromialgija je danas neizlječiva kronična bolest čije se liječenje svodi na liječenje samih simptoma, to jest prije svega smanjenje intenziteta boli te prilagodbe životnoga stila. FDA je odobrila tri lijeka za liječenje fibromialgije odnosno za kontrolu boli. To su Pregabalin (Lyrica®), Duloxentin (Cymbalta®) i Milnacipran(Savella®). Ostala se farmakološka terapija zasniva na smanjenju inteziteta boli i uključuje opioidne analgetike (npr. Tramadol), benzodiazepine te niže doze antidepresiva koji pomažu i u kontroli nesanice. Moguća je i lokalna primjena injekcija Lidokaina u osjetljive točke na tijelu sa ciljemsmanjenja boli. Također, za smanjenje osjećaja boli i ukočenosti preporučuje se redovita tjelovježba koja pridonosi poboljšanju života kod pacijenta s fibromialgijom. Poremećaji spavanja dovode se u kontrolu uvođenjem navika spavanja : odlazak na spavanje i ustajanje u otprilike isto vrijeme, stvaranje mirnoga okruženja, izbjegavanje kofeina i alkohola prije odlaska na spavanja te

lagana tjelovježba tokom dana. Kod težih oblika poremećaja spavanja mogu se koristiti lijekovi za liječenje poremećaja spavanja. Zbog prisutnosti kronične boli kod mnogih pacijenata može se javiti depresija pa je često potrebna i psihološka pomoć i potpora. Dodatna terapija zapravo uključuje tretmane za olakšavanje samih simptoma, poput fizikalne terapije i masaže tijela (Bellato i sur.,2012.).

1.2. L-SELEKTIN

1.2.1. Općenito o L-selektinu

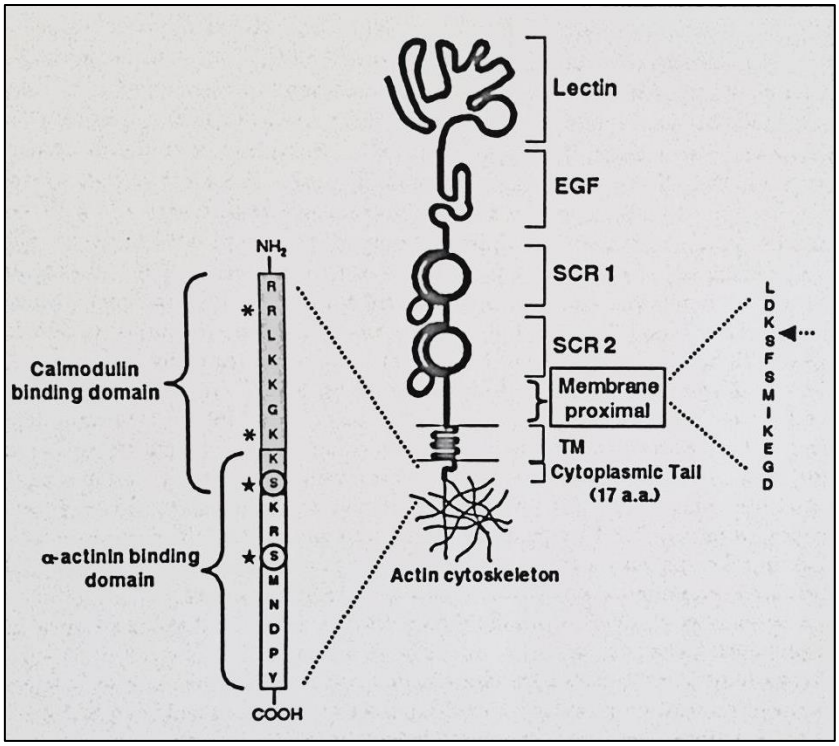
L-selektin je eksprimiran na površini većine leukocita i ima važnu ulogu u brzom i učinkovitom imunosnom odgovoru na način da posreduje interakciju između cirkulirajućih leukocita i vaskularnog endotela. Njegova je najvažnija funkcija da djeluje kao posrednik u prijanjanju leukocita na vaskularni endotel na mjestu upale i vezanju limfocita na specijalizirane post-kapilarne venule (HEV) smještene unutar sekundarnih limfoidnih tkiva. Inicijalna adhezija odvija se preko specifične interakcije L-selektina s odgovarajućim ligandima. Adhezija leukocita jest kompleksan proces pri čemu L-selektin djeluje sinergistički s drugim adhezijskim molekulama prilikom upalnoga procesa da bi se pojačao upalni odgovor i osigurao dolazak leukocita na mjesto upale. L-selektin može djelovati aktivacijski na leukocite vezanjem na određene ligande, ali djeluje i kao signalna molekula odnosno aktivira druge adhezijske molekule, poput integrina i kemokinskih receptora. L-selektin, zbog ranije navedenih razloga, ima izrazito važnu ulogu u migraciji leukocita iz vaskularnog lumena na mjesto upale u tkivima (Douglas i sur., 2007.).

1.2.2. Struktura L-selektina

L-selektin (CD62L) pripada obitelji strukturno sličnih adhezijskih molekula selektina koju čine još i E-selektin i P-selektin (CD62E i CD62P). Selektini imaju specifičan izvanstanični segment koji na N-kraju ima lektinsku domenu ovisnu o kalciju, domenu sličnu epidermalnom faktoru rasta te kratke ponavljajuće dijelove (SCR) homologne domenama u komplementarnim regulatornim proteinima. Selektini dijele, u aminokiselinskom slijedu, oko 65 % homologije lektinskih domena ovisnih o kalciju i domeni sličnoj epidermalnom faktoru rasta, dok u SCR domenama dijele oko 40 % homologije. Humani L-selektin sadrži u svojoj strukturi dvije SCR domene, dok humani E-selektin i P-selektin sadrže od 6 do 9 SCR domena. Citoplazmatske domene, za razliku od izvanstaničnih, imaju unutar obitelji selektina manji postotak homologije. Citoplazmatski slijed L-selektina sadrži područje od 17 aminokiselina koje je očuvano u svim vrstama. Upravo taj slijed, iako kratak, neophodan je u funkciji L-selektina. Pokazano je da on ima ulogu u mnogim procesima poput migracije leukocita, vezanja na specifične ligande i prijenosa signala. Iako su strukturno slični, selektini su različito eksprimirani na pojedinim stanicama i tkivima. L-selektin je konstitutivno eksprimiran na svim klasama leukocita. E-selektin je eksprimiran u vaskularnom endotelu i trombocitima te je njegova aktivacija uvelike ovisna o citokinima. P-selektin je pohranjen u granulama u stanicama vaskularnoga endotela i otpušta se na površinu stanicu u ovisnosti o

medijatorima upale poput TNF (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1) i histamina (Douglas i sur., 2007.).

L-selektin ima dvije izoforme koje su posljedica različite glikozilacije osnovne proteinske forme. Razlikuju se u molekulskoj masi, pri čemu humani limfociti eksprimiraju L-selektin molekulske mase 74 kDa, dok neutrofili eksprimiraju L-selektin molekulske mase 90-110 kDa. U strukturi L-selektina jedinstven je slijed na membranskoj proksimalnoj regiji kojeg prepoznaju endogene membranske proteaze i kidaju u funkcionalne molekule (Douglas i sur., 2007.).



Slika 3. Struktura L-selektina, preuzeto iz Douglas i sur., 2007.

1.2.3. Ligandi L-selektina

Sposobnost selektina da vežu ligande primarno se odvija preko lektinske domene, iakor u vezanju mogu sudjelovati i EGF i SCR domene koje prije svega potpomažu vezanju liganda preko lektinske domene. Lektinska domena jest primarno mjesto vezanja liganda pa je nužno da ligandi koji se vežu imaju ugljikohidratne epitope potrebne za specifična prepoznavanja, odnosno visok je stupanj homologije između lektinskih domena selektina i njihovih liganada. Za primjer, svi selektini prepoznaju i vežu tetrasaharid sijalinizirani Lewis x (sLex), iako je to vezanje slaboga inteziteta. L-selektin specifično prepoznaje funkcionalni ligand 6-sulfo-sLex. *In vivo*, ligandi koje prepoznaje i veže L-selektin nalaze se na mnogim tkivima uključujući HEV, limfne čvorove, leukocite, mijelin i tumorske stanice. Do danas je otkriveno 9 molekula koje su pogodni ligandi za vezanje s L-selektinom, a to su: GlyCAM-1, CD34, podokaliksin, nepmucin, Sgp200, endomucin, endoglikan, MAdCAM-1 i P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) (Rosen, 2004.).

1.2.4. Biosinteza L-selektina

Molekule L-selektina eksprimirane su na mnogim tkivima, ali nisu fiziološki aktivne. Da bi nastale fiziološki aktivne molekule potrebna je pravilna posttranslacijska modifikacija specifičnim enzimima. Molekule sadrže čvrste, produžene, mucinu slične domene bogate serinom i treoninom. Oligosaharidni ostaci kategoriziraju se kao „core 1“, „core 2“ ili dvostruki oligosaharidni ogranci.“ Core 1“ ostaci su puno kraći od „core 2“,ali oba u svojoj strukturi imaju 6-sulfo-sLex ligand. sLex ligand je tetrasaharid sastavljen od galaktoze, N-acetilglukozamina, fukoze i sijalinske kiseline. Kao takav, da bi bio pogodan ligand za vezanje, mora biti posttranslacijski modificiran odnosno glikoliziran, fukoliziran i sijaliziran. Enzimi koji sudujeluju u posttranslacijskim modifikacijama L-selektina razne su glikozil-transferaze (poput α-1,3-fukoziltransferaze VII (Fuc-T VII), Fuc-T IV, α-2,3-sijalin-transferaza IV (ST3Gal-IV), STGal-VI i ST3Gal-III), sulfo-tranferaze (GlcNAc6ST-1 i GlcNAc6ST-2). Rezultat tih modifikacija jesu funkcionalne molekule L-selektina koje nastaju na način da se na proteinsku jezgru vežu O-vezani oligosaharidi koji su fukolizirani, sijalizirani i sulfolizirani (Sperandio, 2006.).

1.2.5. Funkcija L-selektina

Primarno, fiziološki aktivne molekule L-selektina nalaze se na HEV-u i sekundarnim limfnim tkivima. Dokazano je da ekspresija L-selektina na HEV-u prije svega ovisi o faktorima koji se nalaze u aferentnoj limfi, ali nije točno pokazano o kojim molekulama riječ. Na ekspresiju L-selektina utječe i prisutnost antigena u limfnim čvorovima, odnosno potiče aktivnost enzima koji sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama samih molekula L-selektina. Prisutnost antigena potiče akutni imunosni odgovor organizma čime započinje intenzivna sinteza proupalnih citokina (npr. TNF-α) koji još dodatno potiču stvaranje fizioloških aktivnih molekula L-selektina. Ligandi, prije svega MAdCAM-1, koje veže L-selektin mogu se naći i u kroničnim upalnim procesima tkiva, odnosno kroničnim upalnim bolestima kao Gravesova bolest, Hashimotov tireoidizam, reumatoidni artritis i astma (Douglas i sur., 2007.).

Uz endotel, L-selektin je eksprimiran na leukocitima gdje je glavni ligand kojeg veže PSGL-1, koji je zapravo primarni ligand za P-selektin i dodatno posttranslacijski modificiran na način da su dodane još tri sulfo-skupine na položaju Tyr46, Tyr48 i Tyr 51. L-selektin veže većim afinitetom upravo PSGL-1 nego GlyCAM-1. Prisutnost liganda koje veže L-selektin na leukocitima omogućuje adheziju ovisnu o L-selektinu između samih leukocita, što dodatno pojačava sam akutni upalni odgovor odnosno dolazak samih leukocita na primarno mjesto upale (Eriksson i sur., 2001.).

Interakcija leukocita s vaskularnim endotelom odvija se u tri bitna koraka u kojima je dokazana važnost L-selektina. Započinje samom adhezijom između pojedinih leukocita i njihovo usporavanje u cirkulaciji blizu mjesta upale te u konačnici adhezijom na endotel i dolaskom na mjesto upale. L-selektin veže leukocite i veze koje nastaju neprestano se stvaraju i raskidaju. Uz selektine, bitnu ulogu u adheziji leukocita imaju integrini, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1).

Adhezijske molekule djeluju sinergistički u upalnom odgovoru i adheziji samih leukocita na mjestu upale. Dokazano je da L-selektin djeluje u inicijalnoj adheziji između samih leukocita i pospješuje akutni upalni odgovor, dok E-selektin glavnu ulogu ima u usporavanju leukocita u cirkulaciji dolaskom na mjesto upalnoga procesa (Eriksson i sur., 2001.).

Vezanjem liganda i L-selektina dolazi do povećanja unutarstanične koncentracije kalcija, stvaranje superoksida, daljnje fosforilacije proteina i polimerizacije F-aktina što znači da je L-selektin bitna signalna molekula i sudjeluje u staničnoj signalizaciji i pokretanju vezanih staničnih procesa. Također, dolazi do aktivacije raznih kinaza poput MAP-kinaza (mitogen activated protein kinases), N-Jun-kinaze, Ras-a te do aktivacije NFAT-a (nuclear factor of activated T lymphocytes) (Eriksson i sur., 2001.).

L-selektin je molekula koja sudjeluje u mnogim staničnim procesima i vezanjem na pojedine ligande dolazi do raznih staničnih zbivanja koja se moraju u potpunosti istražiti da bi se uloga L-selektina u organizmu u potpunosti razjasnila. Potrebno je dodatno istražiti samu regulaciju L-selektina i njegove mnogobrojne uloge u organizmu. L-selektin je danas molekula od terapeutskoga interesa jer je pokazano da ima ulogu u danas sve češćim bolestima poput reumatoidnog artritisa, astme, lupusa, psorijaze, multiple skleroze i drugim raznim upalnim bolestima uključujući i fibromialgiju. Daljnjim istraživanjem funkcije i regulacije L-selektina očekuje se napredak u kako u razvoju novih terapijskih tako i u dijagnostici bolesti (Douglas i sur.,2007.).

2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Fibromialgija je bolest čiji je glavni dijagnostički kriterij zapravo isključivanje svih ostalih bolesti sličnoga ili istoga podrijetla uz dokazanu prisutnost „osjetljivih točka na tijelu“. Posljednjih nekoliko godina teži se otkrivanju potencijalnog specifičnog analita čija bi koncentracija bila snižena ili povećana u serumu ili drugim tjelesnim tekućinama (npr. sinovijalna tekućina) u oboljelih od fibromialgije, odnosno koji bi mogao biti uvršten kao jedan od dijagnostičkih kriterija bolesti ili bi pak njegova koncentracija korelirala s progresijom fibromialgije i imala utjecaj na odabir terapije. Svrha ovog diplomskog rada jest utvrđivanje razlike u serumskim koncentracijama L-selektina (kod osoba oboljelih od fibromialgije, odnosno kod zdravih dobrovoljaca) kao jednog od potencijalnih analita značajnoga za laboratorijsku dijagnostiku fibromialgije.

S tim u svezi postavljeni specifični ciljevi su :

1. odrediti koncentraciju L-selektina u serumu osoba oboljelih od fibromialgije
2. odrediti koncentraciju L-selektina u kontrolnom uzorku (serum zdravih dobrovoljaca).

Rezultati opisanoga istraživanja trebali bi pokazati postoji li dijagnostički značajna razlika u koncentraciji L-selektina u osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih osoba. Očekuje se da će rezultati biti poticajni za dizajniranje novih istraživanja koja bi uključila veći broj ispitanika i bila fokusirane na procjenu dijagnostičkoga i terapijskoga značenja L-selektina s obzirom da za fibromialgiju nisu ustvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji, a nužno je i propitivanje novih terapijskih mogućnosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

U svrhu određivanja koncentracija L-selektina u osoba oboljelih od fibromialgije korišteni su serumi dvije skupine ispitanika, odnosno serumi osoba oboljelih od fibromialgije te serumi zdravih pojedinaca. Serumi osoba oboljelih od fibromialgije činili su osobe obaju spolova, odnosno 4 muške osobe i 30 ženskih osoba, dok su skupinu zdravih dobrovoljaca činile samo ženske osobe. Serumi su prikupljeni i stavljeni na raspolaganje u svrhu ovog istraživanja od strane dr. sc. Maria D. Cordera (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Deparment).

	Skupina oboljelih od fibromialgije	Zdravi dobrovoljci
Broj ispitanika	34	31
Dob(godine)	41,63 ± 11,13	50,08 ± 6,92
Broj osjetljivih točaka	15,00 ± 2,96	-
Godine trajanja bolesti	13,52 ± 9,20	-

Kod svih pacijenata (34) fibromialgija je dijagnosticirana na temelju dijagnostičkog kriterija ACR-a iz 1990. godine. Podaci od pojedinačnih pacijenata prikazani su u Tablici 1., a pojedinačni podaci o zdravim pojedincima u Tablici 2.

3.2. PRIBOR, KEMIKALIJE I APARATI

Sva mjerenja izvršena su na spektrofotometru VICTOR3Wallac 1420 multilabel counter, proizvođača PerkinElmer, Inc. (USA). Od ostalog laboratorijskog pribora korištene su pipete sljedećih volumena: 1-10 μL, 10-100 μL, 100-1000 μL i za njih odgovarajući nastavci, epruvete od 1,5 mL i boce od 1 L te termomješalica Thermomixer comfort. Sav navedeni pribor nabavljen je od proizvođača Eppendorf (Njemačka).

Za mjerenje koncentracije L-selektina u uzorcima seruma korišten je komercijalno dostupan test Human L-selectin ELISA kit tvrtke Abbexa (Abbexa Ltd., Innovation Centre, Cambrige Science Park, Cambridge) catalog No. abx050137.

Kit je sadržavao :

1. ELISA pločicu s 96 jažica obloženih protutijelom na humani L-selektin
2. dva liofilizirana standarda humanoga L-selektina (koncentracije 10 ng/bočica),
3. pufer za razrjeđivanje uzoraka i standarda (volumen 3o mL),

4. otopina protutijela konjugiranog biotinom na anti-humani L-selektin (volumen 130 µL), razrjeđenje 1:100
5. pufer za razrjeđivanje protutijela (volumen 12 mL),
6. ABC otopina (avidin- biotin- peroksidaza kompleks , volumen 130 µL), razrjeđenje 1:100
7. pufer za razrjeđivanje ABC otopine (volumen 12 mL)
8. TMB supstrat (volumen 10 mL)
9. stop otopina (volumen 10 mL)
10. pufer za ispiranje/pranje (25X, volumen 30mL)

3.3. ODREĐIVANJE SERUMSKE KONCENTRACIJE L-SELEKTINA

3.3.1. Načelo metode

Test se temelji na principu ELISA-e (Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay) sendvič testa. ELISA pločica s 96 jažica prethodno je obložena poliklonskim protutijelima na L-selektin (anti L-selekin protutijela). Anti- L-selektin protutijela konjugirana s biotinom korištena su kao detekcijska protutijela. Na mikrotitarsku pločicu u jažice nanose se standardi, uzorci i detekcijska protutijela. Pločica se ispire puferom za ispiranje. Nakon toga dodaje se kompleks avidin-biotin-peroksidaza, a nevezani konjugati ispiru se puferom za ispiranje. Za vizualizaciju nastalih kompleks dodaje se TMB supstrat. Peroksidaza katalizira pretvorbu TMB-a u kompleks plave boje. Dodatkom stop otopine ovaj kompleks mijenja plavu boju u žutu. Intezitet nastaloga žutog obojenja proporcionalan je koncentraciji L-selektina koji se vezao na anti-L-selektin-protutijela. Apsorbancija se mjeri na 450 nm i na temelju izmjerene apsorbancije izračunava se koncentracija L-selektina.

3.3.2. Postupak

3.3.2.1. Priprema uzorka, pufera i radih otopina

a) Dilucija uzorka

Uzorci za analizu serumi su oboljelih osoba od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca čiji su alikvoti pohranjeni na -20 ºC. Korišteni uzorci za analizu razrijeđeni su puferom za razrjeđivanje uzoraka u omjeru 1 : 1000. Razrijeđeni uzorci dobiveni su na način da je alikvotu uzorka od 1 µL dodano 49 µL pufera za razrjeđivanje uzorka pri čemu je uzorak razrijeđen u omjeru 1:50. Dalje je uzet alikvot od 12µL 50X-razrijeđenog uzorka i dodano 228 µL pufera za razrjeđivanje uzoraka pri čemu je postignuto željeno razrjeđenje 1:1000.

b) Pufer za ispiranje

Pufer za ispiranje priređuje se na način da se koncentrirani pufer za ispiranje razrijedi 25 puta destiliranom vodom, odnosno dodaje se 30 mL koncentriranog pufera za ispiranje u 720 mL destilirane vode.

c) Standardi

Kit je sadržavao dvije bočice standarda u liofiliziranom obliku. Otopina standarda priprema se unutar dva sata prije samoga eksperimenta. Iz standardne otopine 10000 pg/mL, pripremaju se sljedeća razrjeđenja : 4000 pg/mL, 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL i 62.5 pg/mL. Standard koncentracije 10000 pg/mL razrjeđuje se dodatkom 1mL pufera za razrjeđivanje standarda, ostavi na sobnoj temperaturi 10 min i temeljito promiješa. Otopina standarda koncentracije 4000 pg/mL priređuje se na način da se pomiješa 0,4mL otopine standarda koncentracije 10000 pg/mL i 0,6 mL pufera za razrjeđivanje uzorka i promiješa. Otopine standarda koncentracija od 2000 pg/mL do 62,5 pg/mL priređuje se tako da se pomiješaju jednaki volumeni prethodnoga razrjeđenja standarda i pufera za razrjeđivanje uzorka (po 0,3 mL; početno razrjeđenje je 4000 pg/mL).

d) Radna otopina protutijela na L-selektin (anti-humani L-selektin) konjugirana s biotinom

Otopina se mora prirediti unutar 2h od početka eksperimenta. Potrebni volumen otopine izračunava se na temelju broja jažica na pločici pri čemu je za svaku jažicu potrebno 0,1 mL radne otopine. Otopina protutijela na L-selektin (anti-humani L-selektin) koja su konjugirana s biotinom razrjeđuje se 100 puta puferom za razrjeđivanje protutijela.

e) Radna otopina avidin-biotin-peroksidaza-kompleksa (ABC radna otopina)

Otopina se mora prirediti unutar 1h prije početka eksperimenta. Potrebni volumen otopine izračunava se na temelju broja jažica na pločici pri čemu je za svaku jažicu potrebno 0,1 mL radne otopine. Otopina avidin-biotin-peroksidaza-kompleksa razrjeđuje se 100 puta ABC puferom za razrjeđivanje i temeljito promiješa.

3.3.2.2. Postupak testa

U jažice mikrotitarske pločice dodaje se 100 µL otopina standarda. U kontrolnu jažicu (slijepa proba) dodaje se 100µL pufera za razrjeđivanje standarda. U ostale jažice dodaje se 100 µL pravilno razrijeđenih uzoraka. Pločica se pokrije i inkubira 90 minuta na 37 ºC. Nakon toga sadržaj se izlije na filter papir. Na dno svake jažice dodaje se 100µL otopine protutijela (anti-humani L-selektin) konjugiranih s biotinom bez dodira s rubovima stjenke. Stavi se zaštitni pokrov i inkubira na 37 ºC tijekom 60 minuta. Nakon inkubacije pločica se ispire 3 puta na način da se prvo izlije sadržaj jažica na filter papir, a zatim svaku jažicu napuni s puferom za ispiranje i ostavi 1-2 minute. Ovaj se postupak ponavlja 3 puta. Nakon ispiranja u svaku jažicu dodaje se ABC radna otopina u volumenu od 100 µL. Stavi se zaštitni pokrov i inkubira na 37 º C tijekom 30 minuta. Potom se pločica ispire 5 puta puferom za ispiranje. Nakon ispiranja, u svaku se jažicu dodaje 90 µL TMB-a te pokrivena pločica inkubira na

37ºC u tami oko 30 minuta. Tijekom ove inkubacije razvija se plava boja. Poslije dodatka 100 µl STOP otopine dolazi do nastanka žutoga obojenja čiji se intenzitet odnosno apsorbancija očitava spektrofotometrijski.

3.3.3. Statistička analiza

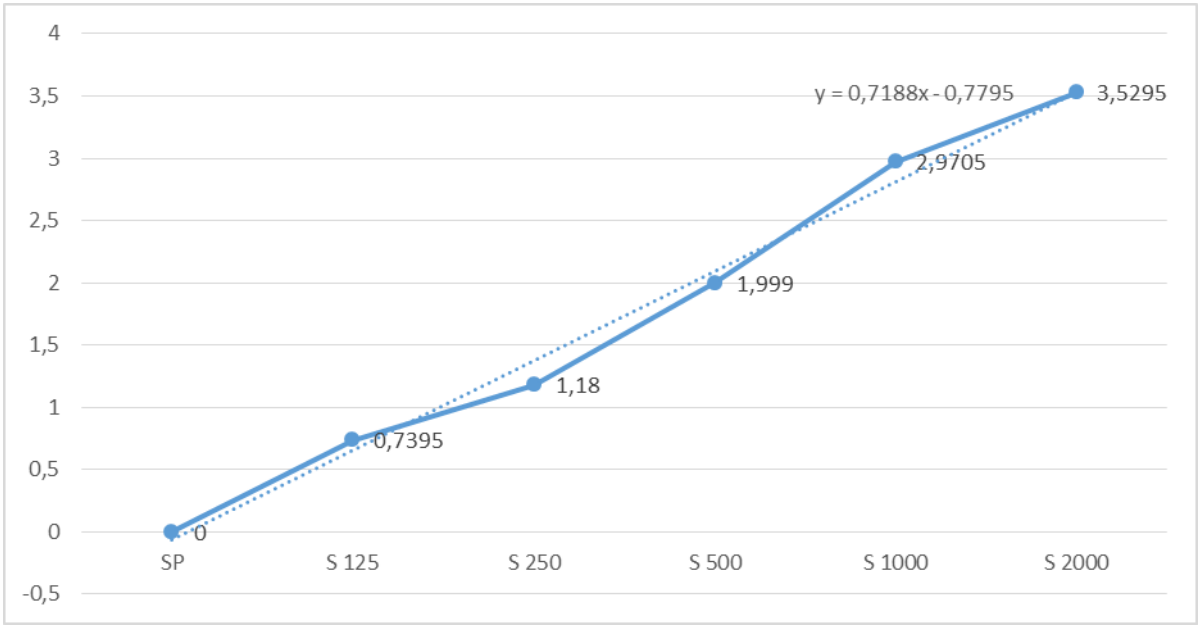
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i analizirani T-testom. Odabrana razina značajnosti iznosila je $p < 0,05$. Osim toga, podaci su analizirani i Mann-Whitney-evim testom i prikazani kao medijan.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE L-SELEKTINA U SERUMU ISPITANIKA

Izvršenim mjerenjima dobivene su vrijednosti apsorbancija temeljem kojih se izračuna ΔA.

Tijekom svakog radnog dana napravljena su mjerenja apsorbancija standarda u duplikatu točno određenih koncentracija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram i određena jednadžba pravca. Iz nje su određene koncentracija kontrolnih uzorka i uzoraka pacijenata s fibromialgijom na temelju izmjerenih apsorbancija. Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 4. Baždarni dijagram

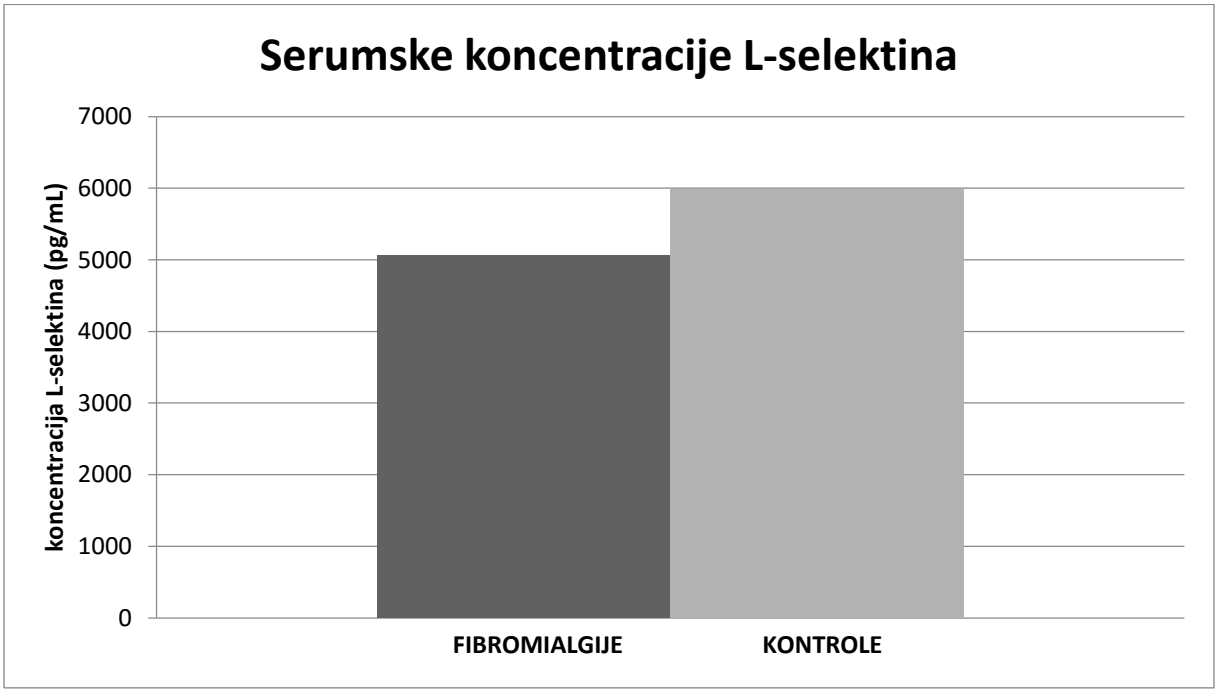
Serumska koncentracija u 34 uzoraka pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 5063,4498 ± 1147,6352 pg/mL. Serumska koncentracija u 31 kontrolnom uzorku iznosi 5983,3113 ± 1376,5465 pg/mL.

P vrijednost dobivena t-testom iznosi p= 0,005. Pojedinačne koncentracije za skupinu oboljelih od fibromialgije prikazane su u Tablici 3., a za kontrolnu skupinu u Tablici 4. (poglavlje 9. DODATAK).

Mann-Whitney-eva statistička analiza napravljena je za ispitivane skupine izuzimajući muške ispitanike.

Rezultati su prikazani kao medijan :

	Medijan	25 %	75 %
Bolesnici s fibromialgijom	5812,590	5576,960	7334,345
Zdravi dobrovoljci	5792,220	5122,360	6500, 76



Slika 5. Grafički prikaz serumskih koncentracija L-selektina izraženih kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; p=0,005

4.2. RASPRAVA

Fibromialgija je sindrom karakteriziran kroničnom boli koštano-mišićnog sustava, ukočenošću zglobova i sistemskim simptomima kao što su umor, nesanica, poremećaji raspoloženja i kognitivne smetnje. Danas je postavljanje dijagnoze uvelike otežano jer sama etiologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena te ne postoje točno definirani biokemijski pokazatelji koji bi sa sigurnošću mogli ukazivati na fibromialgiju. Upravo zbog nedostatka biokemijskih pokazatelja za dijagnostiku fibromialgije nužno je istražiti nove analite koji bi mogli biti dobri dijagnostički pokazatelji za fibromialgiju.

L-selektin je adhezijska molekula koja pripada obitelji selektina. Ona ima ulogu u upalnom odgovoru organizma i povezuje se s mnogim bolestima s upalnom podlogom. U etiološkoj podlozi fibromialgije jest kronični upalni proces. Pretpostavljeno je da bi serumske koncentracije L-selektina mogle biti promijenjene u osoba oboljelih od fibromialgije.

Svrha istraživanja prikazanoga u ovom diplomskom radu bila je utvrditi je li serumska koncentracija L-selektina specifičan biokemijski pokazatelj za fibromialgiju. S tim ciljem određene su koncentracije L-selektina u serumima osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca te uspoređene njihove vrijednosti.

Rezultati prikazani u ovom radu potvrdili su pretpostavku o značajnoj promjeni serumskih koncentracija L-selektina kod osoba s fibromialgijom. Utvrđeno je da su serumske koncentracije L-selektina snižene kod osoba oboljelih od fibromialgije u odnosu na zdrave dobrovoljce. Osim toga, to sniženje statistički je značajno uzme li se u obzir rezultat t-testa($P=0,005$).

Međutim, Mann-Whitney-ev statistički test, kojim su analizirani rezultati određivanja serumske koncentracije L-selektina izuzimajući ispitanike muškoga spola (u skupini bolesnika oboljelih od fibromialgije), ukazuje da razlika između ispitivane skupine nije dovoljno velika da bi isključila slučajnu varijabilnost između uzoraka ($P=0,115$).

S obzirom da uloga L-selektina nije još u potpunosti razjašnjena u patološkim upalnim procesima, ali i u svim ostalim procesima i signalnim putovima u organizmu potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila prije svega točna funkcija samog L-selektina u fibromialgiji, a zatim i značaj u dijagnostici same bolesti na većem broju ispitanika.

5. ZAKLJUČAK

U svrhu određivanja koncentracija L-selektina u osoba oboljelih od fibromialgije korišteni su serumi dvije skupine ispitanika, odnosno serumi osoba oboljelih od fibromialgije te serumi zdravih pojedinaca. Serumi osoba oboljelih od fibromialgije činili su osobe obaju spolova, odnosno 4 muške osobe i 30 ženskih osoba, dok su skupinu zdravih dobrovoljaca činile samo ženske osobe.

Serumska koncentracija u 34 uzorka pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 5063,4498 ± 1147,6352 pg/mL. Serumska koncentracija u 31 kontrolnom uzorku iznosi 5983,3113 ± 1376,5465 pg/mL.

Za utvrđivanje statistički značajne razlike između određenih vrijednosti serumskih koncentracija korišten je t-test. Odabrana razina značajnosti iznosila je $p < 0,05$. P vrijednost dobivena t-testom iznosi $p= 0,005$.

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama L-selektina u osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca.

Mann-Whitney-eva statistička analiza napravljena je za ispitivane skupine izuzimajući muške ispitanike. Rezultati su prikazani kao medijan, bolesnici s fibromialgijom: M=5812,590 (25 % 5576,960; 75 % 7334,345) i zdravi dobrovoljci: M=5792, 220 (25 % 5122,360, 75 % 6500, 676).

6. POPIS LITERATURE

Arnold LM, Fan J, Russell IJ, et al. The fibromyalgia family study: a genome-wide linkage scan study. Arthritis and rheumatism, 2013, 65, 1122-1128.

Bellato E, Marini E, Catoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, Blonna D. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Pain Res Treat*, 2012.

Bradley LA. Pathophysiology of Fibromyalgia. *Am J Med*, 2009, 122(12), 22-30.

Brown CA, El-Deredy W, Jones AK. When the brain expects pain: common neural responses to pain anticipation are related to clinical pain and distress in fibromyalgia and osteoarthritis. *The European journal of neuroscience*, 2014, 39, 663-672

Carskadon M, Dement W. Normal human sleep: An overview. Principles and Practice of Sleep Medicine, 2005., 13–23.

Chakrabarty S, Zoorob R. Fibromyalgia. *Am Fam Physician* , 2007, 76(2), 247-254.

Douglas A. Steeber, Hariharan Subramanian, Jamison J. Grailer, Rochelle M. Conway and Traci J. Storey L-selectin-mediated leukocyte adhesion and migration. Adhesion molecule : Function and Inhibition , 2007. 27-50.

Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med* , 2001, 194, 205–218.

Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central μ-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci*, 2007, 27(37), 10000-10006.

Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev*, 2002, 186, 19–36.

Neeck G. Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. Scand J Rheumatol, 2000, 29(113), 8-12.

Queiroz LP. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Current pain and headache reports*, 2013, 17, 356.

Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* , 2004, 22, 129–156.

Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. FEBS J, 2006, 273, 4377–4389.

Vincent A, Lahr BD, Wolfe F, et al. Prevalence of fibromyalgia: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, utilizing the Rochester Epidemiology Project. *Arthritis care & research*, 2013, 65, 786-792.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB. Fibromyalgia Criteria and Severity Scales for Clinical and Epidemiological Studies: A Modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol*, 2011, 38(6), 1113-1122.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptoms severity. *Arthrit Care Res*, 2010, 62(5), 600-610.

7. SAŽETAK

Vanja Raščanec

Serumske koncentracije u osoba oboljelih od fibromialgije

Posljednjih nekoliko godina teži se otkrivanju potencijalnoga specifičnoga analita čija bi koncentracija bila promijenjena, snižena ili povećana, u serumu ili drugim tjelesnim tekućinama u oboljelih od fibromialgije, odnosno koji bi mogao biti uvršten kao jedan od dijagnostičkih kriterija bolesti ili bi pak njegova koncentracija korelirala s progresijom fibromialgije i imala utjecaj na odabir terapije. U etiološkoj je podlozi fibromialgije kronični upalni proces u kojem ulogu imaju mnoge molekule, uključujući i L-selektin. U ovome je istraživanju ispitano je li promijenjena serumska koncentracija L-selektina u osoba s fibromialgijom. Korištenjem komercijalno dostupnog test kompleta izmjerene su serumske koncentracije L-selektina u bolesnika s fibromialgijom (34 ispitanika) i zdravih dobrovoljaca (31 ispitanik) . Utvrđeno je da je serumska koncentracija L-selektina statistički značajno snižena u bolesnika oboljelih od fibromialgije u odnosu na zdrave dobrovoljce. Rezultati ovoga istraživanja poslužiti će kao osnova daljnjeg ispitivanja koncentracija navedenog analita na većem uzorku s ciljem procjene njegova dijagnostičkog značenja budući da za fibromialgiju nisu utvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji. Osim toga rezultati ovog istraživanja mogu biti poticajni za propitivanje novih terapijskih mogućnosti.

Ključne riječi : fibromialgija, L-selektin

8. SUMMARY

Vanja Raščanec

Serum concentration of L-selectin in people suffering from fibromyalgia

Past few years, many research incline in discover potential analyte, which concentration would be increased or decreased in serum or other body fluids in people suffering from fibromyalgia. Potential analyte would have a role as a part of diagnostic criteria, therapy or his concentration would have correlate with progression of fibromyalgia. Chronic inflammatory process is in etiology of fibromyalgia, in which many molecules have part, including L-selectin. Using commercially available ELISA test serum concentration of L-selectin have been measured. It has been found that there is difference in serum concentration of L-selectin between the people suffering from fibromyalgia and healthy volunteers. Results of this research could be the basis for further research of this analyte, with intention of evaluating their diagnostic application.

Key words : fibromyalgia, L-selectin

9. DODATAK

Tablica 1. Prikaz podataka za pojedine ispitanike

Oznaka	Spol	Dob	Broj osjetljivih točaka	Godine trajanja bolesti
F1	Ž	41	16	17
F2	Ž	63	18	12
F3	Ž	53	15	12
F4	Ž	28	14	6
F5	Ž	53	12	3
F6	Ž	56	13	31
F8	Ž	61	18	30
F9	Ž	46	11	20
F11	Ž	47	16	6
F12	Ž	58	11	12
F13	M	14	11	3
F16	Ž	44	12	4
F17	Ž	30	13	11
F18	M	46	16	4
F19	M	38	12	21
F20	Ž	50	11	11
F21	Ž	56	18	32
F22	Ž	31	18	2,5
F23	M	43	16	11
F24	Ž	41	12	20
F25	Ž	51	10	16
F26	Ž	40	18	12
F27	Ž	44	18	6
F28	Ž	58	18	30
F29	Ž	57	14	11
F30	Ž	54	18	4
F31	Ž	54	18	10
F33	Ž	55	18	10
F34	Ž	71	18	10
F35	Ž	48	16	33
F36	Ž	42	11	12
F37	Ž	50	18	18
F38	Ž	56	18	8
F39	Ž	49	18	13

Tablica 2. Prikaz podataka za pojedine kontrolne uzorke

Oznaka	Spol	Dob
K1	Ž	51
K2	Ž	55
K3	Ž	54
K4	Ž	43
K5	Ž	56
K6	Ž	55
K8	Ž	58
K9	Ž	51
K10	Ž	44
K11	Ž	49
K12	Ž	44
K13	Ž	32
K14	Ž	53
K15	Ž	44
K16	Ž	-
K17	Ž	-
K19	Ž	54
K20	Ž	-
K21	Ž	45
K22	Ž	59
K24	Ž	46
K25	Ž	-
K26	Ž	54
K28	Ž	-
K29	Ž	59
K30	Ž	-
K31	Ž	48
K32	Ž	40
K33	Ž	60
K34	Ž	48
K35	Ž	-

Tablica 3. Prikaz podataka mjerenja za pojedine ispitanike

Oznaka	Koncentracija x 250 (pg/ml)	Koncentracija x 1000 (pg/ml)
F1	1851,8646	5713,7392
F2	1839,1338	4794,6617
F3	1842,7532	5295,1321
F4	1854,3678	5668,2809
F5	1862,5744	4230,6115
F6	1880,5135	5527,3862
F8	-	5104,9680
F9	1833,7519	5674,2676
F11	1850,6625	5574,9166
F12	1857,7709	1237,9590
F13	1845,8481	5739,1370
F16	1858,7682	5070,0245
F17	1865,3494	5792,8723
F18	1870,7297	5206,0694
F19	1881,1802	5830,3286
F20	-	2593,8520
F21	-	5504,2424
F22	-	5519,5456
F23	-	5508,4160
F24	-	5568,2376
F25	1845,4798	5535,4526
F26	1867,4372	5730,9371
F27	1871,3509	5574,7735
F28	-	5392,9464
F29	1876,1342	5636,8307
F30	-	5820,0448
F31	-	4534,5760
F33	-	5324,7776
F34	-	4771,0800
F35	-	5365,1224
F36	-	5216,2640
F37	-	1216,5640
F38	-	5091,0560
F39	-	5792,2208

Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja za pojedine kontrolne uzorke

Oznaka	Koncentracija x 250 (pg/ml)	Koncentracija x 1000 (pg/ml)
K1	1821,0127	-
K2	1837,7785	-
K3	1838,6794	-
K4	1844,1590	-
K5	1854,3734	-
K6	1846,1623	-
K8	1865,1652	-
K9	1853,6191	-
K10	1817,5398	-
K11	1841,7851	-
K12	-	6016,2675
K13	-	6126,4245
K14	-	5852,7458
K15	-	5891,3243
K16	-	5797,2402
K17	-	5895,7669
K19	-	2453,6372
K20	-	5285,5815
K21	-	5504,3382
K22	-	5473,6389
K24	-	5319,8296
K25	-	5633,9333
K26	-	5773,1065
K28	-	5812,5855
K29	-	5659,0193
K30	-	5306,2325
K31	-	5769,4777
K32	-	5729,2417
K33	-	5557,9709
K34	-	1234,7148
K35	-	5708,4662

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za Medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SERUMSKE KONCENTRACIJE L-SELEKTINA U OSOBA OBOLJELIH OD FIBROMIALGIJE

Vanja Raščanec

SAŽETAK

Posljednjih nekoliko godina teži se otkrivanju potencijalnoga specifičnoga analita čija bi koncentracija bila promijenjena, snižena ili povećana, u serumu ili drugim tjelesnim tekućinama u oboljelih od fibromialgije, odnosno koji bi mogao biti uvršten kao jedan od dijagnostičkih kriterija bolesti ili bi pak njegova koncentracija korelirala s progresijom fibromialgije i imala utjecaj na odabir terapije. U etiološkoj je podlozi fibromialgije kronični upalni proces u kojem ulogu imaju mnoge molekule, uključujući i L-selektin. U ovome je istraživanju ispitano je li promijenjena serumska koncentracija L-selektina u osoba s fibromialgijom. Korištenjem komercijalno dostupnog test kompleta izmjerene su serumske koncentracije L-selektina u bolesnika s fibromialgijom (34 ispitanika) i zdravih dobrovoljaca (31 ispitanik) . Utvrđeno je da je serumska koncentracija L-selektina statistički značajno snižena u bolesnika oboljelih od fibromialgije u odnosu na zdrave dobrovoljce. Rezultati ovoga istraživanja poslužiti će kao osnova daljnjeg ispitivanja koncentracija navedenog analita na većem uzorku s ciljem procjene njegova dijagnostičkog značenja budući da za fibromialgiju nisu utvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji. Osim toga rezultati ovog istraživanja mogu biti poticajni za propitivanje novih terapijskih mogućnosti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 33 stranica, 5 grafičkih prikaza, 4 tablice i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fibromialgija, L-selektin

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jozsef Petrik, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc.Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

SERUM CONCENTRATION OF L-SELECTIN IN PEOPLE SUFFERING FROM FIBROMYALGIA

Vanja Raščanec

SUMMARY

Past few years, many research incline in discover potential analyte, which concentration would be increased or decreased in serum or other body fluids in people suffering from fibromyalgia. Potential analyte would have a role as a part of diagnostic criteria, therapy or his concentration would have correlate with progression of fibromyalgia. Chronic inflammatory process is in etiology of fibromyalgia, in which many molecules have part, including L-selectin. Using commercially available ELISA test serum concentration of L-selectin have been measured. It has been found that there is difference in serum concentration of L-selectin between the people suffering from fibromyalgia and healthy volunteers. Results of this research could be the basis for further research of this analyte, with intention of evaluating their diagnostic application.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 33 pages, 5 figures, 4 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fibromyalgia, L-selectin

Mentor: **Karmela Barišić**, **Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić**, **Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jozsef Petrik, **Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Hafner, **Ph.D.,** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry