

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Isabella Koprivec i Josipa Korman

**Uloga topivih adhezijskih molekula sICAM i
sVCAM u etiologiji i dijagnostici fibromialgije**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

KRATICE

ACR	Američki fakultet reumatologije (engl. American College of Rheumatology)
ACTH	adrenokortikotropni hormon
APS	Američko društvo za bol (engl. American Pain Society)
CD31	skupina za diferencijaciju 31 (engl. cluster of differentiation 31)
CD54	skupina za diferencijaciju 54 (engl. cluster of differentiation 54)
CD106	skupina za diferencijaciju 106 (engl. cluster of differentiation 106)
CNS	središnji živčani sustav
ELISA	imunokemijski enzimski test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EULAR	Europska liga za borbu protiv reumatizma (engl. European League Against Rheumatism)
FS	skala simptoma fibromialgije (engl. fibromyalgia symptom scale)
HPA	hipotalamično-pituitarno-adrenalna os
HRP	peroksidaza hrena (engl. horseradish peroxidase)
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula (engl. intercellular adhesion molecule)
IGF-1	čimbenik rasta sličan inzulinu-1 (engl. insulin-like growth factor-1)
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
INF- α	interferon α
INF- γ	interferon γ
kDa	kilodalton

LFA-1	limfocitni antigen-1 (engl. lymphocyte function associated antigen-1)
LPAM	integrin $\alpha_4\beta_7$ (engl. lymphocyte Peyer patch adhesion molecule)
Mac-1	makrofagni antigen-1 (engl. macrophage-1 antigen)
NGF	čimbenik rasta neurona (engl. nerve growth factor)
NF- κ B	nuklearni čimbenik κ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NSAID	nesteroidni protupalni lijekovi (engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs)
OD	optička gustoća (engl. optical density)
PECAM-1	trombocitna stanična adhezijska molekula-1 (engl. platelet endothelial cell adhesion molecule)
TNF- α	tumorski nekrotični čimbenik- α (engl. tumor necrosis factor alpha)
sICAM-1	topiva međustanična adhezijska molekula-1 (engl. soluble intercellular adhesion molecule-1)
SNRIs	inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (engl. serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors)
sVCAM-1	topiva vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (engl. soluble vascular cell adhesion molecule-1)
SS	skala jačine simptoma (engl. symptom severity scale)
TGF- β 1	transformirajući čimbenik rasta- β 1 (engl. transforming growth factor beta 1)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF- α	čimbenik nekroze tumora- α (engl. tumor necrosis factor- α)
VCAM-1	vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (engl. vascular cell adhesion molecule-1)
VLA-4	vrlo kasni antigen-4 (engl. very late antigen-4)
WPI	indeks raširenosti boli (engl. widespread pain index)

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Fibromialgija.....	1
1.1.1.	Patofiziologija fibromialgije.....	2
1.1.2.	Klinička slika fibromialgije.....	6
1.1.3.	Dijagnostika fibromialgije.....	7
1.1.4.	Liječenje fibromialgije.....	9
1.1.5.	ICAM-1 i sICAM-1.....	10
1.1.6.	VCAM-1 i sVCAM-1.....	14
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	16
3.	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1.	Ispitanici.....	17
3.2.	Aparati, pribor i kemikalije.....	17
3.3.	Određivanje koncentracije sICAM-1 adhezijske molekule.....	18
3.4.	Određivanje koncentracije sVCAM-1 adhezijske molekule.....	21
3.5.	Statistička analiza.....	23
4.	REZULTATI.....	24
4.1.	Rezultati mjerenja koncentracije sICAM-1 adhezijske molekule.....	24
4.2.	Rezultati mjerenja koncentracije sVCAM-1 adhezijske molekule.....	26
4.3.	Usporedni rezultati za osobe koje boluju od fibromialgije.....	28
4.4.	Usporedni rezultati za zdrave pojedince.....	29
5.	RASPRAVA.....	31
6.	ZAKLJUČCI.....	33
7.	ZAHVALE.....	34
8.	POPIS LITERATURE.....	35
9.	SAŽETAK.....	43
10.	SUMMARY.....	44
11.	DODATAK.....	45
12.	ŽIVOTOPISI.....	49
12.1.	Isabella Koprivec.....	49
12.2.	Josipa Korman.....	49

1. UVOD

1.1. Fibromialgija

Fibromialgija jest sindrom kojega karakteriziraju ukočenost zglobova, kronična bol koštano-mišićnoga sustava, kognitivne smetnje, anksioznost, umor te poremećaji sna i raspoloženja. Kod oboljelih mogu biti prisutni samo neki od ovih simptoma. Bol je varijabilna što znači da se može mijenjati intenzitet, ali i područje boli. Pripada sindromima centralne osjetljivosti kojima pripadaju i funkcionalna dispepsija, posttraumatski stresni poremećaj te sindromi nemirnih nogu, kronične boli, iritabilnoga crijeva i dr. Fibromialgija može biti udružena s njima, ali i s drugim reumatskim, neurološkim ili psihičkim poremećajima (Bellato i sur., 2012).

Ono što se danas naziva fibromialgijom, prvi puta je bilo opisano već u 19. stoljeću. Gowers je 1904. godine osmislio naziv „fibrozitis“ koji se koristio sve do sedamdesetih godina prošloga stoljeća, nakon čega su Smythe i Moldofsky uveli novi naziv „fibromialgija“. Osim uvođenja novog naziva, oni su i identificirali područja osobite osjetljivosti, poznata kao „osjetljive točke“. 1950.-ih godina Graham je predstavio moderan koncept fibromialgije kao „bolni sindrom“ u odsustvu specifične organske bolesti. Odbor Američkog fakulteta reumatologije (ACR) je 1990. godine (Wolfe i sur., 1990) predstavio kriterij za dijagnosticiranje fibromialgije koji se koristio sve do 2010. godine kada je izmijenjen (Wolfe, 2010) te godinu dana kasnije nadopunjen (Wolfe i sur., 2011).

Prevalencija fibromialgije u ukupnom stanovništvu ovisi o tome koji se kriteriji prema ACR-u koriste u dijagnosticiranju toga sindroma. Također, sindrom se češće dijagnosticira kod žena nego kod muškaraca. Jones i suradnici proveli su 2015. istraživanje kojim su procijenili prevalenciju fibromialgije. Ona iznosi 1,7% prema kriterijima iz 1990., odnosno 1,2% ako se primijene kriteriji iz 2010. Prema modificiranim kriterijima iz 2010. prevalencija ove bolesti iznosi 5,4%. Omjer žena prema muškarcima iznosio je 13.7:1, 4.8:1, odnosno 2.3:1. Prema najnovijim kriterijima iz 2011. godine prevalencija fibromialgije raste, a raste i broj muških osoba s ovim sindromom u odnosu na ranije procjene.

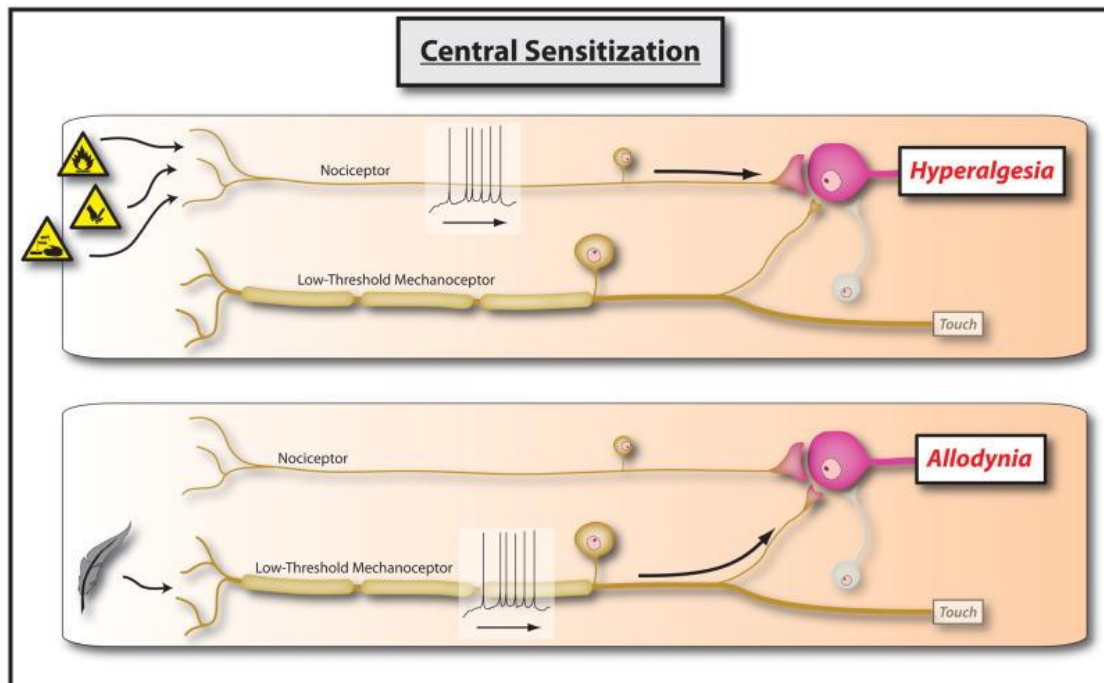
1.1.1. Patofiziologija fibromialgije

Točan uzrok bolesti još uvijek nije poznat, a u nastanak bolesti uključene su komponente središnjega, perifernoga i autonomnoga živčanoga te endokrinoga sustava. Razvoju bolesti pridonose i poremećaji sna, imunološkoga sustava, različiti oblici stresa ili nasljedni čimbenici.

- Živčani sustav

Iako je patogeneza fibromialgije i dalje nerazjašnjena, smatra se kako abnormalni procesi povezani s nastankom i inhibicijom boli dominiraju u njenoj etiologiji. Nastanak boli dinamičan je i kompleksan proces s glavnim ciljem zaštite od ozljeda i opasnosti. Ukoliko taj proces zataji, može doći do znatnog oštećenja tkiva. Brojne studije pokazale su da kod pacijenata s fibromialgijom dolazi do neprilagođenog nastanka osjeta boli ili manjka inhibicije. Funkcionalnom magnetskom rezonancijom (fMRI) pokazano je da bol uzrokuje jednaku neurološku reakciju kod zdravih i bolesnih ispitanika, no kod pacijenata koji boluju od fibromialgije za istu reakciju potreban je manji bolni podražaj (Gracely i sur., 2002). Uz to, bolesnici su imali znatno veću aktivnost odgovarajućih centara u mozgu u odnosu na zdrave pojedince za sve bolne podražaje različitih intenziteta.

Smatra se da su te abnormalnosti posljedica centralne senzitivizacije koja se definira kao pojačani odgovor na stimulaciju središnjega živčanoga sustava (Slika 1.). U normalnim uvjetima, senzitivizacija potiče procese u tijelu koji štite i imobiliziraju ozlijeđeno tkivo kako bi iscjeljenje bilo što brže. Centralna senzitivizacija može uzrokovati kroničnu bol čija je jakost neproporcionalna stvarnom oštećenju tkiva te bol može biti prisutna i nakon zacjeljenja tkiva (Choy i sur., 2015).

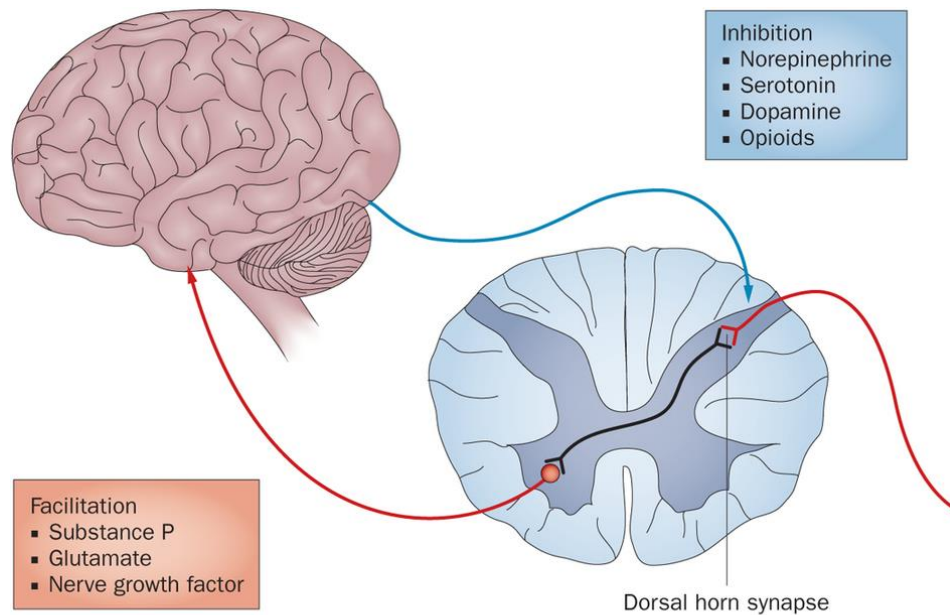


Slika 1. Shematski opis centralne senzitivacije. Centralna senzitivacija pojačava sinaptičku aktivaciju, a smanjuje inhibiciju, što uzrokuje pojačavanje odgovora na bolne podražaje. Isto tako, jačanje sinapsi, koje su inače neaktivne, uzrokuje da podražaji ispod praga podražljivosti boli aktiviraju bolni proces. Preuzeto iz: Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain, 2011.

Drugi mogući mehanizam uključuje poremećaje uzlaznih (afherentnih) putova boli. U dorzalnim rogovima leđne moždine, primarni aferentni neuroni, koji prenose nociceptorske podražaje s periferije tvore sinapsu s neuronima sekundarnog reda koji odlaze u CNS. Neurotransmiteri uključeni u ovaj proces su glutamat, tvar P i čimbenik rasta neurona (NGF). Pokazalo se kako je njihova koncentracija povišena u cerebrospinalnoj tekućini osoba oboljelih od fibromialgije (Choy i sur., 2015). Oni povećavaju ekscitiranost leđne moždine i neurona te su uključeni u centralnu senzitivaciju.

Pretpostavlja se da i silazni inhibitorni putovi boli imaju ulogu u mehanizmu nastanka sindroma (Slika 2.). Oni oblikuju percepciju boli putem viših centara u mozgu. Silazni putovi sadrže neurone s različitim neurotransmiterima, serotoninom, glutamatom, GABA-om i noradrenalinom. Inhibitorni putovi moduliraju odgovor leđne moždine na bolne podražaje te se abnormalnosti u njima povezuju s nastankom fibromialgije. Utvrđeno je da kod osoba s fibromialgijom postoji poremećaj silaznih inhibitornih putova koji uključuje sniženu koncentracija serotonina i noradrenalina u cerebrospinalnoj tekućini (Russell i sur., 1992). Kod

fibromialgije, smanjena je i sposobnost vezanja endogenih opioidnih peptida za μ -opioidne receptore u područjima mozga zaduženim za procesuiranje boli (Harris i sur., 2007).



Nature Reviews | **Rheumatology**

Slika 2. Shematski prikaz ekscitatornih i inhibitorских neurotransmitora. Preuzeto iz: Choy EHS. The role of sleep in pain and fibromyalgia. *Nature Reviews Rheumatology*, 2015.

U prošlosti se smatralo kako je fibromialgija upalni sindrom, a i novije studije ukazuju na moguću ulogu imunskih i upalnih čimbenika u njezinoj patofiziologiji (Häuser i sur., 2015). Glijne stanice povezuju se, osim s centralnom senzitivacijom, i s uzrokovanjem kronične boli stvaranjem različitih kemokina i citokina poput interleukina-8 (IL-8), koji su povišeni u serumu pacijenata s fibromialgijom (Uçeyler i sur., 2011).

Simpatički živčani sustav pridonosi kliničkoj slici fibromialgije. Pacijenti pokazuju visoku razinu emocionalne rastresenosti, usporeni srčani ritam i smanjenu vazokonstrikciju periferne cirkulacije, a sve to upućuje na hiperaktivnost simpatikusa (Littlejohn, 2015).

- Poteškoće sa spavanjem

Poremećaji spavanja čest su simptom kod oboljelih od fibromialgije, te su vjerojatno uključeni u patogenezu bolesti. Elektroencefalografijom je pokazano kako je četvrta faza

spavanja kod oboljelih najviše izmijenjena, što kao posljedicu ima smanjenje koncentracije somatotropina i čimbenika rasta sličnoga inzulinu (IGF-1). Budući da su ti hormoni uključeni u oporavak mišića od traume, poteškoće sa spavanjem mogu utjecati na cijeljenje tkiva (Bellato i sur., 2012).

- Endokrini sustav

Budući da je fibromialgija sindrom koji se povezuje sa stresom, u njezinu patofiziologiju uključena je i hipotalamično-pituitarno-adrenalna os (HPA). Različitim studijama utvrđene su povišene razine kortizola, osobito uvečer, što se povezuje s poremećenim cirkadijalnim ritmom. Pronađene su i povišene razine adrenokortikotropnog hormona (ACTH) pri odgovoru na stres, ali i bazalno (Geenen i sur., 2002). Te su promjene vjerojatno povezane sa sniženim koncentracijama serotonina koje su uočene u slučajevima fibromialgije budući da serotonergička vlakna reguliraju funkciju HPA osi.

Razina somatotropina je normalna tijekom dana, dok se tijekom noći smanjuje ispod razine normalne vrijednosti. Somatotropin se najvećim dijelom luči tijekom četvrte faze sna, a poznato je kako je ta faza kod fibromialgičara izmijenjena. Štoviše, istraživanja pokazuju kako korištenje čimbenika rasta (somatotropina) smanjuje simptome fibromialgije (Cuatrecasas i sur., 2014). Uz to, kod pacijenata je utvrđena i povišena koncentracija inhibitora somatotropina, somatostatina, čije lučenje potiče povišena koncentracija ACTH-a.

- Periferna tkiva

Sve se više istražuju periferna tkiva koja obuhvaćaju kapilare, mišiće i kožu. Smatra se da oštećenje funkcije krvnih žila u mišićima, povišena koncentracija interleukina 1 (IL-1) u kožnim tkivima i tvari P u mišićima, neadekvatan odgovor na oksidacijski stres i fragmentacija DNA u mišićnim vlaknima imaju ulogu u nastanku fibromialgije (Bellato i sur., 2012).

- Genski čimbenici

Dosadašnja istraživanja podržavaju hipotezu da genski čimbenici utječu na razvoj fibromialgije. Utvrđeno je da članovi iste obitelji imaju više zajedničkih osjetljivih točaka te da postoji i povećani rizik od pojave ostalih simptoma fibromialgije kod članova iste obitelji. Smatra se također da nastanku fibromialgije pridonose i određeni polimorfizmi gena, primjerice gena za katehol-O-metiltransferazu, D4 dopaminske receptore, serotoninske 5-HT_{2A} receptore

i serotoninske transportere. Njihovi proteinski produkti sudjeluju u moduliranju boli (Ablin i sur., 2006).

- Psihički čimbenici

Psihički problemi značajno pridonose razvoju fibromialgije. Najčešći poremećaji koji se povezuju s tim sindromom su anksioznost, distimija, posttraumatski stres, panični poremećaj te depresija (Epstein i sur., 1999). Depresija se češće povezuje s fibromialgijom nego s drugim bolestima koštano-mišićnog sustava i odgovorna je za pogoršanje simptoma, stoga se antidepressivi često koriste u terapiji fibromialgije (Fishbain i sur., 2000). Uz to, fibromialgiju se povezuje i s traumama iz djetinjstva, zlostavljanjem i progonom (Häuseri sur., 2015).

- Okidači

Različite infekcije povezuju se s etiologijom sindroma fibromialgije. Često se spominju infekcije Epstein-Barr i Parvo virusima te lajmska boreliozna. Pokazano je da svako dulje febrilno stanje može djelovati kao okidač. Fizičke traume, osobito one kod kojih dolazi do oštećenja leđne moždine, često se navode kao okidači fibromialgije (Häuser i sur., 2015). Dodatno, kao okidači mogu djelovati i različite kemijske tvari i vakcinacije (Bellato i sur., 2012).

1.1.2. Klinička slika fibromialgije

Glavna značajka ovoga sindroma jest bol varijabilne jačine u području osjetljivih točaka. Povećana je osjetljivost na pritisak ili lagani dodir zbog čega dolazi do alodinije, pojave percepcije boli uzrokovane ne-bolnim podražajem, i hiperalgezije, pojačane osjetljivosti na bol (Chinn i sur., 2016). Česti simptomi fibromialgije su umor koji pogađa više od 70% pacijenata i problemi sa spavanjem, a ponekad i nesanica. Zbog toga dolazi do pojave jutarnjeg umora i dnevne pospanosti. Mnogi pacijenti imaju poteškoće s koncentracijom i pamćenjem te s promjenama raspoloženja, uključujući depresiju i anksioznost (Gur i sur., 2008). Javljaju se i glavobolje, vrtoglavica i jutarnja ukočenost zglobova koja se kod većine pacijenata pogoršava tijekom dana (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

1.1.3. Dijagnostika fibromialgije

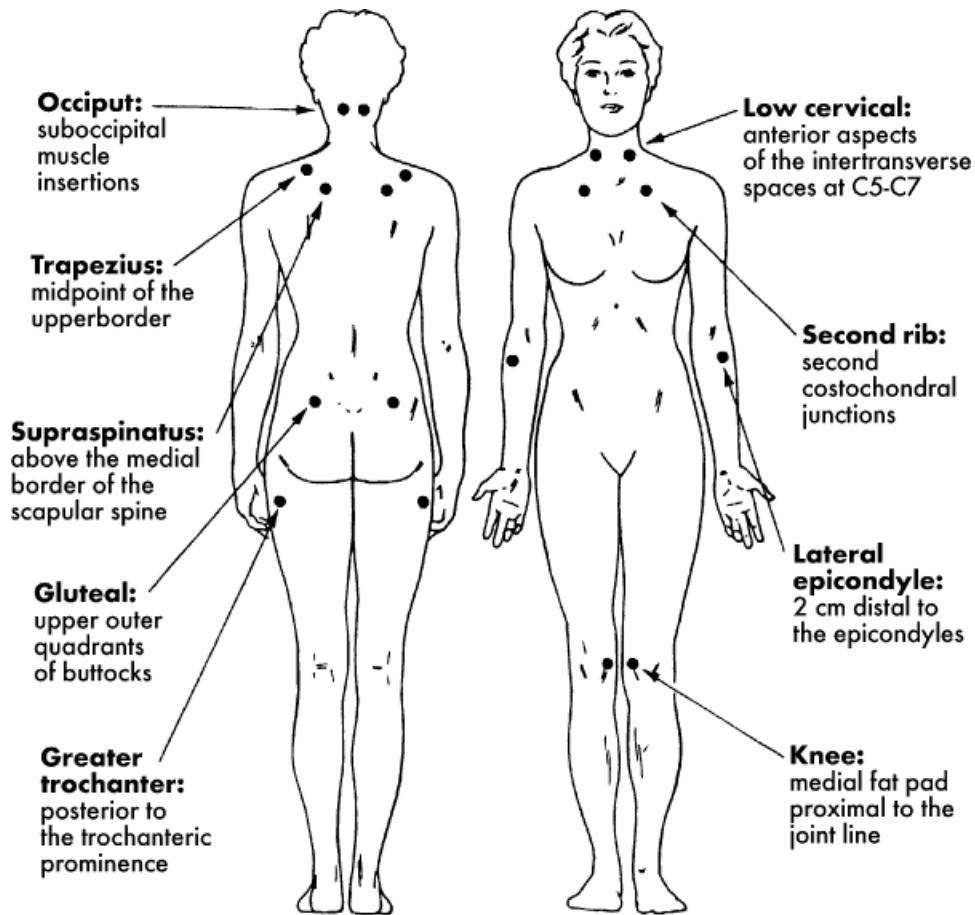
Mnogi slučajevi fibromialgije ne uklapaju se u standardizirane okvire dijagnostičkih kriterija. Budući da ne postoje simptomi specifični za fibromialgiju, kao i zbog generaliziranih i nejasnih simptoma, dijagnoza se često donosi na temelju negativnih rezultata testova na druge bolesti. Unatoč teškoj dijagnozi, tri su glavna simptoma koja su prisutna kod gotovo svih pacijenata, a to su bol, umor i poremećaji sna. Također, liječnik treba utvrditi i vrstu boli (žareća, tupa, duboka, multifokalna ili difuzna), učestalost boli, te je li bol migrirajuća. Potrebno je ustanoviti je li bol posljedica upalnoga procesa ili ozljede. Uz to, važno je procijeniti jesu li prisutni i drugi simptomi poput glavobolje, netolerancije na toplinu ili hladnoću, jutarnje ukočenosti, kognitivnih smetnji, promjena tjelesne težine, sindroma iritabilnoga crijeva ili mjehura, Raynaudova sindroma i sindroma nemirnih nogu (Bellato i sur., 2012). Češće se dijagnosticira kod žena, a dijagnoza u ranijoj životnoj dobi uglavnom znači lošiju prognozu i kvalitetu života (Thomas i sur., 2016).

Laboratorijske pretrage obuhvaćaju kompletnu krvnu sliku, rutinske biokemijske testove seruma, tireotropni hormon, brzinu sedimentacije eritrocita i/ili C-reaktivni protein (CRP). Promjena bilo kojeg od navedenih parametara ne povezuje se specifično s fibromialgijom (Clauw, 2009). Uz to, često se analizira prisutnost antinuklearnih protutijela.

Dijagnoza se temelji na dijagnostičkim kriterijima koje je utemeljio ACR 1990. godine. Prvi kriterij je prisutnost koštano-mišićne boli iznad i ispod struka, s obje strane tijela te u aksijalnom koštanom sustavu (prsna i vratna kralježnica, prsa i donji dio leđa). Uz to, bol mora biti prisutna minimalno tri mjeseca. Drugi kriterij jest bol u barem 11 od ukupno 18 osjetljivih točaka vidljivih na Slici 3. Osjetljivost točaka provjerava se prislanjanjem utega od 4 kilograma na područje provjere osjetljivosti. Fibromialgija se dijagnosticira samo ukoliko su zadovoljena oba kriterija. Također, prisutnost drugih poremećaja ne isključuje prisutnost fibromialgije.

ACR je promijenio dijagnostičke kriterije fibromialgije 2010. godine uklanjanjem osjetljivih točaka. Uočena je i važnost uvođenja kvantitativne mjere boli i jačine drugih simptoma te su, dodatno, uvedeni indeks boli (WPI) i skala jačine simptoma (SS). Utvrđivanjem WPI-ja dobiva se više informacija o opsegu i pragu boli, a SS skalom utvrđuje se opseg i jačina simptoma poput umora, neispavanosti i kognitivnih poteškoća (Wolfe, 2010). Godinu kasnije, kriteriji su izmijenjeni tako da se dijagnostika fibromialgije ne temelji na liječničkoj procjeni tjelesnih simptoma. Uvedena su tri specifična pitanja o prisutnosti abdominalne boli i grčeva,

depresije i glavobolje u zadnjih šest mjeseci koja su zamijenila opseg tjelesnih simptoma SS skale. Stvorena je nova 0-31 skala simptoma fibromialgije (FS) dodavanjem WPI-ja modificiranoj SS skali (Hayek i sur., 2015).



Slika 3. Osjetljive točke prema ACR-ovim kriterijima za dijagnozu fibromialgije (1990. godina). Preuzeto iz: Lawry GV: Systematic Musculoskeletal Examinations, 2011.

1.1.4. Liječenje fibromialgije

Ciljevi terapije su ublažavanje boli, poboljšanje tjelesne funkcije djelovanjem na udružene simptome, te poboljšanje kvalitete sna (Bennett i sur., 2007). Budući da su simptomi fibromialgije raznoliki i povezuje ih se s različitim čimbenicima i tjelesnim funkcijama, liječenje uključuje primjenu raznovrsnih metoda liječenja.

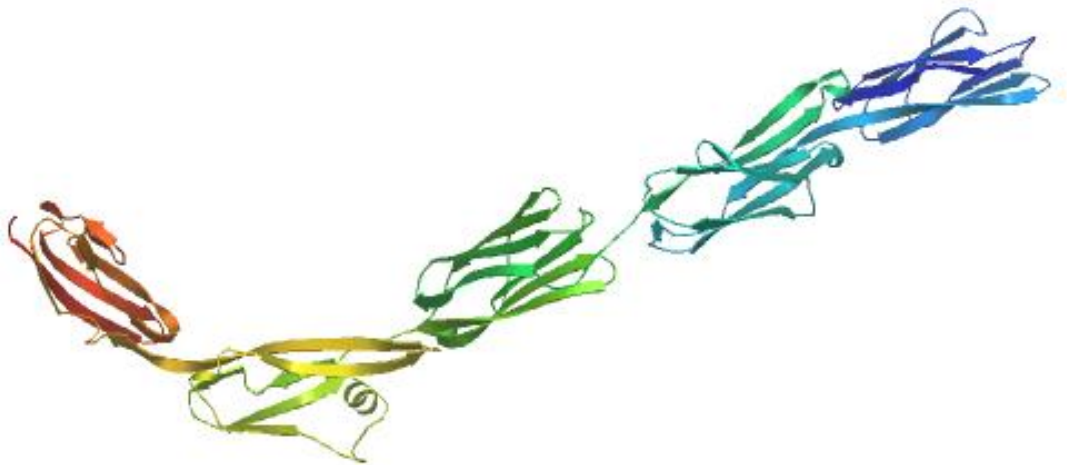
U terapiji fibromialgije primjenjuju se farmakološke i ne-farmakološke metode. Američka Agencija za hranu i lijekove odobrila je tri lijeka za terapiju fibromialgije: duloksetin, milnacipran i pregabalin. Europska komisija nije odobrila nijedan od navedenih lijekova za liječenje fibromialgije (Chinn i sur., 2016). Duloksetin i milnacipran su antidepresivi koji inhibiraju ponovnu pohranu serotonina i noradrenalina (SNRIs). Djeluju tako da inhibiraju specifične transportne proteine koji prenose serotonin, odnosno noradrenalin, iz sinaptičke pukotine u intracelularnu tekućinu presinaptičkog neurona. Pregabalin je antiepileptik. Veže se za $\alpha_2\delta$ podjedinicu presinaptičkih kalcijevih kanala te posljedično dolazi do smanjenja ulaska kalcijevih iona u živčane završetke, zbog čega se smanjuje izlučivanje ekscitatornih neurotransmitera.

Koriste se i nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) koji su slabi analgetici te jaki, opioidni, analgetici poput tramadola. Kliničkom je studijom pokazano kako nabilon, sintetski kanabinoid, umanjuje bol i poboljšava kvalitetu života osoba oboljelih od fibromialgije (Skrabek i sur., 2008). Lijekovi s barem jednim kliničkim ispitivanjem s pozitivnih ishodom u smanjenju simptoma fibromialgije obuhvaćaju moklobemid, gabapentin, tramadol, tropisetron i natrijev oksibat (Calandre i sur., 2015).

Nefarmakološka terapija obuhvaća različite oblike tjelovježbe, balneoterapiju, terapiju masažom i akupunkturu. Pokazano je da tjelovježba u vodi povoljno djeluje na oboljele od fibromialgije ublažavajući simptome (Bidonde i sur., 2014). Također, terapija masažom u trajanju duljem od pet tjedana ublažava simptome boli, anksioznosti i depresije (Li i sur., 2014). Akupunkturu se postiže brzo umanjeno bolova kod fibromialgičara (Stival i sur., 2014).

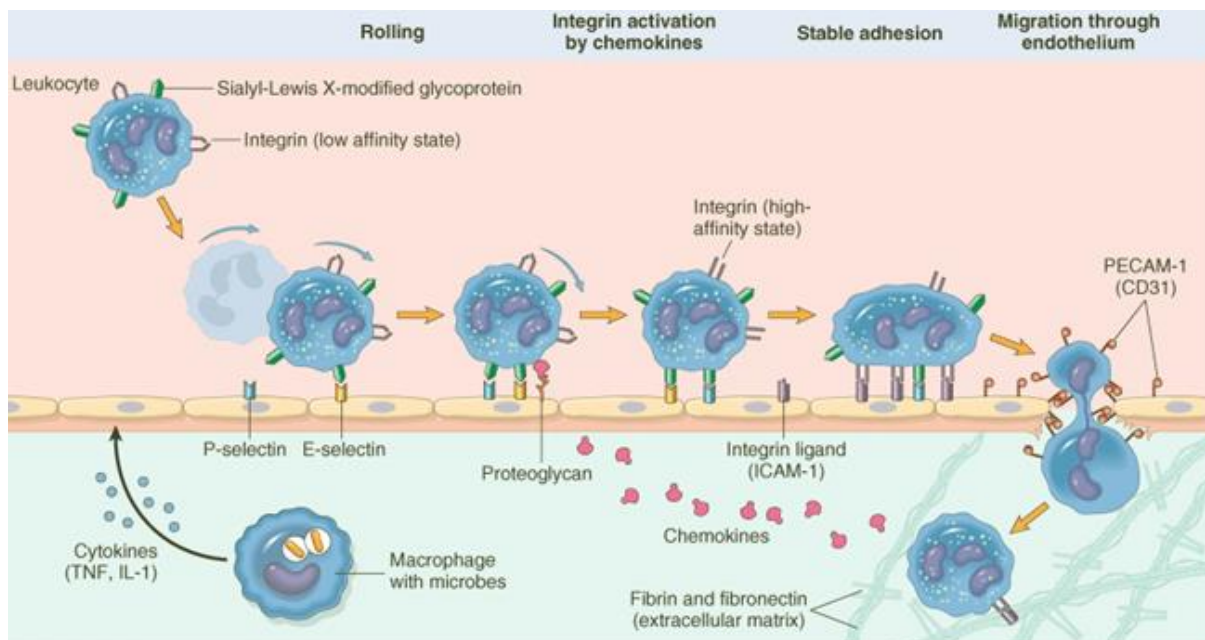
1.1.5. ICAM-1 i sICAM-1

Međustanična adhezijska molekula-1 (ICAM-1), poznata i kao skupina za diferencijaciju 54 (CD54), transmembranski je protein veličine 90 kDa s izvanstaničnim N-krajem i unutarstaničnim C-krajem. Sadrži 5 izvanstaničnih, transmembransku i kratku unutarstaničnu domenu (Lawson i sur., 2009). ICAM-1 je adhezijska molekula koja prema strukturi pripada superobitelji imunoglobulina. Općenito, adhezijske molekule posreduju u interakciji stanica s izvanstaničnim matriksom, kao i s drugim stanicama (Škerk, 2011).



Slika 4. Vrpčasti model ICAM-1 molekule koja obuhvaća aminokiselinske ostatke od 28. po redu do 477. Preuzeto iz: The Protein Model Portal, UniProtKB - P05362 (ICAM1_HUMAN).

ICAM-1 je ligand za β_2 -integrine leukocita, LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) i Mac-1 (Macrophage-1) antigen. Ima ključnu ulogu u transmigraciji leukocita iz krvnih žila u okolno tkivo (Šimundić, 2001). Ekstravazacijom leukocita omogućen je njihov dolazak na mjesto infekcije ili oštećenja (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz ekstravazacije leukocita posredovane različitim adhezijskim molekulama. Preuzeto iz: Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease, 8th edition, 2010. Leukociti se najprije kreću, aktiviraju i zatim adheriraju na površinu endotela. Potom transmigriraju kroz bazalnu membranu u ekstravaskularni prostor te kemotaksijom dolaze do mjesta ozljede. Različite molekule sudjeluju u pojedinim koracima ovoga procesa.

Topiva međustanična adhezijska molekula-1, sICAM-1, predstavlja cirkulirajući oblik ICAM-1 molekule te je konstitutivno ili inducibilno eksprimirana na površini različitih stanica (Witkowska i sur., 2004) uključujući endotelne stanice, aktivirane trombocite, leukocite, astrocite i osteoblaste. ICAM-1 sadrži 532 aminokiselinska ostatka (ExpASy, UniProtKB-P05362). Mehanizam nastanka sICAM-1 još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. *In vitro* studije na endotelnim staničnim kulturama pokazale su da koncentracija sICAM-1 odražava koncentraciju ICAM-1 te je na temelju toga predloženo kako sICAM-1 nastaje iz netopivog oblika proteolitičkim kidanjem specifičnim proteazama (Lyons i sur., 1998). Drugom je, pak, studijom u stanicama utvrđena prisutnost mRNA koja specifično kodira sICAM-1, što upućuje na postojanje više od jednog mehanizma nastanka sICAM-1 (Wakatsuki i sur., 1995).

Induktori ekspresije sICAM-1 jesu čimbenik nekroze tumora-alfa (TNF- α), IL-1, interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ), angiotenzin II, zasićene masne kiseline i alkohol, dok inhibitorno djeluju interleukin-10 (IL-10), transformirajući čimbenik rasta- β 1 (TGF- β 1), rinovirusi, inzulin, antioksidansi i ω -3 masne kiseline (Witkowska i sur., 2004).

Ekspresija, a time i koncentracija sICAM-1 u serumu, ovisi i o dobi ispitanika. Tijekom djetinjstva i rane adolescencije (4-17 godina), koncentracija sICAM-1 snažno opada s godinama, dok u odrasloj dobi nema promjene koncentracije koja se povezuje s godinama (Ponthieux i sur., 2004).

Molekula sICAM može se detektirati u različitim tjelesnim tekućinama poput seruma, sputuma, cerebrospinalne i sinovijalne tekućine, ali i u bronhoalveolarnoj tekućini što znači da se ta adhezijska molekula eksplicira i u dišnom sustavu (Witkowska i sur., 2004).

Povišena koncentracija sICAM-1 u serumu povezuje se s različitim patološkim stanjima kao što su karcinom želuca, kolorektalni karcinom, autoimune, neurološke i mnoge druge bolesti (Alexiou i sur., 2003, Alexiou i sur., 2001). Povišenje koncentracije povezuje se s progresijom tumora kod melanoma i kolorektalnog karcinoma, ali i s veličinom tumora kod karcinoma želuca budući da više koncentracije prate veće tumore (Liu i sur., 1998).

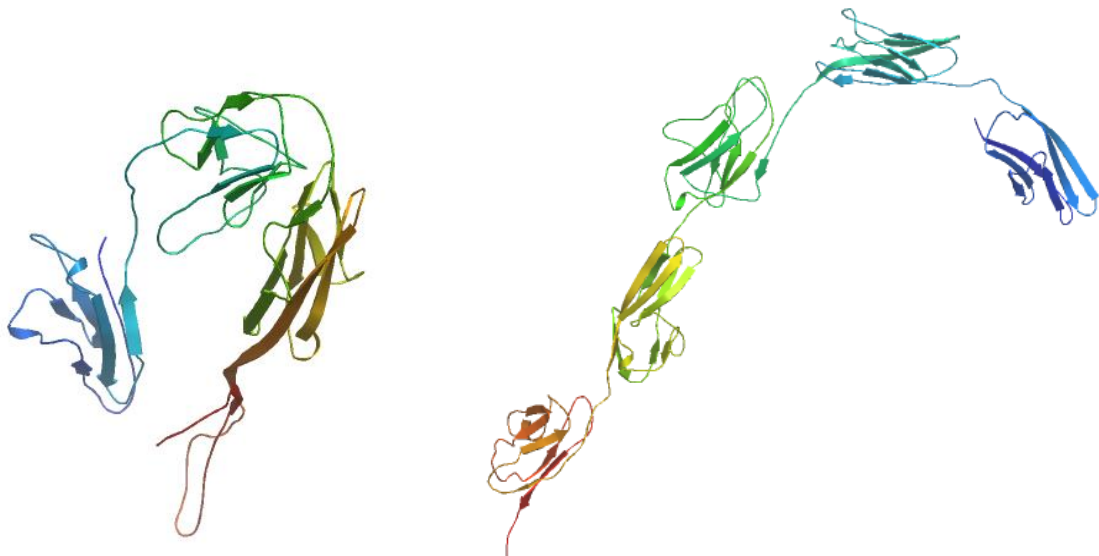
Kod bolesnika s autoimunim bolestima poput reumatoidnoga artritisa, Basedowljeve bolesti, poliarteritisa nodose, sistemske i multiple skleroze te Wegnerove granulomatoze, utvrđena je povišena koncentracija sICAM-1 u serumu (Witkowska i sur., 2004). Porast koncentracije uočen je i kod pušača, osoba koje učestalo konzumiraju alkohol ili pate od hipertenzije (Rohde i sur., 1999). Ta povezanost ukazuje na moguću procjenu rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti na temelju serumske koncentracije sICAM-1. Utvrđeno je i da povišene koncentracije te adhezijske molekule povećavaju rizik za razvoj koronarnih bolesti te da je unutar prvih 12-24 sata akutnoga infarkta miokarda povišena vrijednost sICAM-1, zbog čega se može koristiti za praćenje ishemije i koronarne reperfuzije. Za adhezijske molekule dokazano je da su markeri endotelne disfunkcije te se smatra da su uključene u patogenezu ateroskleroze (Škerk, 2011). Jednom je studijom pokazano da su ICAM-1 molekule snažno i konstantno ekspimirane na površini makrofaga i različitih aterosklerotičnih plakova kod osoba oboljelih od ateroskleroze (Davies i sur., 1993). Također, ispitivanja su pokazala povišeni sICAM-1 titar nakon transplatacije bubrega, jetre ili srca.

Istraživanjima je, nadalje, ustanovljeno da osobe koje pate od migrene (Martelletti i sur., 1997) i shizofrenije (Schwarz i sur., 2010) imaju snižene serumske koncentracije sICAM-1.

ICAM-1, odnosno njegov topivi oblik, povezuje se s brojnim bolestima i stanjima te ima potencijal za praćenje razvoja pojedinih bolesti i njihovih različitih stadija. ICAM-1 upućuje na povećani rizik od oboljenja ili na uspješnost transplatacije organa i terapije različitih bolesti.

1.1.6. VCAM-1 i sVCAM-1

Vaskularna stanična adhezijska molekula-1, koja se još naziva i skupina za diferencijaciju 106 (CD106), transmembranski je protein koji također pripada skupini imunoglobulina. Sadrži 739 aminokiselinskih ostataka (ExpASy, UniProtKB-P19320). Može biti eksprimirana u dva različita oblika, tj. izoforme, te sadržavati šest ili sedam imunoglobulinskih domena. VCAM-1 nije kontinuirano eksprimiran na površini endotela, a *in vitro* je pokazano kako ekspresiju aktiviraju lipoproteini, TNF- α , IL-1, IL-4, INF- γ te transkripcijski čimbenik NF- κ B (Cook-Mills i sur., 2011). Osim endotelnih stanica, poznato je da ovu adhezijsku molekulu mogu eksprimirati i tkivni makrofazi, fibroblasti i dendriti. Kao i ICAM-1, ima važnu ulogu u adheziji i ekstravazaciji leukocita (Cook-Mills i sur., 2011).



Slika 6. Vrpčasti modeli VCAM-1 molekule koji uključuju aminokiselinske ostatke 41-347 (lijevo) i 239-688 (desno). Preuzeto iz The Protein Model Portal, UniProtKB, P19320 (VCAM1_HUMAN).

VCAM-1 može biti ligand za dva različita integrina: $\alpha_4\beta_1$ (engl. very late antigen-4, VLA-4) i $\alpha_4\beta_7$ (engl. lymphocyte Peyer patch adhesion molecule, LPAM) integrin koji se nalaze na površini leukocita (Šimundić, 2001). VLA-4 integrini nalaze se na površini limfocita, monocita i eozinofila, ali ne i na površini neutrofila. Za vezanje integrina odgovorne su prva i

četvrta domena, koje su homologne, te se smatra kako bi one mogle biti rezultat genske duplikacije.

Topivi oblik sVCAM-1 smatra se pokazateljem oštećenja i disfunkcije endotela (Škerk, 2011). Utvrđeno je i kako različita upalna stanja povisuju koncentraciju sVCAM-1. To je slučaj i kod bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa (Wang i sur., 2015).

Studije pokazuju kako djeca i adolescenti s povećanim rizikom oboljenja od ateroskleroze (osobe s hipertenzijom, dijabetesom ili pretilo osobe) imaju povećanu koncentraciju sVCAM-1 u plazmi (Glowinska i sur., 2005). Kod djece je izmjerena veća koncentracija nego kod starijih osoba.

Osobe s karcinomom želuca imaju povišene koncentracije sVCAM-1 te razina tih molekula korelira sa stadijem bolesti, kao i s invazijom tumorskih stanica u limfne čvorove i općenito metastaziranjem (Alexiou i sur., 2003). Također, uočene su povišene koncentracije u serumu i cerebrospinalnoj tekućini osoba s epilepsijom (Luo i sur., 2014) te kod osoba s leukemijom koja je metastazirala u središnji živčani sustav (Si i sur., 2015).

Pokazano je i kako osobe s akutnim respiratornim distres sindromom imaju znatno više koncentracije ove adhezijske molekule u bronhoalveolarnoj tekućini u odnosu na zdrave osobe, što se povezuje s patogenezom ove bolesti (Attia i sur., 2016).

Povišene koncentracije povezuju se i s depresijom kod starijih osoba, koja može biti posljedica oštećenja intrakranijalnih krvnih žila (Tchalla i sur., 2015).

Prošlogodišnjom studijom prvi je puta pokazano kako povišena razina VCAM-1 kod osoba s multiplom sklerozom narušava funkciju krvno-moždane barijere povećavanjem njezine propusnosti te aktivacijom pojedinih signalnih puteva unutar endotelnih stanica u mozgu (Haarmann i sur., 2015).

Povišene serumske koncentracije uočene su također kod osoba sa shizofrenijom (Stefanović i sur., 2016).

VCAM-1 i pripadajući topivi oblik, sVCAM-1, povezuju se s različitim poremećajima i bolestima te imaju potencijal korištenja u svrhu praćenja progresije ili uspješnosti terapije pojedinih bolesti, kao i upućivanja na povećani rizik od nastanka različitih bolesti.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U znanstvenoj literaturi posljednjih su godina objavljeni rezultati istraživanja u kojima je utvrđeno da potencijalnu ulogu u fibromialgiji ima vaskularna deregulacija u mišićima, kao i povećan IL-1 u kutanom tkivu (Bellato i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da je IL-1 induktor sICAM-1 (Witkowska i sur., 2004). S obzirom na to, opći cilj ovoga rada bio je utvrditi vezu između koncentracije sICAM-1 te sVCAM-1 (njemu srodne adhezijske molekule iz porodice imunoglobulina) i fibromialgije.

Na temelju općega cilja postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. Odrediti koncentraciju sICAM-1 u serumu pacijenata oboljelih od fibromialgije i kontrolnom uzorku kojega čine zdravi dobrovoljci
2. Usporediti koncentracije sICAM-1 u ispitanim skupinama, tj. u skupini pacijenata oboljelih od fibromialgije i skupini zdravih dobrovoljaca
3. Odrediti koncentraciju sVCAM-1 u serumu pacijenata oboljelih od fibromialgije i kontrolnom uzorku kojega čine zdravi dobrovoljci
4. Usporediti koncentracije sVCAM-1 u ispitanim skupinama, tj. u skupini pacijenata oboljelih od fibromialgije i skupini zdravih dobrovoljaca

Rezultati predloženog istraživanja trebali bi utvrditi postoje li razlike u koncentraciji sICAM-1 i sVCAM-1 u serumu zdravih osoba i oboljelih pojedinaca te moguću uključenost adhezijskih molekula iz porodice imunoglobulina u samu patogenezu fibromialgije. Budući da do danas još nisu utvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji za fibromialgiju, dobiveni rezultati imaju potencijal potaknuti nova istraživanja s većim brojem zdravih i oboljelih ispitanika te s ciljem procjene potencijalnog dijagnostičkoga i terapijskoga značaja ovih molekula.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju prikazanom u ovome radu obuhvaćene su dvije skupine ispitanika: skupina osoba oboljelih od fibromialgije i skupina zdravih dobrovoljaca. Obje skupine uključuju samo ispitanike ženskoga spola. Za određivanje koncentracije adhezijskih molekula sICAM-1 i sVCAM-1 korišteni su serumi dobiveni uz suglasnost ispitanika, koji su prikupljeni i stavljeni na raspolaganje za navedeno istraživanje zahvaljujući dr. sc. Mariu D. Corderu (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Department, Španjolska).

Skupina osoba oboljelih od fibromialgije		Skupina zdravih dobrovoljaca	
Broj ispitanika:	26	Broj ispitanika	31
Dob (godine):	50,23 ± 10,69	Dob (godine):	49,94 ± 5,66
Broj osjetljivih točaka:	15,38 ± 2,87		
Trajanje bolesti (godine):	14,96 ± 9,54		

Kod svih ispitanih pacijenata (26) dijagnoza fibromialgije postavljena je na temelju dijagnostičkog kriterija ACR-a iz 1990. godine. Pojedinačni podatci o pacijentima prikazani su u Tablici 5., a o zdravim dobrovoljcima u Tablici 6. (poglavlje 11. DODATAK).

3.2. Aparati, pribor i kemikalije

Sva mjerenja izvršena su na spektrofotometru VICTOR³Wallac 1420 multilabel counter, proizvođača PerkinElmer, Inc. (USA). Od laboratorijskoga pribora korištene su pipete volumena 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL i za njih odgovarajući nastavci, epruvete od 1,5 mL, menzure od 100 mL i 1 L, boce od 500 mL, termomikser (Thermomixer compact), miješalica i filter papir. Navedeni pribor nabavljen je od proizvođača Eppendorf (Njemačka).

3.3. Određivanje koncentracije sICAM-1 adhezijske molekule

Za mjerenje koncentracije adhezijske molekule sICAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije i u serumu zdravih dobrovoljaca korišten je komercijalno dostupan ELISA test komplet Human soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) proizvođača AbbexaLtd. (Cambridge, UK). Test komplet sadržavao je:

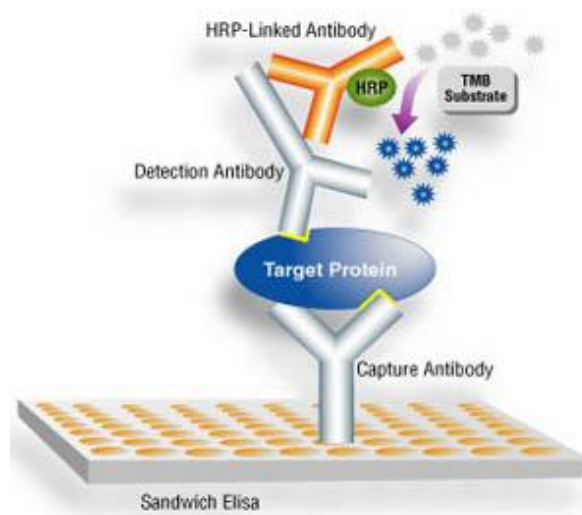
1 pločicu od 96 jažica na čiju su površinu vezana protutijela ljudskoga sICAM-1

Standardna otopina ljudskoga sICAM-1	0,5 mL
Pufer za razrjeđivanje standarda	1, 5 mL
Pufer za ispiranje	20 mL, razrjeđenje 1:30
Pufer za razrjeđivanje uzorka	6 mL
Protutijelo ljudskoga sICAM-1 konjugirano s HRP-om (RTU)	6 mL
Stop otopina	6 mL
TMB supstrat A	6 mL
TMB supstrat B	6 mL
Folija za zatvaranje pločice	2

Princip određivanja koncentracije sICAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije i u serumu zdravih dobrovoljaca temelji se na imunokemijskoj metodi sandwich-ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) (Slika 7.).

Anti-sICAM-1 protutijelo vezano je na površinu svih 96 jažica sICAM-1 ELISA test pločice. U prvih 12 jažica prirede se dvije slijepe probe (pufer za razrjeđivanje standarda, 2 jažice) te standardi (pufer za razrjeđivanje standarda i sICAM-1 standard) koncentracija 6, 4, 2, 1 i 0,5 ng/mL (za svako razrjeđenje standarda po 2 jažice), koji se koriste za izradu baždarnoga pravca. U preostale jažice dodaju se uzorci, serumi osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca. Molekule sICAM-1 iz uzoraka i standardnih otopina vežu se za protutijela vezana na površinu jažica. U sljedećem koraku dodaje se protutijelo (anti-sICAM) konjugirano s HRP-om koje se veže na sICAM-1. Nakon inkubacije od 30 minuta nevezani anti-sICAM-HRP

ispiru se puferom za ispiranje. Za enzimsku reakciju na kraju testa koristi se supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) kojega čini mješavina jednakih volumena TMB supstrata A i TMB supstrata B. TMB supstrat služi kao donor vodika za redukciju H_2O_2 HRP-om. Pri tome se TMB oksidira u 3,3',5,5'-tetrametilbenzidindiimin, spoj plave boje. Dodatkom kisele stop otopine plava boja prelazi u žutu (Slika 8.) čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji sICAM-1 u uzorku. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski na 450 nm u čitaču za pločice. Na temelju očitanih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram i iz njega očitaju koncentracije sICAM-1 u analiziranim serumima.



Slika 7. Shematski prikaz sandwich-ELISA testa. Preuzeto s web stranice Cell Signaling Technology, Inc. (Japan), PathScan[®] Sandwich ELISA Kits.

Određivanje koncentracije sICAM-1 u serumu započinje pripremom standarda u koncentracijama 6 ng/mL (0,4 mL 9 ng/mL otopine standarda i 0,2 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 4 ng/mL (0,4 mL 6 ng/mL otopine standarda i 0,2 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 2 ng/mL (0,3 mL 4 ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 1 ng/mL (0,3 mL 2 ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda) te 0,5 ng/mL (0,3 mL 1ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda). U prve dvije jažice dodaje se 50 μ L pufera za razrjeđivanje standarda i one predstavljaju slijepe probe. U sljedećih 10 jažica dodaje se po 50 μ L razrjeđenih standardnih

otopina u duplikatu. U ostale jažice dodaje se po 50 μ L uzoraka seruma, koji su prethodno inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi i centrifugirani na 2000-3000 g 10-20 minuta. Nakon toga mikrotitarska pločica se zatvori folijom i inkubira 30 minuta u termostatiranom mikseru na 37 °C. Nakon inkubacije, pločica se 5 puta ispiru puferom za ispiranje, koji se pripravi dodatkom 20 mL koncentriranog pufera za ispiranje u 580 mL destilirane vode. U ispirane jažice doda se 50 μ L protutijela anti-sICAM-HRP, pločica se ponovno prekrije folijom i inkubira 30 minuta u termostatiranom mikseru (37 °C). Nakon ove inkubacije pločica se ispiru 5 puta puferom za ispiranje. U jažice se potom doda 50 μ L TMB supstrata A i 50 μ L TMB supstrata B. Pločica se miješa 30 sekundi u termostatiranom mikseru, zatvori folijom te inkubira na 37 °C 15 minuta, pri čemu je potrebno izbjegavati izlaganje svjetlu. Po završetku postupka, u svaku jažicu doda se 50 μ L stop otopine i dobro se promiješa. U ovom koraku dolazi do promjene plave boje u žutu. Apsorbancija se mjeri na 450 nm u čitaču mikrotitarskih pločica, VICTOR³Wallac 1420 multilabel counteru unutar 15 minuta nakon dodavanja stop otopine.

3.4. Određivanje koncentracije sVCAM-1 adhezijske molekule

Za mjerenje koncentracije adhezijske molekule sVCAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije i u serumu zdravih dobrovoljaca korišten je komercijalno dostupan ELISA test komplet Human soluble Vascular cell adhesion molecule -1 (sVCAM-1) proizvođača AbbexaLtd. (Cambridge, UK). Test komplet sadržavao je:

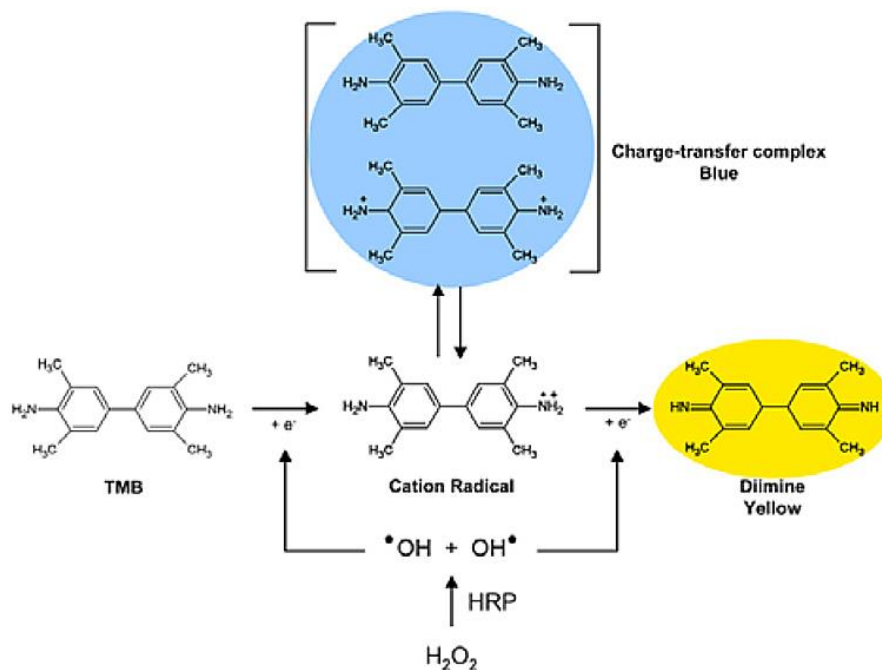
1 pločicu od 96 jažica na čiju su površinu vezana protutijela ljudskoga sVCAM-1

Standardna otopina ljudskoga sVCAM-1	0,5 mL
Pufer za razrjeđivanje standarda	1, 5 mL
Pufer za ispiranje	20 mL, razrjeđenje 1:30
Pufer za razrjeđivanje uzorka	6 mL
Protutijelo ljudskoga sVCAM-1 konjugirano s HRP-om (RTU)	6 mL
Stop otopina	6 mL
TMB supstrat A	6 mL
TMB supstrat B	6 mL
Folija za zatvaranje pločice	2

Princip određivanja koncentracije sVCAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije i u serumu zdravih dobrovoljaca temelji se na imunokemijskoj sandwich-ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) metodi (Slika 7.).

Anti-sVCAM-1 protutijelo vezano je na površinu svih 96 jažica sVCAM-1 ELISA test pločice. U prvih 12 jažica prirede se slijepe probe (pufer za razrjeđivanje standarda, 2 jažice) te standardi (pufer za razrjeđivanje standarda i human sVCAM-1 standard) u razrjeđenjima 9, 6, 3, 1,5 i 0, 75 ng/mL (za svako razrjeđenje standarda po 2 jažice), koji se koriste za izradu baždarnog pravca. U preostale jažice dodaju se uzorci, serumi osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca. Molekule sVCAM-1 iz uzoraka i standardnih otopina vežu se za protutijela vezana na površinu jažica. U sljedećem koraku dodaje se protutijelo (anti-sVCAM) konjugirano s HRP-om koje se veže na sVCAM-1. Nakon inkubacije od 30 minuta nevezani anti-sVCAM-HRP ispiru se puferom za ispiranje. Za enzimsku reakciju na kraju testa koristi se

supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) kojega čini mješavina jednakih volumena TMB supstrata A i TMB supstrata B. TMB supstrat služi kao donor vodika za redukciju H_2O_2 HRP-om. Pri tome se TMB oksidira u 3,3',5,5'-tetrametilbenzidindiimin, spoj plave boje. Dodatkom kisele stop otopine plava boja prelazi u žutu (Slika 8.) čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji sICAM-1 u uzorku. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski na 450 nm u čitaču za pločice. Na temelju očitanih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram i iz njega očitaju koncentracije sVCAM-1 u analiziranim serumima.



Slika 8. Princip enzimske reakcije s HRP-om. Preuzeto s web stranice DmitriFomenkoLabBioinformatics Server.

Određivanje koncentracije sVCAM-1 u serumu započinje pripremom standarda u koncentracijama 9 ng/mL (0,4 mL 13,5 ng/mL otopine standarda i 0,2 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 6 ng/mL (0,4 mL 9 ng/mL otopine standarda i 0,2 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 3 ng/mL (0,3 mL 6 ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda), 1,5 ng/mL (0,3 mL 3 ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda) te 0,75 ng/mL (0,3 mL 1,5 ng/mL otopine standarda i 0,3 mL pufera za razrjeđivanje standarda). U prve dvije jažice dodaje se 50 μL pufera za razrjeđivanje standarda i one predstavljaju slijepe probe. U sljedećih 10 jažica dodaje se po 50 μL razrijeđenih standardnih otopina u duplikatu. U ostale jažice dodaje se po 50 μL uzoraka seruma, koji su

prethodno inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi i centrifugirani na 2000-3000 g 10-20 minuta. Nakon toga mikrotitarska pločica zatvori se folijom i inkubira 30 minuta u termostatiranom mikseru na 37 °C. Nakon inkubacije, pločica se 5 puta ispire puferom za ispiranje, koji se pripravi dodatkom 20 mL koncentriranog pufera za ispiranje u 580 mL destilirane vode. U isprane jažice doda se 50 µL protutijela anti-sVCAM-HRP, pločica se ponovno prekrije folijom i inkubira 30 minuta u termostatiranom mikseru (37 °C). Nakon ove inkubacije pločica se ispire 5 puta puferom za ispiranje. U jažice se potom doda 50 µL TMB supstrata A i 50 µL TMB supstrata B. Pločica se miješa 30 sekundi u termostatiranom mikseru, zatvori folijom te inkubira na 37 °C 15 minuta, pri čemu je potrebno izbjegavati izlaganje svjetlu. Po završetku postupka, u svaku jažicu doda se 50 µL stop otopine i dobro se promiješa. U ovom koraku dolazi do promjene plave boje u žutu. Apsorbancija se mjeri na 450 nm u čitaču mikrotitarskih pločica, VICTOR³Wallac 1420 multilabel counteru unutar 15 minuta nakon dodavanja stop otopine.

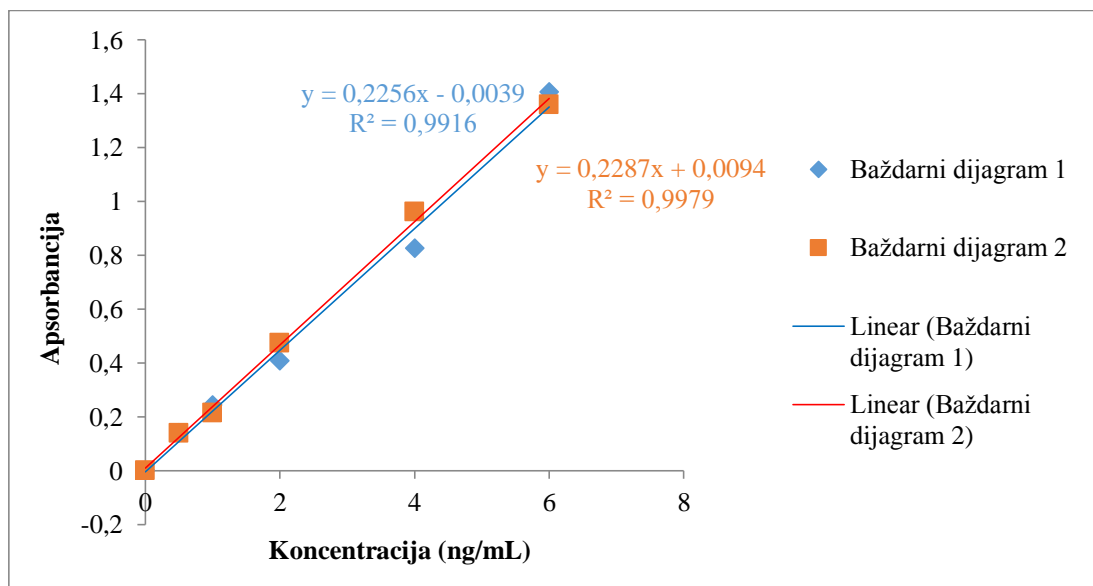
3.5. Statistička analiza

Podatci o ispitanicima prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Iz rezultata određivanja koncentracija adhezijskih molekula u duplikatu izračunata je aritmetička sredina te su dobivene koncentracije topivih adhezijskih molekula za svaki uzorak. Podatci su analizirani pomoću programa SigmaStat 3,0 za Windows/2003, Systat Software, Inc (USA).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati mjerenja koncentracije sICAM-1 adhezijske molekule

Provedenim mjerenjima dobivene su vrijednosti apsorbancija na temelju kojih se odredi koncentracija adhezijskih molekula. Za određivanje koncentracije sICAM-1 adhezijske molekule u uzorcima korišten je baždarni dijagram dobiven na temelju izmjerenih apsorbancija standarda u duplikatu.



Slika 9. Baždarni dijagrami ovisnosti apsorbancije o koncentraciji sICAM-1.

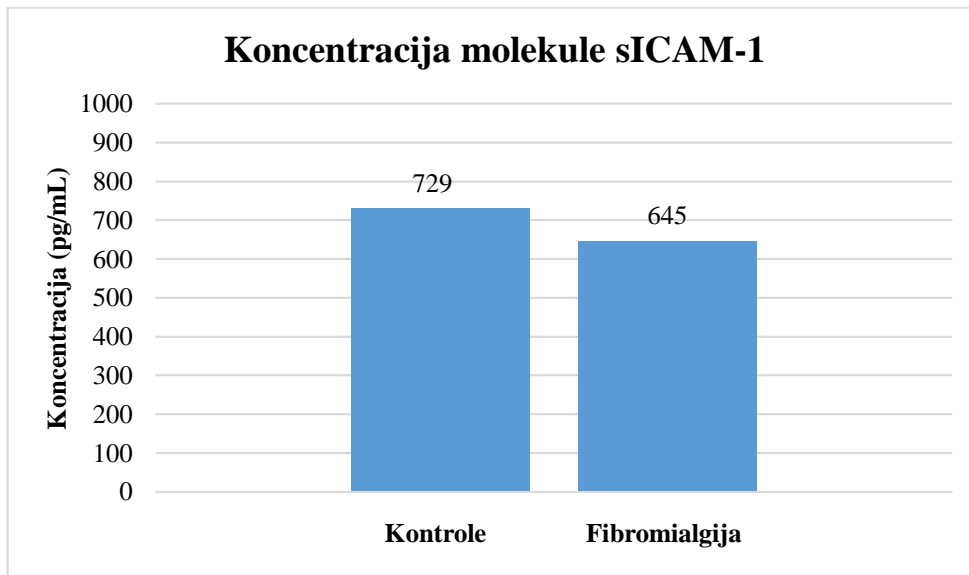
Iz koncentracija sICAM-1 iz dvaju mjerenja izračuna se aritmetička sredina (poglavlje 11. DODATAK). Podatci za svaku skupinu ispitanika analiziraju se odgovarajućim statističkim testovima.

Tablica 1. Rezultati Mann-Whitney testa ($p < 0,001$)

	MEDIJAN	25%	75%
Kontrole	729	671	798
Fibromialgija	645	585	771

T = 1108,000

P = 0,065

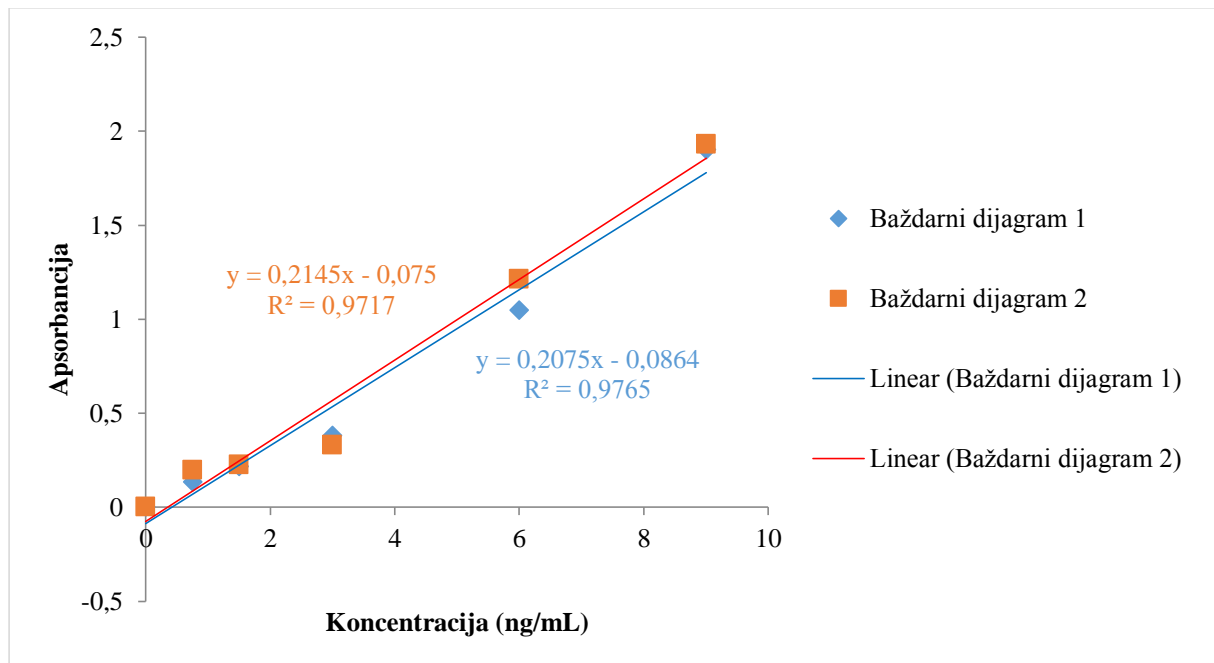


Slika 10. Grafički prikaz izmjerenih koncentracija molekule sICAM-1 za kontrolnu skupinu (zdravi dobrovoljci) i pacijente (fibromialgija) izraženo kao medijan; $p=0,065$.

Koncentracija molekule sICAM-1 u uzorcima seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 645 pg/mL, dok je ta vrijednost u uzorcima zdravih dobrovoljaca viša i iznosi 729 pg/mL. Statistička analiza (Mann-Whitney test) pokazuje da nema statistički značajne razlike između zdravih dobrovoljaca i pacijenata s fibromialgijom ($p=0,065$). Pojedinačne koncentracije sICAM-1 molekule za skupinu osoba koje boluju od fibromialgije prikazane su u Tablici 7., a za skupinu zdravih dobrovoljaca u Tablici 8. (poglavlje 11. DODATAK).

4.2. Rezultati mjerenja koncentracije sVCAM-1 adhezijske molekule

Provedenim mjerenjima dobivene su vrijednosti apsorbancija na temelju kojih se odredi koncentracija adhezijskih molekula. Za određivanje koncentracije sVCAM-1 adhezijske molekule u uzorcima korišten je baždarni dijagram dobiven na temelju izmjerenih apsorbancija standarda u duplikatu.



Slika 11. Baždarni dijagrami ovisnosti apsorbancije o koncentraciji sVCAM-1.

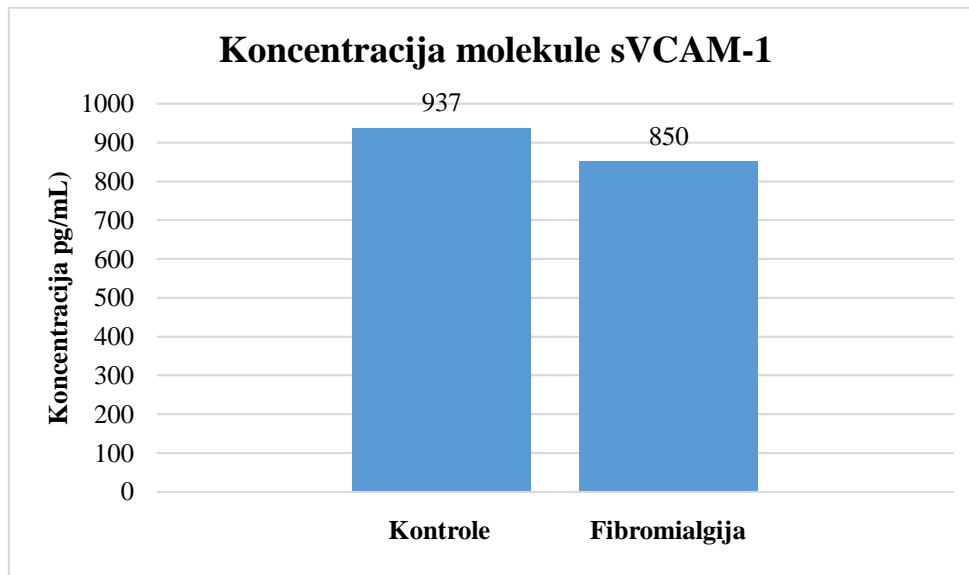
Iz koncentracija sVCAM-1 iz dvaju mjerenja izračuna se aritmetička sredina (poglavlje 11. DODATAK). Podatci za obje skupine ispitanika analiziraju se odgovarajućim statističkim testovima.

Tablica 2. Rezultati Mann-Whitney testa ($p < 0,001$):

	MEDIJAN	25%	75%
Kontrole	937	846	1105
Fibromialgija	850	730	1053

T = 1090,000

P = 0,112



Slika 12. Grafički prikaz izmjerenih koncentracija sVCAM-1 za kontrolnu skupinu (zdravi dobrovoljci) i pacijente (fibromialgija) izraženo kao medijan; $p=0,112$.

Konzentracija molekule sVCAM-1 u uzorcima seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 850 pg/mL, dok je ta vrijednost u uzorcima zdravih dobrovoljaca viša i iznosi 937 pg/mL. Statistička analiza (Mann-Whitney test) pokazuje da nema statistički značajne razlike između zdravih dobrovoljaca i pacijenata s fibromialgijom ($p=0,112$). Pojedinačne koncentracije sVCAM-1 molekule za skupinu osoba koje boluju od fibromialgije prikazane su u Tablici 7., a za skupinu zdravih dobrovoljaca u Tablici 8. (poglavlje 11. DODATAK).

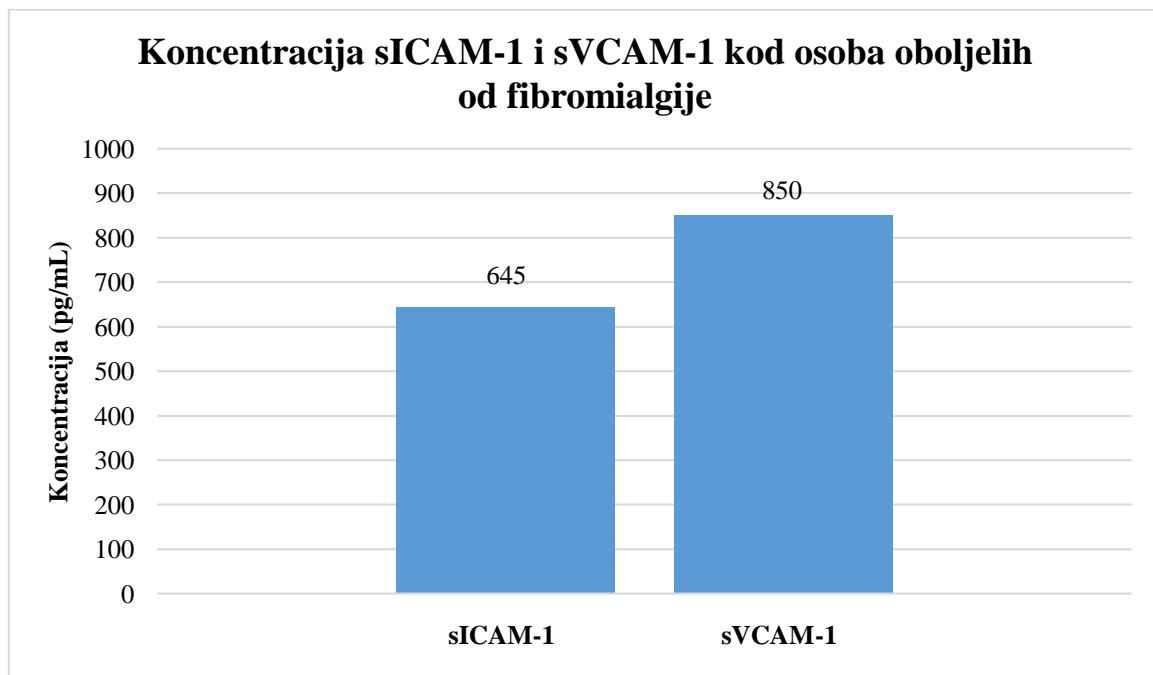
4.3. Usporedni rezultati za osobe koje boluju od fibromialgije

Tablica 3. Rezultati Mann-Whitney testa ($p < 0,001$).

	MEDIJAN	25%	75%
sICAM-1	645	585	771
sVCAM-1	850	730	1053

T = 705,000

P < 0,001



Slika 13. Grafički prikaz izmjerenih koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod osoba oboljelih od fibromialgije izraženo kao medijan; $p = < 0,001$.

Koncentracija molekule sICAM-1 u uzorcima seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 645 pg/mL, dok je vrijednost koncentracije sVCAM-1-u tim uzorcima 850 pg/mL. Spearmanov koeficijent korelacije iznosi 0,729, što ukazuje na statistički značajnu

korelaciju između sICAM-1 i sVCAM-1, $p < 0,001$. Pojedinačne koncentracije sICAM-1 i sVCAM-1 za skupinu osoba koje boluju od fibromialgije prikazane su u Tablici 7. (poglavlje 11. DODATAK)

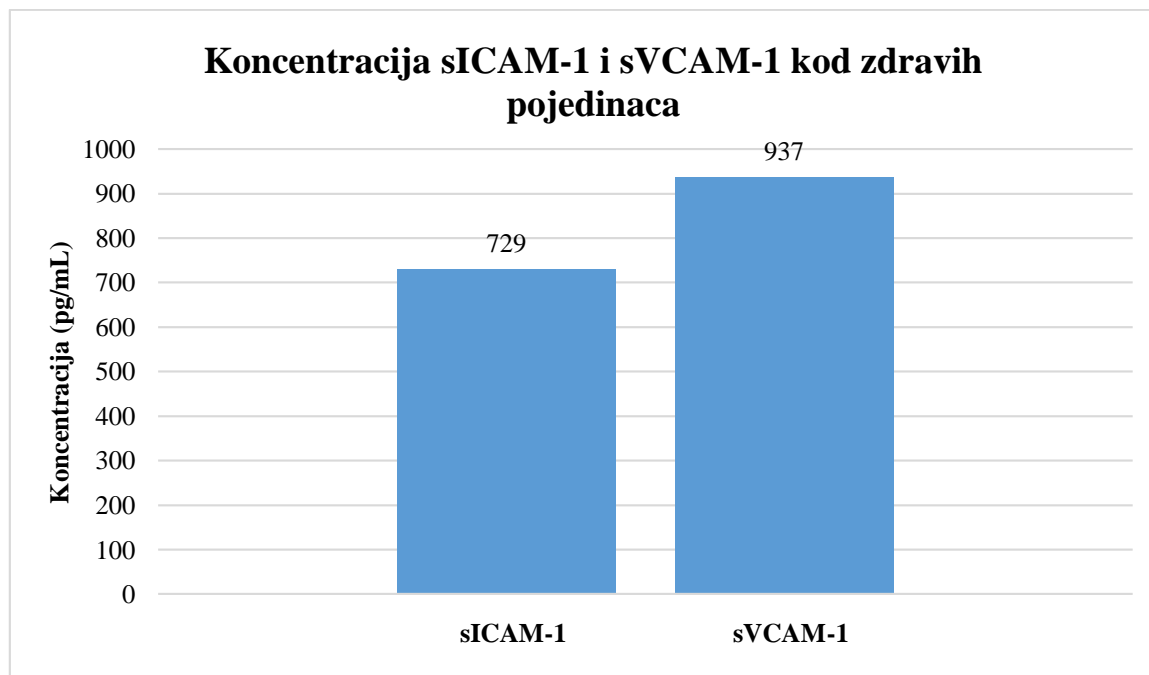
4.4. Usporedni rezultati za zdrave pojedince

Tablica 4. Rezultati Mann-Whitney testa ($p < 0,001$):

	MEDIJAN	25%	75%
sICAM-1	729	671	798
sVCAM-1	937	846	1105

T = 661,000

P < 0,001



Slika 14. Grafički prikaz izmjerenih koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod zdravih pojedinaca izraženo kao medijan; $p < 0,001$.

U sljedećem koraku statistička analiza je pokazala da Spearmanov koeficijent korelacije iznosi 0,315, potvrđujući nepostojanje korelacije između sICAM-1 i sVCAM-1, $p=0,0842$. Pojedinačne koncentracije sICAM-1 i sVCAM-1 molekula za skupinu zdravih pojedinaca prikazane su u Tablici 8. (poglavlje 11. DODATAK)

5. RASPRAVA

Fibromialgija je sindrom kojega karakteriziraju: ukočenost zglobova, kronična bol koštano-mišićnog sustava, kognitivne smetnje, anksioznost, umor te poremećaji sna i raspoloženja. Zbog nepostojanja osnovne organske bolesti i simptoma koji su karakteristični za fibromialgiju, postavljanje ispravne dijagnoze vrlo je teško. Povišene koncentracije sICAM-1 molekula povezuju se s različitim autoimunim, neurološkim i drugim bolestima te upalnim stanjima. Pokazano je kako je kod osoba s reumatoidnim artritisom, koje također pate od kronične boli, povišena serumska koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 molekula (Witkowska i sur., 2004). Također, obje se adhezijske molekule dovode u vezu s različitim upalnim procesima. S ozirom da novije studije naglašavaju ulogu imunskih i upalnih faktora u patofiziologiji fibromialgije (Häuser i sur., 2015), važno je istražiti promjene u serumskim koncentracijama sICAM-1 i sVCAM-1 i tako procijeniti potencijalni značaj ovih topivih adhezijskih molekula za dijagnostiku fibromialgije.

U ovom radu ispitivano je postoje li razlike u koncentracijama sICAM-1 i sVCAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca. Ove su stanične adhezijske molekule odabrane zbog povezanosti njihovih povišenih serumskih koncentracija s različitim autoimunim i upalnim bolestima te s reumatoidnim artritisom, a sve te bolesti karakteriziraju simptomi uočeni i kod fibromialgije.

Obrađeno je 26 uzoraka u skupini osoba oboljelih od fibromialgije (srednje vrijednosti starosti 50,23 godine) te 31 uzorak u skupini zdravih dobrovoljaca (srednje vrijednosti starosti 49,94 godine). U skupini oboljelih od fibromialgije prosječni broj osjetljivih točaka iznosio je 15,38, a trajanje bolesti 14,96 godina. Sve ispitivane osobe bile su ženskog spola. Budući da novije studije ukazuju na moguću ulogu imunskih i upalnih faktora u patofiziologiji fibromialgije (Häuser i sur., 2015), cilj je bio istražiti promjene u serumskim koncentracijama sICAM-1 molekula te ustvrditi imaju li dijagnostički značaj za fibromialgiju. Analizirani uzorci seruma, kako je pokazalo provedeno istraživanje, sadrže topive oblike adhezijskih molekula sICAM-1 i sVCAM-1. Izmjerene koncentracije sICAM-1 u serumu osoba oboljelih od fibromialgije iznosile su 645 pg/mL (izraženo kao medijan), odnosno 729 pg/mL (izraženo kao medijan) kod zdravih pojedinaca. Za sVCAM-1 te su koncentracije iznosile 850 pg/mL

(izraženo kao medijan) za oboljele osobe, odnosno 937 pg/mL (izraženo kao medijan) za zdrave dobrovoljce.

Statističkom analizom uspoređivani su medijani koncentracija sICAM-1 za skupinu pacijenata s fibromialgijom i skupinu zdravih dobrovoljaca. Iako su koncentracije sICAM-1 u skupini osoba s fibromialgijom niže od istih u skupini zdravih dobrovoljaca, ta razlika nije statistički značajna (Mann-Whitney test, $p=0.065$). Medijan koncentracija sVCAM-1 kod osoba oboljelih od fibromialgije niži je od medijana koncentracija sVCAM-1 zdravih dobrovoljaca. Usporedba medijana (Mann-Whitney test) pokazala je da nema statistički značajne razlike između medijana tih dviju ispitivanih skupina ($p=0.112$).

Statistička analiza, Spearmanov test korelacije, pokazala je za uzorke pacijenata s fibromialgijom da između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 adhezijskih molekula postoji korelacija (koeficijent korelacije= $0,729$; $p<0,050$,). U skupini zdravih dobrovoljaca nije ustanovljena korelacija između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 (Spearman-ov koeficijent korelacije= $0,315$; $p=0,0842$).

Sukladno dobivenim rezultatima može se zaključiti da opaženo sniženje koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod osoba oboljelih od fibromialgije u odnosu na zdrave dobrovoljce nije specifično za fibromialgiju. Također, određivanje koncentracije sICAM-1 i sVCAM-1 nema dijagnostičku vrijednost u smislu razlikovanja stanja bolesti od stanja zdravlja. Međutim, s obzirom na veličinu skupina, 26 pacijenata koji boluju od fibromialgije i 31 zdravi dobrovoljac, za konačan zaključak trebalo bi nastaviti ovo istraživanje na većim skupinama pacijenata s fibromialgijom i zdravih dobrovoljaca. U kontekstu značenja topivih oblika adhezijskih molekula potrebno je također napomenuti da bi buduća istraživanja trebala obuhvatiti i membranske oblike adhezijskih molekula ICAM-1 i VCAM-1.

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji topive adhezijske molekule sICAM-1 između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca ($p=0,0065$).
2. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji sVCAM-1 između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca ($p=0,112$).
3. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod osoba oboljelih od fibromialgije ($p<0,001$).
4. Utvrđeno je da postoji korelacija između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod osoba oboljelih od fibromialgije (koeficijent korelacije=0,729; $p<0,050$).
5. Utvrđeno je da ne postoji korelacija između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 kod zdravih pojedinaca ($p>0,050$).

7. ZAHVALE

Veliko hvala cijenjenoj mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju te svim savjetima i pomoći koju nam je pružila tijekom vrijednog iskustva izrade znanstvenog rada. Omogućila nam je stjecanje novih korisnih znanja u području eksperimentalnog rada, kao i u samom pisanju znanstvenih radova, i time uvelike upotpunila naše akademsko obrazovanje.

Također se zahvaljujemo svim zaposlenicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju koji su nam pružili pomoć i ustupili laboratorij za eksperimentalni dio rada, osobito asistentici Andrei Hulini te tehničkoj suradnici Martini Galeković, kao i višem stručnom savjetniku za projekte, dr. sc. Ognjenu Čuliću, koji su izdvojili svoje vrijeme kako bi nam mogli pomoći ili odgovoriti na pitanja.

Zahvaljujemo i dr. sc. Mariu D. Corderu (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Department, Španjolska) na uzorcima koje nam je ustupio.

8. POPIS LITERATURE

Ablin, JN, Cohen H, Buskila D. Mechanisms of disease: genetics of fibromyalgia. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2006, 2, 671–678.

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis A, Tsigris C. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *European Journal of Cancer*, 2001, 37, 2392–2397.

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, Rosenberg T, Diamantis T. Clinical Significance of Serum Levels of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Gastric Cancer Patients. *The American Journal of Gastroenterology*, 2003, 98, 2.

Attia EF, Jolley SE, Crothers K, Schnapp LM, Liles WC. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) Is Elevated in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *PLoS One*, 2016, 11(2).

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

Bennett RM, Jones J, Turk DC, Russell IJ, Matallana L. An internet survey of 2,596 people with fibromyalgia. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2007, 8, 27.

Bidonde J, Busch AJ, Webber SC, Schachter CL, Danyliw A, Overend TJ, et al. Aquatic exercise training for fibromyalgia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014; 2014 (10).

Blann AD, Steele C, McCollum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thrombosis Research*, 1997, 85, 433.

Calandre EP, Rico-Villademoros F, Slim M. An update on pharmacotherapy for the treatment of fibromyalgia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2015, 16(9), 1347-68.

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

Chinn S, Caldwell W, Gritsenko K. Fibromyalgia Pathogenesis and Treatment Options Update. *Current Pain and Headache Reports*, 2016.

Choy EHS. The role of sleep in pain and fibromyalgia. *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 11, 513–520.

Clauw DJ. Fibromyalgia: an overview. *The American Journal of Medicine*, 2009, 122(12), 3-13.

Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, 15, 15(6), 1607–1638.

Coll-Vinent B, Grau JM, Lopez-Soto A, Oristrell J, Font C, Bosch X, Mirapeix E, Urbano-Marquez A, Cid MC. Circulating soluble adhesion molecules in patients with classical polyarteritis nodosa. *British journal of rheumatology*, 1997, 36, 1178.

Cuatrecasas G, Alegre C, Casanueva FF. GH/IGF1 axis disturbances in the fibromyalgia syndrome: is there a rationale for GH treatment? *Pituitary*. 2014, 17(3), 277-83.

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 1993, 141, 223.

Epstein SA, Kay G, Clauw D, et al. Psychiatric disorders in patients with fibromyalgia: a multicenter investigation. *Psychosomatics*. 1999, 40(1):57–63.

Fishbain D. Evidence-based data on pain relief with antidepressants. *Annals of Medicine*, 2000, 32(5), 305–316.

Geenen R, Jacobs JWG, Bijlsma JWJ. Evaluation and management of endocrine dysfunction in fibromyalgia. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2002, 28(2), 389–404.

Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*, 2005, 54(8), 1020-6.

Gowers WR. A lecture on lumbago: its lessons and analogues: delivered at the national hospital for the paralysed and epileptic. *British Medical Journal*. 1904, 1, 117–121.

Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatology*, 2002, 46, 1333–1343.

Gur A, Oktayoglu P. Central nervous system abnormalities in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome: new concepts in treatment. *Current pharmaceutical design*, 2008, 14(13) 1274-94.

Haarmann A, Nowak E, Deiß A, van der Pol S, Monoranu CM, Kooij G, Müller N, van der Valk P, Stoll G, de Vries HE, Berberich-Siebelt F, Buttman M. Soluble VCAM-1 impairs human brain endothelial barrier integrity via integrin α -4-transduced outside-in signalling. *Acta neuropathologica*, 2015, 129(5), 639-52.

Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central μ -opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of Neuroscience*, 2007, 27(37).

Hartung HP, Michels M, Reiners K, Seeldrayers P, Archelos JJ, Toyka KV. Soluble ICAM-1 levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology*, 1993, 43, 2331.

Häuser W, Ablin J, Fitzcharles MA, Littlejohn G, Luciano JV, Usui S, Walitt B. Fibromyalgia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015.

Hayek SM, Shah BJ, Desai MJ, Chelimsky TC. Pain Medicine: An Interdisciplinary Case-Based Approach. *Oxford University Press*, 2015.

Intercellular adhesion molecule 1, 2016., <http://www.uniprot.org/uniprot/P05362>, pristupljeno 15. 4. 2016.

Jones GT, Atzeni F, Beasley M, Flüß E, Sarzi-Puttini P, Macfarlane GJ. The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. *Arthritis and Rheumatology*, 2015, 67(2), 568-75.

Joseph PD, Eling T, Mason RP. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257, 3669- 3675.

Kiener H, Graninger W, Machold K, Aringer M, Graninger WB. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*, 1994, 12, 483.

Lawry GV. Systematic Musculoskeletal Examinations, Lange series, 2011.

Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 2009, 61, 22–32.

Li YH, Wang FY, Feng CQ, Yang XF, Sun YH. Massage therapy for fibromyalgia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 2014, 20, 9.

Liu YZ, Chen B, She XD. A clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 1998, 4, 225.

Luo J, Wang W, Xi Z, Chen D, Wang L, Xiao Z, Wang X. Concentration of Soluble Adhesion Molecules in Cerebrospinal Fluid and Serum of Epilepsy Patients. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, 54, 4, 767-773.

Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of metalloprotease. *Glia*, 1998, 22, 103.

Martelletti P, Stirparo G, Morrone S, Rinaldi C, Giacobazzo M. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), soluble ICAM-1 and interleukin-4 by nitric oxide expression in migraine patients. *Journal of Molecular Medicine*, 1997, 75, 448.

Mrowka C, Sieberth HG. Circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in systemic vasculitis: marked differences between Wegener's granulomatosis and systemic lupus. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994, 72(10), 762-8.

Nebraska Redox Biology Center Educational Portal,
http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/hp.html, 2016.

PathScan® Sandwich ELISA, 2016., http://www.cstj.co.jp/ddt/elisa_line.php, pristupljeno 20. 4. 2016.

Peter K, Weirich U, Nordt TK, Ruef J, Bode C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, 82, 1, 38-43.

Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis*, 2004, 172, 299–308.

Robbins, Cotran. Pathologic Basis of Disease, Elsevier, 2010.

Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg, F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 1992, 35, 550–556.

Schwarz MJ, Riedel M, Ackenheil M, Müller N. Decreased levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in unmedicated and medicated schizophrenic patients. *Biological Psychiatry*, 2000, 47, 29.

Si MY, Fan ZC, Li YZ, Chang XL, Xie QD, Jiao XY. The prognostic significance of serum and cerebrospinal fluid MMP-9, CCL2 and sVCAM-1 in leukemia CNS metastasis. *Journal of neuro-oncology*, 2015, 122(2), 229-44.

Skrabek RQ, Galimova L, Ethans K, Perry D. Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. *The journal of pain*, 2008, 9(2), 164-73.

Stefanović MP, Petronijević N, Dunjić-Kostić B, Velimirović M, Nikolić T, Jurišić V, Lačković M, Damjanović A, Totić-Poznanović S, Jovanović AA, Ivković M. Role of sICAM-1 and sVCAM-1 as biomarkers in early and late stages of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 2016, 73, 45-52.

Stival RS, Cavalheiro PR, Stasiak CE, Galdino DT, Hoekstra BE, Schafranski MD. Acupuncture in fibromyalgia: a randomized, controlled study addressing the immediate pain response. *The Brazilian Journal of Rheumatology*, 2014, 54, 431–436.

Škerk V. Povezanost ventrikulske tahikardije i endotelne disfunkcije u bolesnika s koronarnom bolešću. *Središnja medicinska knjižnica*, 2011.

Šimundić AM. Struktura i funkcija adhezijskih molekula. Uloga adhezijskih molekula u aterogenezi. *Biochemia Medica*, 2001, 1-2.

Tchalla AE, Wellenius GA, Sorond FA, Trivison TG, Dantoine T, Lipsitz LA. Elevated circulating vascular cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) is associated with concurrent depressive symptoms and cerebral white matter Hyperintensities in older adults. *BCM Geriatrics*, 2015, 15, 62.

Thomas SA, Knight L, Balian A. Treatment of Fibromyalgia Pain. *U. S. Pharmacist*, 2016, 41(3), 51-54.

Uçeyler N, Häuser W, Sommer C. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2011, 12, 245.

Uçeyler N, Sommer C, Walitt B, Häuser W. Anticonvulsants for fibromyalgia. A meta-analysis of various anticonvulsant agents for use towards fibromyalgia symptoms. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2013, 2013(10).

Vascular cell adhesion protein 1, 2016., <http://www.uniprot.org/uniprot/P19320>, pristupljeno 15. 4. 2016.

Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Communication and Adhesion*, 1995, 3, 283.

Wang L, Ding Y, Guo X, Zhao Q. Role and mechanism of vascular cell adhesion molecule-1 in the development of rheumatoid arthritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 2015, 10(3), 1229–1233.

Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *European Cytokine Network*, 2004, 15, 2, 91–98.

Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, et al. The American College of Rheumatology 1990. Criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and Rheumatism*, 1990, 33(2), 160–172.

Wolfe F. New American College of Rheumatology criteria for fibromyalgia: a twenty-year journey. *Arthritis Care and Research*, 2010, 62(5), 583–584.

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. *Journal of Rheumatology*, 2011, 38(6), 1113-1122.

Woolf, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 2011, 152, S2–S15.

9. SAŽETAK

Novije studije ukazuju na moguću povezanost povišenih koncentracija topivih oblika adhezijskih molekula (sICAM-1 i sVCAM-1) i različitih autoimunih, neuroloških i upalnih bolesti, što je potaknulo ovo istraživanje. Istraživanje je obuhvatilo određivanje koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 molekula u serumu osoba oboljelih od fibromialgije (26) te u kontrolnoj skupini (zdravi dobrovoljci, 31). Za određivanje koncentracije topivih adhezijskih molekula sICAM-1 i sVCAM-1 korišteni su komercijalno dostupni imunokemijski ELISA testovi. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama topivih oblika adhezijskih molekula između skupine pacijenata s fibromialgijom (medijan sICAM-1=645 pg/mL, medijan sVCAM-1=850 pg/mL) i zdravih dobrovoljaca (medijan sICAM-1=729 pg/mL, medijan sVCAM-1=937 pg/mL). Međutim, uočena je razlika u korelaciji. U serumu osoba oboljelih od fibromialgije postoji korelacija između koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1 (Spearmanov koeficijent korelacije=0,729; $p < 0,050$). Rezultati ovog istraživanja mogu služiti kao osnova za daljnja istraživanja koja bi obuhvatila veći broj ispitanika te uključila i netopive oblike ovih adhezijskih molekula.

Ključne riječi: fibromialgija, sICAM-1, sVCAM-1

10. SUMMARY

Recent studies have revealed a possible connection between increased concentrations of soluble cell adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and various autoimmune, neurological and inflammatory diseases. The above mentioned findings have stimulated this research, which would determine concentrations of those molecules in a serum of people suffering from fibromyalgia (26) and in serum of healthy individuals (control group, 31). Concentrations have been measured using commercially available ELISA kits. Data analysis has shown that there is no statistically significant difference in concentrations of soluble adhesion molecules between the group of people suffering from fibromyalgia (median sICAM-1=645 pg/mL, median sVCAM-1=850 pg/mL) and the control group (median sICAM-1=729 pg/mL, median sVCAM-1=937 pg/mL). However, a difference in correlation has been found. In the serum of people suffering from fibromyalgia there is a correlation between concentrations of sICAM-1 and sVCAM-1 (Spearman correlation coefficient=0.729; $p<0.050$). Results of this research could be a base for further research which would include more subjects, as well as insoluble forms of cell adhesion molecules.

Keywords: fibromyalgia, sICAM-1, sVCAM-1

11. DODATAK

Tablica 5. Prikaz podataka za pojedine ispitanike koji boluju od fibromialgije.

Oznaka	Spol	Dob (godine)	Broj osjetljivih točaka	Trajanje bolesti (godine)
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
F15	Ž	64	11	32
F16	Ž	44	12	4
F17	Ž	30	13	11
F20	Ž	50	11	11
F21	Ž	56	18	32
F22	Ž	31	18	2,5
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

Tablica 6. Prikaz podataka za pojedine kontrolne uzorke.

Oznaka	Spol	Dob (godine)
K1	Ž	51
K2	Ž	55
K3	Ž	54
K4	Ž	43
K5	Ž	56
K6	Ž	55
K8	Ž	58
K9	Ž	54
K10	Ž	44
K11	Ž	54
K12	Ž	44
K13	Ž	52
K14	Ž	53
K15	Ž	44
K16	Ž	53
K17	Ž	45
K19	Ž	54
K20	Ž	44
K21	Ž	45
K22	Ž	59
K24	Ž	46
K25	Ž	46
K26	Ž	54
K28	Ž	47
K29	Ž	55
K30	Ž	40
K31	Ž	48
K32	Ž	40
K33	Ž	60
K34	Ž	48
K35	Ž	47

Tablica 7. Prikaz rezultata mjerenja za pojedine ispitanike koji boluju od fibromialgije.

Oznaka	sICAM-1 (pg/mL)	sVCAM-1 (pg/mL)
F1	588,25	738,69
F2	684,05	741,38
F3	718,34	726,85
F4	1306,76	1683,74
F5	1091,18	1496,82
F6	583,89	985,83
F8	605,15	1060,36
F9	713,10	1031,41
F11	528,51	701,16
F12	12985,70	23936,10
F15	552,96	724,27
F16	587,32	727,21
F17	645,31	727,01
F20	679,32	1143,66
F21	645,81	953,93
F22	649,39	899,35
F24	612,89	879,38
F25	795,35	761,28
F26	588,38	758,66
F27	603,72	853,64
F28	1136,89	1536,19
F29	601,60	744,02
F30	3713,69	3997,33
F31	772,90	810,37
F33	766,78	850,27
F34	25653,70	18899,90

Tablica 8. Prikaz rezultat mjerenja za pojedine kontrolne uzorke.

Oznaka	sICAM-1 (pg/mL)	sVCAM-1 (pg/mL)
K1	729,58	1290,39
K2	755,81	1121,05
K3	728,93	994,43
K4	876,54	893,55
K5	16408,30	24867,00
K6	717,09	1427,56
K8	774,21	677,79
K9	688,40	812,95
K10	846,11	937,21
K11	744,65	873,80
K12	897,18	962,84
K13	826,96	1295,78
K14	786,62	1068,72
K15	483,42	876,55
K16	667,08	767,15
K17	693,33	692,54
K19	625,73	890,56
K20	2442,12	3008,63
K21	713,28	1370,97
K22	707,61	807,21
K24	531,32	899,93
K25	739,78	836,41
K26	1068,85	726,63
K28	802,21	1117,54
K29	694,58	994,27
K30	564,37	1054,71
K31	638,45	1042,95
K32	742,65	879,49
K33	683,85	960,20
K34	597,30	885,01
K35	508,74	772,92

12. ŽIVOTOPISI

12.1. Isabella Koprivec

Isabella Koprivec rođena je 8.11.1994. godine u Čakovcu. Završila je Gimnaziju Josipa Slavenskog Čakovec. Tijekom školovanja sudjelovala je u organizaciji raznih projekata kao što su „Grandma's Apples“, pobjednički projekt World Wildlife Fund (WWF) inicijative ESFALP i „International science competition“, projekt u organizaciji Gimnazije Čakovec, Gimnazije Franca Miklošića Ljutomer i Gimnazije Kolcsey Ferenc Zalaegerszeg. Upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet 2013. godine, a trenutno je studentica treće godine. Iste godine dobila je i nagradu zaklade Adris za najbolji ukupni rezultat na državnoj maturi u Republici Hrvatskoj. Od upisa do danas članica je Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije. Pristupila je izradi ovog rada zbog velikog interesa za područje biomedicine te zbog želje za stjecanjem novih znanja i iskustava u znanstveno-istraživačkom radu.

12.2. Josipa Korman

Josipa Korman rođena je 19.11.1994. godine u Našicama. Završila je Srednju školu Isidora Kršnjavoga, prirodoslovno-matematički smjer. 2013. godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu kao peta na upisnoj listi, a trenutno je studentica treće godine. Također, 2015. je pohađala i položila završni ispit CEEPUS međunarodne ljetne škole u Portorožu (Slovenija). Aktivna je članica CPSA-e (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske) te je sudjelovala u organizaciji 2. Kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (2015.g.). Studij farmacije upisala je zbog velikog interesa za kemiju i područje biomedicinskih znanosti. Pristupila je izradi ovog rada zbog želje za stjecanjem iskustva u biomedicinskom istraživanju i dijagnostici.