

LATVIJAS UNIVERSITĀTES
RAKSTI

735. SĒJUMS

Medicīna

SCIENTIFIC PAPERS
UNIVERSITY OF LATVIA

VOLUME 735

Medicine

SCIENTIFIC PAPERS
UNIVERSITY OF LATVIA

VOLUME 735

Medicine

Latvijas Universitāte

LATVIJAS UNIVERSITĀTES
RAKSTI

735. SĒJUMS

Medicīna

UDK 61(082)
Me 082

Galvenā redaktore *Dr. habil. med. prof. Renāte Ligere*

Redkolēģija

- Dr. habil. med. asoc. prof. Igors Aksiks* (LU Medicīnas fakultāte)
Ph. D. prof. Pēteris Alberts (Zviedrija)
Dr. habil. med. Juris Bērziņš (Rīgas Austrumu slimnīca, Onkoloģijas centrs)
Ph. D. prof. Irje Kollans (Somija, Turku Universitāte)
Dr. habil. biol. prof. Ruta Muceniece (LU Medicīnas fakultāte)
Ph. D. prof. Zaiga Priede-Kalniņš (ASV)
Dr. habil. biol. prof. Nikolajs Sjakste (LU Medicīnas fakultāte)
Dr. habil. med. prof. Immanuels Taivans (LU Medicīnas fakultāte)
Dr. habil. med. prof. Uldis Vikmanis (LU Medicīnas fakultāte)
Dr. habil. med. prof. Aija Žileviča (LU Medicīnas fakultāte)

Literārās redaktors: **Ieva Plauma, Gita Bērziņa, Māra Anteniške**
Maketu veidojis **Jānis Misiņš**

Visi krājumā ievietotie raksti ir recenzēti.
Pārpublicēšanas gadījumā nepieciešama Latvijas Universitātes atļauja.
Citējot atsauksme uz izdevumu obligāta.

ISSN 1407-2157
ISBN 978-9984-825-52-6

© Latvijas Universitāte, 2008

Satura rādītājs

Igors Aksiks, Rodrigo Sveržickis

Kraniālo nervu mikrovaskulāras dekompresijas 22 gadu pieredze / A 22-year
Period of Experience with Microvascular Decompression (MVD)
of the Cranial Nerves 7

Edgars Bodnieks, Aldis Puķītis, Juris Pokrotnieks

Malnutrīcijas cēloņu analīze pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām /
Malnutrition Analysis in Patients with Inflammatory Bowel Disease 19

Kristīne Geldnere, Dace Māliņa, Dace Spilnere, Arta Balode, Pēteris Ošs, Uga Dumpis

Ar plaušu mākslīgo ventilāciju asociētās pneimonijas Intensīvās terapijas
nodaļā Latvijā / *Ventilator-Associated Pneumonia in the Latvian*
Multidisciplinary Intensive Care Unit 36

Inese Kolontaja, Ināra Ančupāne

Mikroorganismu ietekme uz atopiskā dermatīta klīnisko gaitu, alerģizāciju
un dzīves kvalitātes līmeni / *Impact of Different Microorganisms*
on Clinical Progress, Allergisation, and Quality of Life in Atopic
Dermatitis Patients 43

Alvils Krams, Guntars Mauriņš, Baiba Simsons, Andra Cīrule

Tuberkulozu un bakteriālu spondilītu klīniskā norise un diferenciālā
diagnostika / *Clinical Course and Differential Diagnosis of Spondylitis*
of Tuberculous and Bacterial Aetiology 51

Normunds Legzdīņš, Tatjana Sjakste, Nikolajs Sjakste

Pie DNS cieši saistītie proteīni / *The DNA Tightly-Bound Proteins* 64

Iveta Mintāle, Andrejs Ērglis

Mērķtiecīgas pacientu pārbaudes programmas nozīme koronārās sirds
slimības ārstēšanā / *Importance of the Follow-up Programme for*
Patients with Coronary Artery Disease 71

Ruta Muceniece, Kristīne Vrubļevska, Reinis Vilšķersts, Una Riekstiņa, Rūdolfs Mežapuķe, Olga Žarkova, Jānis Ancāns, Maija Dambrova

Melanokortīnu saistīšanās pie γ -aminosviestskābes receptoriem peļu
smadzenēs / *Binding of Melanocortins to γ -aminobutyric Acid Receptors*
in Mice Brain 77

Ilva Nakurte, Ilze Plinte, Pēteris Mekšs, Žanete Zvirbule, Agnese Sudraba, Ivars Tolmanis, Aija Line, Uldis Vikmanis, Viesturs Boka, Mārcis Leja

Development and Validation of the HPLC Method for the Determination
of Paclitaxel Concentration in Human Serum / *AEŠH (augstefektīvās*
šķidrumu hromatogrāfijas) metodes izstrāde un validācija paklitaksela
koncentrācijas noteikšanai cilvēka asins serumā 84

Isabella Yaroslavsky, Valdis Pīrāgs	
Comparison of Pre-Operative Diagnostics and Outcomes of Surgery in Patients with Primary Hyperparathyroidism in Two University Hospitals in Israel and Latvia / <i>Primārās hiperparatireozes preoperatīvās diagnostikas un ķirurģiskās ārstēšanas rezultātu salīdzinājums divās universitātes slimnīcās Izraēlā un Latvijā</i>	93
Una Riekstiņa, Ruta Muceniece, Inese Čakstiņa, Jānis Ancāns	
Cilvēka ādas cilmes šūnu iegūšana un pavairošana <i>in vitro</i> / <i>Isolation and Propagation of Human Skin Stem Cells in vitro</i>	107
Evita Salna, Karīna Siliņa, Jeļena Šaripova, Aija Linē, Nikolajs Sjakste	
Kvercetiņa un kemferola ietekme uz iNOS ekspresiju kontroles un LPS inducēta iekaisuma gadījumā Wistar līnijas žurku aknās / <i>Effect of Quercetin and Kaempferol on iNOS Expression in Control and LPS-Induced Inflammation Cases in the Liver of Wistar Line Rats</i>	114
Gunta Tīcmane, Jānis Jirģensons	
Management of Risk Factors for Hypertension in a Family Practice in a Rural Area of Latvia / <i>Hipertensija un tās riska faktoru apzināšana ģimenes ārsta praksē vienā no Latvijas lauku rajoniem</i>	123
Aija Žileviča, Rita Treimane	
Nosocomial Infections. Etiology of Surgical Site Infection / <i>Nozokomiālās infekcijas. Brūču infekcijas izraisītāji</i>	130
Olga Utehina, Sergejs Popovs, Dace Puriņa, Lāsma Koškina, Ilga Vēvere, Dzintars Emziņš, Juris Bērziņš	
Staru terapijas komplikāciju attīstība pēc krūts vēža ārstēšanas: radiobioloģiskie aspekti / <i>Development of Radiation Therapy Complications after Breast Cancer Treatment: Radiobiological Aspects</i>	136
Mārcis Leja, Žanete Zvirbule, Agnese Sudraba, Ilva Nakurte, Ilze Plinte, Pēteris Mekšs, Ivars Tolmanis, Viesturs Boka, Uldis Vikmanis	
Liver Function as Determined by ¹³ C Methacetine Breath Test Following the Admission of Paclitaxel-based Chemotherapy / <i>Ar ¹³C metacetīna elptestu noteikta aknu funkcija pacientēm pēc paklitakselu saturošas ķīmijterapijas</i>	151
Jurijs Markovs, Sergejs Isajevs, Baiba Rozentāle, Gundega Knipše, Darja Svirina	
The EMT Phenomenon: Special Emphasis on Analysis of Hepatic Fibrosis and Hemosiderosis / <i>EMT fenomēns aknu fibrozes un hemosiderozes apstākļos</i>	157
Aksels Rībenis, Igors Aksiks, Justus Kleine, Peter A. Winkler	
Intraoperatīva un ekstraoperatīva galvas smadzeņu garozas stimulācija un tās loma epilepsijas ķirurģijā / <i>Intraoperative and Extraoperative Cortical Stimulation and Its Role in Epilepsy Surgery</i>	169

Kraniālo nervu mikrovaskulāras dekompresijas 22 gadu pieredze *A 22-year Period of Experience with Microvascular Decompression (MVD) of the Cranial Nerves*

Igors Aksiks, Rodrigo Sveržickis

Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca

Pilsoņu iela 13, Rīga, LV-1002

E-pasts: igors.axix@stradini.lv; sverzickis@inbox.lv

Galvas smadzeņu nervus mugurējā bedrē no smadzeņu stumbra līdz pamatnes kaulu atverēm var ietekmēt asinsvadi, izraisot dažādus patoloģiskus sindromus. Visbiežāk šie sindromi var izpausties kā trigemināla neiralģija (TN), glosofaringeāla neiralģija (GN), hemifaciāla spazma (HS), tinnīts, kūlīša galvassāpes (KG), torticollis un esenciāla arteriāla hipertensija (EH). Izmantojot mugurējās bedres eksplorāciju, 432 pacientiem ar minētajām kraniālās rizopātijas formām tika veikta nerva saknītes mikrovaskulāra dekompresija (MVD), sākot no 1985. gada.

Nervus komprimējošie asinsvadi tiek mobilizēti no attiecīgās nerva saknītes (*n.trigeminus*, *n.facialis* u. c.) ieejas-izejas zonas smadzeņu stumbrā un imobilizēti ar bioloģiski inertu starpliku. Operētie pacienti bija vecumā no 17 līdz 92 gadiem (vidēji 58 gadi). Novērošanas laiks – no 1 līdz 22 gadiem pēc operācijas.

Darbā iegūtie agrīnie un vēlīnie rezultāti liecina par labu minimāli invazīvai neiroķirurģijai, kur vadošā ir rizopātisko kraniālo nervu MVD. Pacienti ar trigeminālo neiralģiju no sejas sāpēm tika atbrīvoti 92,4% gadījumu, bet vēlākā periodā šādu pacientu skaits samazinājās līdz 85%. Sāpes saglabājās, ja pirms MVD ir veikta kāda nerva ablatīva ārstēšana. Glosofaringeālās neiralģijas gadījumos operācijas efekts palika noturīgs visiem pacientiem, ar hemifaciālajām spazmām pilns operācijas efekts tika novērots 66% pacientu, bet tā recidīvs bija 6% pacientu pirmajos divos gados. Pacientiem ar kūlīša galvassāpēm operācija bija efektīva tikai agrīnā periodā, tinnīta slimniekiem (ar vertigo) tika veikta sekmīga MVD trijos gadījumos, bet esenciālas arteriālas hipertensijas slimniekiem 83% gadījumu arteriālais spiediens normalizējās, taču ne ilgāk par 1 gadu. Torticollis slimniekiem *accessorius* nerva mikrodekompresijas operācijas bija efektīvas 31% pacientu, galvenokārt tiem, kuriem bija horizontālā torticollis forma.

TN, GN, HS un tinnīta slimniekiem MVD ir izvēles ārstēšanas metode, ko var rekomendēt pirms nerva destrukcijas operācijām. Rizotomija ir indicēta tehniski neiespējamai MVD vai iepriekš veiktām nerva destrukcijām. Ilgtermiņā MVD operācija ir mazāk efektīva atipiskas trigeminālas neiralģijas, kūlīša galvassāpju, esenciālas arteriālas hipertensijas un torticollis anteroretrocollis formām.

Atslēgvārdi: mugurējā bedre, kraniālie nervi, smadzeņu stuburs, kraniāla rizopātijā, neirovaskulārs konflikts, mikrovaskulārā dekompresija.

Ievads

Kraniālo rizopātiju ķirurģiskā ārstēšana var būt divējāda: pirmkārt – simptomātiska ārstēšana, kas notiek jau vairāk nekā 100 gadus un ir reducējama uz nerva destrukciju, ko pavada tā pilns anatomisks un funkcionāls bojājums; otrkārt – patoģenētiskā ārstēšana, kad slimības dēļ bojātais nervs tiek izārstēts, atjaunojot tā normālu funkciju un vienlaikus saglabājot arī anatomisko veselumu.

20. gadsimta 30. gados *n.trigeminus* vaskulāru bojājumu mugurējā bedrē trigeminālās neiralģijas gadījumos pirmais pētīja ievērojamais ASV neiroķirurgs Dendijs (*Dandy*) (7). Kraniālo nervu (*n.trigeminus* un *n.facialis*) neirovaskulāra konflikta teorija no jauna tika izteikta jau 20. gadsimta 50. gados, kad neiroķirurģijā sāka izmantot optiku (9). Pēc desmit gadiem ASV neiroķirurgs Džaneta (*Jannetta*) (11), operējot ar jaudīgāku operācijas mikroskopu, spēja pierādīt neirovaskulārā konflikta esamību TN un HS gadījumos, iegūstot arī labu klīnisko rezultātu. Diemžēl vēl vairākus gadu desmitus zinātnieki bija skeptiski pret neirovaskulārā konflikta teoriju TN un HS ārstēšanā un, protams, citām kraniālo rizopātiju formām. Tādēļ Džanetas operācijām 1985. gadā (tās bija pirmās šāda veida operācijas bij. PSRS) bija liela zinātnieku un konservatīvo ārstu pretestība. Izmantojot tolaik moderno DT un diagnostisko elektroneirofizioloģisko aparatūru, operācijas mikroskopu (ar dokumentēšanas iespējām), autoriem ar MVD operācijām izdevās apstiprināt un papildināt ASV zinātnieku teoriju, ka TN, HS un GN slimību pamatā ir smadzeņu stumbra nervu saknītes ieejas-izejas zonas kompresija (1, 4, 11, 12).

P. Stradiņa KUS kraniālo nervu MVD ķirurģiskā metode tika uzsākta 1985. gadā un attīstīta autonomi, bez apmācības vai tiešas metodes pārņemšanas no citas klīnikas.

Mūsdienās kraniālo rizopātiju patofizioloģiju izskaidro neirofizioloģiskā teorija, kuru raksturo aterosklerozes asinsvadu elongēšanās, sākumā irritējot nerva saknīti, bet vēlāk radot tās demielinizāciju un izraisot izkropļotu vadāmību. Nerva saknītē attīstās ephaptiska transmisija no lielajām daļēji demielinizētām A šķiedrām uz tievākām mielinizētām A-delta un C (nociceptīvām) šķiedrām.

Rakstā ir apkopoti un analizēti trigeminālās neiralģijas, glosofaringeālas neiralģijas, kūlīša galvassāpju, tinnīta, hemifaciālas spazmas, esenciālas arteriālas hipertensijas un torticollis ķirurģiskās ārstēšanas pieredze.

Materiāls un metodes

Laika periodā no 1985. līdz 2007. gadam Igors Aksiks klīnikā ir veicis 432 mikrovaskulāras operācijas pacientiem ar dažādām kraniālo nervu rizopātiju formām. Pacientu pārbaudes laiks bija 1–20 gadi, vecums – 17–92 gadi (vidēji – 58,01). Informāciju par pacientiem sk. 1. tabulā.

Lai verificētu iespējamo neirovaskulāro konfliktu pacientiem, kuriem kraniālā rizopātija ilgusi vismaz vienu gadu, tika veikta elektrofizioloģiskā nerva vadāmības pārbaude (izraisītie potenciāli), kā arī MR mērķtiecīgai saknītes neirovaskulāras kompresijas verifikācijai. Pacientiem, kuriem bija kāda no kraniālās rizopātijas

formām, veica DT un MR, lai izslēgtu tilpuma procesu galvā (audzējs, AVM, aneirisma u. c.).

1. tabula

432 kraniālo rizopātiju mikrovaskulāras operācijas
Characteristics of 432 MVD surgical procedures of cranial rhizopathy

Rizopātijas forma	Op. skaits	Op. uzsākšanas gads	Vid. vecums	Vīr./Siev.
Trigemināla neiralģija	330	1985.	64,2	144 / 186
Glosofaringeāla neiralģija	19	1986.	59,4	7 / 12
Kūlīša galvassāpes	9	1988.	62,2	6 / 3
Tinnīts & Menjēra slimība	3	1999.	60,6	0 / 3
Hemifaciālā spazma	39	1985.	51,5	17 / 28
Esenciāla hipertensija	6	2000.	48,3	4 / 2
Torticollis	26	1986.	40,2	16 / 10

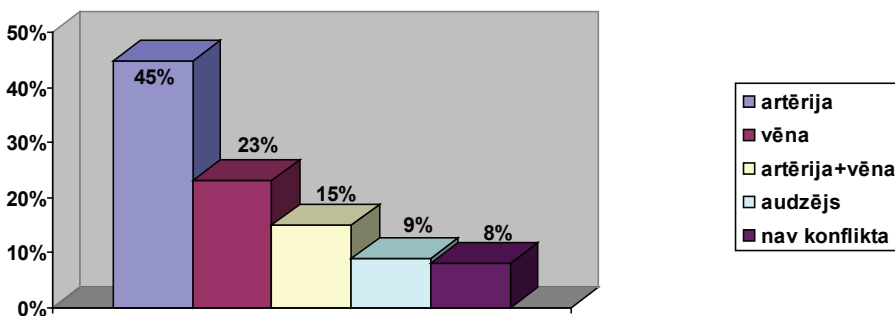
Visas operācijas pacientiem tika veiktas vispārējā anestēzijā guļus stāvoklī uz sāniem, veicot kraniotomiju slimības pusē ar mugurējās bedres eksplorāciju (torticollis pacientiem – arī ar C1 lociņa rezekciju). Pēc neirovaskulārā konflikta verificācijas tika izdarīta nerva komprimējošā asinsvada transpozīcija un imobilizācija ar teflona materiālu (bioloģiski inerts), bet mazākās vēnas koagulēja un šķēla, vai arī veica kāda konkrēta nerva PSR (parciāla sensora rizotomija).

Rezultāti

Visvairāk operēti slimnieki ar **trigeminālu neiralģiju** (330), jo tā ir visizplatītākā no rizopātijām (gadījumu skaits gadā 4/100 000). Operatīvā atradne, eksplorējot pontocerebelāro leņķi TN pacientiem, parādīta 2. tabulā.

2. tabula

Intraoperatīvā atradne 330 trigeminālās neiralģijas pacientiem
Intraoperative findings in 330 patients with trigeminal neuralgia

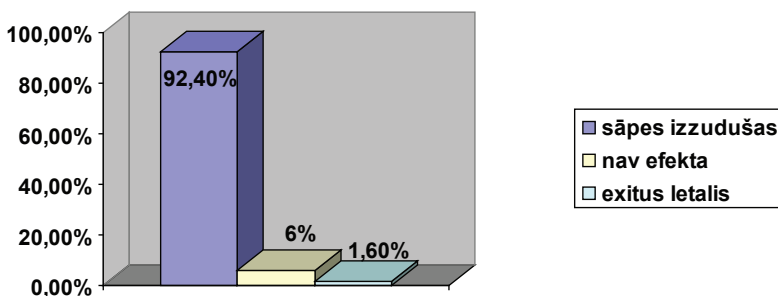


274 (83%) gadījumos acīmredzams un pārliecinošs neurovaskulārs konflikts bija arteriālas vai venozas ģenēzes (*v.petrosa sup.* vai *v.petrosa inf.*), kuru bija iespējams likvidēt ar MVD. Arteriāla kompresija ar *a.cerebelli sup.* visbiežāk tika novērota 145 (44%) gadījumos, kas klīniski parasti izpaudās ar trigeminālā nerva 3. (arī 3. un 2.) zara neiralģiju. *A.cerebelli inf. ant.* (6%) biežāk bija iemesls 1. zara neiralģijai. Citos gadījumos sāpju iemesls 2. un 3. zaram (reizēm kopā ar 1. zaru) bija elongēta aterosklerotiska *a.basilaris* (3%) vai arī tā kombinācija ar kādu mazāku artēriju (piem., *a.trigeminalis*) vai vēnu, saspiežot nerva saknīti t. s. *sendviča* veidā (4%). Operācijas taktiku katrā konkrētā gadījumā noteica operācijas atradne un sāpju klīnika (tipiska vai netipiska TN) vai arī iepriekš veiktās ķirurģiskās manipulācijas. Tādēļ ¼ veikto MVD bija nepieciešams kombinēt ar PSR. 30 (9%) gadījumos trijzaru nervu komprimēja neliels audzējs (neirinoma, meningeoma vai epidermoīds) kombinācijā ar kādu smadzenīšu artēriju. 26 (8%) gadījumos tilta leņķa eksplorācija bija bez neurovaskulārā konflikta atradnes, divos gadījumos tie bija pacienti ar multiplo sklerozi. Šiem pacientiem tika veikta nerva PSR.

Pēcoperācijas agrīnie rezultāti (sk. 3. tabulu) rāda, ka 305 (92,4%) gadījumos ir panākts labs klīniskais efekts ar sāpju izzušanu. 20 (6%) pacientiem, kuriem bija atipiskas TN simptomi, sāpes ātri atjaunojās vai saglabājās. 5 (1,6%) pacienti pēc operācijas mira no plaušu artērijas trombolijas (3) un hemorāģiskā insulta (2).

3. tabula

Agrīnie operāciju rezultāti 330 trigeminālās neiralģijas pacientiem
Early results after MVD in 330 patients with trigeminal neuralgia



Pēcoperācijas vēlīnie rezultāti (sk. 4. tabulu) tika pētīti 292 pacientiem 2 līdz 10 gadus (dažos gadījumos līdz pat 22 gadiem) pēc operācijas. Šai laikā 248 (85%) pacientiem saglabājās labs un stabils izārstēšanās efekts. Tipiskas TN sāpju recidīvu novēroja 18 (6%) gadījumos, tādēļ tika veiktas reoperācijas ar nerva PSR, ja iepriekš bija MVD.

Atkārtotas operācijas laikā tika konstatēta teflona plāksnītes vai arteriālās cilpas dislokācija vai venozas kompresijas atjaunošanās. Sāpes ar atipiskas TN simptomiem saglabājās 26 (9%) pacientiem, kuriem operācija jau sākotnēji daļēji mazināja vai nebija noņēmusi sāpes un kuri iepriekš bija pārcietuši destruktīvas iejaukšanās (pilna *n.trigeminus* rizotomija, nerva destrukcija ar verdošu ūdeni, glicerolu, alkoholu u. c.).

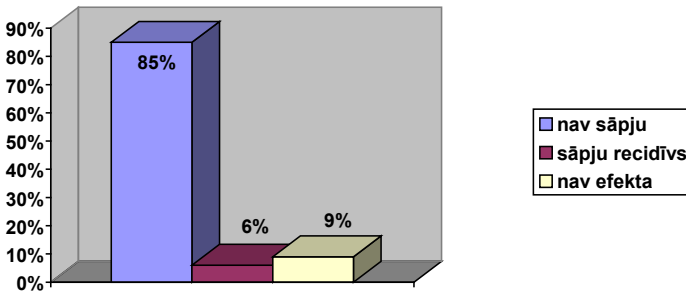
Viena no galvenajām operāciju komplikācijām bija operētās sejas puses hipestēzija. To novēroja pacientiem, kuriem klīnisku (iepriekš veikta nerva destrukcija) vai tehnisku (nevar veikt kvalitatīvu MVD) apsvērumu dēļ operāciju beidza ar PSR.

Pēc “tūrās” MVD tranzistoru sejas hipestēziju novēroja 6 (1,8%) pacientiem.

Operatīvā atradne **glosofaringeālās neiralģijas** pacientiem atspoguļota 5. tabulā. Eksplorējot pontocerebelāro apvidu 19 pacientiem, tika parādīts, ka 13 (70%) pacientiem IX nervs bija komprimēts pie iegarenām smadzenēm ar *a.cerebelli inf. post.* (PICA), bet pārējos gadījumos ar *a.cerebelli inf.ant.* (AICA).

4. tabula

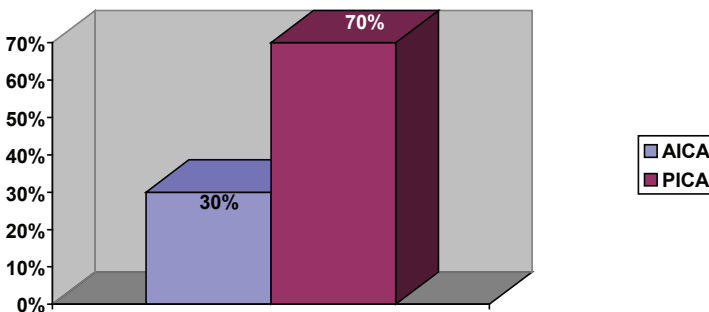
Vēlīnie MVD rezultāti 292 trigeminālās neiralģijas pacientiem
Long-term results after MVD in 292 patients with trigeminal neuralgia



Pēcoperācijas agrīnajā periodā sāpes izzuda visiem operētajiem pacientiem, un tāds rezultāts saglabājās arī visā vēlīnajā periodā.

5. tabula

Intraoperatīvā atradne 19 glosofaringeālās neiralģijas pacientiem
Intraoperative findings in 19 patients with glossopharyngeal neuralgia



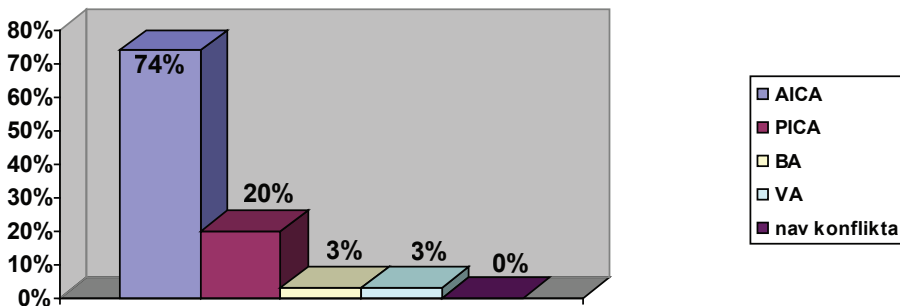
Kūlīša galvassāpju gadījumos (*Cluster headache*) pontocerebelārā leņķa revīzija tika veikta 9 pacientiem, kuriem izdarīja *n.Wrisbergi* (n.XIII) rizotomiju ar MVD vai bez tās. Pacientiem agrīnā pēcoperācijas periodā sāpes ievērojami mazinājās vai izzuda 5 (77%) gadījumos, bet visiem atgriezās 1/2–3 gadu laikā.

Tika operēti arī 3 pacienti ar **tinnītu** (ar *vertigo* komponentu). Pirms operācijas klīniskos simptomus un izmaiņas audiogrammā apstiprināja verificētais neirovaskulārais konflikts MR. Operācijas laikā pontocerebelārā leņķī *n.cochlearis* vai *n.vestibularis* bija komprimēts ar elongētu un aterosklerotisku *a.cerebelli inf. ant.* (PICA) divos gadījumos un vienā ar *a.auditiva int.* Pēc MVD operācijas troksnis izzuda, reibonis samazinājās, bet dzirdes traucējumi saglabājās.

Operatīvā atradne, eksplorējot pontocerebelāro leņķi **hemifaciālās spazmas** gadījumos, atspoguļota 6. tabulā.

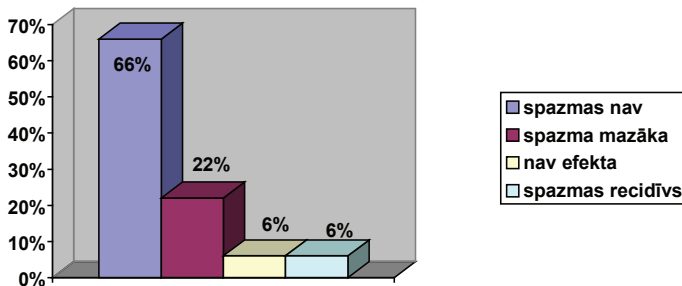
6. tabula

Intraoperatīvā atradne 39 hemifaciālās spazmas pacientiem
Intraoperative findings in 39 patients with hemifacial spasm



7. tabula

Vēlīnie MVD rezultāti 39 pacientiem ar hemifaciālo spazmu
Long-term results after MVD in 39 patients with hemifacial spasm



N. facialis neirovaskulārais konflikts blakus smadzeņu stumbram ar *a.cerebelli inf. ant.* (AICA) bija 29 (74%) pacientiem, 8 (20%) ar *a.cerebelli inf. post.* (PICA), 1 ar *a.basilaris* (AB) un 1 ar *arteria vertebralis* (AV).

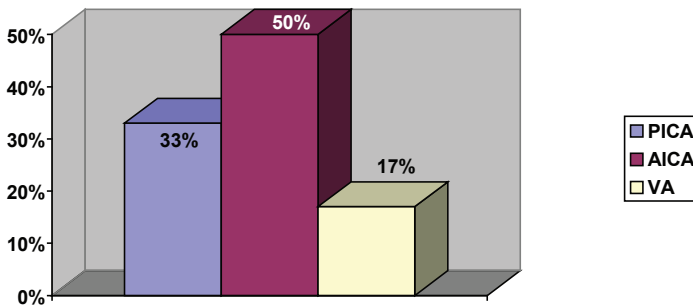
Pēcoperācijas HS izzuda 26 (66%) pacientiem (sk. 7. tabulu). Operācija bija mazefektīva 9 (23%) pacientiem, bet 2 (6%) slimniekiem sejas spazma saglabājās.

Visi HS recidīvi tika novēroti pirmo 2 gadu laikā un tādi arī saglabājās vēlīnajā periodā.

Ar grūti ārstējamu **esenciālo arteriālo hipertensiju** tika operēti 6 pacienti. Operāciju atradne pacientiem, kuriem tika veikta kreisās puses kaudālo nervu (n.IX un n.X) un *medulla oblongata* eksplorācija ar MVD, atspoguļota 8. tabulā. 3 (50%) pacientiem bija konstatēts neirovaskulārs konflikts ar *a.cerebelli inf.post.* (AICA), 2 (33%) – ar *a.cerebelli inf.post.* (PICA), bet vienam – ar vertebrālo artēriju (VA).

8. tabula

Intraoperatīvā atradne 6 esenciālas arteriālas hipertensijas pacientiem
Intraoperative findings in 6 patients with primary arterial hypertension

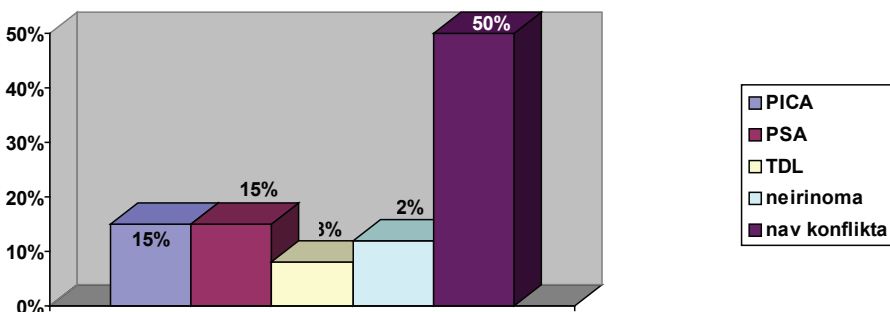


Agrīnā pēcoperācijas periodā arteriālais spiediens mazinājās pacientiem, kuriem bija veikta MVD no PICA un AICA. Tomēr pēc 6–12 mēnešiem tika novērota tendence asinsspiedienam atgriezties pirmsoperācijas līmenī, kas bija jākompensē medikamentozī. Maksimālais sistoliskā asinsspiediena pazeminājums bija 100 mm Hg, diastoliskā – 40 mm Hg.

Ar **torticollis** slimību tika operēti 26 pacienti (sk. 9. tabulu). Kraniospinālās eksplorācijas laikā tika veikta *n.accessorius* mikrodekompresija no *a.cerebelli inf. post.* (PICA) 4 (15%) gadījumos, no *a.spinalis post.* (PSA) – 4, no *lig.denticulare term.* (TDL) – 2 (8%), no *n.accessorius* neirinoma – 3 (12%) gadījumos. 13 (50%) pacientiem ar anterokolis un retrokolis neirovaskulārs konflikts netika konstatēts.

9. tabula

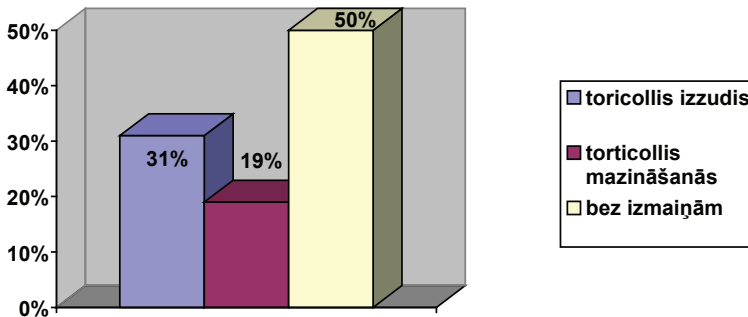
Intraoperatīvā atradne 26 torticollis spastika pacientiem
Intraoperative findings in 26 patients with spastic torticollis



Pēcoperācijas pacientu novērojumi parādīja, ka TS simptomi neizzūd agrāk par ½ gadu. Pakāpeniski slimības simptomi samazinājās gada laikā, līdz veseli kļuva 8 (31%) pacienti ar horizontālo TS formu. Pieciem (19%) pacientiem novēroja daļēju TS simptomu mazināšanos, bet 13 (50%) pacientiem slimības simptomi anterokolis un retrokolis gadījumos nemainījās.

10. tabula

Vēlīnie mikrodekompresijas rezultāti 39 torticollis pacientiem
Long-term results after microdecompression in 39 patients with torticollis



Diskusija

Ja ir precīzi noteikta kādas kraniālās rizopātijas formas diagnoze, tad ārstēšanu parasti sāk ar konservatīvu terapiju, kas var ilgt 1–5 gadus. Kaut arī daudzu zinātnieku darbi ir pierādījuši un apstiprinājuši neirovaskulārā konflikta cēloni vairākām kraniālo rizopātiju formām un MVD augsto efektivitāti (5, 10, 18, 20), joprojām tiek lietotas un attīstītas dažādas operatīvas nervu destrukcijas metodes: glicerola rizolīze, radiofrekvences rizotomija, perkutāna balona mikrokompresija, stereotakses radioķirurģija un perifērās nervu blokādes (6, 14, 15, 17, 20, 23).

Apkopotie dažādu autoru salīdzinošie TN operāciju rezultāti ar *n.trigeminus* destrukīvām metodēm un MVD (sk. 11. tabulu) liecina, ka ievērojami biežāk slimības recidīvi ir destrukīvām metodēm (23, 24).

TN operāciju rezultāti (sk. 3. un 4. tabulu) parāda noturīgu un augstu (92%) MVD izārstēšanās efektivitāti pēc operācijas, un 15% pacientu novēroti sāpju recidīvi vēlīnā periodā, kas ievērojami pārspēj ablatīvo TN ārstēšanas metodi un nav sliktāki par citu autoru veiktajām MVD operācijām.

Tā kā glosofaringeālā neiralģija ir ievērojami mazāk izplatīta (viens uz 70 TN gadījumiem), arī šajā materiālā to skaits ir neliels – tikai 19. Līdzīgi kā TN slimības sākumā tā labi reaģē uz karbamazepīniem, un ar MR iespējams noteikt neirovaskulāro konfliktu. Visi operētie pacienti ar MVD bija izārstēti no sāpēm. Pētījuma gaitā nenācās sastapties ar literatūrā aprakstītiem GN lēkmes gadījumiem, kas komplicējas ar sinkopi (8).

11. tabula

**Salīdzinošie trigeminālās neiralģijas ārstēšanas
iznākumi ar dažādām ķirurģijas metodēm**
Comparison of the results of trigeminal neuralgia surgery

Kritērijs	RFR	Glicerols	Balons	SR	MVD (citi autori)	MVD (Aksiks)
Sākotnējais p/op efekts	91–99%	91%	93%	80–96%	85–98%	92,4%
Vēlīnie p/op recidīvi	19% – 6 gadi 80% – 12 g.	54% – 4 gadi	21% – 2 gadi	25% – 3 gadi	15% – 5 gadi 30% – 10 gadi	15% – 2–20 gadi
Sejas notirpums	98%	60%	72%	20%	2%	1,8%

Saīsinājumi

RFR – radiofrekvences rizotomija;
SR – stereotakses radioķirurģija (gamma nazis);
MVD – mikrovaskulāra dekompresija;
Balons – balona mikrokompresija;
Glicerols – gaserotomija ar glicerolu.

Hemifaciālās spazmas gadījumos MVD panāca izārstēšanos ar spazmu izzušanu 66% pacientu, taču citiem autoriem (3) MVD bija neefektīva vai bija vērojams SH recidīvs 12% pacientu. Šajos gadījumos novēroja izteiktu *n.facialis* kompresiju, kur bija iesaistīta liela kalibra artērija (*a.vertebralis*), bet to dislocēt bija liels risks vai arī tehniski neiespējami. Vēlīnā pēcoperācijas periodā 2 (5%) pacientiem novēroja spazmas recidīvu, kuriem veica sekmīgu reoperāciju. Jāatzīmē, ka dažiem pacientiem iepriekš saņemtās sejas mīmikas muskuļu botulīna toksīna injekcijas deva netipiski paildzinātu MVD pēcoperācijas gaitu. Iespējams, ka, līdzīgi kā izmantojot TN ārstēšanas destruktīvās metodes, arī botulīna toksīna injekcijas traucē sejas nerva funkcijas atjaunošanos.

Tika operēti tikai 3 pacienti ar tinnīta slimību. Lai arī sākumā pēc MVD bija iegūti labi rezultāti, pēc 2–3 gadiem sūdzības daļēji atjaunojās, attīstījās dzirdes vājums. Domājams, ka tas ir saistīts ar dzirdes nerva lielo jutīgumu un saaugumiem, kas radās pēc MVD ar teflonu. MVD varētu būt pacientiem kā izvēles metode pirms kāda ORL destruktīva rakstura procedūras (translabirinta 8. nerva šķelšana, labirintektomija, vestibulāra neirektomija u. c.).

Pacientiem ar kūlīša galvassāpēm (*Cluster headache*) operācijas uz *n.intermedius* sākotnējie rezultāti bija cerīgi, bet jau pēc ½–3 gadiem visiem pacientiem bija daļējs vai pilns sāpju recidīvs. Dažiem sekmīgi tika veikta stereotakses talamotomija un sāpju vadīšanas ceļu pārslēgšanās kodolos, kurai, iespējams, ir priekšroka *Cluster headache* ķirurģiskajā ārstēšanā.

Interesants ir MVD izmantojums primārās arteriālās hipertensijas gadījumā. Teorijas pamatā ir smadzeņu stumbra vaskulāras kompresijas ideja *n.glossopharyngeus* un *n.vagus* saknīšu izejas-ieejas zonā kreisajā pusē kardiovaskulārās regulācijas centra tuvumā (13). Pamatojoties uz darba analīzi, var pievienoties arī citu autoru

viedoklim, ka esenciālā arteriālā hipertensija var kombinēties ar hemifaciālās spazmas un glossofaringeālās neiralģijas rizopātijas formu kreisajā pusē (18).

Šādas operācijas tika veiktas 6 pacientiem tikai rezistentas arteriālas hipertensijas gadījumā. Diemžēl operācijas rezultāti nebija tik efektīvi un noturīgi kā citās rizopātijū formās. Arī tehniski bija grūti vai riskanti dislocēt no smadzeņu stumbra elongēto un rigīdo *a.vertebralis*, kas kopā ar apakšējām smadzenīšu artērijām sekmeja kompresiju. Autori uzskata, ka šis varētu būt viens no galvenajiem iemesliem, kāpēc jau gada laikā pēc MVD arteriālais spiediens atgriezās pirmsoperācijas līmenī. Turklāt šādām manipulācijām ir relatīvi augsts operācijas risks, savukārt pacientiem ir pieejamas plašas farmakoloģiskās ārstēšanās iespējas.

Kā liecina literatūras dati, torticollis gadījumos neviena no zināmajām ārstēšanas metodēm negarantē noturīgu izārstēšanos, jo slimības patogēnēze nav noskaidrota. Visizplatītākās ir smadzeņu dziļo gangliju stereotaksis elektrokoagulācijas metode, selektīva spinālā *n.accessorius* rizotomija un botulīna toksīna injekcijas. Ir daži ziņojumi par labiem rezultātiem ar dziļo smadzeņu stimulāciju (16). Pētījumā izmantotā *n.accessorius* MVD, kā arī cita veida mikrodekompresija (audzējs, zobveida saite) bija pacientiem (8 gadījumos) ar horizontālo torticollis formu. Savukārt, botulīna toksīna injekcijas varētu palīdzēt pacientiem ar retrokolis formu. Līdzīgi secinājumi ir arī citiem autoriem (22).

Atšķirībā no citām rizopātijū formām torticollis sāka mazināties pakāpeniski, ne ātrāk kā ½ gada laikā, un, ja stāvoklis uzlabojās, pēc tam nedeļa slimības recidīvu.

Kopumā darbs parāda MVD operācijas izvēles metodes priekšrocības. Lai panāktu efektīvu ārstēšanas iznākumu, nepieciešama rūpīga pacientu atlase. Pirms operācijas klīniskā, elektrofizioloģiskā izmeklēšana un vizuālā diagnostika jebkurai no minētajām saslīmšanām dod iespēju izvēlēties optimālo ārstēšanas veidu.

Literatūra

1. Aksik I. *Microneural decompression operations in the treatment of some forms of cranial rhizopathy*. Acta Neurochir (Wien), 125, p. 64–74, 1993.
2. Aksiks I, Sverzickis R, Dzelzite S. *Microvascular decompression in the posterior fossa as a treatment method for essential hypertension*. Zh Vopr Neurohir (Moscow) 4, p. 11–15, 2002.
3. Auger RG, Peipgras DG, Laws ER. Hemifacial spasm: Results of microvascular decompression of the facial nerve in 54 patients. Mayo Clin Proc 61, p. 640–644, 1986.
4. Baker FG, Jannetta PJ, Bissonette DJ, Larkins MV, Jho HD. The long-term outcome of microvascular decompression for trigeminal neuralgia. N Engl J Med, 334: 1077–1084, 1996.
5. Burchiel KJ, Slavin KV. On the natural history of trigeminal neuralgia. Neurosurgery 46, p.152–155, 2000.
6. Brown JA, McDaniel MD, Weaver MT. Percutaneous trigeminal nerve compression for treatment of trigeminal neuralgia: results in 50 patients. Neurosurgery 32, p. 570–573, 1993
7. Dandy WE. Concerning the cause of trigeminal neuralgia. Am J Surg 24, p. 447–455, 1934.

8. Ferrante L, Artico M, Nardacci B et al. Glossopharyngeal neuralgia with cardiac syncope. *Neurosurgery* 36, p. 56–63, 1995.
9. Gardner WJ. Concerning the mechanism of trigeminal neuralgia and hemifacial spasm. *J Neurosurg* 19, p. 947–958, 1962.
10. Hitotsumatsu T, Matsushima T, Inoue T. Microvascular decompression for treatment of trigeminal neuralgia, hemifacial spasm, and glossopharyngeal neuralgia: three surgical approach variations: technical note. *Neurosurgery* 53, p. 1436–1443, 2003.
11. Jannetta PJ. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 26 (Suppl), p. 159–162, 1967.
12. Jannetta PJ, Abbasy M, Maroon JC, Ramos FM, Albin MS. Etiology and definitive microsurgical treatment of hemifacial spasm. Operative techniques and results in 47 patients. *J Neurosurg* 47, p. 321–328, 1977.
13. Jannetta PJ. Cranial Rhizopathies. In *Neurological Surgery*, JR Youmans, ed. Saunders WB, Philadelphia, p. 4169–4182, 1990.
14. Kennedy RH et al. Treatment of blepharospasm with botulinum toxin. *Mayo Clin Proc* 64, p. 1085–1090, 1989.
15. Kondziolka D, Lundsford LD, Bissonnette DJ. Long-term results after glycerol rhizotomy for multiple sclerosis-related trigeminal neuralgia. *Can J Neurol Sci* 21, p. 137–140, 1994.
16. Kraus JK. Deep Brain Stimulation for Dystonia in Adults. Overview and Developments. *Stereotact Funct Neurosurg* 78, p. 168–182, 2002.
17. Murali R, Rovit RL. Are peripheral neurectomies of value in the treatment of trigeminal neuralgia? An analysis of new cases and cases involving previous radiofrequency Gasserian thermocoagulation. *J Neurosurg* 85, p. 435–437, 1996.
18. Nakamura T, Osawa M, Uchiyama S, Iwata M. Arterial Hypertension in Patients with Left Primary Hemifacial Spasm is Associated with Neurovascular Compression of the Left Rostral Ventrolateral Medulla. *European Neurology* 57 (3), p. 150–156, 2007.
19. Rhoton AL Jr. The cerebellopontine angle and posterior fossa cranial nerves by the retrosigmoidal approach. *Neurosurgery* 47 (3 Suppl), p. 93–129, 2000.
20. Sheehan J et al. Stereotactic gamma knife surgery for trigeminal neuralgia: outcomes and prognostic factors. *J Neurosurg* 102, p. 434–441, 2005.
21. Shima F, Fukui M, Kitamura K et al. Diagnosis and surgical treatment of spasmodic torticollis of 11th nerve origin. *Neurosurgery* 9, p. 258–263, 1988.
22. Taha JM, Tew JM Jr, Buncher CR. A prospective 15-year follow up of 154 consecutive patients with trigeminal neuralgia treated by percutaneous stereotactic radiofrequency thermal rhizotomy. *J Neurosurg* 83: 989–993, 1995.
23. Taha JM, Tew JM. Comparison of surgical treatments for trigeminal neuralgia: Reevaluation of radiofrequency rhizotomy. *Neurosurgery* 38, p. 865–871, 1996.
24. Urgosik D, Liscak R, Novotny J Jr. et al. Treatment of essential trigeminal neuralgia with gamma knife surgery. *J Neurosurg* 102 (Suppl), p. 29–33, 2005.

Summary

Object. *Compression of the cranial nerves by the blood vessels as they cross between the brain stem and the base of skull is implicated in the production of a wide variety of syndroms including such diseases as trigeminal neuralgia (TN), glossopharyngeal neuralgia (GN), hemifacial spasm (HS), vertigo and tinnitus, cluster headache (CH), essential hypertension (EH), and spastic torticollis (ST).*

Methods. Microvascular decompression (MVD) surgery via retro-sigmoid approach to the pontocerebellar region in the posterior fossa was sufficient in the case of visible neurovascular conflict. 432 operations of the lower cranial nerves have been performed by the same surgeon since 1985. The offending vessels were moved from the nerve root entry-exit zone (trigeminal, facial nerve radices, etc), separated and immobilized by a teflon layer. When the examinations did not prove a neurovascular conflict, or in the case when MVD was technically impossible, partial rhizotomy of the damaged nerve were performed. The follow-up period was 1–22 years. The mean patient age was 58.01, in a range of 17–92 years, by diseases: TN – 330, GN – 19, CH – 9, Tinnitus – 3, HS – 39, ST – 26, and EH – 6 patients.

In the present retrospective study we analysed the post-operative outcome of the microsurgery procedures in the first years after surgery and in the long-term.

The long-term results after surgery showed that 85% of patients with TN were pain free (92.4% – in the first two years), all operated patients with GN were well. MVD was ineffective in atypical TN cases. For HS, the symptoms disappeared in 66% of the cases after the first two years, and blood pressure normalized in 70% of patients with EH. In the cases of tinnitus (3 patients) the MVD was successful. The headache returned in ½–3 years after surgery of Wrisberg nerve (the 13th nerve) for CH patients. MVD can be used as a neurosurgical treatment in certain cases of severe refractory primary arterial hypertension. In essential hypertension MVD of the left side medulla oblongata and IX and X nerve, 83% had normal blood pressure, but in a year, arterial hypertension returned.

In spasmodic torticollis patients, decompression of the 11th nerve was effective in 31% of the cases (horizontal torticollis). For 55% of the patients with ST, symptoms decreased.

Conclusions. *MVD is the therapy of choice and recommended as the first surgical method. In trigeminal neuralgia, glossopharyngeal neuralgia, hemifacial spasm, tinnitus (vertigo), cluster headache, essential hypertension, and spastic torticollis rhizotomy is indicated if MVD is technically impossible or in the case of previous destructive surgery (deep alcoholization, thermocoagulation, compression, etc)*

MVD is less effective for atypical trigeminal neuralgia, cluster headache and anterocollis or retrocollis forms of ST.

Keywords: *posterior fossa, cranial nerves, brain stem, cranial rhizopathy, neurovascular compression, microvascular decompression.*

Malnutrīcijas cēloņu analīze pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām

Malnutrition Analysis in Patients with Inflammatory Bowel Disease

Edgars Bodnieks, Aldis Puķītis, Juris Pokrotnieks

P. Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Gastroenteroloģijas centrs
Pilsonu iela 13, Rīga, LV-1002

E-pasts: bodnieks.e@gmail.com; pukitis@latnet.lv; pokrot@latnet.lv

Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā (KUS) no 2003. līdz 2006. gadam retrospektīvi tika veikta datu analīze stacionāriem pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām (IZS). Tika izvērtēti antropometriskie rādītāji, iekaisuma aktivitāte, bioķīmiskie rādītāji un komplikāciju veidi. Iegūtie dati liecina, ka čūlainā kolīta (ČK) pacientu skaits stacionārā ir divas reizes lielāks nekā Krona slimības (KS) pacientu skaits.

KS pacientiem ir novērots samazināts ķermeņa masas indekss (ĶMI) ($17,31 \text{ km}^2$) un biežāk novērotas komplikācijas (g. k. ķirurģiskās komplikācijas: tievās zarnas obstrukcija, stenoze, fistulas). Lai mazinātu iespējamās akūtās un hroniskās komplikācijas, tika ieteikts veikt nutritīvo skrīningu, lai izvērtētu malnutrīcijas risku, un rekomendēts mērķtiecīgi uzsākt agrīnu uztura terapiju, kurā uzturs tiek papildināts ar nepieciešamo enerģiju enterālās ēdināšanas standarta formulas veidā.

Atslēgvārdi: iekaisīgas zarnu slimības, malabsorbēcija, malnutrīcija, hiperkatabolisms, enterālā ēdināšana, parenterālā ēdināšana, uztura terapija.

Ievads

Iekaisīgas zarnu slimības – čūlainais kolīts un Krona slimība – ir hroniskas, imunoloģiski predisponētas, nezināmas etioloģijas iekaisīga rakstura slimības. Pasaulē pieaug iekaisīgu zarnu slimnieku un īpaši Krona slimības pacientu skaits. Tā ir aktuāla problēma gastroenteroloģijā arī Latvijā. IZS pacientiem ir gremošanas problēmas, pazūd apetīte, mazinās uzņemtā uztura daudzums, attīstās alimentārs deficīts, malabsorbēcija, palielinās uzturvielu zudumi, izveidojas hiperkatabolisms, un ir paaugstināta uzturvielu nepieciešamība. Adekvāta uztura terapija mazina uzturvielu zudumu un reducē iekaisuma atbildes reakciju, tādējādi mazinot slimības aktivitāti. Krona slimības gadījumā enterālā ēdināšana paātrina klīniskas remisijas iestāšanos pieaugušajiem, veicina augšanu un dzimuma nobriešanu bērniem. Laikus uzsākt enterālā ēdināšana novērš gan slimības akūto, gan vēlīno komplikāciju attīstību.

Pētījuma mērķis ir izvērtēt malnutrīcijas pakāpi pacientiem ar IZS un izstrādāt papildu rekomendācijas malnutrīcijas novēršanai.

Etioloģija un patoģenēze

Iekaisīgās zarnu slimības KS un ČK ir ģenētiski predisponēta (KS – hromosomā 16q 12, (NOD2/CARD 15 gēns (1); ČK – hromosomās 3, 7, 12, DR2, DRB1* 12 alēlē (2)) patoloģija. IZS raksturo hronisks recidivējošs zarnas gļotādas iekaisums, ko nosaka ģenētiskie, apkārtējās vides, ģeogrāfiskie un imunoloģiskie faktori (3, 4). Ir pierādīts noteikta izraisītāja (antigēns – noteikta olbaltumvielu struktūra) inducējošs mehānisms ģenētiski predisponētam organismam, kurā noris imūno šūnu hipererģiska atbildes reakcija, kas izpaužas kā aktīvo šūnu degranulācija un bioloģiski aktīvu citokīnu (IL-1, TNF α) sintēze. Iekaisīgā procesa dēļ ir traucēta gremošanas trakta gļotādas funkcija, izmainīti organisma vielmaiņas procesi. Minēto slimību saasinājumos attīstās zarnas gļotādas iekaisums, gļotādas barjeras funkcijas traucējumi, kas rada malabsorbciju un veicina **alimentāru deficītu**, kura pamatā ir uztura uzņemšanas problēmas (nespēja un nevēlēšanās ēst), uzsūkšanās traucējumi gremošanas traktā. Slimības rezultātā progresē anoreksija un sāpes vēderā, kuras izraisa gan iekaisīgie procesi, gan uzturs. Nereti novēro sliktu dūšu, ko rada gremošanas trakta kairinājums vai medikamenti (metronidazols, sulfasalazīns). Izveidojas gļotādas absorbcijas traucējumi, dažādu nutrientu (olbaltumvielu, vitamīnu, mikroelementu, žults skābju) malabsorbcija. Diarejas, zarnu fistulu, limfātiskās drenāžas traucējumu dēļ palielinās proteīnu zudums. Slimnieka organismā **paātrinās metabolisma process**. Bojātajās gremošanas trakta gļotādas šūnās sintezējas iekaisuma citokīni un iekaisuma proteīni.

Iekaisīgo zarnu slimību ārstēšanā steroīdo hormonu lietošana **paātrina katabolismu**, ietekmē kaulu vielu maiņu (asinīs paaugstināts parathormona līmenis, palielināta kalcija resorbcija no kauliem, attīstās D vitamīna deficīts, kas saistīts ar malnutrīciju), veicinot osteoporozes attīstību.

Proteīna enerģētiskā trūkums ir sastopams 23–85% (5, 6) pacientu ar iekaisīgām zarnu slimībām (KS un ČK) atkarībā no procesa lokalizācijas, klīniskās formas, slimības ilguma un saņemtās terapijas.

Klīniskā uztura terapija spēj novērst nutritīvos traucējumus, uzturvielu (olbaltumvielu, mikroelementu un makroelementu, vitamīnu) deficītu, modulē iekaisīgo procesu izmaiņas un atjauno zarnu funkcijas slimības aktivitātes fāzē, kā arī mazina šo slimību komplikāciju risku. Enterālā ēdināšana ir izvēles metode uztura terapijas uzsākšanai pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām. Tā ir vienkārša, pieejama un ar mazu komplikāciju risku. Totāla parenterāla ēdināšana indicēta iekaisīgās zarnu slimības akūtā fāzē (smagā paasinājumā, preoperatīvā, postoperatīvā fāzē), ja pacienti slikti panes enterālo ēdināšanu un ja ir izteiktas tievo zarnu fistulas. Absolūta indikācija totālai parenterālai ēdināšanai ir pacienti ar īsās zarnas sindromu (tievās zarnas garums < 60–100 cm).

IZS bieži asociējas ar tādiem nutritīviem traucējumiem kā olbaltumu trūkums, malnutrīcija, minerālvielu un vitamīnu deficīts. Slimības aktivitātes paasinājums pacientiem ar IZS veicina komplikāciju risku – zarnu obstrukcijas sindromu, zarnas rezekcijas nepieciešamību (7, 8). Uztura terapijai ir ārstnieciska nozīme, tā ietekmē slimības patoģenētisko gaitu un mazina komplikāciju risku.

Analizējot uztura terapijas nozīmi, var izdalīt trīs galvenos aspektus, kas jāņem vērā:

- 1) uztura vielu (nutrientu) iedarbība uz patogēnētisko mehānismu;
- 2) pacientu nutritīvais stāvoklis;
- 3) klīniskās uztura terapijas praktiskās iespējas.

Nutritīvā stāvokļa deficīts. Sastopamība, iemesli, iznākumi

IZS simptomi ietver pastiprinātu zarnu peristaltiku, asins zudumu, sāpes vēderā, sliktu dūšu, vemšanu un anoreksiju, kas asociējas ar malnutrīciju. Slimības aktivitāte (paasinājuma pakāpe un procesa lokalizācija) ietekmē malnutrīcijas pakāpi. Malnutrīcija biežāk sastopama pacientiem ar KS, jo KS iekaisuma process galvenokārt skar tievo zarnu. Lielākā daļa uzturvielu absorbējas tieši tievās zarnas gļotādā. ČK gadījumā tiek skarta resnā zarna, kas galvenokārt nodrošina elektrolītu absorbciju.

Faktori, kas rada klīniskās izmaiņas pacientiem ar IZS, redzami 1. tabulā.

Akūta anoreksija ietekmē citokīnu (IL-1 un TNF) palielināšanos asinīs (9). Zarnu obstrukcija, fistulas un gļotādas iekaisums samazina uzņemtā uztura absorbciju un stimulē ķermeņa masas olbaltumvielu zudumu. Tievo zarnu terminālās (ileālās) daļas rezekcija izraisa žults sāļu un B₁₂ vitamīna deficītu. Malabsorbcijas dēļ rodas taukskābju un taukos šķīstošo vitamīnu deficīts.

Baktēriju proliferācija, fistulu veidošanās, aklās cilpas sindroms un zarnu stenozē arī veicina malabsorbciju. Eksudatīvs olbaltumvielu zudums, kas rodas iekaisušo zarnu gļotādā, ir proporcionāls iekaisuma procesa un čūlu veidošanās aktivitātei.

Nelielas malnutrīcijas iemesls var būt arī medikamentu lietošana. Glikokortikoidi ietekmē kalcija absorbciju, sulfasalazīns – folātu un holesterinamīns – taukos šķīstošo vitamīnu uzsūkšanos. Daži medikamenti (sulfasalazīns, 5-amino salicilāti, metronidazols) var izraisīt sliktu dūšu, vemšanu, garšas izmaiņas un dispepsiju.

Klīniskā pacientiem ar IZS anēmija ir sastopama 54–80% gadījumu, tās iemesli ir hroniska iekaisuma process, asiņošana un dzelzs, folātu, kā arī B₁₂ vitamīna deficīts. Hipoalbuminēmijas (25–80%) iemesli ir anoreksija, zems olbaltumvielu daudzums uzturā, reducēta aknu sintēze, paātrināti katabolisma procesi un palielināts proteīna zudums caur fistulām un no zarnu gļotādām (5). Malabsorbcijas dēļ rodas arī minerālvielu (dzelzs, vara, selēna, cinka, magnija) deficīts, kas savukārt samazina organisma enzīmu (superoksīda dismutāze, katalāze, glutatona peroksīdāze) un neenzīmu antioksidantu (glutations, taurīns) sintēzi.

Vitamīna B₁₂ un folātu deficīts veicina hiperhomocisteinēmiju, kas nelabvēlīgi ietekmē (palielina) lipīdu sintēzi aknās, kā arī palielina trombožu risku (7). Malnutrīcija simptomātiski asociējas ar celulārās un humurālās imūnās sistēmas traucējumiem, bērniem – ar atpalikšanu augšanā un dzimuma nobriešanas traucējumiem. Minētās klīniskās un bioloģiskās izmaiņas IZS, kas saistītas ar nutritīvo deficītu, apkopotas 2. tabulā.

1. tabula

Klīniskās izmaiņas pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām
Clinical change in patients with inflammatory bowel disease

Neadekvāta uztura uzņemšana (abdominālas sāpes, diareja, anoreksija, slikta dūša, vemšana, apetītes zudums – medikamentu blakusparādības).
Malabsorbēcija (plašs zarnu gļotādas iekaisums, zarnas daļas rezekcija, žults sāļu deficīts, baktēriju proliferācijas sindroms, fistulu veidošanās, medikamentu ietekme uz absorbēciju).
Palielināti nutrienču zudumi tievajās zarnās (asiņošana, zarnu fistulas, olbaltumvielu un žults skābju zuduma enteropātija, elektrolītu un minerālvielu zudumi).
Palielināta enerģijas (kcal) nepieciešamība (augšanas periodā – bērniem), akūta iekaisuma fāze, sepse, drudzis, fistulas, slimības aktivitāte.

Pētījumi (5, 6) liecina, ka svara zudumu un malnutrīciju IZS pacientiem rada malabsorbēcija, anoreksija, proteīna zudumi tievajās zarnās un hipermetabolisms.

2. tabula

Klīniskās un bioloģiskās izmaiņas pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām
Clinical and biological changes in patients with inflammatory bowel disease

<p>1. Klīniskās izmaiņas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - svara zudums (olbaltumvielu deficīts), - vājums, tūskas, anēmija (dzelzs, B₁₂ vit., folijskābes deficīts), - palēninās rētu un fistulu dzīšanas process (Zn, Se deficīts) (32), - palielinās postoperatīva mirstība, - osteopēnija (<i>Semeao E, J Pediatrics 1999, Hymans JS, J Pediatr Gastr Nutr, 1996, Roux S et al, Arthritis Res, 2000</i>), - bērniem atpaliek augšana un dzimumnobriešana, - paaugstinās trombožu risks (folijskābes, B₁₂ vit. deficīts, hiperhomocisteinēmija (<i>Papa A et al A J Gastroenterol 2001, Mahmud N et al, Gut 1999, Chowders Y, A J Gastroenterol 2000</i>)). <p>2. Bioloģiskas izmaiņas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - izmainās šūnu membrānas struktūra, - izmainās šūnu membrānas funkcijas (transporta sistēmas, receptoru darbība), - modificējas intracelulāro signālu transkripcija pret specifiskiem gēnu domēniem (citokīni, adhēzijas molekulas), - rodas zarnas ekosistēmas izmaiņas, - rodas izmaiņas šūnas ciklā, veicina apoptozi (ČK > KS) (<i>Ina K, et al, J Immunol 1999</i>).

Pētījuma mērķi

- 1) Izvērtēt stacionārā ārstēto pacientu ar KS un ČK lokalizācijas formas, slimības smagumu, ķirurģiskās terapijas efektu.
- 2) Ņemot vērā iegūtos datus (slimības smagumu), izvērtēt malnutrīcijas pakāpi, uztura terapijas efektivitāti.
- 3) Veikt situācijas analīzi, izstrādāt ieteikumus malnutrīcijas izvērtēšanas uzlabošanai un jaunu uztura terapijas algoritmu ieviešanai Paula Stradiņa KUS.

3. tabula

Iekaisīgo zarnu slimību nutrientu deficīts
Deficit of nutrition in inflammatory bowel disease

	Krona slimība	Čūlainais kolīts
Samazināts svars	70%	18–55%
Laktozes intolerance	30–40%	25–65%
Hipoalbuminēmija	25–80%	0–10%
Anēmija	25–85%	22–68%
Folijskābes deficīts	50–79%	5–20%
Vitamīna B ₁₂ deficīts	16–39%	8–30%
Fe deficīts	10–44%	30–80%
Osteopātija	24–39%	0–15%
Esenciālo taukskābju deficīts	2–5%	0–2%
Ca deficīts	20–60%	0–46%
Mg deficīts	30–68%	2–55%
Zn deficīts	42–92%	12–52%

(Sven-David Muller. *Nutrition in inflammatory bowel disease. Revised ed. 2003.*)

Materiāls un metodes

Šis ir retrospektīvs pētījums, kurā iekļauti abu dzimumu pacienti bez vecuma ierobežojuma. Pētījums sastāv no trīs etapiem:

I etaps. Pētījuma protokola izstrāde.

Tiek izstrādāts protokols, pēc kura tiek atlasīti pacienti ar KS un ČK. Protokolā ietverts: aktivitātes indekss, ŅMI, kopējais olbaltums, albumīns, c-reaktīvais olbaltums, Hb, Er, Lkc, Fe līmenis asins serumā. Grupā iekļauti tie pacienti, kuriem bija noteikti visi minētie parametri.

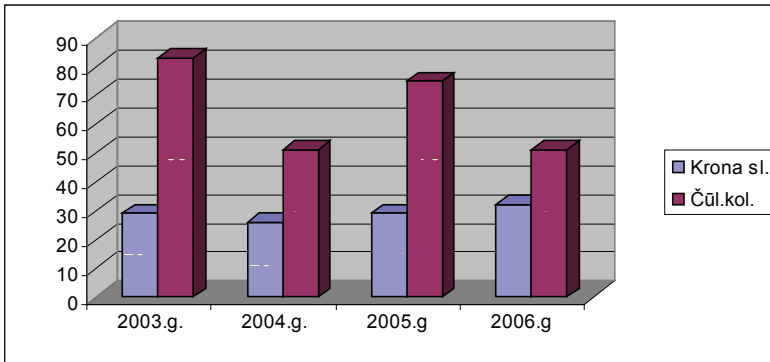
II etaps. Retrospektīva stacionāra medicīnisko karšu analīze par laika periodu no 2003. gada līdz 2006. gadam pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām, kuri ārstējušies Paula Stradiņa KUS Gastroenteroloģijas centrā.

III etaps. Datu analīze, rezultātu apkopošana.

EXCEL programmā apstrādāta datu analīze, absolūtos skaitļos, procentos un vidējās vērtības noteikšana.

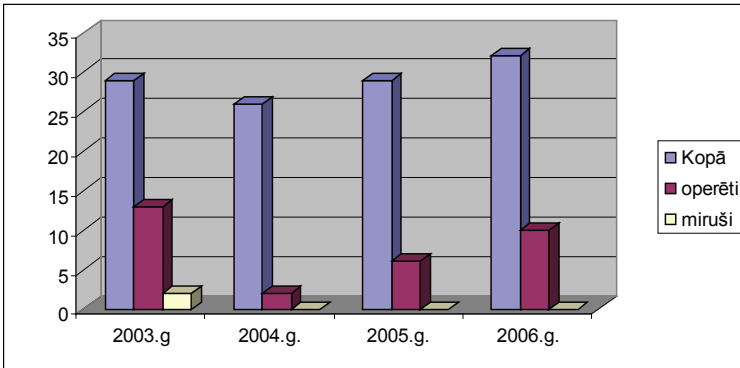
Rezultāti

Tika izvērtēti 376 pacienti, no tiem 116 pacienti ar KS un 260 – ar ČK. Apkopojot iegūtos datus (KS un ČK reģistrēto pacientu skaits laikā no 2003. līdz 2006. gadam), konstatēts, ka pētījuma grupā saslimstība ar ČK ir aptuveni divas reizes biežāka nekā saslimstība ar KS.



1. attēls. Krona slimības un čūlainā kolīta pacientu skaits laika posmā 2003.–2006. g.
Number of patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) during 2003–2006

Saslimstībai ar KS pēdējo gadu laikā ir tendence pieaugt. Salīdzinot operēto gadījumu skaitu KS un ČK pacientiem, vērojams, ka ar KS saistīto operāciju biežums procentuāli ar katru gadu pieaug.



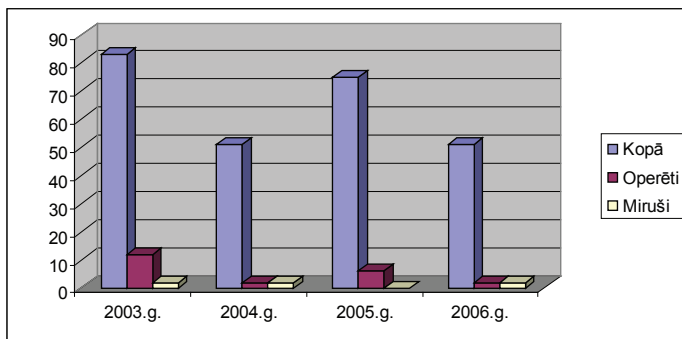
2. attēls. Krona slimības pacientu skaits laika posmā 2003.–2006. g. (operētie un mirušie)
Surgery manipulations and deaths from CD during 2003–2006

No aprēķinātajiem datiem iegūti šādi rezultāti – KS kopējais pacientu skaits 2003. gadā ir 29, no tiem operēti 13 (44,82 %), miruši 2 (6,89 %).

2004. g. kopējais pacientu skaits 26, operēti 2 (15,38 %), mirušo nav.

2005. g. kopējais pacientu skaits 29, operēti 6 (20,69 %), mirušo nav.

2006. g. kopējais pacientu skaits 32, operēti 10 (31,25 %), mirušo nav.



3. attēls. Čūlainā kolīta pacientu skaits laika posmā 2003.–2006. g. (operētie un mirušie)
Surgery manipulations and deaths from UC during 2003–2006

2003. gadā pavisam reģistrēti 83 pacienti ar ČK, no tiem operēti 12 (14,46 %), miruši 2 (2,4 %).

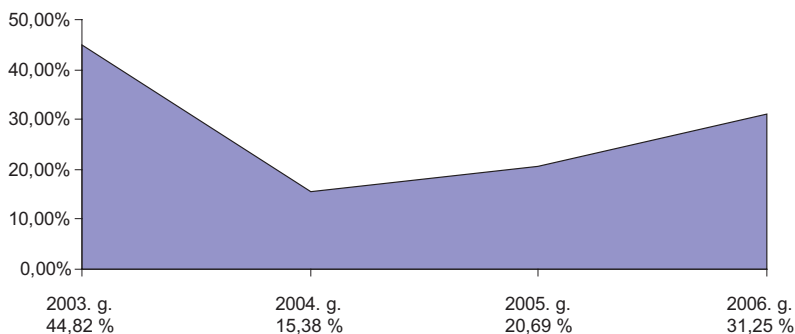
2004. g. reģistrēts 51 pacients, operēti 2 (3,92 %), miruši 2 (3,92 %).

2005. g. reģistrēti 75 pacienti, no tiem operēti 6 (8 %), miruši 0.

2006. g. reģistrēts 51 pacients, operēti 2 (3,92 %), miruši 2 (3,92 %).

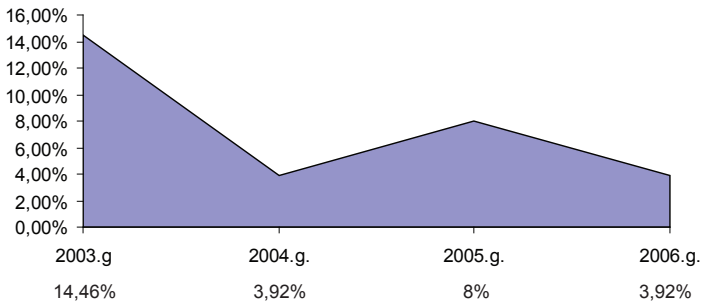
Salīdzinot novērotos datus, operāciju skaits KS pacientiem ir vidēji 3 reizes biežāks nekā ČK pacientiem. KS un ČK operēto pacientu skaits ir parādīts 4. un 5. attēlā.

Operētie pacienti ar Krona slimību



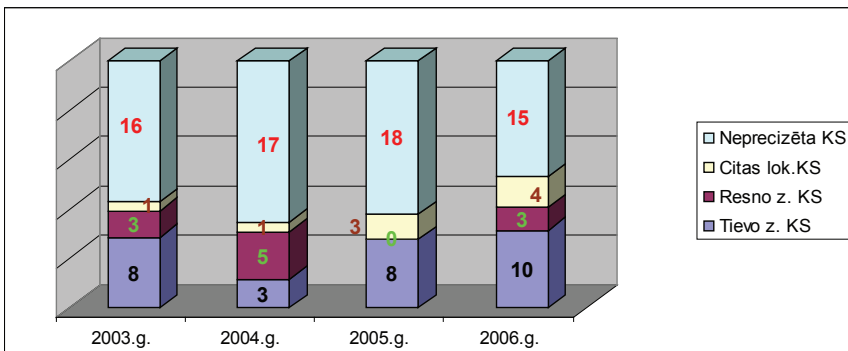
4. attēls. Krona slimības pacientu skaits procentos (operētie)
Surgical patients with CD, percent

Operētie pacienti ar čūlaino kolītu



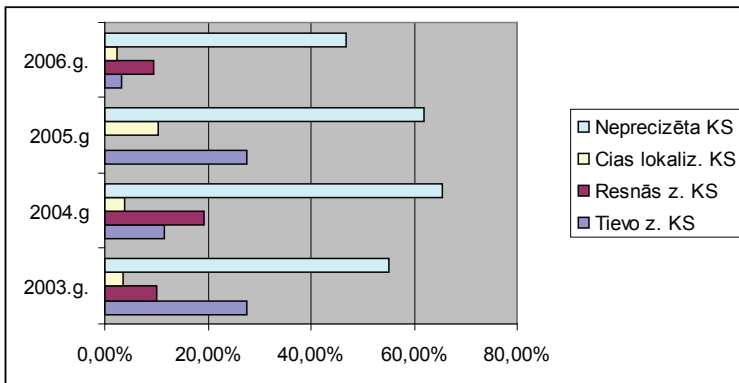
5. attēls. Čūlainā kolīta pacientu skaits procentos (operētie) *Surgical patients with UC, percent*

Malnutrīcija konstatēta 80% pacientu ar Krona slimību, tādēļ šiem pacientiem pētījuma grupā veikta padziļināta analīze. Sīkāk izpētītas KS pacientu slimības vēstures (laika posmā no 2003. līdz 2006. gadam) un noskaidrotas KS klīniskās formas, kuras redzamas 6. un 7. attēlā.



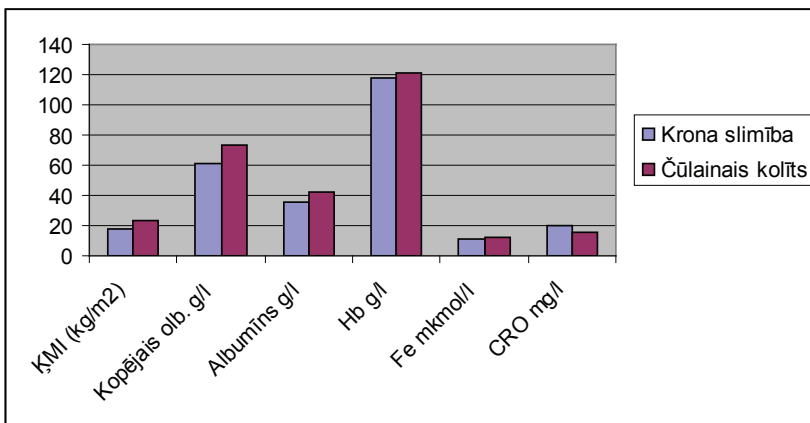
6. attēls. Krona slimības lokalizācijas formas *Location forms of CD*

Izvērtējot arhīva materiālus, sagrupējot minētās slimības pēc kodu reģistra un apkopojot iegūtos rezultātus, redzams, ka vairāk nekā pusei pacientu ar KS ir neprecizēta lokalizācija, apmēram vienai trešdaļai ir tievo zarnu KS lokalizācija, retāk resno zarnu un citas lokalizācijas. To varētu izskaidrot ar nepilnīgajām tievās zarnas izmeklēšanas iespējām, kas saistītas ar diagnostikas tehnoloģijām – pagaidām Latvijā nav iespējas veikt endoskopisku tievās zarnas izmeklēšanu ar divbalona enteroskopu, lai precizētu KS lokalizāciju tievajā zarnā.



7. attēls. Krona slimības lokalizācijas formas procentos
Location forms of CD, percent

Lai izvērtētu bioķīmisko rādītāju atšķirības KS un ČK, tika pētīti P. Stradiņa KUS arhīva statistikas dati par 2006. gadu, kur kopējais pacientu skaits ar IZS ir 93 (ČK – 51, KS – 32). Arhīva materiālos tika nejauši atlasīta 10 pacientu kopa no katras slimības grupas. Analīzei izvēlēti tikai tie slimnieki, kuriem bija noteikti šādi bioķīmiskie rādītāji: kopējais olbaltums, albumīns, hemoglobīns, dzelzs asins serumā, c-reaktīvais olbaltums, arī augums un svars. 8. attēlā ir parādītas aprēķinātās vidējās vērtības 10 cilvēku grupās, salīdzinot KS un ČK.



	ĶMI (kg/m ²)	Kop. olb. (g/l)	Albumīns (g/l)	Hb (g/l)	Fe (mkmol/l)	CRO (mg/l)
Krona slimība	17,31	61,2	36	118,2	11,2	19,47
Čūlainais kolīts	23,5	73,2	42,7	121,2	12,46	15,54

8. attēls. Krona slimības un čūlainā kolīta bioķīmisko rādītāju vidējās aprēķinātās vērtības
Calculated average values of biochemical parameters of patients with CD and UC

Diskusija

Nutrientu vajadzība un nozīme iekaisīgo zarnu slimību pacientiem

1) Enerģijas daudzums

IZS metabolo enerģijas vajadzību nosaka slimības klīniskā aktivitāte, nutritīvais stāvoklis, slimības komplikācijas, paredzētā terapijas taktika (glikokortikoīdi, imunomodulatori, ķirurģiska terapija). Pacientiem, kuriem ticami ir samazināties ķermeņa masas indekss (ĶMI), uztura terapija jāsāk ar 20–25 kkal/kg svara. Pacients ir monitorējams, lai izvērtētu enerģijas nepieciešamību dinamikā (23).

Ieteicamais enerģijas daudzums pacientiem pamatots ar ĶMI rādītājiem (4. tabula).

4. tabula

Ieteicamais enerģijas daudzums, pamatojoties uz ķermeņa masas indeksu
Recommended value of energy by BMI

ĶMI (kg/m ²)	Enerģijas vajadzība (kkal/kg/dn)
< 15	36–45
15–19	31–35
20–29	26–30
> 30	15–25

Klein S: A Primer of Nutritional Support for Gastroenterologists. Gastroenterology, 2002; 122: 1677–1687.

Aprēķinot nepieciešamo enerģijas daudzumu, jāņem vērā papildu klīniskie faktori – izzudušas zemādas tauku krokas, kritiski slims pacients, palielināts hiperglikēmijas risks vai draudošs pārbarošanas (*overfeeding*) sindroms, kas asociējas ar infekcijas risku. Veiktajos novērojumos uztura vērtība sasniedz 2000–2200 kkal/dienā, bet, kā liecina literatūras dati, enerģijas nepieciešamība ir lielāka.

2) Olbaltumvielas

Pacientiem ar KS ir lielāka nepieciešamība pēc olbaltumvielām, ņemot vērā olbaltumvielu zudumu, kas rodas zarnu iekaisuma, katabolisma, infekcijas (abscess) vai malabsorbcijas dēļ pēc tievās zarnas rezekcijas. Minētie faktori ir KS malnutricijas iemesli, kas apstiprinās novērojumā. Parasti uzturā rekomendēts lietot 0,8 g/kg svara dienā. IZS gadījumā rekomendējams 1,0–1,5 g/kg svara dienā (37). Olbaltumvielu ierobežojums ir jāievēro pacientiem ar traucētu nieru funkciju, kuri nesaņem nieru aizstājējterapiju. Pacientiem, kuri saņem hemodialīzi vai peritoneālo dialīzi, rekomendētais olbaltumvielu daudzums ir 1,2–1,5 g/kg svara dienā (33). Kā liecina iegūtie dati, P. Stradiņa KUS Gastroenteroloģijas centrā pacientiem uztura olbaltumvielas tiek nodrošinātas līdz 1,0 g/kg. Alimentārs deficīts ir atkarīgs no absorbcijas traucējumiem zarnu gļotādā un pacienta apetītes. Paredzētiem izmeklējumiem (kolonoskopijai, irigoskopijai, kapsulas endoskopijai) pacienti tiek sagatavoti ar zarnu tīrīšanas metodēm – laksatīviem līdzekļiem, kas arī veicina uzturvielu zudumu.

Pašreizējā uztura terapijā pacienti Gastroenteroloģijas centrā saņem virtuves ēdienu – GEC diētu, kurā kopējais olbaltumvielu daudzums dienā ir 0,9–1,0 g/kg (65–75 g), kopējais kaloriju daudzums ir 2000–2200 kkal/d.

Saņemtā virtuves ēdiena bioloģiskā vērtība un kalorāža ir nepietiekama KS aktīvā fāzē, sevišķi tajos gadījumos, kad pacientam ir komplikācijas (fistulas, stenoze, veikta abdomināla operācija). Lai uzlabotu pacientu ārstēšanas kvalitāti, būtu nepieciešams adaptēt Eiropas uztura terapijas vadlīnijas. Lai apstiprinātu minēto, tiek aprēķināts nepieciešamās enerģijas patēriņš, izmantojot *Long* formulu, kurā ir ietverts dzimums, vecums, aktivitātes faktors, traumas faktors (33).

Enerģijas patēriņš (EE) (pēc Long)

Vīr. EE = $(66,47 + (13,57 \times \text{kg}) + (5,0 \times \text{cm}) - (6,76 \times \text{gadi})) \times \text{AF} \times \text{TF} = \text{kkal}$

Siev. EE = $(655,1 + (9,56 \times \text{kg}) + (1,85 \times \text{cm}) - (4,68 \times \text{gadi})) \times \text{AF} \times \text{TF} = \text{kkal}$

AF – aktivitātes faktors

TF – traumas faktors

Piemēram, 35 gadus vecam, 70 kg smagam, 1,70 m garam staigājošam vīrietim ar traumas faktoru 1,25 (abdomināla operācija), enerģijas patēriņš ir 2648,3 kkal (~2650 kkal). Lai nodrošinātu vienmērīgu ievadi, nepieciešama zondes barošana ar ievades pumpi. Ja enterālās ēdināšanas maisījumu lieto pulsa veidā lielākās devās, var provocēt osmotiska caureja. Gadījumos, kad pacients spēj ēst virtuves ēdienu, var izmantot enterālās ēdināšanas maisījumus p/o kā uztura papildinājumu. Autori uzskata, ka, ņemot vērā IZS klīniskos faktorus, pacientiem ar $\text{KMI} \leq 18,5$, kuriem IZS ir aktīvā fāzē, būtu iespējams mērķtiecīgi papildināt virtuves ēdienu ar enterālās ēdināšanas formulām.

Var izmantot enterālās ēdināšanas maisījumus (piem., *Nutridrink*). 100 g šī maisījuma satur 6 g olbaltumvielu, 18,4 g ogļhidrātu, 5,8 g tauku, 150 kkal. Minētais enterālās ēdināšanas maisījums ir bagātināts ar nepieciešamajām minerālvielām, B grupas vitamīniem, folijskābi, taukos šķīstošiem vitamīniem.

Lai pacientiem nodrošinātu pilnvērtīgu uzturu, ir iespēja virtuvē gatavotu ēdienu papildināt ar enterālās ēdināšanas maisījumu (viens iepakojums (200 ml) divas reizes dienā vai pa 1/2 paciņai 4 reizes dienā (1 ml = 1,5 kkal)), tātad kopā papildu 600 kkal un 24 g olbaltumvielu.

3) Aminokābes

Glutamīns ir visizplatītākā aminoskābe asinīs. Tas nodrošina galveno oksidatīvo enerģiju epitēlija šūnās, sevišķi tievās zarnas enterocītos. Tomēr nav pārlicinošu datu par glutamīna terapeitisku nozīmi IZS uztura terapijā. P. Stradiņa KUS glutamīna lietošana pacientiem ar IZS netiek izmantota.

4) Taukskābes

Zarnu baktēriju darbības dēļ, pārstrādājot ogļhidrātus, resnajās zarnās rodas īso ķēžu taukskābes. Cilvēku zarnās vairāk nekā 90% no īso ķēžu taukskābēm sastopama etiķskābe, propionskābe un sviestskābe, kas ir galvenais kolonocītu enerģijas avots. Īso ķēžu taukskābes inducē celulāru proliferāciju, uzlabo viscerālo apasiņošanu, paaugstina nātrija un ūdens absorbciju no zarnas lumenā. Sviestskābe (butirāts) 70% nodrošina galveno enerģijas daudzumu resnās zarnas šūnām – kolonocītiem (34, 35). Īso ķēžu taukskābju nozīme ČK paučīta (pēc proktokolektomijas) terapijā ir pētāma. Līdz šim veikto pētījumu rezultāti ir pretrunīgi.

Garo ķēžu omega-3 taukskābju terapeitiskais efekts IZS uztura terapijā ir pierādīts. IZS gan orāli, gan parenterāli ir novērots pozitīvs klīniskais efekts, kas samazina klīniskos simptomus, glikokortikoīdu nepieciešamību un uzlabo resnās zarnas epitēlijšūnu struktūru, kas ir endoskopiski un histoloģiski apstiprināts (27, 28). Omega-3 taukskābes labvēlīgi ietekmē iekaisuma mediatoru profilu, samazinot proinflatōru mediatoru (PG E2/I2, LT B4 /C4 /D4 /E4 /F4), un palielina mazāk iekaisīgo mediatoru (PGE3, PGI3, TXA3, LTB5 /C5 /D5 /E5) sintēzi, kā arī tām piemīt imunomodulējošs efekts (29). Pētījumos ir pierādīta lielāka terapeitiska efektivitāte parenterāli lietotām omega-3 taukskābēm salīdzinājumā ar enterālo lietošanu.

Vidējo ķēžu taukskābes papildus lieto IZS pacientiem, kuriem ir tauku malabsorbcija. Šīs taukskābes pārsvarā ir papildu komponents parenterālos un enterālos uztura maisījumos. Rekomendējamā deva ir 50 g/d. Vidējo ķēžu taukskābes nesatur esenciālās taukskābes (36). Arī Paula Stradiņa KUS ir iespējams izmantot enterālās ēdināšanas formulas, kuru sastāvā ir vidējo ķēžu taukskābes.

5) Vitamīni un minerālvielas

IZS pacientiem ir pierādīts zems vitamīnu un minerālvielu daudzums asinīs serumā (24).

Biežāk sastopamie simptomi, kas ir saistīti ar vitamīnu un minerālvielu deficītu IZS, ir parādīti 5. tabulā.

D vitamīna rekomendētā dienas deva veselam cilvēkam ir 400 IU. IZS D vitamīna deficīts ir multifaktoriālas izcelsmes (piena produktu nelietošana laktozes intolerances dēļ, malabsorbcija, malnutricija, hipogonādisms). Sevišķi izteikts D vitamīna deficīts ir IZS pacientiem, kuri ilgu laiku ārstēšanā saņem glikokortikosteroīdus. Pacientiem, kuri saņem glikokortikoīdus > 7,5 mg/d, ir samazināts kaulu densitātes blīvums. Šiem pacientiem rekomendē lietot D vitamīnu 400–600 IU 2–3 reizes dienā kopā ar adekvātu kalcija devu. Pētījumos ir pierādīts, ka prednizolons inducē D vitamīna rezistenci, jo palielina parathormona līmeni asinīs, kas veicina Ca zudumu. Lai inhibētu šo procesu, ieteicamā D vitamīna deva ir 50 000 IU katras 2–4 nedēļas. Pacientiem ar funkcionējošu zarnu traktu ilgstoši lietot D vitamīnu lielās devās nav ieteicams (4, 25, 26). Pacientiem ar smagu malabsorbciju rekomendēts lietot 2000–4000 IU D vitamīna dienā, kontrolējot seruma 25-hidroksivitamīna D līmeni asinīs, kam jābūt normas robežās (25, 26).

Simptomātiskā KS gadījumā pacientiem papildus jāsaņem kalcijš 1000 mg un D vitamīns 400–800 IU dienā, kas mazina osteopēnijas un osteoporozes attīstības

risku. Cinka deficīta gadījumos, kā iemesls visbiežāk ir ielgusi šķidra vēdera izeja, papildus rekomendēts Zn 20–50 mg dienā.

5. tabula

Vitamīnu un minerālvielu rekomendētās devas pacientiem ar iekaisīgām zarnu slimībām

Recommended dose of vitamins and minerals for patients with IBD

Nutrienti	Rekomendētā dienas deva	Deficīta klīniskie simptomi	Rekomendētā aizstājējterapijas deva
Cinks (Zn)	15 mg	Sausa, pelēka āda, plaukstu lobīšanās, diareja, mentālas izmaiņas	50 mg dienā
Dzelzs (Fe)	10–15 mg/d	Mikrocitāra anēmija, vājums	300 mg 1–3 x/d
Vit. B ₁₂ kobalamīns	3 mkg	Makrocitāra anēmija, parestēzijas, ataksija, diareja, mentālas izmaiņas	1000 mkg/d
Folāti	400 mkg	Sausa mute, glosīts, diareja, makrocitāra anēmija	1 mg/d
Kalcijs (Ca)	800–1500 mg	Osteopēnija, osteoporoze, tetānija	1500–2000 mg/d
Magnijs (Mg)	400 mg	Slikta dūša, muskuļu vājums, aritmijas, apjukums	150 mg 4x/d elementālā Mg
D vitamīns	400 IU	Rahīts, osteomalācija, osteopēnija, muskuļu vājums, tetānija	Devu variabla (skatīt tekstā)

Pacientiem ar IZS vitamīnu un minerālvielu papildu terapiju parasti rekomendē lietot ambulatori, izrakstoties no stacionāra.

6) Prebiotikas, probiotikas

Prebiotikas ir fruktooligosaharīdi (inulīns, laktuloze, galaktooligosaharīdi), tie šķīst ūdenī un veicina zarnu pasāžu. Ņemot vērā, ka 10 g fruktooligosaharīdu dienā var provocēt šķidru vēdera izeju ar krampju epizodēm, pēc autoru domām, IZS aktīvā fāzē prebiotikas nav rekomendējamas, lai gan tiek ražotas enterālās ēdināšanas formulas, kuru 1000 kkal satur 4–8 g oligosaharīdu.

Probiotiku nozīme ir pierādīta zarnu infekcijas riska mazināšanā. Pētījumos probiotiku terapeitiskā efektivitāte IZS ir diskutabla. Literatūrā aprakstīti daži pētījumi, kuros probiotiku terapijai ar *E. Coli Nissle 1917* bija ekvivalents terapeitisks efekts, panākot remisiju salīdzinājumā pret 5-ASA preparātiem (29, 30, 31).

Veiktie klīniski novērojumi analizētajā periodā parāda, ka pacientu ar KS ir divas reizes mazāk nekā pacientu ar ČK. Tā kā resno zarnu ar diagnostiskām metodēm iespējams izmeklēt pilnībā (kolonoskopiski), ir pierādāmi resnās zarnas lokalizēti KS gadījumi. Taču, ņemot vērā, ka Latvijā pašreiz nav iespēju endoskopiski izmeklēt tievās zarnas, pastāv lielas grūtības identificēt iekaisīgās zonas lokalizāciju. Ņemot vērā, ka etiopatogēnētiski KS visvairāk skar tievās zarnas daļas, visbiežāk klīniski attīstās multifaktoriāls nutrientu deficīts, kas ir saistīts ar alimentāru un metabolisma izraisītu deficītu, un tas liecina par iespējamo tievās zarnas gļotādas bojājumu.

Pašreiz pastāv iespējas diagnosticēt (ar radioloģiskām izmeklēšanas metodēm – Rtg ar kontrastvielu, CT, MR) KS komplikācijas (obstrukciju, zarnas stenozi, fistulas), kuras bieži ir novēlotā slimības stadijā. Pagaidām Latvijā nav pieejama endoskopiska (enteroskopijas metode) tievās zarnas izmeklēšana, kas apgrūtina tievās zarnas KS lokalizācijas formu noteikšanu. No 2006. gada Paula Stradiņa KUS sāka izmantot kapsulas endoskopiskās izmeklēšanas metode (šajā pētījumā), kas ir pirmais solis endoskopiskā tievās zarnas izmeklēšanā. Tas dos iespēju diferencēt KS lokalizācijas formas. Pēc autoru domām, otra lielākā problēma, kas izraisa biežākas komplikācijas KS slimniekiem, ir nepietiekamas etiopatoģenētiskas ārstēšanas (klīniskās uztura terapijas, bioloģiskās terapijas) izmantošana klīniskā praksē. KS komplikāciju dēļ tiek veikta operatīva terapija, kas nav vēlama, jo tā palielina malabsorbcijas risku un nemazina atkārtota recidīva risku. Savukārt smaga ČK gadījumā operatīvās terapijas efekts ir klīniski pierādīts.

Autori uzskata, ka vienkāršākās un ekonomiski izdevīgākās KS komplikāciju riska mazināšanas iespējas būtu izvērtēt IZS pacientu antropometriskos rādītājus (augums, svars), izvērtēt slimības aktivitāti (bioķīmiskās analīzes: albumīns, c-reaktīvais olbaltums, IZS aktivitātes indekss, apetīte, anoreksija), lai uzsāktu adekvātu klīnisko uztura terapiju. Pacientiem 5% svara zudums noteiktā laika posmā (6 mēnešu, 3 mēnešu vai 1 mēneša laikā) dod pilnīgu priekšstatu par nutritīvā stāvokļa smaguma pakāpi. Malnutrīcija negatīvi ietekmē IZS klīnisko gaitu, palielina komplikāciju risku un palielina postoperatīvo mirstību. Preoperatīva malnutrīcija palielina postoperatīvas komplikācijas un palielina pacientu hospitalizācijas laiku (16, 17, 18). Papildus KS terapijai būtu mērķtiecīgi iniciāli uzsākt enterālo ēdināšanu, kurai ir pierādīts terapeitiskais efekts, tādējādi ātrāk panākot KS slimības remisiju (10, 11).

Enterālās ēdināšanas nozīme:

- a) malnutrīcijas prevencija un ārstēšana,
- b) augšanas un nobriešanas nodrošināšana bērniem un pusaudžiem ar KS,
- c) dzīves kvalitātes uzlabošana.

Specifiskas enterālās ēdināšanas indikācijas KS:

- a) akūtas fāzes terapija,
- b) perioperatīva enterālā ēdināšana.

Agrīni uzsākta enterālā ēdināšana novērš gan akūto, gan vēlīno slimības komplikāciju attīstību. Literatūrā ir aprakstīti pētījumi, kuros pierādīts, ka nav būtisku efektivitātes atšķirību enterālās ēdināšanas speciālajām formulām, tāpēc ieteicams uzsākt enterālo ēdināšanu ar elementālām (proteīnus saturošām) formulām, kuras ordinē papildus (600 kkal) virtuves uzturam. Pēc literatūras datiem, nelielu daudzumu enterālās barošanas maisījumu pacienti labi panes. KS aktīvā fāzē uzsākta enterālā ēdināšana sasniedz remisiju 60% gadījumu (19, 20, 21, 22). Ja ir smaga KS forma vai akūtās fāzes stadija, kad ir izteikts zarnu gļotādas iekaisums, enterocītu bojājums ar izteiktu aktivitāti (vēdera sāpju sindromu – ielītu, subokluzīvām epizodēm, izteiktu diareju, hipoalbuminēmiju (albumīns serumā < 35 g/l)), tad optimāla izvēles metode būtu īslaicīga parenterāla barošana (apmēram 5 dienas vai ilgāk). Tas atslodotu zarnu traktu akūta iekaisuma fāzē (14, 15). Grūti ārstējamā, glikokortikoīdu rezistentā KS,

lietojot totālu parenterālo ēdināšanu, īslaicīgu remisiju var panākt 64% gadījumu, bet ilglaicīgāku remisiju mazāk nekā 50% gadījumu (4, 5, 16). Fistulu veidošanās zarnās ir bīstama KS komplikācija, jo ir gļotādas transmūrāls iekaisuma defekts. Totāla parenterāla ēdināšana 44% gadījumu samazina fistulu attīstības risku (4).

Absolūta indikācija totālai parenterālai ēdināšanai ir īsās zarnas sindroms.

Ja pacients lieto virtuves ēdienu, jāievēro noteikti diētas principi – eliminācijas diēta (nelietot produktus, kuri veicina zarnu kairinājumu). Vēlams nelietot piena produktus (laktozi), jo bojātā zarnu gļotādā bieži attīstās laktozes intolerance. KS stenozejošās formās uzturā nelietot produktus, kas bagāti ar šķiedrvielām (pilngraudu produkti, oligosaharīdi – pākšaugi). Pacientiem būtu vēlams papildus saņemt enterālās barošanas maisījumus ar vidējo ķēžu taukskābēm, jo tievo zarnu iekaisumā nereti ir steatoreja, kurā tiek zaudētas garo ķēžu taukskābes, to uzsūkšanai ir nepieciešamas žults skābes, kuras tiek masīvi zaudētas šķidrā vēdera izejā.

IZS pacientiem tiek rekomendēts papildus uztura terapijā lietot vitamīnus, minerālvielas un omega-3 taukskābju preparātus.

Secinājumi

Izvērtējot Paula Stradiņa KUS stacionārā ārstēto pacientu ar KS un ČK, analizētajā periodā tika konstatēts, ka pacientu ar KS ir divas reizes mazāk nekā pacientu ar ČK, bet klīniskā norise KS ir smagāka, tai ir grūtāk diagnosticējamās formas un ir biežākas komplikācijas (zarnu stenozes, fistulas, obstrukcijas). Pēc pētījuma datiem, KS gadījumos visbiežāk ir novērotas neprecīzētas lokalizācijas formas, tas ir saistīts ar diagnostikas aparatūras trūkumu. Otra biežākā KS lokalizācija ir tievo zarnu forma. Tievās zarnas ir galvenais patoģenētiskais posms, kuram iekaisot, attīstās malabsorbcija un malnutrīcija, kas savukārt paaugstina KS komplikāciju risku, postoperatīvo komplikāciju biežumu un pagarina hospitalizācijas laiku (10, 11).

Ņemot vērā literatūras datus un izvērtējot veikto analīzi, komplikāciju mazināšanai ir ieteicams izvērtēt nutritīvo stāvokli un slimības aktivitāti, lai mērķtiecīgi uzsāktu agrīnu klīnisko uztura terapiju, kas spēj mazināt akūtās un hroniskās KS komplikācijas un panākt agrīnāku slimības remisiju.

Pašreizējā uztura terapijā pacientiem Paula Stradiņa KUS Gastroenteroloģijas centrā saņemtā uztura kalorāža neatbilst IZS vajadzībām. Pacientiem ar IZS paasinājuma fāzē, kuru $\text{KMI} \leq 18,5$, būtu ieteicams papildus pašreizējam uztura daudzumam saņemt 600 kkal enterālās ēdināšanas standarta formulas veidā.

Literatūra

1. Cavanaugh J. IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 68: 1165–71, 2001.
2. Satsangi J, Parkes M, Louis E et al. Two-stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7, 12. *Nat Genet* 14:199–202, 1996.

3. Griffiths AM. Inflammatory bowel disease. *Nutrition* 14: 788–91, 1998.
4. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92: 5–11, 1997.
5. Gassull MA, Abad A, Cabre et al. Enteral nutrition in inflammatory bowel disease. *Gut* 27: 76–80, 1986.
6. Han PD, Burke A, Baldassano RN et al. Nutrition and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin* 28: 423–436, 1999.
7. Dieleman LA, Heizer WD. Nutritional issues in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 27: 435–451, 1998.
8. Duerksen DR, Nehra V, Bistrain BR et al. Appropriate nutritional support in acute and complicated Crohn's disease. *Nutrition* 14: 462–65, 1998.
9. Grimble RF. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition*, 14: 634–40, 1998.
10. Lochs H, Dejong C, Hammarqvist X et al. ESPEN Guidelines on enteral nutrition: gastroenterology. *Clinical Nutrition* 25: 260–274, 2006.
11. Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG et al. Inflammatory bowel disease. Principles of nutritional therapy. *Rev Hosp Clin Fac Med S. Paulo* 57(4): 87–198, 2002.
12. Kondrup J, Allison SP, Elia M et al. ESPEN guidelines for nutrition screening 2002. *Clinical Nutrition* 22 (4): 415–421, 2003.
13. Kondrup J, Johansen N, Plum LM et al. Incidence of nutritional risk and causes of inadequate nutritional care in hospitals. *Clinical Nutrition* 21: 46–468, 2002.
14. Seo M, Okada M, Yao T et al. The role of total parenteral nutrition in management of patients with acute attacks of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 29: 270–275, 1999.
15. Messing B. Parenteral nutrition: indications and techniques. *Ann Med Interne (Paris)* 151(8): 652- 658, 2000.
16. Cucino C, Sonnenberg A. Cause of death in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 7: 250–5, 2001.
17. Lindor KD, Fleming CR, Ilstrup DM. Preoperative nutritional status and other factors that influence surgical outcome inpatients with Crohn's disease. *Mayo Clin Proc* 60: 393–6, 1985.
18. Higgins CS, Keighley MR, Allan RN. Impact of preoperative weight loss and body composition changes on postoperative outcome in surgery for inflammatory bowel disease. *Gut* 25: 732–6, 1984.
19. Messori A, Trallori G, D'Albasio G, Milla M, Vannozzi G, Pacini F. Defined-formula diets versus steroids in the treatment of active Crohn's disease: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 31: 267–72, 1996.
20. Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutrition therapy for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000542, 2001.
21. Seidman EG. Semi-liquid diet versus prednisone in treatment of active Crohn's disease in children and adolescents. *Gastroenterology* 104: A778, 1993.
22. Fernandez-Banares F, Carbe E, Esteve-Comas M et al. How effective is enteral nutrition in inducing clinical remission in active Crohn's disease? A meta-analysis of the randomized clinical trials. *J Parent Enteral Nutr* 19: 356–64, 1995.
23. Schneewies B et al. Energy and substrate metabolism in patients with active Crohn's disease. *J Nutr* 129: 844–848, 1999.
24. Graham TO, Kandil HM. Nutritional factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 31: 203–218, 2002.
25. Jeejeebhoy KN. *Clinical Nutrition*: 6. Management of nutritional problems of patients with Crohn's disease. *CMAJ*, 166: 913–918, 2002.

26. Klein S. Nutritional therapy. In Ahaya SN, Flood K, Paranjothi S (Eds), The Washington Manuel of Medical Therapeutics. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 27–42, 2001.
27. Almallah YZ, Richardson S, O'Hanrahan T et al. Distal procto-colitis, natural cytotoxicity and essential fatty acids. *Am J Gastroenterol* 93: 804–809, 1998.
28. Geerling BJ, Badart-Smook A, Van Deursen C et al. Nutritional supplementation with N-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflamm Bowel Dis* 6 (2): 77–84, 2000.
29. Campos FG, Waitzberg DL, Texeira MG, Mucerino DR et al. Pharmacological nutrition in inflammatory bowel diseases. *Nutr Hosp* 18: 57–64. ISSN 0212–1611, 2003.
30. Marteau P, Boutron-Ruault MC. Nutrition advantages of probiotics and prebiotics. *British J Nutr*, 87: 153S–157S, 2002.
31. Rembacken BJ et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet* 354: 635–639, 1999.
32. Kruis W et al. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission in ulcerative colitis. *Alimentary Phar Ther* 11: 853–858, 1997.
33. Hendricks K et al: Dietary intake of adolescents with Crohn's disease. *J Am Diet Assoc*, 94: 441, 1994.
34. Schepach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Kasper H. Effect of butyrate in distal ulcerative colitis. *Gastroenterol* 103: 51–56, 1992.
35. Hove H and Mortensen PB. Influence of intestinal inflammation (IBD) and small and large bowel length on faecal short-chain fatty acids and lactate. *Dig Dis Sci* 40: 1372–1380, 1995.
36. Griffiths AM, Ohlsson A, Sherman PM, Sutherland LR. Metaanalysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. *Gastroenterol*, 108: 1056–1067, 1995.
37. Eiden KA. Nutritional considerations in inflammatory bowel disease. *Nutrition issues in gastroenterology*, 5: 34–35, 2003.

Summary

Inflammatory bowel disease (IBD) – ulcerative colitis and Crohn's disease (CD) – are chronic immunological predisposed gastrointestinal inflammatory diseases of unknown etiology. Inflammatory bowel disease, particularly Crohn's disease, are increasing in recent years, becoming a big problem of gastroenterology in the whole world. Decreased oral intake, malabsorption, accelerated nutrient losses, increased nutrient requirements, and drug-nutrient interactions cause nutritional and functional deficiencies that require proper correction by nutrition therapy. Nutrition therapy reduces malnutrition and modulates inflammatory response, thus decreasing the activity of the disease. Enteral nutrition is effective for inducing clinical remission of IBD in adults. Nutrition therapy is equally effective in primary therapy and induction of remission of active Crohn's disease. Early enteral feeding prevents acute and chronic complications of IBD.

The goal of this study is to reassess the nutritive status of patients with IBD treated in the Gastroenterology Centre of Paul Stradin's Clinical University Hospital, considering the clinical data and nutritive status' analysis of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, and to work out the recommendations for preventing malnutrition by nutrition therapy.

The studied data confirmed that nutritive deficit in CD patients is related to the injury of small bowel and it facilitates severity of late complications.

Keywords: *Inflammatory bowel disease (IBD), malnutrition, malabsorption, hypercatabolism, enteral nutrition, parenteral nutrition, nutrition therapy.*

Ar plaušu mākslīgo ventilāciju asociētās pneimonijas Intensīvās terapijas nodaļā Latvijā *Ventilator-Associated Pneumonia in the Latvian Multidisciplinary Intensive Care Unit*

Kristīne Geldnere¹, Dace Māliņa², Dace Spilnere³, Arta Balode⁴,
Pēteris Ošs⁵, Uga Dumpis⁶

¹ Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Endokrinoloģijas centrs
Pilsonu iela 13, Rīga, Latvija. E-pasts: kristine@transplantation.lv

² Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Pilsoņu iela 13, Rīga, Latvija
³ Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte, Rīga, Latvia

⁴ Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Mikrobioloģijas laboratorija
Pilsonu iela 13, Rīga, Latvija

⁵ Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Reanimācijas un intensīvās
terapijas nodaļa, Pilsoņu iela 13, Rīga, Latvija

⁶ Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Epidemioloģijas nodaļa
Pilsonu iela 13, Rīga, Latvija. E-pasts: ugadumpis@stradini.lv

A prospective two-year study was conducted to determine the incidence and main pathogens of ventilator-associated pneumonia (VAP) in the Multidisciplinary Intensive Care Unit of Pauls Stradins Clinical University Hospital, Rīga, Latvia.

A prospective cohort study design was used. The primary outcome examined was the incidence of VAP in mechanically ventilated patients. All patients who required mechanical ventilation for more than 48 hours from 1 April 2001 to 1 April 2003 were enrolled in the study. The following patient data were recorded: age, gender, underlying disease, duration of hospital stay, duration of mechanical ventilation, prior use of antibiotics, and risk factors for VAP.

Among 512 mechanically ventilated patients 37 (7.2%) developed VAP. The estimated incidence of VAP was 13.6 per 1,000 ventilator days. Incidence was notably higher in summer months. 70% of patients were males. Crude mortality rate of patients with VAP was 29.7%.

Microbiological samples were obtained by bronchoalveolar lavage. One pathogen was isolated from 17 patients, two pathogens from 14, and three pathogens from 2 patients. Cultures from 4 patients were negative. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from 19 (51%), *Acinetobacter baumannii* from 11 (30%), *Klebsiella pneumoniae* from 13 (23%), and *Staphylococcus aureus* from 4 (11%) patients.

A high degree of antibacterial resistance was detected in Gram-negative bacteria. Resistance to imipenem/cilastatin, ceftazidime, gentamycin, and ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* extended 60%. Resistance to carbapenems was identified in 10% of *Acinetobacter baumannii* strains. MRSA was not isolated during the study.

This study provides data highlighting the clinical importance of VAP and the antibacterial resistance of Gram-negative bacteria in the ICU. Further studies evaluating prevention and treatment strategies are needed.

Keywords: Ventilator-associated pneumonia (VAP), nosocomial infections, surveillance, intensive care unit.

Introduction

Ventilator-associated pneumonia (VAP) represents the leading cause of death from nosocomial infections among patients requiring admission to the intensive care unit¹. The estimated prevalence of VAP ranges from 8% to 65% with associated case fatality rates exceeding 25%. VAP must be distinguished from other forms of hospital-acquired pneumonia because it leads to a significantly prolonged hospital stay and increased mortality and resource utilization².

Gram-negative bacteria are the most common pathogens isolated from patients with VAP in most of the studies published so far. In several countries, spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has led to an increasing importance of MRSA as the main causative agent. In many patients, VAP is caused by multiple organisms.

The main objective of this prospective study was to establish the incidence of VAP in the Latvian Multidisciplinary ICU. We also analysed risk factors and microbiological findings in order to introduce a more effective prevention and treatment strategy.

Materials and Methods

A prospective cohort study design was used. The primary outcome examined was the incidence of VAP in mechanically ventilated patients. All patients who required mechanical ventilation for more than 48 hours from 1 April 2001 to 1 April 2003 were enrolled in the study. The following patient data were recorded: age, gender, underlying disease, duration of hospital stay, duration of mechanical ventilation, prior use of antibiotics, and risk factors for VAP.

Definition criteria for VAP in our study were

- 1) Fever $> 38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ and WBC $> 11,000$ or $< 4,000/\text{mm}^2$,
- 2) Increase in purulent excretions,
- 3) Positive tracheal aspirate culture,
- 4) Presence of new, persistent pulmonary infiltrates in chest radiographs.

VAP was diagnosed if two of the criteria were present.

In each case of definite pneumonia, we performed bronchoscopy to collect bacteriological samples by bronchoalveolar lavage (BAL). Acquired specimens were transferred to a microbiological laboratory within 45 min. The media and incubation conditions were appropriate for the cultivation of the most probable respiratory pathogens. Standard disk diffusion method was used for antibiotic sensitivity testing.

Results

A total of 1174 patients was admitted to ICU over the study period. 512 patients required mechanical ventilation for more than 48 hours. VAP developed in 37 ventilated patients (7.2%). Incidence of VAP was 13.6 per 1,000 ventilator days. The majority of patients had neurological disorders (Table 1).

Different pathogens isolated over the study period are shown in Table 2. One pathogen was isolated from 17 patients, two pathogens from 14, and three pathogens from 2 patients. Cultures from 4 patients were negative.

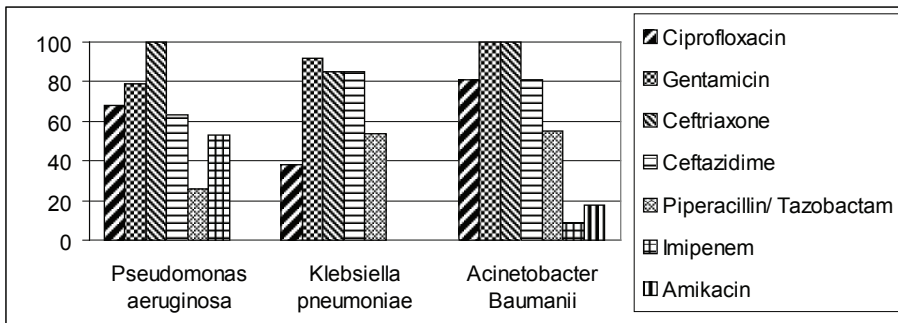


Figure 1. Antibacterial resistance (%) of Gram-negative microorganisms isolated from patients with VAP.

Izolēto Gram-negatīvo mikroorganismu antibakteriālā rezistence (%) pacientiem ar VAP

Discussion

Incidence of VAP in our study was 7.2%, or 13.6 cases per 1,000 ventilator days, to provide a better comparison. Overall rates reported by other researchers are most commonly 10 to 15 cases per 1,000 ventilator days, depending on the populations studied³.

There is no accepted “gold standart” for diagnosis of VAP. We had to choose the approach most suitable for our clinical setting. A postmortem study with similar definitions established 69% sensitivity and 75% specificity of the method⁴. Available evidence at the time of the selection of our methodology indicated that the diagnosis of VAP is associated with about 30–35% false negative and 20–25% false positive results⁵. Four patients were BAL culture negative. We could speculate that their radiological infiltrates were not of infectious aetiology.

Crude ICU mortality rates of 24 to 76% have been reported for VAP in different institutions. In our study, mortality in patients with VAP was 29.7%. It is difficult to determine whether such patients would have survived if VAP had not occurred.

The majority of patients with VAP in our study were males. Male sex has been associated with higher incidence of VAP in several studies⁶. We cannot make such conclusions because a significant proportion of patients with head injuries are males. Patients with head injuries contribute to many VAP cases in our study (Table 1)

Table 1

Characteristics of patients with VAP
VAP pacientu raksturojums

Characteristics	Patients with VAP
Age, yr	Mean 51 (range 18–85)
Gender	
Male	26 (70%)
Female	11 (30%)
Reason for hospitalization in ICU	
Traumatic head injury	10 (27%)
Spontaneous cerebral haematoma	9 (24%)
Other sever neurological disorders	8 (22%)
Renal failure	2 (5%)
Other disorders	8 (22%)
Risk factors	
Nasogastral tube	37 (100%)
Prior use of antibiotics	27 (73%)
Tracheotomy	34 (92%)
Surgical intervention	22 (59%)
Chronic heart failure	5 (14%)
Chronic renal failure	4 (11%)
COPD	3 (8%)
Diabetes	3 (8%)
Time of hospitalization before VAP	12,6 (SD = ±10.3)
Time of mechanical ventilation before VAP	10 (SD = ±8)
Onset of VAP	
Early (<96 h)	7 (19%)
Late (>96 h)	30 (81%)
Mortality rate	29.7 % (11/37)

A higher incidence of VAP was registered in summer months. This most likely could not be attributed only to the outbreak of certain bacteria because an increased number of different pathogens were isolated. We can speculate that infection control measures were not sufficient at that time.

Conceptually, VAP can be divided into an early-onset and late-onset disease, according to the day of the onset. In our study, 19% of patients had an early-onset disease. There was a difference in the etiology of early-onset disease and late-onset disease (data not shown).

The most frequent pathogens isolated from our patients were Gram-negative rods. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from half of VAP patients. These findings are similar to previously published information⁷. Most of the isolates were highly resistant to fluoroquinolones, ceftazidime, and gentamycin. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* was detected during our study in one patient. These findings could have potential severe implications that could make the choice of empirical treatment difficult and expensive.

Table 2

The number of main pathogens isolated over the study period.

Galveno izolēto mikroorganismu skaits pētījuma laikā

	April May 01	Jun Jul 01	Aug Sept 01	Oct Nov 01	Dec Jan 01	Feb Mar 02	Apr May 02	Jun Jul 02	Aug Sept 02	Oct Nov 02	Dec Jan 03	Feb Mar 03	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4		2			3			1		1	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2	2	1	2	2	6		2	1			19
<i>Acinetobacter baumannii</i>		3		1			3	1	1	1		1	11
<i>Staphylococcus aureus</i>		1					2					1	4
Other		1	2		1		1	2	1				6
Total number of isolates	3	11	4	4	3	2	15	3	4	3		3	53
Number of patients	2	7	2	3	2	2	8	2	3	2	2	2	37

Interestingly, only 4 oxacillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates were identified as a possible cause of VAP. MRSA and VRE (Vancomycin-resistant *enterococcus*) were not endemic in our hospital at the time of the survey. Once they will occur, we expect rapid spread of these pathogens due to lack of serious infection control measures in our ICU.

Multiple pathogens were isolated by BAL from nearly half of the studied patients. Polymicrobial flora complicates the choice of empirical treatment and can have a serious impact on the outcome of the disease. The number of patients in our study was too small to assess the impact of polymicrobial flora on mortality. For the same reason, we were not able to analyse the impact of different antibiotic treatment regimens on the outcome and microbiological clearance of infection.

This is the first study in Latvia of patients with VAP performed to date. Findings of this study indicate that VAP is an important morbid outcome among critically ill patients in our Multidisciplinary University Hospital ICU. Surveillance of VAP is useful to characterise the epidemiological situation and improve the quality of prevention measures and empirical treatment. Further studies evaluating prevention and treatment strategies are needed.

Acknowledgements

We thank the Hospital administration and the ICU staff for supporting the study. Work on this paper has been supported by the grant No. 1100.1 of Latvian Council of Science.

References

1. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, *et al.* The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995, 274: 639–44.
2. Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, *et al.* Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med* 1993, 94: 281–8.
3. Craven DE. Epidemiology of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000, 117: 186S–7S.
4. Torres A, el Ebiary M, Padro L, *et al.* Validation of different techniques for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Comparison with immediate postmortem pulmonary biopsy. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149: 324–31.
5. Fabregas N, Ewig S, Torres A *et al.* Clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax* 1999, 54: 867–73.
6. Kollef MH. Epidemiology and risk factors for nosocomial pneumonia. Emphasis on prevention. *Clin Chest Med* 1999, 20: 653–70.
7. Fagon JY, Chastre J, Domart Y *et al.* Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin Infect Dis* 1996, 23: 538–42.

Kopsavilkums

Veikts divus gadus ilgs prospektīvs pētījums, lai noskaidrotu ar ventilāciju asociētās pneimonijas (VAP) incidenci un biežākos tās izraisītājus Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas (Rīga, Latvija) Intensīvās terapijas nodaļā.

Izprētē izmantots prospektīva kohortas pētījuma dizains. Kā primārais iznākums tika definēta VAP incidence pacientiem ar mākslīgo plaušu ventilāciju. Pētījumā tika iekļauti visi pacienti, kuru ārstēšanā laika posmā no 2001. gada 1. aprīļa līdz 2003. gada 1. aprīlim bija nepieciešama mākslīgā plaušu ventilācija. Tika dokumentēti šādi pacientu dati: vecums, dzimums, pamatslimība, hospitalizācijas ilgums, mākslīgās plaušu ventilācijas ilgums, iepriekšēja antibakteriālās terapijas lietošana, VAP attīstības riska faktori.

VAP attīstījās 37 (7,2%) no 512 pacientiem, kuriem tika izmantota mākslīgā plaušu ventilācija. Aprēķinātā VAP incidence bija 13,6 uz 1000 ventilācijas dienām. Vasarā VAP incidence bija ievērojami augstāka. 7% no VAP pacientiem bija vīrieši. Pacientu mirstība ar VAP bija 29,7%.

*Bronhoalveolārās lavāžas laikā tika iegūti paraugi mikrobioloģiskai izmeklēšanai. Viens mikroorganisms tika izolēts 17 pacientiem, 2 mikroorganismi – 14 pacientiem un 3 mikroorganismi – 2 pacientiem. Četriem pacientiem uzņēmumi bija negatīvi. *Pseudomonas**

aeruginosa tika izolēta 19 (51%) pacientiem, Acinetobacter baumannii – 11 (30%), Klebsiella pneumoniae – 13 (23%) un Staphylococcus aureus – 4 (11%) pacientiem.

Gram-negatīvām baktērijām tika konstatēta izteikta rezistence pret antibiotikām. Pseudomonas aeruginosa rezistence pret imipenēmu/cilastatīnu, ceftazidīnu, gentamicīnu un ciprofloksacīnu sasniedza 60%, bet Acinetobacter baumannii rezistence pret karbapenēmiem bija 10%. Meticilīnrezistentais staphylococcus aureus (MRSA) pētījuma laikā netika izolēts.

Šī pētījuma dati atspoguļo VAP klīnisko nozīmību un Gram-negatīvo baktēriju antibakteriālo rezistenci Intensīvās terapijas nodaļā Latvijā. Nepieciešami turpmāki pētījumi, lai novērtētu VAP novēršanas iespējas un iespējamās ārstēšanas stratēģijas.

Mikroorganismu ietekme uz atopiskā dermatīta klīnisko gaitu, alergizāciju un dzīves kvalitātes līmeni *Impact of Different Microorganisms on Clinical Progress, Allergisation, and Quality of Life in Atopic Dermatitis Patients*

Inese Kolontaja^{1,2,3}, Ināra Ančupāne¹

¹Bērnu klīniskā Universitātes slimnīca

Vienības gatve 45, Rīga, LV-1004

²Diplomātiskā servisa medicīnas centrs

Elizabetes 57, Rīga, LV-1050

³Klīnika „Adoria”

A. Čaka 70, Rīga, LV-1011

Atopiskais dermatīts (AD) ir recidivējoša niezoša dermatoze, kam raksturīga atopija, imunoloģiskas ādas pārmaiņas un polimorfi izsitumi ar noteiktu lokalizāciju dažādām vecuma grupām (4, 7). Slimnieku āda ir uzņēmīga pret apkārtējās vides bioloģiskiem faktoriem – baktērijām un mikroskopiskajām sēnītēm (5, 3, 6). Savlaicīga jauktas infekcijas diagnostika ļautu piemērot adekvātu ārstēšanu, kas pozitīvi ietekmētu slimnieku dzīves kvalitāti. Atopiskā dermatīta etioloģija un patoģenēze nav pilnībā izpētīta (8, 9). Būtiska loma patoģenēzē ir ģenētiski nosacītām imunoloģiskām ādas pārmaiņām, apkārtējās vides bioloģiskajiem (bakteriālajiem, vīrusālajiem, sēnīšu), neuroendokrīnajiem, kā arī veģetatīvajiem faktoriem. Atopiskā dermatīta patoģenēzē būtiska nozīme ir bakteriālajai superinfekcijai (3, 13, 14, 15). Slimnieka organisma mijiedarbība ar mikroorganismiem var izpausties gan kā pastiprināta mikrofloras kolonizēšanās, gan arī kā makroorganisma sensibilizācija pret to. Tāpēc infekcioziem izraisītājiem ir būtiska nozīme ne tikai infekcijas, bet arī alergiska iekaisuma uzturēšanā (2, 6, 13). Pētot dažādus ādas mikrofloras veidus un biežumu uz veselu cilvēku ādas, noskaidrots, ka atopiskā dermatīta gadījumā atšķiras gan mikrofloras sastāvs, gan arī slimnieka organisma reakcija pret virspusējām bakteriālām infekcijām un sēnīšinfekcijām (5, 14, 15). Slimnieku grupām ar paaugstinātu slimības klīniskā smaguma pakāpi (angl. *atopic dermatitis scoring* – SCORAD) nepieciešams veikt detalizētu bakterioloģisko un mikroskopisko sēnīšu kultūrdiagnostiku un piemērot adekvātu sensitīvu patoģenētiski pamatotu ārstēšanu. Atopiskā dermatīta gadījumā aktivētie eozinofīlie leikocīti, degranulējoties apkārtējos audos, izdala aktīvus proteīnus, no kuriem būtiskākais ir eozinofīlais katjoniskais proteīns (ECP). Tā klīniskais izmantojums ļautu rutīnas praksē padziļināti pievērsties alergizācijas jautājumu risināšanai.

Laikus precizēti alergēni ļauj būtiski pozitīvi ietekmēt atopiskā dermatīta ārstēšanas posmu, kuru regulē pats slimnieks, apzināti izvairoties no saskares ar alergēniem vai iespējami tos eliminējot un tādējādi aizkavējot paasinājumus un novēršot nopietnas psiholoģiskas ciešanas gan sev, gan saviem tuviniekiem. Kopumā tas ļautu ievērojami paaugstināt slimnieku dzīves kvalitāti – rast pozitīvu ieguldījumu tautsaimniecībā, ietaupot ekonomiskos resursus, jo laikus tiktu noteikta infekcija un alergizācija un uzsākta adekvāta ārstēšana. Ārstējot slimības ar neskaidru etioloģiju, būtiski ir izzināt patoģenētiski nozīmīgus faktorus un

izstrādāt patoģenētiski pamatotas terapijas veidus. Svarīgs posms sekmīgā hronisku slimību kontrolē ir praktisku rekomendāciju izstrādāšanai un ieviešanai rutīnas klīniskajā praksē. Realizējot izvirzītos darba uzdevumus, tiek rasts praktisks ieguldījums hroniskas recidivējošas dermatozes – atopiskā dermatīta – laboratoriskajā diagnostikā un ārstēšanā, kas ļaus ievērojami paaugstināt slimnieku dzīves kvalitāti, – tas ir būtisks solis tautsaimniecības resursu lietderīgā izmantošanā.

Atopiskā dermatīta slimniekiem ar dažādu klīniskā smaguma pakāpi alergizācijas līmenis jauktas infekcijas grupās būtiski ietekmē dzīves kvalitāti.

Atslēgvārdi: jaukta infekcija, ECP, SCORAD, bakteriāla superinfekcija, dzīves kvalitātes līmenis.

Ievads

Pētījuma mērķi ir noteikt mikroorganismu sugas un analizēt to ietekmi uz atopiskā dermatīta klīnisko simptomātiku un eozinofilo leukocītu degranulāciju, kā arī noteikt jauktas infekcijas un eozinofilā katjoniskā proteīna ietekmi uz atopiskā dermatīta slimnieku dzīves kvalitātes līmeni dažādās slimības smaguma grupās.

Darba uzdevumi:

- 1) Identificēt mikroorganismus līdz sugai no atopiskā dermatīta slimnieku ādas paasinājuma un remisijas grupās.
- 2) Noteikt ECP ietekmi uz infekcijas veidiem un DLQI (angl. *dermatology life quality index*) noteiktās SCORAD grupās.

Materiāli un metodes

Jauktas infekcijas morfoloģiskās struktūras analīze un eozinofilā katjoniskā proteīna kvantitatīvā analīze tika veikta ambulatori atopiskā dermatīta slimniekiem. Kopumā tika analizēts 98 slimnieku stāvoklis ar apstiprinātu atopiskā dermatīta diagnozi pēc J. M. Hanifina un G. Rajkas diagnostiskiem kritērijiem, un šie slimnieki atbilda visiem iekļaušanas kritērijiem (9).

Iekļaušanas kritēriji:

- 1) Pēc J. M. Hanifina un G. Rajkas diagnostiskiem kritērijiem apstiprināta atopiskā dermatīta diagnoze.
- 2) Pēdējā mēneša laikā nav lietotas antibiotikas.
- 3) Pēdējā mēneša laikā nav lietoti kortikosteroīdi vai citostatiķi (metotreksāts).
- 4) Apskates brīdī nav konstatēta cita hroniski recidivējoša dermatoze.
- 5) Anamnēzē nav atzīmētas smagas sirds un asinsvadu, endokrīnas, ģinekoloģiskas, uroģenitālas vai citu orgānu sistēmu slimības, kas prasa regulāru medikamentozu ārstēšanu.
- 6) Slimnieka vecums ≥ 18 gadu.
- 7) Slimnieks brīvprātīgi piekrīt piedalīties pētījumā.

Izslēgšanas kritēriji bija neatbilstība kādam iekļaušanas kritērijam.

Pētījumam izvēlētie slimnieki atbilda visiem iekļaušanas kritērijiem, un netika novēroti izslēgšanas kritēriji. Lai vērtētu atopiskā dermatīta intensitāti un klīniskos simptomus, lietota SCORAD sistēma. SCORAD indeksu veido slimības apjoma, klīnisko pazīmju (eritēma, tūska / vezikulopapulozi elementi, mitrošana, kreveles, ekskoriācijas, lihenifikācija un neskartās ādas sausums / lobīšanās) intensitāte un subjektīvie simptomi.

Niezes un miega traucējumu intensitāti vērtē, izmantojot vizuālo analoģu skalu (VAS), kur maksimālais punktu skaits ir 10 un minimālais 0. Pēc SCORAD indeksa atopiskajam dermatītam tiek šķirtas trīs smaguma pakāpes:

I < 15 – viegla forma;

II 15–40 – vidēji smaga forma;

III > 40 – smaga forma.

Lai vērtētu slimnieka subjektīvo stāvokli, lietots dzīves kvalitātes indekss (DLQI). Daudzatzbilžu testa anketā ir 10 jautājumi. Atbildot uz visiem jautājumiem, maksimālais iespējamais punktu skaits ir 30, minimālais – 0. DLQI punktu skaidrojums ir šāds:

0–1 – nav ietekmes uz slimnieka dzīvi;

2–5 – neliela ietekme;

6–10 – vidēji liela ietekme;

11–20 – liela ietekme;

21–30 – ļoti liela ietekme.

Par izmeklējamo materiālu mikroskopisko sēnīšu identifikācijai tika izmantoti nokasījumi no bojātās ādas. Materiāls tika izmeklēts pēc Mikolīna metodes (3, 7). Mikolīna barotne sastāv no caurspīdīga plastmasas trauciņa un sintētiska objekta nešēja ar diviem sēnīšu kultivēšanai piemērotiem agarjiem. Tā ir selektīva barotne dermatofītiem un acitidinrezistentām sēnītēm. Agarju inkubē termostatā četras nedēļas 28–30 °C temperatūrā. Izaugušās kultūras identificē mikroskopējot.

Baktēriju sugas tika identificētas, izmantojot *BD BBL CRYSTAL* sistēmu, kas paredzēta grampozitīvo baktēriju, anaerobo un gramnegatīvo baktēriju, kā arī enterisko un nefermentējošo baktēriju identifikācijai. *BBL* kristālu *GP ID* panelis satur 29 sausos bioķīmiskus un enzimatiskus substrātus un šķīdumu baktēriju suspensijai. Testi, kas tiek izmantoti sistēmā, balstās uz mikrobu spēju utilizēt un degradēt specifiskus substrātus, ko nosaka ar dažādām indikatorsistēmām.

Eozinofilā katjoniskā proteīna (ECP) noteikšanai slimniekam tukšā dūšā ņem venozās asinis *Becton Dickinson SST* vakuumtaineros un atzīmē savākšanas laiku. Asinis inkubē 60–20 min 15–28 °C temperatūrā. Centrifugē 1000–1300 * g 10 min un atdala serumu. Svarīgi ir ievērot pareizu inkubēšanas temperatūru, centrifugēšanas noteikumus, jo tas var ietekmēt ECP koncentrāciju. Nepieciešamais tilpums ir 5 µl. Paraugus var glabāt 7 dienas 2–8 °C temperatūrā vai līdz trim mēnešiem –20 °C temperatūrā. Paraugus glabā polipropilēna stobros, jo stikls var mazināt ECP līmeni. Jāvairās no atkārtotas sasaldēšanas. Reāģentus glabā 2–8 °C temperatūrā. Metodes pamatā ir ELISA imūnfermentatīvā metode. Normas intervāls ECP ir 0–24 ng/ml.

Rezultāti

Pētāmajā pacientu kopā vidējais SCORAD punktu skaits paasinājuma periodā bija $44,71 \pm 1,361$ (SD 8,819), remisijas periodā – $15,84 \pm 0,7314$ (SD 5,473). Subjektīvo simptomu intensitāte, izdalot niezi un miega traucējumus, tika vērtēta pēc vizuālo analoģu skalas (VAS) 0–10 punktu intervālā, kur 0 – subjektīvo izpausmju nav un 10 – stipri izteiktas subjektīvās izpausmes – nieze un miega traucējumi. Paasinājuma grupā VAS katrā subjektīvo pazīmju skalā vidēji tika atzīmēti $6,071 \pm 0,2419$ (SD 1,568), remisijas grupā – $2,768 \pm 0,1507$ (SD 1,128).

Visi slimnieki aizpildīja DLQI anketas. DLQI tika aprēķināts, saskaitot kopējo DLQI daudzatzbilžu anketu punktu skaitu. 98% respondentu lielu ietekmi slimība atstāj tieši uz personiskām attiecībām un ikdienas aktivitātēm. Remisijas grupā vidējais DLQI punktu skaits bija $7,661 \pm 0,3478$ (SD 2,603), kas ataino vidēji lielu slimības ietekmi uz slimnieka dzīvi. Paasinājuma periodā vidējais DLQI punktu skaits ir $11,43 \pm 0,3657$ (SD 2,370), kas atbilst lielai ietekmei uz slimnieka dzīvi. Ļoti spēcīgi tiek ietekmēta personisko attiecību veidošana un subjektīvās izjūtas.

Ar bakterioloģiskām un mikroskopisko sēnīšu kultūrdiagnostikas metodēm līdz sugai nosakot bakteriālo un mikroskopisko sēnīšu izraisītājus, tika izdalīta jauktas infekcijas AD slimnieku grupa. Jauktai bakteriālai un mikroskopisko sēnīšu infekcijai neapšaubāmi ir ietekme tieši atopiskā dermatīta paasinājuma periodā, kur šī jauktā infekcija konstatēta 62%, savukārt remisijas grupā 38% pacientu. Pēc *BBL crystal GP ID* taksonomijas izdalītās grampozitīvās baktērijas: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Micrococcus spp*; *Staphylococcus cohnii*; *Streptococcus spp*; *Bacillus spp*. Pēc *BBL crystal GP ID* taksonomijas izdalītās nefermentējošās un entēriskās baktērijas: *Acinetobacter Iwofii*; *Citrobacter spp*; *Escherichia coli*; *Pantoea agglomerans*; *Pseudomona spp*; *Stenotrophomona maltophilia*; *Enterobacter spp*; *Klebsiella spp*.

Staphylococcus aureus izdalīts 56%, normālā ādas mikroflora – *S. epidermidis* – 28%, *Micrococcus spp*. – 14%, patogēnās nefermentējošās baktērijas 2–4% gadījumu. Gramnegatīvās nefermentējošās baktērijas vienādi bieži sastopamas gan paasinājuma, gan remisijas grupā. Tātad šo baktēriju nozīme iekaisuma akūtās fāzes patoģenēzē nav tik liela kā koagulāzes pozitīvo baktēriju gadījumā.

Jauktas infekcijas grupā tika izdalītas šādas mikroskopiskās sēnītes:

- *Pityrosporum orbiculare*;
- *Candida albicans*;
- *Epidermophyton spp*.

Pētītajiem slimniekiem izmeklējamais materiāls mikroskopisko sēnīšu identifikācijai tika ņemts no bojātās ādas perēkļiem ar spilgtāko klīnisko simptomātiku. Atopiskā dermatīta slimniekiem *Pityrosporum orbiculare* tika konstatēts 16%, *Epidermophyton floccosum* – 2%, *Candida albicans* – 4% gadījumu. Jaukta infekcija ir statistiski ticami palielināta paasinājuma periodā, kam raksturīga izteikta eritēma un primāras eflorescences bojājuma perēkļos.

ECP vidējā vērtība slimnieku grupā ar nelielu ietekmi uz dzīves kvalitāti ir $30,84 \pm 8,002$ (SD 25,31), grupā ar vidēji lielu slimības ietekmi uz dzīves

kvalitāti attiecīgi $27,87 \pm 3,325$ (SD 21,55), grupā ar lielu slimības ietekmi uz dzīves kvalitāti – $75,65 \pm 7,076$ (SD 40,65), grupā ar ļoti lielu slimības ietekmi uz dzīves kvalitāti – $119,6 \pm 11,7$ (SD 38,71). *Kruskal–Wallis* tests uzrādīja augstu statistisko ticamības pakāpi, jo $p < 0,0001$. Lai salīdzinātu dažādu dzīves kvalitātes grupu vidējos ECP lielumus, tika izmantots *Dunn's multiple comparison* tests, kas atklāja, ka statistiskā ticamība ir augsta starp grupām ar nelielu un lielu, ar nelielu un ļoti lielu, kā arī starp grupām ar vidēji lielu un lielu un grupām ar vidēji lielu un ļoti lielu slimības ietekmi uz dzīves kvalitāti, jo $p < 0,001$. Svarīgs mērķis dzīves kvalitātes celšanā ir ECP samazināšana.

Secinājumi

1. Atopiskā dermatīta slimniekiem konstatētas šādas mikroorganismu sugas: *S. epidermidis* 28%, *S. cohnii* 2%, *Micrococcus spp.* 14%. *S. aureus* konstatēts 56%, gramnegatīvās baktērijas – 2–4%, saprofitiskā sēnīte *Pityrosporum orbiculare* – 16%, *Epidermophyton floccosum* – 2% un *Candida albicans* 4% gadījumu.

2. Jauktas bakteriālas un mikroskopisko sēnīšu infekcijas grupā konstatēta statistiski ticami paaugstināta eozinofilo leukocītu degranulācija. Konstatēta saistība starp ECP līmeņa palielināšanos un SCORAD un DLQI indeksu palielināšanos.

Diskusija

AD ir hroniska recidivējoša ādas slimība, kam raksturīgas imunoloģiskas pārmaiņas ādā un pastiprināta *S. aureus* kolonizācija bojājuma perēkļos. *S. aureus* AD slimniekiem kolonizē gan uz bojātās ādas perēkļiem, gan apkārtējās ādas, taču atšķirīga ir superantigēnu producējošo celmu attiecība. 50% *S. aureus* celmu nespēj producēt superantigēnus (4, 8, 9, 15). Grampozitīvo baktēriju šūnas siena sastāv no peptidglikāniem (PEG) un lipoteihonskābju (LTA) polimēriem (5, 13). Paasinājuma periodā galvenās klīniskās pazīmes bojājuma perēkļos bija ādas eritēma, eksudācija, vezikulācija, papulācija, kreveles, virspusējas erozijas, ekskoriācijas. Remisijas periodā galvenās klīniskās izpausmes bija ādas sausums, nodulas, papulas, lihenifikācija, ekskoriācijas, lobīšanās, plaisas. Ādas nieze un sausums dažādās intensitātes izpausmēs tika konstatēta gan paasinājuma, gan remisijas grupās, un tas neapšaubāmi atstāj negatīvu ietekmi uz pacienta psiholoģiskā komforta līmeni. AD gadījumā āda ir vizuāli mainīta arī remisijas periodā – sausums, lobīšanās, lihenifikācija ir pazīmes, kas negatīvi ietekmē ādas estētisko funkciju, tādējādi negatīvi ietekmējot slimnieka dzīves kvalitāti (15). Paasinājuma periodā raksturīga niezes intensitātes palielināšanās, klīniski pievienojas ādas apsārtums, mitrošana, kreveles un papulācija. DLQI daudzatzbilžu tests ļauj objektīvi kontrolēt slimnieka subjektīvā diskomforta līmeni, kas saistīts ar slimības ietekmi (1, 10, 15). Kā liecina jaunākā literatūra, AD ir slimība, kas atstāj lielu ietekmi uz slimnieka dzīvi – darbu, atpūtu, sociālām aktivitātēm (1, 11, 12). Visi slimnieki anamnēzē atzīmēja, ka slimība atstāj negatīvu ietekmi uz ikdienas aktivitātēm, darbu, mācībām, atpūtu. Pētījumā mikrofloras analīze AD pacientiem pierāda, ka galvenā nozīme ir tieši koagulāzes pozitīvām baktērijām,

ko apstiprina arī literatūras dati. Normāli ādu kolonizē saproftiskās baktērijas – *S. epidermidis* un *Micrococcus*, kas, konkurējot ar patogēniskām un nosacīti patogēniskām baktērijām, veic ādas aizsargfunkcijas. Pētāmajā slimnieku grupā 56% gadījumu no ādas bojājuma perēkļiem tika izolēts patogēnais koagulāzes pozitīvais mikroorganismis *S. aureus*. Pēc literatūras datiem, galvenais *S. aureus* rezervuārs ir deguna ejas, tādēļ joprojām aktuāls ir jautājums par intranazālo antibiotiku lietošanu AD remisijas periodā (4, 5, 13). Normālā ādas mikroflora – *S. epidermidis* – konstatēta tikai 28%, *Micrococcus spp.* – 14% gadījumu. Patogēnajām gramnegatīvajām un nefermentējošām baktērijām ir nebūtiska loma, jo tās ir izolētas no AD slimnieku ādas tikai 2–4% gadījumu. Literatūrā sastopami dati par *E. coli* un *Corynebacterium* iespējamo nozīmi AD patogēnēzē, jo šie mikroorganismi izolēti attiecīgi 33% un 27% gadījumu, taču šie dati ir pretrunīgi (28, 13, 15). Pētāmajā pacientu grupā *E. coli* tika konstatēts 2% un *Corynebacterium* 4% gadījumu, pie tam netika novērota šo baktēriju kvantitatīva palielināšanās, pieaugot slimības smagumam. Jaukta infekcija paasinājuma periodā konstatēta 62%, savukārt remisijas periodā – 38% gadījumu. 16% AD pacientu no ādas tika izdalīta mikroskopiskā sēnīte *Pityriopsis orbicularis*, 4% – *Candida albicans*, 2% – *Epidermophyton floccosum*. Uz slimnieku ādas remisijas periodā dominējošā mikroflora ir *Staphylococcus epidermidis* un *Micrococcus* augstākā titrā ($1-3 \times 10^5$), nekā tas novērots paasinājuma periodā (1×10^3), kas liecina par normālās ādas mikrofloras alterāciju, reaģējot uz apkārtējās vides faktoriem. Paasinājuma periodā ir pastiprināta ādas uzņēmība gan pret patogēnisko baktēriju, gan pret mikroskopisko sēnīšu invāziju, kas atgriezeniski pasliktina klīnisko slimības gaitu. Pastiprināta eozinofilo leukocītu degranulācija korelē ar tādiem klīniskiem raksturlielumiem kā eritēma, papulas, ekskoriācijas, lihenifikācija, miega traucējumi, taču visspilgtāk eozinofilo leukocītu degranulācijas proteīns ECP korelē ar kopējo SCORAD indeksu. Pētījumā tika veikta ECP korelācijas analīze ar infekcijas veidiem un dzīves kvalitātes indeksu. Tika atklāts, ka ECP ir statistiski ticami ($p < 0,0001$) paaugstināts paasinājuma periodā ($90,69 \pm 6,792$) salīdzinājumā ar remisijas periodu ($30,36 \pm 3,121$). ECP palielināšanās pozitīvi korelē ar SCORAD indeksa pieaugumu, jo *Kruskal-Wallis* tests uzrādīja augstu ticamības pakāpi starp dažādām SCORAD grupām ($p < 0,001$). ECP pozitīvi korelē arī ar dzīves kvalitātes indeksa pieaugumu ar augstu statistisku ticamību, jo *Tukey's multiple comparison* testa $p < 0,001$. ECP avots ir vienīgi eozinofīlie leukocīti, un šis degranulācijas proteīns ir toksisks pret neironiem, dažām epitelijsūnu līnijām un izolētām miokarda šūnām (2, 15). ECP neironālais toksiskums ir nozīmīgs faktors niezošo dermatožu patogēnēzē. Izzinot AD patogēnēzē iesaistītos faktorus, paveras prospektīvas iespējas izstrādāt jaunus patogēnētiski pamatotus ārstēšanas virzienus, laboratoriskās diagnostikas algoritmus praktizējošiem ārstiem un nekomplcētus uzskates materiālus slimniekiem ar mērķi paaugstināt slimnieku dzīves kvalitāti.

Literatūra

1. Al-Awadi R, Dykes PJ, Gonzalez M, Finlay AY. Life activity impairment by skin disease. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2000, 14 (1): 50–54.
2. Akdis CA, Akdis M, Simon HU, Blaser K. Regulation of allergic inflammation by skin homing T cells in allergic ekzema. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118 (2–4): 140–144.

3. Bayrou O, Pecquet C, Flahault A, Artigou C, Abuaf N, Leynadier F. Head and Neck Atopic Dermatitis and Malassezia-furfur-specific IgE Antibodies. *Dermatology* 2005, 211: 107–113.
4. Coleman R, Trembath RC, Harper JI. Genetic studies on atopy and atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 1997, 136: 1–5.
5. Davison S, Allen M, Vaughan R, Barker J. Staphylococcal toxin induced use of superantigen reactive V-beta in cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)-positive lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121: 181–186.
6. Devos SA, van der Valk PG. The relevance of skin prick tests for pityrosporum ovale in patients with head and neck dermatitis. *Allergy*, 2000, 55: 1056–1058.
7. Fitzpatrick TB, Johnson RA, Wolf K. *Clinical dermatology. Common and serious diseases*. 2003, 6th ed.
8. Greaves MW. The immunopharmacology of skin inflammation: the future is already here. *Br J Dermatol*, 2000, 143: 47–52.
9. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)*, 92 (suppl), 1980, 44–47.
10. Holme SA, Edwards C, Hughes MT, Stone NM. Dermatology quality of life during contact dermatitis patch testing investigations. *Br J Dermatol*, 2003, 148–847.
11. Hongbo Y, Harrison MA, Salek MS, Finlay AY. Assessing the meaningfulness of Dermatology Life Quality Index (DLQI) scores. *JEADV*, 2003, 17 (3): 113.
12. Weber M, Mazzotti N, Barzenski B, Silva T. Evaluation of the quality of life in patients with atopic dermatitis participating in support groups. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52 (1): 70.
13. Wehner J, Neuber K. Staphylococcus aureus enterotoxins induce histamine and leukotriene release in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol*, 2001, 145: 302–305.
14. Wessels MW, Doeks G, Van Ieperen-Van Dijk AG. IgE antibodies to pityrosporon ovale in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 1991, 125: 227–232.
15. Kolontaja I. Vides un patogēnēzes faktoru saistība un ietekme uz dzīves kvalitāti atopiskā dermatīta slimniekiem Latvijā. Promocijas darbs. Rīga, 2006, 129 lpp.

Summary

Browsing through various publications of the last decade that discuss the complex role of mixed infection in the cases of chronic dermatoses, an idea grew to explore the morphological structure of the infectious agents, relationship with allergisation level, clinical progress, and life quality in the cases of atopic dermatitis.

The objective of the research is to study the impact of different microorganisms' and eosinophilic cationic protein (ECP) on the clinical severity of atopic dermatitis and on the patients' life quality and to identify the impact of the mixed infection on the clinical progress of the disease and the patients' life quality. The research involved 98 patients with confirmed atopic dermatitis according to diagnostic criteria of J. M. Hanifin and G. Rajka, who met all the inclusion criteria and did not display any exclusion criterion. The statistic data processing program GraphPad Prism 4 was used to process the research data. The results were measured as average values with a standard error. The area of the affected skin was estimated according to the "rule of nines". The average number of SCORAD (atopic dermatitis scoring) points in the period of aggravation was calculated as follows: 44.7 ± 1.361 (SD 8.819), and for the period of remission as follows; 15.84 ± 0.7314 (SD 5.743). The DLQI (Dermatology Life Quality Index) was calculated, summarising the total of the points of DLQI multi-reply inquiry forms. In the group of remission, the average number of

DLQI was 7.661 ± 0.3478 (SD 2.603), which illustrates a medium impact on the patients' life. In the period of aggravation, the average DLQI is 11.43 ± 0.3657 (SD 2.370), which confirms a strong impact. In the aggravation group, mixed infection was reported in 62% of patients while in the remission group in 38%, which inevitably demonstrates the role of the skin's protective functions in fight with pathogen microorganisms. 56% had the pathogen microorganism *Staphylococcus aureus*, 28% had a normal microflora - *S. epidermidis*, and 14% had *micrococcus spp.* The pathogen non-fermenting bacteria were reported in 2–4% of the cases. Gram-negative non-fermenting bacteria were likewise present for both groups. *Pityrisporum orbiculare* was identified in 16%, *Epidermophyton floccosum* in 2%, *Candida albicans* in 4%. ECP was statistically highly credibly increased in the period of aggravation in comparison to the period of remission ($P < 0.0001$). The average ECP was 90.69 ± 6.792 (SD = 44.02) for the aggravation group and 30.36 ± 3.121 (SD 23.35) for the remission group.

Keywords: mixed infection, ECP, SCORAD, bacterial superinfection, DLQI.

Tuberkulozu un bakteriālu spondilītu klīniskā norise un diferenciālā diagnostika

Clinical Course and Differential Diagnosis of Spondylitis of Tuberculous and Bacterial Aetiology

Alvils Krams^{1,2}, Guntars Mauriņš¹, Baiba Simsonē², Andra Cīrule¹

¹Tuberkulozes un plaušu slimību valsts aģentūra
p/n Cekule, Rīgas rajons, LV-2118

²Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: Alvils.Krams@tuberculosis.lv

Pētījuma mērķis ir noskaidrot tuberkulozas un netuberkulozas (bakteriālas) etioloģijas spondilītu klīniskās norises atšķirības un diagnostisko izmeklējumu nozīmi to diferenciālajā diagnostikā. Retrospektīvi tika analizēti 28 tuberkuloza (TBsp) un 86 netuberkuloza (neTBsp) spondilīta pacienti, kuri laikā no 2004. gada 1. janvāra līdz 2006. gada 31. decembrim tika operēti Tuberkulozes un plaušu slimību valsts aģentūrā (TPSVA). No riska faktoriem un blakus slimībām ar lielāko diagnostisko nozīmi ir aktīva plaušu tuberkuloze, kas statistiski augsti ticami ($p = 0,002$) biežāk konstatēta tuberkuloza spondilīta gadījumā. Netuberkuloza spondilīta gadījumā salīdzinoši biežāk konstatēts lumbālās daļas bojājums, savukārt tuberkuloza spondilīta gadījumā statistiski ticami biežāk novērota abscedēšanās, attiecīgi 68% un 38% ($p = 0,005$). Piogēnās baktērijas operācijas materiāla uzņēmumos konstatētas 29% tuberkuloza un 35% netuberkuloza spondilīta gadījumos ($p > 0,05$). Tuberkulozu spondilītu operāciju materiālā bakterioloģiski apstiprināja 50%, savukārt pārējos gadījumos diferenciālajā diagnostikā noteicoša bija operācijas materiāla patohistoloģiskā izmeklēšana. Lai arī dažos klīniskās norises rādītājos starp grupām konstatēta statistiski ticama atšķirība, pētījums apstiprina operatīvas terapijas un operācijas materiālu bakterioloģiskas (uz *M. tuberculosis*) un patohistoloģiskas izmeklēšanas izšķirīgo lomu klīniskās diagnozes noskaidrošanā.

Atslēgvārdi: tuberkulozs spondilīts, bakteriāls spondilīts, diferenciālā diagnostika.

Ievads

Apmēram 1–3% tuberkulozes slimnieku ir kaulu tuberkuloze (12), visbiežāk – apmēram pusē gadījumu – novēro spondilītu (11).

Latvijā gandrīz visi gan tuberkuloza, gan netuberkuloza spondilīta pacienti tiek operēti un ārstēti TPSVA. Tuberkuloza un citas etioloģijas bakteriāla spondilīta gadījumā neeksistē kāds konkrēts patognozs simptoms, kas ļautu tos droši diagnosticēt (3). Ikdienas klīniskajā praksē, pat saņemot operācijas materiāla patohistoloģiskās un bakterioloģiskās izmeklēšanas datus, galīgā klīniskā diagnoze nereti sagādā grūtības. Publikāciju par šo tēmu ir diezgan maz, kā arī tās nāk no valstīm ar atšķirīgu sociāli ekonomisko stāvokli un saslimstību ar tuberkulozi.

Pētījuma mērķis – salīdzināt klīnisko norisi un diagnostisko izmeklējumu rezultātus tuberkulozas etioloģijas un netuberkulozas (bakteriālas) etioloģijas spondilītu gadījumā.

Pētījuma uzdevumi – retrospektīvi salīdzināt tuberkulozas un netuberkulozas etioloģijas spondilītus pēc šādiem klīniskajiem rādītājiem: pacientu demogrāfiskie parametri, slimības norise un simptomi, riska faktori un blakus slimības, laboratoriskie iekaisuma rādītāji, spondilītu lokalizācija un komplikācijas, kā arī novērtēt bakterioloģisko un histopatoloģisko izmeklēšanas metožu nozīmi spondilītu etioloģiskajā diagnostikā.

Pacienti un metodes

Retrospektīva arhīvā pieejamo slimības vēsturu datu analīze pacientiem, kuri laika posmā no 2004. gada 1. janvāra līdz 2006. gada 31. decembrim spondilīta dēļ tika operēti TPSVA. Operēto pacientu loks tika noteikts, izmantojot TPSVA operāciju zāles reģistrācijas žurnālu.

Slimības vēsturu dati tika apkopoti īpaši izstrādātās anketās.

Anketās ietvertas šādu datu kopas: demogrāfiskie dati, slimības norises anamnēze, tuberkulozes anamnēze, riska faktori un blakus slimības, laboratoriskās un radioloģiskās izmeklēšanas rezultāti, mugurkaulāja skriemeļu bojājuma līmenis, spondilīta komplikācijas, neiroloģiskie simptomi, operācijas veids, histopatoloģiskās un bakterioloģiskās izmeklēšanas rezultāti.

Tuberkuloza spondilīta gadījumā galīgā diagnoze tika pārbaudīta Valsts Tuberkulozes reģistrā, savukārt bakterioloģiskās diagnostikas rezultāti tika papildus precizēti TPSVA Bakterioloģiskās laboratorijas datubāzē. Iegūtie dati tika anonimizēti un ievadīti *Microsoft Office® Excel* datubāzē.

Pētījuma mērķu un uzdevumu sasniegšanai operētie pacienti tika iedalīti 2 grupās – ar tuberkulozu un ar netuberkulozu (bakteriālu) spondilītu.

Pētījuma rezultātu statistiskai apstrādei tika izmantota *Microsoft Office® Excel* programmas statistiskās apstrādes pakete un *EpiInfo6* statistiskās analīzes programma.

Primāri ievāktiem datiem norādīta vidējā vērtība \pm standartnovirze. Statistiskā atšķirība tika noteikta ar Hī-kvadrātā (*chi-squares*) testu un nesapārotu grupu divvirziena t-testu (*unpaired two-tailed t-test*).

Pētījuma veikšanai saņemta TPSVA Ētikas komisijas atļauja.

Pētījuma rezultāti

TPSVA operāciju zāles reģistrācijas žurnālā laikā no 2004. gada 1. janvāra līdz 2006. gada 31. decembrim bija reģistrētas 120 spondilīta operācijas. Pētījumā tika iekļauti 114 spondilīta pacienti, jo 5 slimības vēstures TPSVA arhīvā netika atrastas,

savukārt 1 gadījums neatbilda pētījuma kritērijiem – paravertebrāls abscess bez mugurkaulāja skriemeļu bojājuma.

114 analizējamie pacienti tika iedalīti 2 grupās – ar tuberkulozu un netuberkulozu (bakteriālu) spondilītu.

Tuberkulozs spondilīts tika konstatēts 28 (24,6%), savukārt netuberkulozs spondilīts – 86 (75,4%) pacientiem.

Sieviešu abās grupās bija mazāk nekā vīriešu – 36% TBsp un 33% neTB spondilīta gadījumā, abās grupās kopā – 33% (38) gadījumu.

Pacientu vidējais vecums bija 56 ± 15 gadi, sievietes bija statistiski ticami ($p = 0,024$) vecākas nekā vīrieši – attiecīgi 60 ± 15 un 53 ± 15 gadi.

Gan TBsp, gan neTBsp gadījumā sievietes bija vecākas par vīriešiem – attiecīgi 64 ± 16 un 58 ± 13 gadi TBsp ($p > 0,05$) un 59 ± 14 un 52 ± 16 gadi neTBsp ($p = 0,046$).

TBsp pacientu vidējais vecums bija lielāks nekā neTBsp pacientu vecums – attiecīgi 60 ± 14 un 54 ± 16 ; arī sievietes un vīrieši ar TBsp bija vecāki nekā ar neTBsp – attiecīgi 64 ± 16 un 59 ± 14 gadi un 58 ± 13 un 52 ± 16 , taču šī atšķirība visos gadījumos nav statistiski ticama ($p > 0,05$).

1. tabula

Pacientu demogrāfiskie dati tuberkuloza un netuberkuloza spondilīta gadījumā
Demographic data of patients with tuberculous and nontuberculous (bacterial) spondylitis

	Kopā	Sievietes	Vīrieši
Sadalījums pa grupām [n]	114	38 (33%)	76 (67%)
Vecums [gadi] (SN)	56 (15)	60 (15) *	53 (15) *
TB spondilīts [n]	28	10 (36%)	18 (64%)
Vecums [gadi] (SN)	60 (14)	64 (16)	58 (13)
NeTB spondilīts [n]	86	28 (33%)	58 (67%)
Vecums [gadi] (SN)	54 (16)	59 (14) **	52 (16) **

* $p = 0,024$; ** $p = 0,046$; SN – standarta novirze

Anamnēze un blakus slimības

TBsp pacientiem slimības sākums bija akūts 21% (6), bet neTBsp – 34% (29) gadījumu ($p > 0,05$).

Slimības norise abās grupās bija līdzīga – paaugstināta ķermeņa temperatūra konstatēta 64% (18) TBsp un 67% (58) neTBsp pacientu, vidējais paaugstinātas temperatūras ilgums abās grupās bija vienāds – $4 \pm 2,5$ nedēļas.

Abās grupās visiem pacientiem novērotas muguras sāpes, TBsp gadījumā tās novērotas ilgāk nekā neTBsp – attiecīgi $16 \pm 12,3$ un $11,9 \pm 13,1$ nedēļas, taču šī atšķirība nav statistiski ticama ($p = 0,15$).

3 TBsp pacientiem (11%) hospitalizācijas brīdī konstatēta aktīva plaušu tuberkuloze, taču tā nav konstatēta nevienam neTBsp pacientam ($p = 0,002$), nevienam netika konstatēta arī citu orgānu tuberkuloze (izņemot mugurkaulāju un plaušas).

Tuberkuloze anamnēzē un rentgenoloģiski diagnosticētas tuberkulozes seku pārmaiņas plaušās biežāk bija TBsp – attiecīgi 14% un 5%, 21% un 15% gadījumu ($p > 0,05$).

2. tabula

Tuberkulozes anamnēzes dati
Data of TB history

	TBsp (n = 28)	neTBsp (n = 86)	p vērtība
Tuberkuloze anamnēzē	14% (4)	5% (4)	0,08
Hospitalizācijas brīdī aktīva plaušu tuberkuloze	11% (3)	0% (0)	0,002
Rentgenoloģiski konstatētas iespējamās TB seku pārmaiņas plaušās	21% (6)	15% (13)	0,44
Konstatēta citu orgānu tuberkuloze (izņemot plaušas un mugurkaulāju)	0% (0)	0% (0)	0

3. tabula

Riska faktori un blakus slimības
Risk factors and co-morbidities

	TBsp (n = 28)	neTBsp (n = 86)	p vērtība
Inficēšanās ar HIV	4 (1)	0 (0)	0,08
Alkohola lietošana	4 (1)	1 (1)	0,4
I/v narkotiku lietošana (i/v narkomāns)	0 (0)	0 (0)	0
Invazīvas manipulācijas (pēdējo mēnešu laikā)	11 (3)	27 (23)	0,08
Strutaina infekcija (pēdējo mēnešu laikā)	7 (2)	7 (6)	0,98
Hronisks infekcijas process organismā	14 (4)	17 (15)	0,15
Citu orgānu bojājumi septiska procesa ietvaros	0 (0)	8 (7)	0,12
Cukura diabēts	4 (1)	14 (12)	0,08
Ilgstoša ārstēšanās ar glikokortikoidiem	0 (0)	1 (1)	0,13
Imūnsupresīva terapija	4 (1)	1 (1)	0,4
Anamnēzē audzējs	7 (2)	9 (8)	0,73
Bezpaumnieks	0 (0)	0 (9)	0
Bezdarbnieks	21 (6)	17 (15)	0,64

Rezultāti [%] no kopskaita katrā grupā, gadījumu skaits; i/v – intravenozi

Salīdzinot abās grupās riska faktorus un blakus slimības (3. tabula), netika konstatēta statistiski ticama atšķirība. 3 gadījumos novērota tendence ($p = 0,08$), ka

1 TBsp pacients bija HIV inficēts (neTBsp – neviens), savukārt invazīvas manipulācijas pēdējo mēnešu laikā un cukura diabēts biežāk bija neTBsp pacientiem, attiecīgi 27 un 11, 14 un 4%.

Laboratoriskie rādītāji

Leikocītu skaits abās grupās būtiski neatšķīrās – $7,9 \pm 1,9$ un $8,6 \pm 3,1$ attiecīgi TBsp un neTBsp grupā.

Hemoglobīns [g/l] TBsp gadījumā bija statistiski ticami ($p = 0,04$) zemāks – $11,4 \pm 2,0$ pret $12,4 \pm 2,3$, savukārt eritrocītu grimšanas ātrums [mm/h] statistiski ticami ($p = 0,024$) lielāks – 74 ± 42 pret 52 ± 42 .

Arī C-reaktīvais olbaltums TBsp gadījumā bija statistiski ticami ($p = 0,034$) augstāks nekā neTBsp – attiecīgi $90,7 \pm 81,6$ un $37,5 \pm 56,5$, taču šī analīze bija veikta tikai 21% pacientu ar TBsp un 47% – ar neTBsp.

4. tabula

Laboratoriskie rādītāji
The results of laboratory investigations

	TBsp ($n = 28$)	neTBsp ($n = 86$)	p vērtība
Leikocītu skaits (WBC) [$\times 10^9 / \text{mm}^3$]	$7,9 \pm 1,9$	$8,6 \pm 3,1$	0,32
Hemoglobīns (Hb) [g/dl]	$11,4 \pm 2,0$	$12,4 \pm 2,3$	0,04
C-reaktīvais olbaltums* (CRO) [mg/l]	$90,7 \pm 81,6$	$37,5 \pm 56,5$	0,034
Eritrocītu grimšanas ātrums (EGĀ) [mm/h]	74 ± 42	52 ± 42	0,024

* CRO bija noteikts 21% (6/28) TBsp un 47% (40/86) neTBsp slimnieku

Laboratoriskie rādītāji tika sīkāk analizēti arī saistībā ar komplikācijām – abscedēšanos.

TB spondilīta gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība vidējos leikocītu skaita, Hb un EGĀ rādītājos ar abscesu vai bez tā.

Savukārt neTB spondilīta pacientiem, salīdzinot laboratoriskos rādītājus ar abscedēšanos vai bez tās, konstatēta statistiski ticama atšķirība ($p < 0,05$) – abscedēšanās gadījumā novērots augstāks leikocītu skaits, CRO un EGĀ, kā arī zemāks Hb līmenis asinīs. Leikocīti [$\times 10^9 / \text{mm}^3$] bija attiecīgi $9,5 \pm 3,7$ pret $8,0 \pm 2,6$ ($p = 0,03$), hemoglobīns [g/dl] – $11,2 \pm 1,6$ un $13,1 \pm 2,4$ ($p = 0,0001$), eritrocītu grimšanas ātrums [mm/h] – 73 ± 37 un 38 ± 4 ($p = 0,0001$), savukārt C-reaktīvais olbaltums [mg/l] – $68,4 \pm 78,6$ un $20,8 \pm 31,9$ ($p = 0,01$). CRO bija noteikts 42% neTBsp pacientu ar abscedēšanos un 49% bez abscedēšanās.

5. tabula

Laboratoriskie rādītāji neTB spondilītu gadījumā ar abscedēšanos vai bez tās
The results of laboratory investigations in patients with and without abscess

Laboratoriskie rādītāji	Ar abscedēšanos (n = 33)	Bez abscedēšanās (n = 53)	p vērtība
Leikocītu skaits (WBC) [$\times 10^9 / \text{mm}^3$]	9,5 \pm 3,7	8,0 \pm 2,6	0,03
Hemoglobīns (Hb) [g/dl]	11,2 \pm 1,6	13,1 \pm 2,4	0,0001
C-reaktīvais olbaltums* (CRO) [mg/l]	68,4 \pm 78,6	20,8 \pm 31,9	0,01
Eritrocītu grimšanas ātrums (EGĀ) [mm/h]	73 \pm 37	38 \pm 4	0,0001

* CRO bija noteikts 42% (14/33) gadījumu ar abscedēšanos un 49% (26/53) gadījumu bez tās

Radioloģisko izmeklējumu (rentgenogrāfija, datortomogrāfija un magnētiskā rezonanse) dati slimībās vēsturēs bija nepilnīgi (daļa slimnieku tika pārvesti no citām veselības aprūpes iestādēm ar jau veiktiem izmeklējumiem), tādēļ iegūtie rezultāti nav analizēti.

Mugurkaulāja skriemeļu bojājuma līmenis TB un neTB spondilītu gadījumā

Gan TB, gan neTB spondilīta gadījumā viena skriemeļa bojājums novērots ļoti reti – attiecīgi 1 (3,6%) un 3 (3,4%) slimniekiem. 86% (24) TBsp un 94% (81) neTBsp slimnieku novērots 2 skriemeļu bojājums. 3 un vairāk skriemeļu bojājums vienlaikus biežāk novērots TBsp gadījumos nekā neTBsp – attiecīgi 10,7% (3) un 3,5% (3), taču, tāpat kā 1 un 2 skriemeļu bojājumu gadījumā, šī atšķirība nebija statistiski ticama ($p > 0,05$).

Gan TBsp, gan neTBsp biežāk lokalizējās mugurkaulāja torakālajā un lumbālajā daļā. Taču TBsp pacientiem torakālo un lumbālo skriemeļu bojājums novērots vienādi bieži, bet neTBsp pacientiem biežāk konstatēts process lumbālajā daļā. Salīdzinot abas grupas, TBsp slimniekiem biežāk skarta torakālā daļa, savukārt neTBsp slimniekiem – lumbālā daļa.

Pētījuma rezultātu statistiskais novērtējums (statistiskā ticamība) šajā sadaļā nedaudz atšķiras atkarībā no pieejas rezultātu analīzei. Tā kā ap 90% spondilīta slimnieku tiek skarti vismaz 2 skriemeļi, vienam pacientam vienlaikus iespējams torakālo (Th) un lumbālo (L) vai lumbālo un sakrālo (S) skriemeļu bojājums.

4 līmeņu gadījumā (6. tabula) statistiski ticami biežāk neTBsp pacientiem bija skarta lumbālā daļa (15/28 un 64/86, $p = 0,038$), savukārt TBsp pacientiem novērota tikai tendence ($p = 0,057$) biežāk skart torakālo daļu – attiecīgi 14/28 un 26/86.

Izdalot atsevišķi ThL un LS bojājumu līmeni (7. tabula), arī neTBsp pacientiem novērota tikai biežāka L daļas bojājuma tendence: 36% (11/28) un 57% (49/86), $p = 0,051$.

Novērtējot torakālās un lumbālās daļas bojājumu biežumu TB un neTB spondilītu pacientiem pēc bojāto skriemeļu skaita attiecības pret kopējo bojāto skriemeļu skaitu attiecīgajā grupā (8. tabula), atšķirība starp grupām ir statistiski ticama – Th daļā 48% pret 25% ($p = 0,001$); lumbālajā daļā 41% pret 67% ($p = 0,0004$).

6. tabula

**Salīdzinošais skriemeļu bojājuma līmeņu sadalījums,
rēķinot pret gadījumu skaitu (4 līmeņi)
Comparative distribution (affected bodies/all cases)
of affected vertebral bodies by level (4 levels)**

	TBsp ($n = 28$)	neTBsp ($n = 86$)	p vērtība
C	2	2	0,23
Th	14	26	0,057
L	15	64	0,038
S	2	9	0,6

Mugurkaulāja daļas: C – kakla, Th – krūšu, L – jostas, S – krustu

7. tabula

**Salīdzinošais skriemeļu bojājuma līmeņu sadalījums,
rēķinot pret gadījumu skaitu (6 līmeņi)
Comparative distribution (affected bodies/all cases)
of affected vertebral bodies by level (6 levels)**

	TBsp ($n = 28$)	neTBsp ($n = 86$)	p vērtība
C	7% (2)	2% (2)	0,23
Th	39% (11)	23% (20)	0,1
Th-L	11% (3)	7% (6)	0,52
L	36% (10)	57% (49)	0,051
L-S	7% (2)	10% (9)	0,6
S	0	0	-

Mugurkaulāja daļas: C – kakla, Th – krūšu, L – jostas, S – krustu

8. tabula

**Salīdzinošais skriemeļu bojājuma līmeņu sadalījums,
rēķinot pret bojāto skriemeļu skaitu
Comparative distribution (affected bodies/all bodies) of affected vertebral bodies**

	TB spondilīts; bojāto skriemeļu skaits ($n = 58$)	neTB spondilīts; bo- jāto skriemeļu skaits ($n = 175$)	p vērtība
C1 – C7	7% (4)	2% (4)	0,09
Th1 – Th12	48% (28)	25% (44)	0,001
L1 – L5	41% (24)	67% (118)	0,0004
S1 – S5	3% (2)	5% (9)	0,6

Mugurkaulāja daļas: C – kakla, Th – krūšu, L – jostas, S – krustu

Analizējot atsevišķi bojājumu skaitu katram skriemelim (pret gadījumu skaitu katrā grupā), TBsp pacientiem statistiski ticami biežāk ($p < 0,05$) tika bojāts Th6 skriemelis – 6,7% un 1,1% gadījumu, savukārt neTBsp pacientiem – L4 un L5 skriemelis, attiecīgi 24,0% un 10,3% un 22,4% un 10,3% gadījumu. Statistiski ticama atšķirība šo skriemeļu bojājuma biežumā saglabājās arī, aprēķinot atsevišķo bojājumu skaitu pret kopējo bojāto skriemeļu skaitu katrā grupā (9. tabula).

9. tabula

Salīdzinošais bojājumu sadalījums atsevišķi katram skriemelim
Comparative distribution of spondylitis by each vertebral

	TBsp: bojāto skriemeļu skaits $n = 58$; gadījumi $n = 28$			neTBsp: bojāto skriemeļu skaits $n = 175$; gadījumi $n = 86$			p vērtība SK	p vērtība G
	n	SK	G	n	SK	G		
C7	1	1,7	3,6	0	0	0	0,08	0,08
Th6	4	6,7	14,3	2	1,1	2,3	0,017	0,014
Th7	4	6,7	14,3	4	2,3	4,7	0,1	0,08
Th8	4	6,7	14,3	4	2,3	4,7	0,1	0,08
L4	6	10,3	21,4	42	24,0	48,8	0,026	0,01
L5	6	10,3	21,4	39	22,4	45,3	0,046	0,025

Tabulā iekļauti tikai tie skriemeļi, kuru bojājumu atšķirībai starp grupām $p < 0,1$

Mugurkaulāja daļas: C – kakla, Th – krūšu, L – jostas; n – gadījumu skaits; SK – [%] pret bojāto skriemeļu skaitu; G – [%] pret spondilīta gadījumu skaitu.

Spondilītu komplikācijas

No neiroloģiskās simptomātikas abās grupās visiem pacientiem novērotas muguras sāpes.

Nervu saknīšu sāpes biežāk novērotas neTBsp pacientiem – attiecīgi 71% (61/86) un 57% (16/28) gadījumu ($p > 0,05$), savukārt parēzes – TBsp pacientiem – 46% (13/28) un 37% (32/86) gadījumu ($p > 0,05$). Nevienam pacientam netika konstatēta paralīze.

Abscedēšanās TBsp pacientiem konstatēta 68%, savukārt neTBsp – 38% gadījumu ($p = 0,005$).

TBsp pacientiem statistiski ticami biežāk nekā neTBsp novērots arī paraver-tebrāls abscess – 68% un 31% gadījumu ($p = 0,0006$), vienlaikus paravertebrāls un *m. psoas* abscess – 11% un 1% ($p = 0,017$), kā arī jebkuri 2 vai 3 abscesi vienlaikus – attiecīgi 54% un 25% gadījumu ($p = 0,02$).

TBsp pacientiem epidurālu vai *m. psoas* abscess novērots tikai kopā ar paravertebrālu abscesu, savukārt 4 neTBsp pacientiem (5%) novērots arī izolēts epidurāls abscess.

Pārējos gadījumos statistiski ticama atšķirība starp grupām netika konstatēta (10. tabula).

10. tabula

Abscedēšanās biežums TB un neTB spondilītu gadījumā
Abscess frequency in tuberculous and nontuberculous (bacterial) spondylitis

Abscesa veids	TBsp (<i>n</i> = 28)	neTBsp (<i>n</i> = 86)	<i>p</i> vērtība
Epidurāls (EP)	0	5 (4)	0,25
Paravertebrāls (PV)	14 (4)	5 (4)	0,08
<i>M. psoas</i> (MP)	0	0	
EP + PV	36 (10)	20 (17)	0,08
EP + MP	0	2 (2)	0,4
PV + MP	11 (3)	1 (1)	0,017
EP + PV + MP	7 (2)	6 (5)	0,8
EP (kopā)	43 (12)	33 (28)	0,32
PV (kopā)	68 (19)	31 (27)	0,0006
MP (kopā)	18 (5)	9 (8)	0,22
2 un vairāk	54 (15)	25 (25)	0,02
Vismaz 1	68 (19)	38 (33)	0,005

Rezultāti [%] no kopskaita katrā grupā, (gadījumu skaits)

Analizējot atsevišķi katrai grupai (TBsp un neTBsp) paravertebrāla un epidurāla abscesa biežumu Th un L līmenī, netika konstatēta būtiska ($p > 0,05$) atšķirība:

- paravertebrāls abscess TBsp Th līmenī – 64% (9/14) un L līmenī – 73% (11/15), savukārt neTBsp – attiecīgi 35% (9/26) un 30% (19/64) pacientu;
- epidurāls abscess TBsp Th līmenī – 50% (7/14) un L līmenī – 40% (6/15), savukārt neTBsp – attiecīgi 27% (7/26) un 34% (22/64) pacientu.

M. psoas abscess novērots tikai tad, ja bija bojāti L1–L5 skriemeļi (divos Th12 bojājuma gadījumos vienlaikus novērots arī L skriemeļu bojājums).

TB pacientiem lumbālās daļas spondilīta *m. psoas* abscess novērots biežāk nekā neTBsp – attiecīgi 33% (5/15) un 12,5% (8/64) gadījumu, $p = 0,05$.

Analizējot abscesu saistību ar riska faktoriem, konstatēts, ka neTB spondilīta pacientiem, ja bija kāds no abscesiem, invazīvas manipulācijas pēdējo mēnešu laikā bija veiktas 39% (13/33), savukārt, ja abscesu nebija – 19% (10/53) gadījumu ($p = 0,037$). Citu riska faktoru gadījumā būtiska atšķirība abās grupās netika konstatēta.

Bakterioloģiskā diagnostika

Operācijas materiāla izmeklēšana uz tuberkulozes mikobaktērijām

Operācijas materiāls visos gadījumos tika izmeklēts uz tuberkulozes mikobaktērijām bakterioskopiski, kā arī veikts uzsējums gan uz cietajām (Lēvenšteina–Jense-na), gan šķidrām indikatorbarotnēm.

Izmeklējot operācijas materiālu bakterioskopiski (auramīna–rodamīna fluorescences metode), 4 gadījumos (14,3%) tika atrastas tuberkulozes mikobaktērijas

(2 gadījumos uzsējums gan uz cietajām, gan šķidrām indikatorbarotnēm bija negatīvs).

Uzsējums uz cietajām barotnēm bija pozitīvs 7 (25%) gadījumos, savukārt uz šķidrām indikatorbarotnēm – 12 (43%). Visos gadījumos, kad uzsējums bija pozitīvs uz cietās barotnes, tas bija pozitīvs arī uz šķidrās indikatorbarotnes.

Operācijas materiāla izmeklēšana uz piogēnajām baktērijām

11. tabula

Operācijas materiāla uzsējuma rezultāti uz piogēnajām baktērijām *Culture results of surgical material for pyogenic bacteria*

	TBsp (<i>n</i> = 28)		neTBsp (<i>n</i> = 86)	
Uzsējums pozitīvs	8	29%	30	35%
<i>S. aureus</i>	5	18%	15	17%
<i>S. epidermidis</i>	1	4%	3	3%
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	0%	2	2%
citi izraisītāji	2	7%	10	12%

Operācijas materiāls visos TB un neTB spondilīta gadījumos tika uzsēts uz piogēnām baktērijām. Salīdzinot uzsējumu rezultātus, statistiski ticama atšķirība netika konstatēta ($p > 0,05$). Piogēnās baktērijas kultūrā izauga 29% TBsp un 35% neTBsp gadījumu. Abās pacientu grupās visbiežāk izauga *S. aureus*: gan TBsp grupā – 62,5%, gan neTBsp grupā – 50% gadījumu. Meticilīnrezistens *S. aureus* (MRSA) netika konstatēts.

NeTBsp gadījumā operācijas materiālā piogēnās baktērijas, tostarp *S. Aureus*, konstatētas statistiski ticami biežāk, ja bija kāda no strutainām komplikācijām – abscess, piogēnās baktērijas attiecīgi 64% un 17% ($p = 0,00001$), savukārt *S. aureus* – 33% un 8% ($p = 0,02$) gadījumu. Arī TBsp gadījumā, ja bija abscess, uzsējums biežāk nekā gadījumos bez abscedēšanās bija pozitīvs – 32% un 22% gadījumu, biežāk uzsējumā izauga arī *S. aureus* – attiecīgi 21% un 11% gadījumu, taču atšķirība nav statistiski ticama ($p > 0,05$).

12. tabula

Operācijas materiāla uzsējuma uz piogēnām baktērijām korelācija ar abscedēšanos *Correlation of abscess with culture results of surgical material for pyogenic bacteria*

	TB spondilīts (<i>n</i> = 28)		neTB spondilīts (<i>n</i> = 86)	
	Ar abscesu <i>n</i> = 19	Bez abscesu <i>n</i> = 9	Ar abscesu <i>n</i> = 33	Bez abscesu <i>n</i> = 53
Uzsējums +	32% (6)	22% (2)	64% (21)*	17% (9)*
<i>S. aureus</i> +	21% (4)	11% (1)	33% (11)**	8% (4)**

* $p = 0,00001$; ** $p = 0,002$

TB un neTB spondilītu pacientiem veiktā operācijas materiāla histopatoloģiskā izmeklēšana 100% atbilda galīgajai klīniskajai diagnozei.

Diskusija

Pētījums apstiprina dažādas etioloģijas spondilītu diferenciālās diagnostikas problemātiku.

Publikācijās konstatētais spondilīta pacientu vidējais vecums (apm. 50–60 gadi) sakrīt ar pētījuma datiem (1, 4).

Pētījumā biežāk konstatēts neTBsp nekā TBsp, kas sakrīt ar Japānas zinātnieku publikāciju (1), kurā no 27 gadījumiem 21 bija neTB spondilīts, kā arī Spānijas zinātnieku publikāciju (4) – attiecīgi 72 piogēna spondilīta un 42 TBsp gadījumi.

Pētījumā netika konstatēta statistiski ticama atšķirība riska faktoru un blakus slimību ziņā, kas, iespējams, saistāms ar šādam retrospektīvam pētījumam raksturīgiem nepilnīgiem anamnēzes datiem slimības vēsturēs. TBsp vairāk raksturīga ilgstošāka norise, izteiktāks neiroloģiskais bojājums, salīdzinoši retāk novēro paaugstinātu ķermeņa temperatūru (8). Savukārt bakteriāla spondilīta gadījumā biežāk novēro cukura diabētu, invazīvas manipulācijas anamnēzē (1, 4).

Mugurkaulāja bojājums TBsp pacientiem vienādi bieži konstatēts Th un L daļā, savukārt neTBsp pacientiem – L daļā. Tiek uzskatīts, ka TB spondilīts biežāk skar Th daļu (10, 11), taču pēdējās publikācijas, līdzīgi kā šī pētījuma dati, norāda uz Th un L daļas bojājuma biežuma izlīdzināšanos (6).

Pārsvarā 2 un vairāk skriemeļu bojājums gan TB, gan neTB spondilīta slimniekiem, kā arī pētījumā statistiski ticami biežāk konstatētā abscedēšanās TBsp slimniekiem sakrīt ar literatūras datiem (5).

Lai arī daži autori iesaka konservatīvu TB spondilīta ārstēšanu, citu pētnieku rīcības algoritms spondilītu pacientiem ir līdzīgs kā TPSVA – operatīva terapija – lumbotomija vai torakotomija, audu dertrīta (daļēja skriemeļu rezekcija) un strutu (abscesa) evakuācija ar audu, nervu un muguras smadzeņu dekompresiju un mugurkaulāja stabilizācija ar skriemeļu priekšēju spondilodēzi (9, 10). Šādas taktikas priekšrocības ir ne tikai ātrāka sāpju kupēšana un neiroloģiskā bojājuma sanācija, bet, iespējams, arī labāki rezultāti ilgtermiņā, novēršot mugurkaulāja deformāciju. Tomēr jādomā, ka būtiskākais arguments ir ātrāka un precīzāka diferenciālā diagnostika un mērķtiecīga ārstēšana – pēc Milinkovica datiem (9), biežāk nekā 40% gadījumu pirms operācijas klīniski–radioloģiskā diagnoze bija šaubīga.

Pētījumā bieži konstatētā neiroloģiskā simptomātika – muguras sāpes visiem pacientiem, nervu saknīšu sāpes gan TBsp, gan neTBsp pacientiem, attiecīgi 57% un 71% gadījumu, parēzes 46% un 37% gadījumu, kā arī augstais abscedēšanās īpatsvars, īpaši tuberkulozu spondilītu gadījumā, pamato operatīvas taktikas izmantošanu.

Interesanta un nozīmīga ir pētījumā konstatētā nelielā atšķirība starp operāciju materiāla uzsējumos izaugušo piogēno baktēriju kultūru biežumu TBsp un neTBsp pacientiem – attiecīgi 29% un 35% gadījumu. Šie dati sakrīt ar citu autoru datiem un norāda uz zemo diferenciāldiagnostisko vērtību. Tā, piemēram, Bausano (2) publicējis ļoti intriģējošu rakstu par 5 stafilokoku sepses gadījumiem tuberkuloza spondilīta slimniekiem, kas aizkavējis savlaicīgas prettuberkulozes terapijas uzsākšanu, savukārt Luks (8) par pašsaprotamu uzskata sekundāras piogēnās infekcijas uzslāņošanās uz tuberkuloza spondilīta.

Pētījumā tuberkulozi bakterioloģiski operācijas materiālā izdevās apstiprināt 50% gadījumā, kas sakrīt ar literatūras datiem (8). Biežāku pozitīvo uzskaitu uz šķidrām indikatorbarotnēm nekā uz Lēvenšteina–Jensena cietajām barotnēm varētu izskaidrot ar operācijas materiāla cietāku konsistenci, kas, salīdzinot, piemēram, ar krēpu (šķidrās!) uzskaitēm, sliktāk un nevienmērīgāk saskaras ar barotnes virsmu. Operācijas materiāla sasmalcināšana varētu uzlabot TBsp bakterioloģisko diagnostiku.

Secinājumi

Lai gan konstatēta statistiski ticama atšķirība tuberkuloza un netuberkuloza spondilīta klīniskās norises rādītājos, kā, piemēram, aktīvs tuberkulozs process plaušās un biežāka abscedēšanās tuberkuloza spondilīta gadījumā, pētījums apstiprina, ka operatīvai terapijai un operācijas materiāla patohistoloģiskai izmeklēšanai, kā arī bakterioloģiskai izmeklēšanai uz tuberkulozes mikobaktērijām ir izšķirīga loma klīniskās diagnozes noskaidrošanā. Operācijas materiāla uzskaitēm uz piogēnajām baktērijām tuberkuloza un netuberkuloza spondilīta diferenciālajā diagnostikā ir nebūtiska nozīme.

Literatūra

1. Asamoto S, Doi H, Kobayashi N, Endoh T, Sakagawa H, Iwanaga Y, Ida M, Jinbo H. Spondylodiscitis: diagnosis and treatment. *Surg Neurol*, 2005; 64: 103–108.
2. Bausano I, Cazzadori A, Danzi C, Scardigli A, Concia E. Staphylococcal Sepsis Delaying Diagnosis and Treatment of Vertebral Tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 436.
3. Buchelt M, Lack W, Kutschera HP et al. Comparison of tuberculous and pyogenic spondylitis. An analysis of 122 cases. *Clin Orthop*, 1993; 296: 192–199.
4. Colmenero JD, Jimenez-Mejias ME, Sanchez-Lora FJ, Reguera JM et al. Pyogenic, tuberculous, and brucellar vertebral osteomyelitis: a descriptive and comparative study of 219 cases. *Ann Rheum Dis*, 1997; 56: 709–715.
5. Griffith JF, Kumta SM, Leung PC et al. Imaging of musculoskeletal tuberculosis: a new look at an old disease. *Clin Orthop*, 2002; 398: 32–39.
6. Leonard MK Jr, Blumberg HM. Musculoskeletal tuberculosis. In Schlossberg D. *Tuberculosis and Non-tuberculosis Mycobacterial Infections*. 5th ed., 2006.
7. Ludwig B, Lazarus A. Musculoskeletal Tuberculosis. *Dis Mon*, 2007; 53: 39–45.
8. Luk KDK. Tuberculosis of the spine in the new millennium. *Eur Spine J*, 1999; 8: 338–345.
9. Milinkovic ZB, Filipovic MS, Basara V, Vucinic Z. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 1997; 7: 241–244.
10. Turgut M. Spinal tuberculosis. *Neurosurg Rev*, 2001; 24: 8–13.
11. Watts HG, Lifescope RM. Tuberculosis of bones and joints. *J Bone Joint Surg Am*, 1996; 78: 288–299.
12. Yao DC, Sartoris DJ. Musculoskeletal tuberculosis. *Radiol Clin North Am*, 1995; 33: 679–689.

Summary

*The objective of this study was to clarify the difference in clinical presentation between spondylitis of tuberculous and bacterial aetiology as well as usefulness of certain diagnostic tests in their differential diagnosis. Altogether 28 cases of tuberculous and 86 cases of nontuberculous (bacterial) spondylitis were retrospectively analyzed that were surgically treated at the State Agency of Tuberculosis and Lung Disease from the 1st of January 2004 to the 31st of December 2006. Concomitant active pulmonary tuberculosis is the most informative of the risk factors, statistically highly significant and more often recognised in the case of tuberculous spondylitis. Nontuberculous spondylitis more often affects the lumbar part of spine, but statistically significant abscess formation was more often observed in tuberculous spondylitis, in 68% and 38% of the cases, respectively ($p = 0.005$). The culture of pyogenic bacteria was more often positive in the cases of bacterial, not tuberculous spondylitis, but the difference – 35% and 29% – was not statistically significant ($p > 0.05$). Bacteriological confirmation of tuberculosis in tissue samples obtained during surgery was achieved in 50% of cases, in other cases the diagnosis was confirmed by patohistological examination of these samples. Although we found a statistically significant difference between the groups in the frequency of some parameters, our study confirms the crucial role of bacteriological (for *M. tuberculosis*) and patohistological examination of surgically obtained tissue samples.*

Pie DNS cieši saistītie proteīni *The DNA Tightly-Bound Proteins*

Normunds Legzdīņš¹, Tatjana Sjakste², Nikolajs Sjakste^{1,3}

¹Latvijas Organiskās sintēzes institūts
Aizkraukles iela 21, Rīga, LV-1006
E-pasts: norman_leg@inbox.lv

²Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts
Miera iela 3, Salaspils, LV-2169
E-pasts: tanja@email.lubi.edu.lv

³Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001
E-pasts: Nikolajs.Sjakste@lu.lv

Viens no iespējamiem dezoksiribonukleīnskābes (DNS) transkripciju regulējošiem faktoriem ir pie DNS cieši saistītie proteīni (*tightly-bound proteins*, TBP), kuru daudzums ir apgriezti proporcionāls gēna transkripcijas aktivitātei. Darbā apkopoti dažādu autoru dati par TBP īpašībām, kā arī pētījumi par TBP dažādos organismos, audos un šūnās.

Atslēgvārdi: pie DNS cieši saistītie proteīni, TBP.

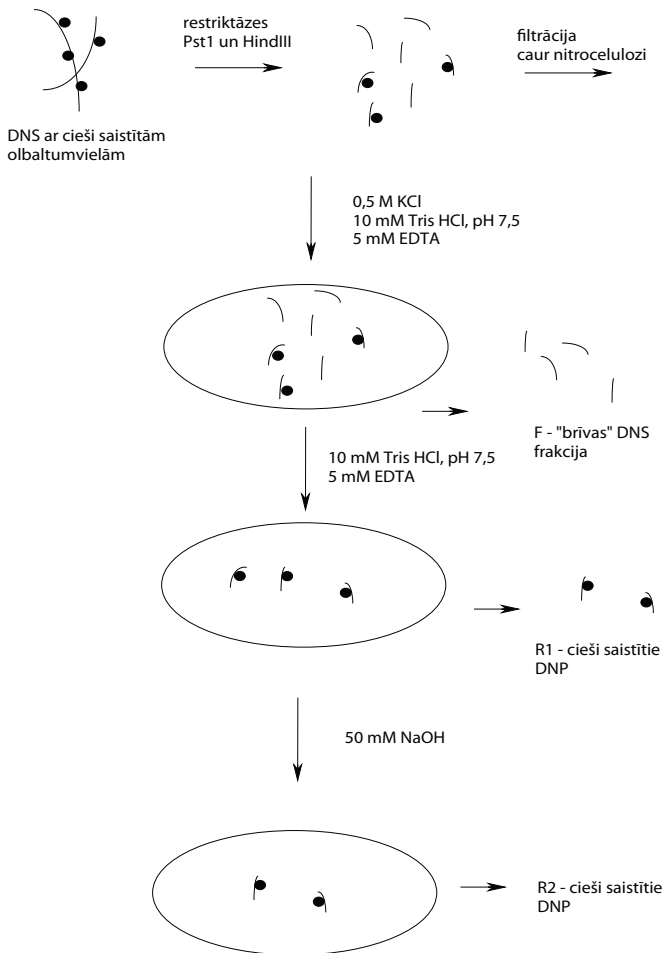
Līdztekus DNS mijiedarbībai ar kodola matriksu šūnā eksistē vēl ciešākas vai pat kovalentas mijiedarbības starp DNS un t. s. cieši saistītajiem proteīniem. Šo mijiedarbību fizioloģiskā nozīme ir samērā maz pētīta un pagaidām nav skaidra.

Pie DNS cieši saistītos proteīnus (*tightly-bound proteins*, TBP) dažreiz pieskaita arī pie kodola matriksa proteīniem. TBP proteīnu izpētē lieli nopelni ir vācu zinātniekam D. Verneram, krievu zinātniekiem S. Razinam, J. Vaseckim, V. Černohvostovam, bulgāru zinātniekam R. Canevam un lietuviešu zinātniekam B. Jodkam. Ar DNS cieši saistīto proteīnu grupu var definēt kā atlieku proteīnus, kas paliek saistīti ar DNS pēc tās deproteinizācijas (sk. 1. un 2. attēlu).

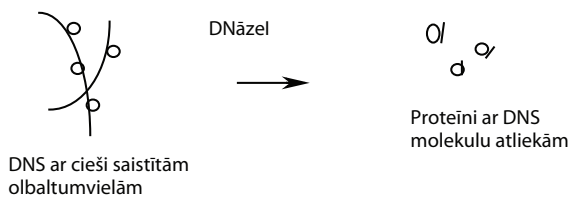
Proteīnu un DNS-proteīnu mijiedarbības raksturojums. Ar DNS cieši saistītie proteīni ir atrasti dažādās dzīvo organismu sugās (13). Attīrīti DNS-proteīnu kompleksi izskatās kā globulas ar diametru 25–30 nm. Proteīnu komponentu, piemēram, vistu eritroblastos, veido polipeptīdi ar molekulārsvaru 70, 49, 45, 30, 24, 19, 17 kDa. Kompleksa blīvums ir diezgan augsts salīdzinājumā ar citu aktīvu kodola polarizāciju (DNP) – 1,7 g/cm³, to nosaka RNS molekulu iesaistīšanās kompleksā (1).

Ciešie DNS proteīnu kompleksi var saturēt gan kovalentas, gan nekovalentas saites (3, 5). Ir iespējami divi TBP lokalizācijas veidi:

- 1) proteīni ir piesaistīti pie sāniski izvietotas DNS brīvā 3' vai 5'-gala;
- 2) laterālās proteīnu daļiņas interkalējas starp antiparalēliem DNS pavedieniem.



1. attēls. DNS frakcionēšanas un pie DNS cieši saistīto proteīnu iegūšanas shēma
The schema of DNA fractionation and extraction of DNA tightly-bound proteins



2. attēls. DNS cieši saistīto proteīnu iegūšana, izmantojot DNāzi I
Extraction of DNA tightly-bound proteins with DNase I

Proteīnus, kas ietilpst nukleīnskābju – proteīnu kompleksos, var iedalīt divās klasēs saskaņā ar to funkcijām.

1. klase. Šie proteīni veido kovalentus kompleksus ar nukleīnskābēm caur nukleofilo aizvietošanas reakciju starp hidroksiaminoskābes atlikumu un starpnukleotīdo fosfātgrupu. Reakcijas sākumposmos proteīnu un nukleīnskābju mijiedarbības rezultātā veidojas primārais nekovalentais, atgriezeniskais komplekss. Primārā DNS kompleksa kooperatīvā daba ir parādīta uz Topoizomerāzes I (Topo I), ϕ X174 proteīna A un citu šīs klases proteīnu, piemēriem, Topoizomerāzi I bieži izmanto modeļu izstrādei, kaut gan to nevar pieskaitīt pie TBP proteīnu grupas. Topo I un DNS ciešais (nekovalentais) komplekss var disociēt augstas koncentrācijas Mg^{2+} sāls šķīdumā. Starpprodukta veidošanās ($3'$ -fosfātgrupu aizvietošana) ir iespējama, pavājinoties starpnukleotīdu saitei. Tādējādi šis starpprodukts izraisa starpnukleotīdu saites sabrukšanu. Tas ietekmē fosfodiestersaites ģeometriju, ko veido hidroksiaminoskābes atlikumi (pierādīts ar cilvēka DNS-Topo I kompleksu rentgenkristalogrāfiju). Piemēram, eikariotiem kovalentajos kompleksos Topo I ir piesaistīta pie $3'$ -fosfātgrupas, bet bakteriālās šūnās Topo I ir piesaistīta pie $5'$ -fosfātgrupas. Pirmajā klasē ietilpst fermenti, kam piemīt divas aktivitātes: starpnukleotīdu saišu sašķelšana un to atjaunošana (transferāžu klase). Kovalentie kompleksi nodrošina polinukleotīdu pārnešanu uz akceptora molekulām. Internukleotīdu saites sadalīšana un kovalento kompleksu izveide starp nukleīnskābi un proteīnu notiek ar H_2O molekulu izmantošanu. Šīs klases proteīni ir atrodami šūnas kodolā un arī citoplazmā.

2. klase. Šīs klases proteīni katalizē kovalento kompleksu izveidi un to sadalīšanu. Piemēram, ϕ 29 bakteriofāgu un adenovīrusu DNS polimerāze katalizē proteīnu kovalento piesaistīšanu pie $5'$ -terminālā nukleotīda atbilstošajā nukleīnskābē, bet nesaistošie fermenti katalizē iekšpolimēru fosfodiestersaites hidrolīzi starp DNS un Topo I. Šie proteīni ģenerē stabilus kovalentus kompleksus ar nukleīnskābēm, pateicoties mijiedarbībai ar izveidotā polipeptīda $5'$ -terminālo mononukleozīdtrifosfātu. Kompleksos DNS vienmēr saistās pie proteīna ar savu $5'$ -galu. Šie proteīni, saukti par gala proteīniem, piedalās arī iniciācijas reakcijās nukleīnskābes replikācijas laikā. Kovalento kompleksu veidošanā piedalās šūnu membrānas (2).

TBP spektra īpatnības dažādos organismos, orgānos un audos. TBP polipeptīdu spektrs ir atkarīgs no orgāna un attīstības stadijas. Jaunos miežu dīgstos ir tikai viens cieši saistīts proteīns ar molekulmasu 30 kDa, miežu dīgstiem novecojot, strauji palielinās TBP skaits – papildus tiek piesaistīti proteīni ar molekulmasu 16, 21, 36, 42, 55, 60, 69 un 76 kDa. Līdzīgs process notiek arī saknēs. Jaunās saknēs bez 30 kDa liela proteīna konstatē arī mazākus – 16 kDa proteīnus. Novecojušās saknēs papildus var atrast 36 kDa proteīnu un dažus nelielus lielmolekulārus polipeptīdus. Izmaiņas TBP spektrā koleoptilē izrādās pretējas. TBP struktūra jaunā koleoptilē ir diezgan sarežģīta. Šeit ir atrodams lielmolekulārs polipeptīds ar molekulmasu ap 200 kDa, vairākas polipeptīdu virknes ar 67 un 38 kDa, kā arī 30 kDa liela polipeptīdu virkne, kas ir sastopama visos orgānos, un 16 kDa virkne, kas konstatēta saknēs. Arī otrādi – tikai divi proteīni atklāti vecā koleoptilē: 36 kDa proteīns, kas atrodams arī citos novecojušos orgānos, un 16 kDa liels proteīns, kas arī ir visos orgānos, bet domājams, ka sevišķi daudz tā ir tieši koleoptilē (12).

Ir veikti pētījumi, lai noteiktu TBP dažādos žurku orgānos. Apstrādājot iegūtos datus, novērots, ka visizteiktākā polipeptīdu virkne *vairogdziedzerī* ir 134; 130; 127; 108; 89; 86; 83; 80; 76; 74; 70; 68; 63; 60; 34; 29; 27; 22 kDa, *sirdī* – 134; 120; 111; 108; 104; 102; 100; 96; 76; 68; 65; 63; 60; 59; 55; 43; 40; 37; 34; 29; 27; 24; 22; 19; 16 kDa, *galvas smadzenēs* – 108; 83; 76; 60; 57; 38; 34; 30; 30; 29; 27; 24; 22 kDa, *skeleta muskuļos* – 120; 108; 63; 60; 45; 43; 40; 37; 34; 27; 24; 22; 20; 18 kDa, *timusā* – 134; 108; 60; 57; 43; 40; 34; 30; 29; 26; 24 kDa, *plaušās* – 116; 108; 63; 57; 43; 38; 37; 34; 29; 26; 24; 22 kDa, *aknās* – 116; 111; 108; 63; 60; 57; 53; 50; 45; 43; 38; 34; 30; 29; 26; 24; 20; 19; 17 kDa, *liesā* – 134; 108; 63; 60; 50; 45; 38; 34; 30; 20 kDa, *kaulu smadzenēs* – 134; 120; 108; 96; 63; 57; 55; 45; 43; 38; 34; 30; 27; 24; 20; 16 kDa, *sēkliniekos* – 108; 65; 57; 55; 50; 45; 43; 38; 34; 30; 27; 24; 22; 20 kDa un *nierēs* – 108; 65; 48; 45; 38; 34; 30; 26; 24; 22; 20; 18 kDa.

Sirdī ir visizteiktākā polipeptīdu virkne, kas sastāv apmēram no 25 polipeptīdiem, aknās no 19, vairogdziedzerī no 18, kaulu smadzenēs no 16, skeleta muskuļos, sēkliniekos no 14, plaušās, nierē, galvas smadzenēs no 12, timusā no 11, liesā no 10 polipeptīdiem.

Vislielākās atšķirības vērojamas vairogdziedzerī, kur ir visizteiktākā polipeptīdu virkne 130; 127; 89; 86; 80; 74; 70 kDa, sirdī 104; 102; 100; 59 kDa, aknās 53; 17 kDa un nierēs 48 kDa, kas nav novērota citos orgānos un audu paraugos.

TBP saistības vietas raksturojums genomā. TBP komponentu lokalizācija ir specifiska, tie atrodas vairākās atkārtotās sekvencēs un DNS mijiedarbības vietās ar kodola matriksu (10, 6, 7, 14). TBP sadale struktūras gēnos ir atkarīga no šūnu diferencēšanās tipa, piemēram, šos proteīnus atrod globīna gēnos eritroidālās šūnās, toties cita veida šūnās šie proteīni neveido kompleksus ar globīna gēnu sekvencēm (8). Vistu alfa globīna gēna domēnā TBP atrodas galvenokārt matriksa saistīšanas rajonā (MAR – *matrix attachment regions*) un enhanseru lokalizācijas vietās (11). Cilvēkam ir identificēta satelīta III nukleotīdu sekvence ar tipisko satelīta III ATTCC pentamēru (7).

Ciešo DNS kompleksu sadale ir izpētīta miežu 1H hromosomā, izmantojot mikrosatelītu analīzi. Lai atrastu ar attīstību saistītas izmaiņas TBP sadalē, DNS ekstrahēta no sausiem miežu graudiem, kā arī no koleoptīles, saknēm, jaunām un vecām lapām. Sausajos dīgstos TBP neveido specifiskus kompleksus ar noteiktām DNS sekvencēm. Attīstības gaitā sākas specifiska mijiedarbība starp TBP un noteiktiem hromosomas lokusiem. Koleoptīles hromosomu garā pleca marķieri netiek iesaistīti TBP kompleksos, bet centromēras marķieri novēroti tikai ciešajos TBP. Līdzīga, bet ne identiska sadale novērota saknēs un jaunajās lapās. Lapu novecošanas gaitā specifiska TBP un DNS mijiedarbība izzūd (12).

Autoru nesējā pētījumā (12) no jauniem miežu dīgstiem, koleoptīles un miežu dīgstu saknes bija izolēti pie DNS cieši saistīto proteīnu kompleksi, izmantojot divas alternatīvas metodes – attīrīšanu ar hromatogrāfiju uz nitrocelulozes un pilnīgu DNS sašķelšanu ar DNāzi I. DNS fragmenti, kuri saistās ar cieši saistītiem proteīniem, bija klonēti, un apmēram 600 fragmenti bija sekvencēti. Rezultātā pie DNS cieši saistītie kompleksi bija salīdzināti ar DNS, kurās nav proteīnu un kuras iziet caur nitrocelulozes filtru ar augstu jonu spēku (filtrēta dezoksiribonukleīnskābe (F-DNS) salīdzinājumā ar proteīniem bagātināto

dezoksiribonukleīnskābi (R-DNS) saglabājas uz filtra nitrocelulozes filtrācijas procesā). Vēlāk notika klonēšana un fragmentu sekvencēšana, lai izmantotu sekvenču komplekso analīzi. Abas frakcinēšanas procedūras deva augstu CT-motīvu sekvenču proporciju, kas izpaužas lielākoties kā 16-bp CC(TCTCCC)₂TC fragmenti. 16-bp fragments bija noteikts DNS paraugos, tas bija saistīts ar cieši saistītiem proteīniem, kuri attīrīti no audiem ar abām izmantotajām metodēm, tomēr tas nesaturēja F-DNS. CT-motīvs bija daudz vairāk izplatīts R-DNS frakcijās no koleoptiles un jaunajiem miežu dīgļiem. Salīdzinājumā ar citām R-DNS paraugu frakcijām tās frakcijas, kas iegūtas no saknēm, bija bagātinātas ar GC-sekvencēm, iespējams, 49-GC fragmentā (apmēram 50% R-DNS saknēs salīdzinājumā ar 5% koleoptiles R-DNS un 1% visos paraugos, kas iegūti ar DNāzi I).

Motīvu analīze atklāj to esamību miežu ESTs (*expressed sequence tag*), tāpat kā to sastopamību citos genomos un līdzību ar nemainīgiem elementiem. 6-bp daudzreizējs elements -TCTCCC- no CT-motīva ir līdzīgs 5-bp -TCTCC- elementam, kas iepriekš aprakstīts caļā DNS (13).

TBP fermentatīvās aktivitātes. Dažiem TBP piemīt fosfatāzes un kināzes aktivitāte (4). Proteīnu fosforilāciju un defosforilāciju kontrolē divi fermentu tipi. Šīs posttranslācijas modifikācijas izmanto vairākas eikariotu šūnas daudzu funkciju kontrolei. Fosfatāzes ne tikai fosforilē proteīnkināzes substrātu, bet arī defosforilē dažas proteīnkināzes un tādējādi kontrolē to funkcijas. TBP fosfatāzes aktivitāti inhibē vanādijs un cinka joni, NaF un 50 mM NaCl daļēji nomāc fermenta aktivitāti. TBP fosfatāzes aktivitāte piemīt vairākiem TBP peptīdiem (p36, p90, p120). Fosfatāzes lokalizācija kodolā var būt nozīmīga šūnu cikla regulācijai.

Ir atrasti TBP, kuriem piemīt serīna proteāzes inhibitoru aktivitāte (serpīni). Serpīna proteāzes inhibitors, kas izdalīts no peļu Spi-3 gēna, ir homologisks cilvēka proteīnam, t. s. citoplazmatiskai antiproteāzei (CAP) vai placentāram trombīna inhibitoram. Inhibitori, kas izdalīti no peļu Spi-1 un Spi-2 gēniem, ir homologiski cilvēka alfa-1 antitripsīnam un alfa-1 antihimotripsīnam. Pirmie priekšstati par cilvēka homologu intracelulāro lokalizāciju pamatojas uz citoķīmiskiem datiem. TBP (serpīnu) komplekss ar DNS ir izdalīts no nesekretējošām šūnām ar izsālīšanas paņēmieni. Ar šo paņēmieni ir identificētas trīs 12 nm garas polipeptīdu daļiņas. Ar elektroforēzi SDS-poliakrilamīda gēlā ir identificēti to komponenti (trīs galvenie polipeptīdi ar molmasām 62 kDa, 52 kDa, 40 kDa). Šo kompleksu minorais komponents satur DNS-atkarīgo fosfatāzi. Kodolu polipeptīds ar garumu 52 kDa masu ir identificēts pirmais (ar mikrosekvenču analīzi), tas ir proteīns, kas saistīts ar Spi-1 gēnu (62 kDa-Spi-2; 40 kDa-Spi-3). Serīna proteāzes inhibitori regulē dažus strukturālos un funkcionālos proteīnus, kas ir iesaistīti šūnas proliferācijas, diferencēšanās un apoptozes regulācijā, aktivācijā vai degradācijā. Ir dati par tādu proteīnu funkcionālo lomu apoptozē, kas atvasināti no Spi-1, Spi-2 gēniem. Spi-1 un Spi-2 gēni atrodas 12. hromosomas noteiktā lokusā, ko sauc par TNF aizsarglokusu un kas nosaka rezistenci pret audzēju nekrozes faktoriem (9).

Apkopojot literatūras datus un pētījumu rezultātus, var secināt, ka cieši saistītie proteīni ir perspektīvi kandidāti gēnu ekspresijas regulācijā un šiem proteīniem ir noteikta loma kodola struktūras uzturēšanā. Latvijā un citur pasaulē jāturpina veikt pētījumus par TBP.

Šis pētījums ir veikts valsts pētījuma „Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošo galveno patoloģiju zinātniskā izpēte ar multidisciplināra pētnieciskā konsorcijs palīdzību” programmas ietvaros kā projekta „Diagnostikas metožu izstrāde ļaundabīgu audzēju riska faktoru noteikšanai, agrīnai audzēju un pirmsvēža stāvokļu diagnostikai, audzēju terapijas optimizēšanai” uzdevums ar mērķi izstrādāt ļaundabīgo audzēju marķierus, izmantojot ar DNS cieši saistītu proteīnu grupu.

Literatūra

1. Chernokhovostov V. V., Stelmashuk V. Ya., Razin S. V., Georgiev G. P. DNA-Protein Complexes of the Nuclear Matrix: Visualisation and Partial Characterisation. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 175–183, 1989.
2. Drygin Yu. F. Natural covalent complexes of nucleic acids and proteins: some comments on practice and theory on the path from well-known complexes to new ones. *Nucleic Acids Research* 21, 4791–4796, 1998.
3. Juodka B., Pfütz M., Werner D. Chemical and enzymatic analysis of covalent bonds between peptides and chromosomal DNA. *Nucleic Acids Research* 19, 6391–6398, 1991.
4. Labeikytė D., Bagdonienė L., Juodka B. DNA-protein complexes in murine erythro-leukemia cells contain peptides with phosphatase and kinase activities: evidence for association with chromatin. *ISSN Biol.* 4, 13–21, 1999.
5. Nehls P., Keck T., Greferath R., Spiess E., Glaser T., Rothbarth K., Stammer H., Werner D. DNA cloning, recombinant expression and characterization of polypeptides with exceptional DNA affinity. *Nucleic Acids Research* 26, 1160–1166, 1998.
6. Neuer-Nitsche B., Lu X., Werner D. Functional role of a highly repetitive DNA sequences to anchorage of the mouse genome. *Nucleic Acids Research* 16, 8351–8360, 1988.
7. Pfütz M., Gileadi O., Werner D. Identification of human satellite DNA sequences associated with chemically resistant nonhistone polypeptide adducts. *Chromosoma* 101, 607–617, 1992.
8. Razin S. V., Chernokhovostov V. V., Vassetzky E. S. The distribution of tightly bound proteins along the DNA chain reflects the type of cell differentiation. *Nucleic Acids Research* 16, 3617–3633, 1988.
9. Rothbarth K., Kempf T., Juodka B., Glaser T., Stammer H., Werner D. Intracellular location and nuclear targeting of the Spi-1, Spi-2 and Spi-3 gene-derived serine protease inhibitors in non-secretory cells. *Eur J Cell Biol* 80, 341–348, 2000.
10. Sjakste N. Enrichment of the Xenopus satellite I sequence in DNA fraction containing tightly bound DNA-protein complexes. *Proc. Latv. Acad. Sci.* 51, 61–63, 1997.
11. Sjakste N., Sjakste T., Stacey G., Bolton B., Doyle A. Distribution of tightly-bound proteins along the chicken alpha-globin gene. *Proc. Latv. Acad. Sci.* 53, 5–11, 1999.
12. Sjakste T., Roder M., Labeikytė D., Bagdonienė L., Levina A., Juodka B., Sjakste N. Distribution of tight DNA-protein complexes along the barley chromosome 1H, as revealed by microsatellite marker analysis. *Cell Mol Biol Lett* 10, 1, 49–59, 2005.
13. Tsanev R., Avramova Z. Stably-bound chromosomal proteins. *Chromosoma* 103, 293–301, 1994.
14. Werner D., Neuer-Nitsche B. Site-specific location of covalent DNA-polypeptide complexes in the chicken genome. *Nucleic Acids Research* 17, 6005–6015, 1989.

Summary

This article attempts to summarize data about the DNA tightly-bound proteins (TBP) as well as research on TBP in different organisms and components. The proteins that remain attached to DNA after conventional deproteinisation procedures (the so-called tightly-bound proteins or TBP) probably take part in regulation of gene activity, as they preferably bind to untranscribed sequences.

Keywords: *DNA tightly-bound proteins, TBP.*

Mērķtiecīgas pacientu pārbaudes programmas nozīme koronārās sirds slimības ārstēšanā *Importance of the Follow-up Programme for Patients with Coronary Artery Disease*

Iveta Mintāle, Andrejs Ērglis, PhD, (FESC, FACC)

Latvijas kardioloģijas centrs, Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
Pilsõņu 13, Rīga, LV-1006, Latvija
E-pasts: iveta@stradini.lv

Koronārās sirds slimības (KSS) ārstēšanas pamatā ir koronāro asinsvadu lūmena atjaunošana, ko veic ar invazīvu metodi – perkutāno koronāro intervenci (PCI), kombinējot to ar medikamentozu terapiju. Lai optimizētu šādu pacientu aprūpi un ārstēšanu, izveidota mērķtiecīgas pārbaudes programma, kuras galvenā izmeklēšanas metode ir slodzes tests. Latvijā līdz šim nav veikts šāds pētījums, kas sniegtu plašas iespējas analizēt pacientu funkcionālo stāvokli, iespējamo risku un prognozi pēc invazīvas KSS ārstēšanas.

Pamatojums. Slodzes tests joprojām ir KSS diagnostikas pamatmetode. Tāpat šo metodi lieto, lai noteiktu iespējamu restenozi koronārajās artērijās – procesu, kas ir patofizioloģiski atšķirīgs no primāra aterosklerozes mehānisma (atpakaļsarašanās, vēlīna remodelācija, tromboze, neointīmas proliferācija).

Metodes. Mērķtiecīgi pārbaudīti pacienti ar KSS, kas ārstēti ar PCI. Pacientiem izdarīts slodzes tests – veloergometrija – vai miokarda perfūzijas scintigrāfija. Pārbaude veikta vienu, trīs un sešus mēnešus pēc koronārās intervences.

Sešu mēnešu apsekošana izdarīta 7300 pacientiem. 17% pacientu konstatētas koronāras sūdzības, 13% – nozīmīgas ST segmenta izmaiņas EKG (elektrokardiogrammas) slodzes testa laikā, 6,4% šo pacientu angiogrāfiski noteikta restenoze koronārajās asinsvados. Atrasta pacientu grupa ar pozitīvu slodzes testu, bet bez sūdzībām – 22% pacientu, 9% no tiem konstatēta restenoze.

Mērķtiecīga pārbaudes programma, veicot slodzes testu, ļauj novērtēt pacientu klīnisko stāvokli, laikus noteikt iespējamo restenozes risku, precīzi dozēt nepieciešamos medikamentus atkarībā no pacienta funkcionālā stāvokļa un koriģēt riska faktorus, kas varētu nelabvēlīgi ietekmēt slimības gaitu.

Atslēgvārdi: koronārā sirds slimība, perkutānā koronārā intervence, restenoze, slodzes tests.

Ievads

Koronārā sirds slimība (KSS) joprojām ir biežākais Latvijas iedzīvotāju nāves iemesls. Pacienti ar diagnosticētu KSS pieder pie augsta riska grupas, ar īpaši lielu pēkšņas nāves vai kardiovaskulāru komplikāciju iespējamību. Lai gan jaunākās ārstēšanas metodes strauji progresē, joprojām ir neatrisināti jautājumi efektīvākas diagnostikas un ārstēšanas jomā.

KSS ārstēšanas pamatā ir invazīva un medikamentoza ārstēšana. Invazīva ārstēšanas metode ir perkutānā koronārā intervence (PCI), kas jāapvieno ar medikamentozu terapiju. Kopš pirmo angioplastiju izdarīšanas apzināta jauna problēma – restenoze, tas ir process, kas patofizioloģiski atšķiras no primārās aterosklerozes mehānisma (atpakaļsarašanās, vēlna remodelācija, tromboze, neointīmas proliferācija), tāpēc rodas jauni uzdevumi šīs problēmas noteikšanā un risināšanā.

Metodes

Standartmetode KSS diagnostikā ir fiziskās slodzes tests ar EKG.

Fiziskās slodzes tests joprojām ir vispieejamākais un relatīvi lētākais izmeklēšanas veids gan sākotnējā koronārās sirds slimības diagnostikā, gan arī izvērtējot tās smaguma pakāpi. Tāpat slodzes tests izmantojams pacientu turpmākai pārbaudei, uzsākot KSS ārstēšanu. Šāds metodes izmantojums diemžēl nav pietiekami populārs, kaut arī sniedz ļoti nozīmīgu informāciju par pacientu.

Latvijas Kardioloģijas centrā (LKC) kā slodzes tests tradicionāli tiek lietota veloergometrija, kuras zinātnisko pamatojumu un praktisko izmantojumu izstrādājis ilggadējais LKC vadītājs prof. Uldis Kalniņš. Viņa disertācija veltīta KSS diagnostikai un lielo epikardiālo koronāro artēriju sašaurinājumu noteikšanai.

Ilgus gadus šī metode tiek izmantota ne tikai LKC, bet arī citviet Latvijā.

Jau kopš laika, kad tika uzsākta invazīvā KSS ārstēšana ar angioplastijas metodi, LKC izveidota pacientu pārbaudes programma, kuras mērķi ir:

- 1) a – novērtēt pacienta funkcionālo stāvokli pēc invazīvās ārstēšanas metožu izmantošanas;
b – izvērtēt turpmāko kardiovaskulāro notikumu risku konkrētam pacientam;
c – spriest par ārstēšanas efektivitāti;
- 2) izveidot prognostisku modeli, kas palīdz laikus izvērtēt pacientus ar nelabvēlīgu ilgtermiņa iznākumu vai neapmierinošiem ārstēšanas rezultātiem;
- 3) izveidot pacientu datubāzi, lai varētu precīzāk analizēt atsevišķu pacientu grupas ar dažādu riska pakāpi un prognozi.

Pacientiem, kas ārstēti ar angioplastijas metodi, stāvoklis tiek izvērtēts:

- 1 mēnesi pēc invazīvās ārstēšanas – tūlītējā riska noteikšanai un medikamentu korekcijai;
- 3–6 mēnešus pēc PCI (attālā periodā) – restenozes iespējamības noteikšanai un medikamentu korekcijai;
- 12–24 mēnešus pēc PCI (vēlīnā periodā) – restenozes iespējamības noteikšanai un medikamentu korekcijai.

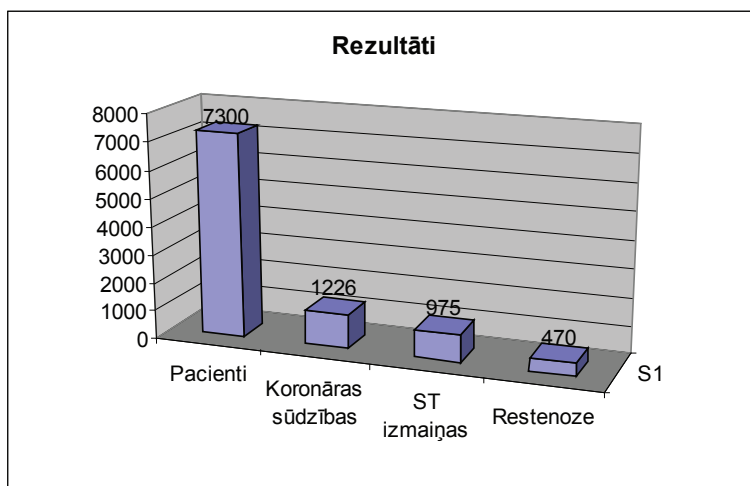
Atsevišķi tiek apskatīti īpaši augsta riska pacienti ar smagu 3 artēriju slimību un kreisās koronārās artērijas stumbra stenozi. Šiem pacientiem izmantotas precīzākas diagnostikas metodes – miokarda perfūzijas scintigrāfija (MPS) ar fiziskās vai farmakoloģiskās slodzes testu. MPS pamatā ir radioaktīvā tehnēcija spēja uzkrāties

miokarda dzīvotspējīgās šūnās, līdz ar to iespējams precīzāk un vispusīgāk noteikt sirds muskuļa bojājuma apjomu un dziļumu. Šāda pacientu apsekošanas programma ir nozīmīga koronārās sirds slimības pacientu sekundārā profilaksē, lai mainītu pacientu riska faktoru profilu, uzsvērtu medikamentozas ārstēšanas nozīmīgumu, īpaši kontrolējot hipolipidēmisko līdzekļu, b-blokatoru un antiagregantu lietošanu, kā tas noteikts KSS ārstēšanas vadlīnijās, kā arī lai kontrolētu pacienta pašreizējo klīnisko stāvokli.

Iegūtie rezultāti

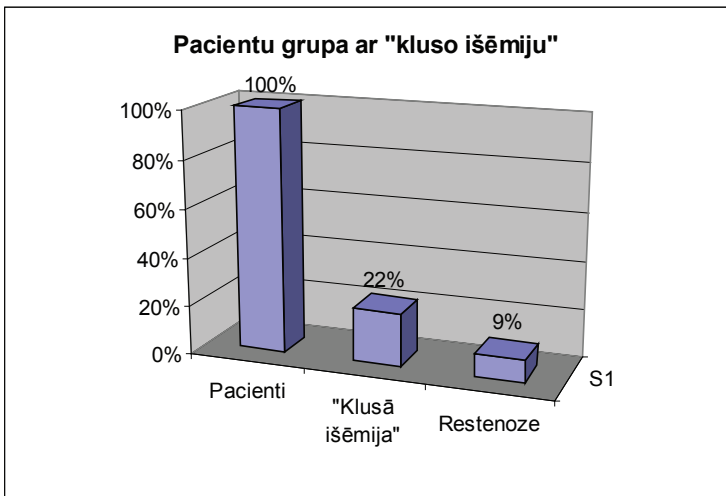
Pārbaudes programmas ietvaros viena, trīs un sešu mēnešu vizītēs ieradušies 7300 pacientu ar izdarītu PCI. Pacientiem veikts slodzes tests, pēc nepieciešamības koriģēti lietojamie medikamenti un kontrolēta riska faktoru novēršanas iespēja, tādējādi var noteikt pacienta kardiovaskulāro notikumu risku un restenozes iespējamību.

Koronārās sūdzības šajā grupā bijušas 1226 pacientiem (17%). ST segmenta izmaiņas EKG slodzes testa laikā, kas varētu norādīt uz iespējamu miokarda išēmiju, konstatētas 975 pacientiem (13%). Diagnozes precizēšanai 264 pacientiem izdarīta miokarda perfūzijas scintigrāfija, kurā nozīmīgas miokarda išēmijas reģistrētas 88 pacientiem (30% no 264). Kopumā no visas kontrolēto pacientu grupas angiogrāfiska restenoze konstatēta 470 pacientiem (6,4%).



1. attēls. Apsekošanas programmas rezultāti
Follow-up results

Pārbaudot pacientus, atrasta pacientu grupa, kam nav sūdzību par sāpēm krūtīs, taču slodzes testa laikā konstatētas izteiktas ST segmenta izmaiņas EKG (t. s. “klusā išēmija”, kas ir slikts prognostisks rādītājs). Tie ir 22% pacientu, no tiem 9% angiogrāfijā atrasta restenoze koronārajās artērijās.



2. attēls. Pacienti ar "klusu išēmiju"
Patients with silent ischemia

Šis fakts vēlreiz pierāda mērķtiecīgas kontroles nepieciešamību – ja izdarītu slodzes testu tikai pacientiem ar sūdzībām par sāpēm krūtīs, netiktu pārbaudīti "klusās išēmijas" pacienti, kuriem iespējama restenoze. Svarīgs ieguvums ir arī pacienta līdzestība – ir pierādīts, ka regulāras pārbaudes, medikamentu korekcija, pacienta izglītošana un riska faktoru korekcija palielina pacienta atbildību ārstēšanas procesā, līdz ar to nodrošinot lielāku ārstēšanas efektivitāti un noturību.

Diskusija

Raksturīga atradne EKG fiziskās slodzes testa laikā, kas liecinātu par KSS klātbūtni, ir atgriezeniska slodzes provocēta ST segmenta depresija. Tā norāda uz miokarda išēmiju pacientam ar nozīmīgi sašaurinātiem koronārajiem asinsvadiem pieaugoša skābekļa pieprasījuma apstākļos, kamēr miera stāvoklī asinsplūsma nav limitēta. Tomēr jāņem vērā pēdējo pētījumu dati, ka augstāks kardiovaskulāru notikumu risks ir pacientiem ar nestabilu aterosklerotisku plāksni, kā arī tad, ja tā nedod nozīmīgu anatomisku koronārās artērijas sašaurinājumu. Tātad ir nepieciešama vēl nopietnāka slodzes testa datu izvērtēšana, lai uzlabotu metodes diagnostisko vērtību. Neatbildēts paliek jautājums par to, vai slodzes testu ar EKG var lietot pacienta prognozes noteikšanai paralēli iespējam noteikt obstruktīvu koronāro artēriju bojājumu. Tas ļautu efektīvi mazināt pēkšņas nāves vai nopietnu koronāru notikumu risku.

Secinājumi

Mērķtiecīga invazīvi ārstētu pacientu pārbaude ar slodzes testu ļauj precīzi sekot pacienta ārstēšanas gaitai, noteikt pacienta funkcionālo kapacitāti, ārstēšanas efektivitāti, izdarīt nepieciešamās medikamentu korekcijas, vērtēt pacienta tālāko kardiovaskulāro notikumu risku un noteikt iespējamu restenozi koronārajos asinsvados, kā arī nodrošināt labāku pacienta līdzestību ārstēšanas procesā.

Literatūra

1. Gianrossi R, Detrano R, Mulvihill D et al. Exercise-induced ST depression in the diagnosis of coronary artery disease. *Circulation* 1989, 80: 87–98.
2. Gibson SR. The diagnostic and prognostic value of exercise electrocardiography in asymptomatic subjects and stable symptomatic patients. *Curr Opin Cardiol* 1991, 6: 536–546.
3. Lauer SM. Exercise electrocardiogram testing and prognosis. Novel markers and predictive instruments. *Cardiol Clin* 2001, 19: 401–414.
4. ACC/AHA guidelines for the clinical application of echocardiography: executive summary. *J Am Coll Cardiol* 1997, 29: 862–879.
5. Kalnins U. Fiziskās slodzes testu izmantošana klīniskā praksē. *Latv Ārsts* 1993/3, 250.
6. Kligfield P, Lauer MS. Exercise Electrocardiogram Testing Beyond the ST Segment. *Circulation* 2006, 114: 2070–2082.
7. Underwood SR et al. Myocardial perfusion scintigraphy: the evidence. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2004, 31: 261–291.
8. McNeer JF et al. The role of the exercise test in the evaluation of patients for ischaemic heart Disease. *Circulation* 1978, 57: 64–70.
9. Updated imaging guidelines for nuclear cardiology procedures. *J Nucl Card* 2001, 8: G5–G33.
10. Latus KA, Underwood SR. Clinical considerations in cardiac stress testing. *J Nuc Card* 2001, 8: 410–4.
11. Merenich JA et al. Mortality Reduction Benefits of a Comprehensive Cardiac Care Programme for Patients with Occlusive Coronary Artery Disease. *Pharmakotherapy* 2007, 27 (10): 1370–1378.

Summary

Objectives. *The principle of coronary artery disease (CAD) treatment is revascularization of coronary arteries, combined with medication. To optimize the cardiac care of patients (pts) with CAD, we established a targeted follow-up programme with stress test as the basic diagnostic method. In our country, this is the first study offering an opportunity to evaluate the functional capacity of pts, severity of CAD, prediction of risk and prognosis after invasive treatment with percutaneous coronary intervention (PCI).*

Background. *Stress testing still remains the basic and most widely accessible method for initial evaluation of suspected CAD. It is also possible to use this method for evaluation of possible restenosis – a process which is pathologically different from the mechanism of initial atherosclerosis (recoil, late remodeling, thrombosis, neointimal proliferation).*

Methods. CAD patients treated with PCI were inspected during the exercise test or myocardial perfusion imaging (MPI). Follow-up was carried out 1.3 and 6 months after the coronary intervention.

Results. In 6 months 7300 pts were included in the research. 17% of pts were complaining of angina, 13% pts had significant ST segment changes in the exercise test ECG, 6.4% of those pts had proved restenosis in angiography. There was also a group of pts with ST segment changes but without angina (silent ischemia) – 22% of pts, with a 9% restenosis rate in this group.

Conclusions. A targeted follow-up programme including the exercise test can help to estimate patients' clinical condition, evaluate the possibility of restenosis, qualify the risk factor profile, manage medical treatment, wherewith favorably affect clinical outcomes, maintaining patients' long-term compliance, also to medical therapy.

Keywords: coronary artery disease, percutaneous coronary intervention, stress test, exercise test, myocardial perfusion imaging.

Melanokortīnu saistīšanās pie γ -aminosviestskābes receptoriem peļu smadzenēs *Binding of Melanocortins to γ -aminobutyric Acid Receptors in Mice Brain*

Ruta Muceniece¹, Kristīne Vrubļevska¹, Reinis Vilšķērsts^{1,2}, Una Riekstiņa¹,
Rūdolfs Mežapuķe², Olga Žarkova², Jānis Ancāns³, Maija Dambrova²

¹Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: Ruta.Muceniece@lu.lv

²Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Aizkraukles iela 21, Rīga, LV-1006

E-pasts: md@biomed.lu.lv

³Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultāte

Kronvalda bulvāris 4, Rīga, LV-1050

E-pasts: jancans@lanet.lv

Melanokortīni (MK) ietekmē tik daudz fizioloģisko norišu, ka tiek izteikta hipotēze par MK spēju tieši iedarboties ne tikai uz MK receptoriem, bet arī uz citu endogēno ligandu receptoriem. Šī darba mērķis – noskaidrot MK afinitāti pie peļu smadzeņu GASS_A receptora *in vitro*, izmantojot radioligandu saistīšanās metodi un specifiskus GASS_A receptoru ligandus. Iegūtie rezultāti apliecināja vāju MK afinitāti pret GASS receptoriem. Tā γ_1 -melanocītstimulējošais hormons (γ_1 -MSH) un β -melanocītstimulējošais hormons (β -MSH) saistījās pie [³H]GASS iezīmētiem receptoriem ar 200–300 μ M afinitāti, bet γ_2 -MSH tikai ar mM afinitāti, un α -MSH neparādīja nekādu saistīšanās aktivitāti. Pie [³H]flunitrazepāma iezīmētām benzodiazepīnu saistīšanās vietām saistījās tikai β -MSH.

Jāsecina, ka MK tiešā saistīšanās pie GASS_A receptoriem nevarētu būt pamatā to fizioloģiskajiem efektiem un aktivitātei *in vivo*.

Atslēgvārdi: melanokortīni, γ -aminosviestskābe, radioligandu saistīšanās.

Ievads

Dažādu smadzeņu neiromediatoru un neuropeptīdu savstarpējo mijiedarbību pētījumi ir veikti jau pirms cilvēka receptoru klonēšanas un receptoru proteīnu struktūras atšifrēšanas. Melanokortīnu (MK) pirmais pārstāvis – neuropeptīds

α -melanocītstimulējošais hormons (α -MSH) – tika atklāts 1912. gadā (1), bet MK receptori klonēti salīdzinoši nesen – 1992.–1993. gadā (2). Pētot hipofīzes ekstrakta ietekmi uz vardes ādas pigmentāciju (1), tika izteikta hipotēze, ka hipofīze izdala kādu vielu, kura stimulē vardes ādas tumšināšanos. Tā pirmo reizi tika aprakstīta melanokortīnu (MK) bioloģiskā aktivitāte, taču aktīvās molekulas formula tika

noskaidrota tikai pēc 43 gadiem (3). Vēlāk tika atklāts, ka eksistē vairāki MSH peptīdi: α -MSH, β -MSH, γ_1 -MSH, γ_2 -MSH, tomēr līdz šim galvenokārt α -MSH tiek izmantots MK darbības pētījumos. Tāpēc lielākoties zinātniskā literatūrā ir atrodami dati tikai par α -MSH un smadzeņu darbību kavējošā mediatora – γ -aminosviestskābes (GASS) receptoru ligandu mijiedarbību *in vivo*.

Veicot uzvedības testus pelēm un žurkām, tika novērots, ka α -MSH un adrenokortikotropīna (AKTH) centrāla ievadīšana pelēm un žurkām izraisa dažādas uzvedības reakcijas: lokomotoro aktivitāti, celšanos uz pakaļkājām, staipīšanos un mazgāšanos (*grooming*). GASS receptoru ligandu diazepāma un baklofēna ievadīšana kopā ar α -MSH nobloķēja α -MSH darbību (4), bet GASS antagonists baklofēns stimulēja α -MSH grūmingu izraisīto efektu (5). Pētot šo vielu mijiedarbību žurku smadzeņu griezumos, tika secināts, ka GASS aktīvām vielām un MK iespējama pretēja iedarbība uz šūnu sekundārajām signālpārneses molekulām – ciklisko adenozinmonofosfātu (cAMF) un kalcija joniem (6), kā arī tika pierādīts, ka GASS inhibē α -MSH atbrīvošanos žurku hipotalāma audos (7).

MK mijiedarbība ar aminoskābju receptoriem neaprobežojas ar GASS sistēmu vien. cAMF producēšanas testā *in vitro* (8) tika pierādīta α -MSH un glutamāta (Glu) receptoru ligandu mijiedarbība, un neuroendokrīnās šūnās (žurku melanotrofos) Glu stimulēja α -MSH atbrīvošanos (9). Tādējādi MK un smadzeņu aminoskābju mijiedarbība ir vairākkārt aprakstīta un pētīta dažādos eksperimentālajos modeļos, bet nav skaidrs, vai MK spēj tieši saistīties ar GASS un Glu receptoriem. Dažādu autoru pētījumi rāda, ka ar α -MSH iegūtie rezultāti ne vienmēr ir attiecināmi uz visiem MK un ka nepieciešams pētīt arī β -MSH un γ -MSH peptīdu aktivitāti, kas var būt atšķirīga dažādos testos. Tika atklāts pat γ_1 -MSH un γ_2 -MSH pretējas darbības (antagonisma) fenomens, lai gan abu γ -MSH peptīdu struktūras lielā mērā ir līdzīgas (11). Atklātā γ_1 -MSH un γ_2 -MSH pretējā darbība norāda uz abu peptīdu funkcionālo lomu smadzeņu procesu regulācijā, lai nodrošinātu psihoaktivācijas, sāpju percepcijas (un, iespējams, arī motivācijas) procesu homeostāzi. Tieši sāpju testos tika atklāta iespējamā γ_2 -MSH pretsāpju darbība, iedarbojoties uz GASS receptoriem (12).

Tāpēc šī darba mērķis – noskaidrot endogēno MK afinitāti pie peļu smadzeņu mikrosomālo membrānu GASS receptoriem *in vitro*.

Materiāli un metodes

Pētījumiem nepieciešamie reaģenti tika pirkti no dažādām firmām: MSH peptīdi no *Bachem* (Šveice), radioaktīvie ligandi no *Amersham Biosciences* (Zviedrija), ķīmiskie reaģenti no *Sigma-Aldrich Chemical Co* (ASV) pārstāvniecības Latvijā.

ICR peles tika iegādātas Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijā. Peles tika dekapitētas, un no izņemtajām smadzenēm tika iegūtas mikrosomālās membrānas. Visas procedūras ar dzīvniekiem notika saskaņā ar EU Direktīvu 86/609/EEC un ar Latvijas Veterinārā un pārtikas centra Ētikas komisijas atļauju.

[³H]flunitrazepāma un [³H]GASS saistīšanas konkurences pētījumiem tika izmantotas jau agrāk publicētas metodes (13, 15). Peļu smadzenes tika homogenizētas

atbilstošā buferšķīdumā, homogenāti atkārtoti centrifugēti 150000xg 15 min. Iegūtās nogulsnes izšķīdinātas 50 mM Tris/HCl (pH = 7,4) buferī ar aprēķinu, lai proteīnu koncentrācija būtu aptuveni 0,5–0,7 mg/ml. Līdz lietošanai šūnu membrānu šķīdumi tika uzglabāti sasaldētā veidā –80 °C temperatūrā.

Ekspērimētos smadzeņu membrānu suspensija, [³H]flunitrazepāms 3 nM koncentrācijā un pētāmie MK peptīdi dažādās koncentrācijās 60 min tika inkubēti 96 bedrīšu planšetēs (*MultiScreen harvest plates*) 4 °C temperatūrā. Ekspērimētos, kuros tika pētīta peptīdu konkurence par saistīšanos pie GASS receptoriem, attiecīgās mikrosomālās membrānas un pētāmie peptīdi dažādās koncentrācijās kopā ar 10 nM [³H]GASS tika inkubēti 20 min 4 °C temperatūrā. Nespecifiskā saistīšanās tika noteikta, pievienojot inkubācijas maisījumam 2 mM diazepāmu un 10 mM GASS. Nespecifiskā saistīšanās nepārsniedza 10% no totālā saistītās radioaktivitātes līmeņa. Ekspērimēti tika atkārtoti trīs reizes ar diviem paralēliem mērījumiem.

Reakcija tika apturēta, pēc katras inkubēšanas paraugus ātri filtrējot caur Vatmana GF/B filtriem un mazgājot ar ledusaukstu buferšķīdumu. Pēc tam filtri tika šķīdināti scintilatora šķīdumā (*OptiPhase scintillation cocktail*). Paraugu radioaktivitāte tika skaitīta 1 min ar skaitītāju *1450 Microbeta Trilux* (Wallac, Somija). Visi ekspērimēti tika atkārtoti trīs reizes, katrā reizē izdarot divus paralēlos mērījumus.

Nelineārās regresijas aprēķinu veikšanai un līkņu izveidošanai (*curve fit*) tika izmantota komerciāli pieejama datorprogramma *Prism 4,0* (*GraphPad Software*, ASV).

Rezultāti

Visu MSH peptīdu struktūrā ir kopējs vidus fragments (1. attēls), kuru uzskata par melanokortīnu receptoru saistīšanās vietu peptīda molekulā.

α -MSH

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

γ_1 -MSH

H-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-NH₂

γ_2 -MSH

H-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly-OH

β -MSH

H-Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH

1. attēls. Peptīdu struktūras *Structure of peptides*

Veicot radioligandu saistīšanās ekspērimētos, tika izmantotas atbilstošās references vielas ar zināmu afinitāti pret pētāmo receptoru: diazepāms [³H]flunitrazepāmam un GASS radioaktīvi iezīmētai [³H]GASS. Visas šīs vielas pēc uzbūves ir

ļoti atšķirīgas no MSH peptīdiem, un to struktūras ir piemērotas attiecīgo receptoru ligandu saistīšanās vietām. Iegūtie rezultāti tika izmantoti kā kontroles dati, kas apliecināja, ka iegūtajās mikrosomālajās membrānās atrodas pētāmie receptori. 1. tabulā ir apkopotas eksperimentos aprēķinātās vielu afinitātes, ko raksturo inhibīcijas konstantes (K_i).

1. tabula

Pārbaudīto vielu saistīšanās K_i , konkurējot ar attiecīgiem iezīmētiem ligandiem
 K_i values of tested compounds obtained by competition with corresponding labeled ligands

Vielā	[³ H]GASS $K_i \pm S.E.M.$	[³ H]flunitrazepāms $K_i \pm S.E.M.$
γ_1 -MSH	221 \pm 20 μ M	n.s.
γ_2 -MSH	5460 \pm 653 μ M	n.s.
β -MSH	300 \pm 75 μ M	412 \pm 78 μ M
α -MSH	n.s.	n.s.
Diazepāms	n	4 \pm 0,6 nM
GASS	10 \pm 4 nM	n

S.E.M. – vidējā kvadrātiskā kļūda (mean standard error)

n. s. – nav novērota saistīšanās pie receptoriem (no binding)

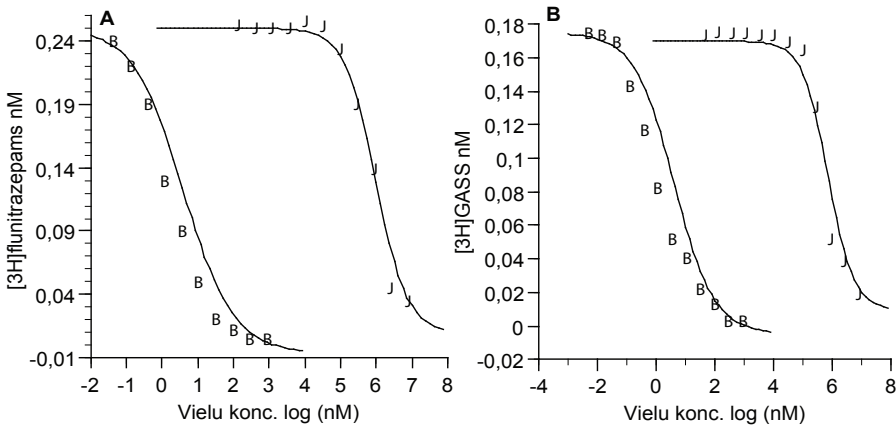
n – nav datu (no data)

No visiem pārbaudītajiem MSH peptīdiem tikai β -MSH konkurēja ar abām radioaktīvajām iezīmēm – [³H]flunitrazepāmu un [³H]GASS – par saistīšanos pie attiecīgo ligandu vietām uz GASS_A receptora. γ -MSH peptīdi saistījās tikai pie GASS saistīšanās vietas un γ_2 -MSH bija daudz vājāka afinitāte par γ_1 -MSH, bet α -MSH pārbaudītajā koncentrāciju intervālā nesaistījās ne pie GASS, ne pie benzodiazepīnu vietām uz GASS_A receptora. 2. attēlā ir parādītas β -MSH konkurences līknes salīdzinājumā ar diazepāma (A) un GASS (B) saistīšanās spēju pie receptora.

Diazepāmam un GASS bija ļoti zema nespecifiskā saistīšanās (mazāk nekā 10% no piesaistītās radioaktivitātes), kas apliecina iegūto peļu smadzeņu mikrosomālo membrānu kvalitāti un saistīšanās reakcijas optimālu norisi.

Diskusija

Šajā pētījumā sniegta atbilde uz vairākkārt izvirzīto jautājumu – vai GASS un MSH peptīdu savstarpējā mijiedarbība ir kaut kādā mērā izskaidrojama ar MSH peptīdu saistīšanos pie GASS receptoriem. 2003. gadā publicētajos pētījumos (17) tika diskutēts par tiešu vai netiešu α -MSH ietekmi uz GASS receptoriem un nepieciešamību noskaidrot precīzāku MK un GASS saistības mehānismu. Smadzeņu struktūrās – arī hipotalāmā – ir tiešs sinaptisks kontakts starp MSH neironiem un GASS nervu galiem, kas pieļauj ciešu neuropeptīdu molekulu kontaktu ar GASS_A receptoriem. Zināms, ka sistemātiska α -MSH ievadīšana dzīvniekiem izraisa nemieru un anoreksiju. Šo uzvedības izmaiņu pamatā varētu būt vairāku ar G proteīnu saistīto



2. attēls. **A.** Diazepāma (kvadrāti) un β -MSH (apļi) konkurence ar $[^3\text{H}]$ flunitrazepāmu par saistīšanos pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas, $n = 6$
B. GASS (kvadrāti) un β -MSH (apļi) konkurence ar $[^3\text{H}]$ GASS par saistīšanos pie GASS saistīšanās vietas, $n = 6$
A. Competition of Diazepam (squares) and β -MSH (circles) with $[^3\text{H}]$ flunitrazepam for binding to benzodiazepine binding sites, $n = 6$
B. Competition of GABA (squares) and β -MSH (circles) with $[^3\text{H}]$ GABA for binding to GABA site, $n = 6$

receptoru aktivācija vai inhibīcija. Ievadot diazepāmu un muscimolu žurkām pirms intracerebroventrikulāri (*icv*) injicēta α -MSH, tika novērota α -MSH efektu samazināšanās, bet GASS_A receptoru antagonists bikukulīns pastiprināja α -MSH darbību (16). Tas apliecināja, ka α -MSH ir negatīva ietekme uz GASS-erģisko sistēmu, bet šajos testos netika atklāts mijiedarbības mehānisms.

Arī γ -MSH peptīdiem ir pierādīta saistība ar GASS signālceļiem, jo γ_2 -MSH būtiski palielināja etanola izraisīto analgēzijas efektu, GABA_A receptora antagonists bikukulīns pilnīgi antagonizēja γ_2 -MSH izraisīto analgēziju, bet neizmainīja ne α -MSH, ne γ_1 -MSH efektus sāpju testā *tail flick* (12). GABA_A receptora agonists muscimols neizraisīja izmaiņas ne α -MSH, ne γ_1 -MSH *tail flick* testa latentajā periodā. Turpretī γ_2 -MSH izraisīto analgētisko efektu muscimols nozīmīgi potencēja. α - un γ_1 -MSH būtiski samazināja GABA_A receptora benzodiazepīna saistīšanās vietas liganda diazepāma iedarbību, taču γ_2 -MSH neietekmēja diazepāma analgētisko efektu (17). MK receptoru antagonists HS014 neietekmēja γ_2 -MSH analgētisko darbību, tā parādot, ka šī darbība nenotiek ar MK receptoru starpniecību. Minētie un vēl citi pētījumi norādīja, ka MSH peptīdiem piemīt arī nemelanokortīnerģiskie efekti.

Šajā darbā pirmo reizi parādīts, ka MSH peptīdi saistās pie GASS_A receptoriem, tomēr saistīšanās spēja pie GASS receptoriem ir vāja. Pie $[^3\text{H}]$ flunitrazepāma iezīmētām benzodiazepīnu saistīšanās vietām saistījās tikai β -MSH, kas tādēļ būtu uzskatāms par aktīvāko MK, jo tas konkurēja par saistīšanos pie receptoriem ar abiem radioaktīvajiem ligandiem. Afinitātes rinda ir: β -MSH= γ_1 -MSH> $>$ γ_2 -MSH.

Interesanti, ka tieši visvairāk GASS un MK mijiedarbības testos pētītais α -MSH nekonkurēja par saistīšanos ne pie benzodiazepīnu, ne pie GASS saistīšanās vietas. Arī γ -MSH peptīdi nekonkurēja ar benzodiazepīnu saistīšanās vietas iezīmi. Iespējams, šie rezultāti apstiprina hipotēzi, ka GASS un MSH peptīdu mijiedarbība notiek signālmolekulu atbrīvošanās regulācijas līmenī (18), nevis tieši saistoties pie receptoriem.

Nevar noliegt iespēju, ka endogēnie β -MSH un γ_1 -MSH varētu noteiktos patoloģiskos stāvokļos saistīties pie smadzeņu GASS receptoriem, jo nav zināmi lokālie MSH peptīdu līmeņi sinapsēs *in vivo*. Tomēr jāsecina, ka MK tiešā saistīšanās pie GASS_A receptoriem nevarētu būt pamatā to fizioloģiskajiem efektiem un aktivitātei *in vivo*.

Pateicība

Darbs veikts ar Latvijas Zinātnes padomes granta 05.1419, ERAF projekta VPD/ERAF/CFLA/05/APK/2.5.2./000072/036 un ESF grantu doktorantiem un jaunajiem zinātniekiem finansiālu atbalstu.

Literatūra

1. Fuchs R. F. *Die physiologische function des chromatophorsystems als organ der physikalischen wärmerregulierung der poikilothermem*. Sitzungsberichte der physikalisch-medezinischen sozietāt in erlangen, 1912, 44, p. 134–177.
2. Wikberg J. E., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. *New aspects on the melanocortins and their receptors*. Pharmacol Res, 2000, 42, p. 393–420.
3. Lee T. H., Lerner A. B. *Isolation of melanocyte-stimulating hormone from hog pituitary gland*. J Biol Chem, 1956, 221, p. 943–959.
4. Cremer C., de Barioglio S. R., Civallero G., Celis M. E. *alpha-MSH-induced behavior: changes after diazepam and baclofen administration related with cyclic AMP levels*. Peptides, 1995, 16, p. 821–825.
5. De Barioglio S. R., Lezcano N., Celis M. E. *Alpha MSH-induced excessive grooming behavior involves a GABAergic mechanism*. Peptides, 1991, 12, p. 203–205.
6. Cremer M. C., de Barioglio S. R., Celis M. E. *Interaction between alpha-MSH and gabaergic agents upon striatal cAMP levels: an in vitro model*. Peptides, 1998, 19, p. 383–388.
7. Mabley J., Wayman C. P., Wilson J. F. *Endogenous gamma-aminobutyric acid tonically inhibits release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from rat hypothalamic slices*. Eur J Pharmacol, 1991, 209, p. 127–129.
8. De Barioglio S. R., Brito M. I. *Effect of alpha-MSH upon cyclic AMP levels induced by the glutamatergic agonists NMDA, quisqualic acid, and kainic acid*. Peptides, 1996, 17, p. 1303–1306.
9. Kreft M., Blaganje M., Grile S., Rupnik M., Zorec R. *Glutamate stimulation increases hormone release in rat melanotrophs*. Neurosci Lett, 2006, 404, p. 299–302.
10. Muceniece R., Zvejniece L., Kirjanova O., Liepinsh E., Krigere L., Baumane L., Kalvinsh I., Wikberg J. E., Dambrova M. *Beta- and gamma-melanocortins inhibit lipopolysaccharide induced nitric oxide production in mice brain*. Brain Res., 2004, 995, p. 7–13.

11. Jansone B., Bergstrom L., Svirskis S., Lindblom J., Klusa V., Wikberg J. E. *Opposite effects of gamma(1)- and gamma(2)-melanocyte stimulating hormone on regulation of the dopaminergic mesolimbic system in rats*. *Neurosci Lett*, 2004, 361, p. 68–71.
12. Klusa V., Germane S., Svirskis S., Wikberg J. E. *The gamma(2)-MSH peptide mediates a central analgesic effect via a GABA-ergic mechanism that is independent from activation of melanocortin receptors*. *Neuropeptides*, 2001, 35, p. 50–57.
13. Cope D. W., Wulff P., Oberto A., Aller M. I., Capogna M., Ferraguti F., Halbsguth C., Hoeger H., Jolin H. E., Jones A., McKenzie A. N., Ogris W., Poeltl A., Sinkkonen S. T., Vekovischeva O. Y., Korpi E. R., Sieghart W., Sigel E., Somogyi P., Wisden W. *Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit*. *Neuropharmacology*, 2004, 47, p. 17–34.
14. Klusa V., Kiiwet R. A., Muceniece R., Liepa I., Harro J., Svirskis S., Andermanis A., Rago L. *Thymopentin antagonizes stress-induced changes of GABA/benzodiazepine receptor complex*. *Regul. Pept.*, 1990, 27, p. 355–365.
15. Mehta A. K., Ticku M. K. *Unsulphated and sulphated neurosteroids differentially modulate the binding characteristics of various radioligands of GABA(A) receptors following chronic ethanol administration*. *Neuropharmacology*, 2001, 40, p. 668–675.
16. Rao T. L., Kokare D. M., Sarkar S., Khisti R. T., Chopde C. T., Subhedar N. *GABAergic agents prevent alpha-melanocyte stimulating hormone induced anxiety and anorexia in rats*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2003, 76, p. 417–423.
17. Klusa V., Jansone B., Svirskis S., Rumaks J., Muceniece R. *The fundamental roles of melanocortins in brain process*. In: *Chemical Probes in Biology*, edited by Schneider M. P., Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 2003, p. 255–267.
18. Pampillo M., Scimonelli T., Duvilanski B. H., Celis M. E., Seilicovich A., Lasaga M. *The activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects GABA and alpha-melanocyte stimulating hormone release from the hypothalamus and the posterior pituitary of male rats*. *Neurosci Lett*, 2002, 327, p. 95–98.

Summary

Melanocortins (MCs) mediate so wide array of physiological functions that it has been hypothesized that MCs could possibly act not only through MC receptors but also possess some affinity to receptors of other endogenous ligands, including neuromediator gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors. Even though it has been investigated that MCs influence the GABA-ergic processes in vivo, the binding of MCs to GABA receptors had never been tested before. Therefore, the aim of the present study was to determine the affinity of endogenous MCs to GABA receptors in a microsomal fraction of mice brain membranes. Using the radioligand binding method and labelled GABA receptor ligands, it was discovered that γ_1 -melanocyte stimulating hormone (γ_1 -MSH) and β -melanocyte stimulating hormone (β -MSH) bound to [3 H]GABA-labelled receptors with 200–300 μ M affinity, but γ_2 -MSH possessed low mM affinity and α -MSH did not displace the label. Only β -MSH showed affinity for [3 H] flunitrazepam-labelled benzodiazepine sites; therefore, it could be considered the most active endogenous MC tested in these experiments.

We conclude that the direct binding to GABA_A receptors could not account for the physiological effects and in vivo activity of MCs.

Development and Validation of the HPLC Method for the Determination of Paclitaxel Concentration in Human Serum

AEŠH (augstefektīvās šķidrumu hromatogrāfijas) metodes izstrāde un validācija paklitaksela koncentrācijas noteikšanai cilvēka asins serumā

Ilva Nakurte¹, Ilze Plinte¹, Pēteris Mekšs¹, Žanete Zvirbule², Agnese Sudraba^{1,2},
Ivars Tolmanis³, Aija Line⁴, Uldis Vikmanis¹, Viesturs Boka², Mārcis Leja^{1,3}

¹ University of Latvia, Raiņa bulvāris 19, Rīga, e-pasts: ilva.nakurte@gmail.com

² Riga Eastern Clinical University Hospital, Hipokrāta iela 4, Rīga

³ Digestive Diseases Centre GASTRO, Linezera iela 6, Rīga

⁴ Latvian Biomedical Research and Study Centre, Rātsupītes iela 1, Rīga

Paclitaxel is a well known anti-cancer drug that was discovered in a yew-tree. Today paclitaxel is used approximately in 22% of the cancer cases as an anti-cancer drug. Analytical assays describe the determination of paclitaxel in human serum. However, paclitaxel is used in different drug formulations together with other ingredients, which may influence its pharmacokinetics. Therefore, for each novel drug formulation used in clinical studies, an appropriate assay should be worked out. The work of the authors aimed to develop and validate the high performance liquid chromatography (HPLC) method for paclitaxel measurement and therapeutic monitoring in the patients' serum that use *Paxene* (generic formulation of paclitaxel) for cancer treatment, without any preliminary treatment of the sample. The promoted HPLC assay method was validated and will be used in clinical studies in the nearest future.

Keywords: paclitaxel, high performance liquid chromatography, validation.

Introduction

Today, paclitaxel is one of the most popular anti-cancer drugs used in anti-cancer chemotherapy. It constitutes about 22% of all major cancer chemotherapy regimens all over the world market [1]. Paclitaxel, structurally the most complex in its family, and its congener cephalomannine perform antitumor activities. Paclitaxel inhibits cell proliferation by inducing a sustained mitotic block at the metaphase/anaphase boundary, formation of an incomplete metaphase plate of chromosomes, and an abnormal organization of spindle microtubules as a result of the stabilization of microtubule dynamics [2]. *Paxene* (Norton Healthcare Limited, London) is a generic formulation of paclitaxel used in everyday clinical practice in the Latvian Centre of Oncology, Riga Eastern Clinical University Hospital.

A number of papers have reported methods for the determination of paclitaxel in biological fluids by using HPLC [3–12]. Currently, chromatographic methods are

achieving growing popularity all over the world. The sample preparation process for liquid chromatography (LC) is not complicated and it does not result in decomposition of the samples. LC equipped with a new generation diode array detector can get a spectrum of any compound. It is necessary for complete efficiency and precision of the method used. The current work was aimed to develop and validate the HPLC method for the detection of paclitaxel in human samples with the objective to conduct further clearance studies.

Materials and Methods

Chemicals and reagents. The used solvents were of HPLC grade, deionized water (MiliQ system), organic solvent acetonitrile (Lab Scan, Ireland, Batch No. 3814/6). Paclitaxel for stock standard solution was obtained from *Paxene 6 mg/ml* drug form (IVAX, Norton Healthcare Limited, London, UK, R046869).

Instrumentation. HPLC was performed using a *Waters 2690 Alliance* liquid chromatography system consisting of a pump with degasser system, an autosampler with cooler, a diode array detector 996 and a column oven. The chromatographic system was controlled by the software package Millennium³² Version 4.00. The detection was carried out at $\lambda = 229 \pm 1.2$ nm. Separations were achieved using 40% water and 60% acetonitrile in an isocratic elution, using a Symmetry ShieldTM RP-18 4.6×250 mm I.D. 5 μ m (*Waters*) as a stationary phase. The column temperature was 30 °C. The mobile phase flow rate was kept constant at 1 ml/min⁻¹, and the injection volume was 10 μ l. The free volume of the column was determined by injecting methanol into the system.

Preparation of blood samples. Samples of human blood were obtained in BD Vacutainer[®] Plus plastic serum tube with red BD HemogardTM closure and spray-dried clot activator (silica, PVP, L-720) as additive.

We tried to devise the proposed paclitaxel determination method without further paclitaxel liquid-liquid extraction from the blood serum. Sample preparation was based on simple serum dilution with deionized water and sample filtration with PTFE 0.45 μ m filters before injection.

Validation of the proposed method. Standard solutions of paclitaxel were prepared by dissolving *Paxene* in deionized water. Standard solutions were kept at 5 °C and were stable at least for 3 months. Method specificity was determined by injecting deionized water as solution agent, standard solution and serum solution dissolved in deionized water. Calibration curve was prepared using solutions with known concentration of paclitaxel (0.001 mg/ml – 1 mg/ml). The detection and quantitation limits were calculated as the peak height at a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 and 10, respectively. Method assay precision and accuracy were assessed using serum spiked with 0.01 mg/ml paclitaxel. At last, stability of sample and standard solutions at room temperature (25 °C) during 24 hours was detected.

Results and Discussion

Chromatographic separations. The experimental conditions were chosen on the basis of literature reviews [7–13] and initial research for the separation of paclitaxel in

different conditions. The chosen stationary phase RP-18 had a low surface coverage of C-18 ligands [13]. Acetonitrile was used instead of methanol to improve the low-wavelength UV detection. Mobile phase strength was selected for better retention and resolution of paclitaxel to avoid noise and eluting of drifts in the free volume of the column. The overall chromatographic runtime was achieved within 10 min. Figure 1 shows a typical chromatogram of paclitaxel (A) and its UV absorption spectra in deionized water (B).

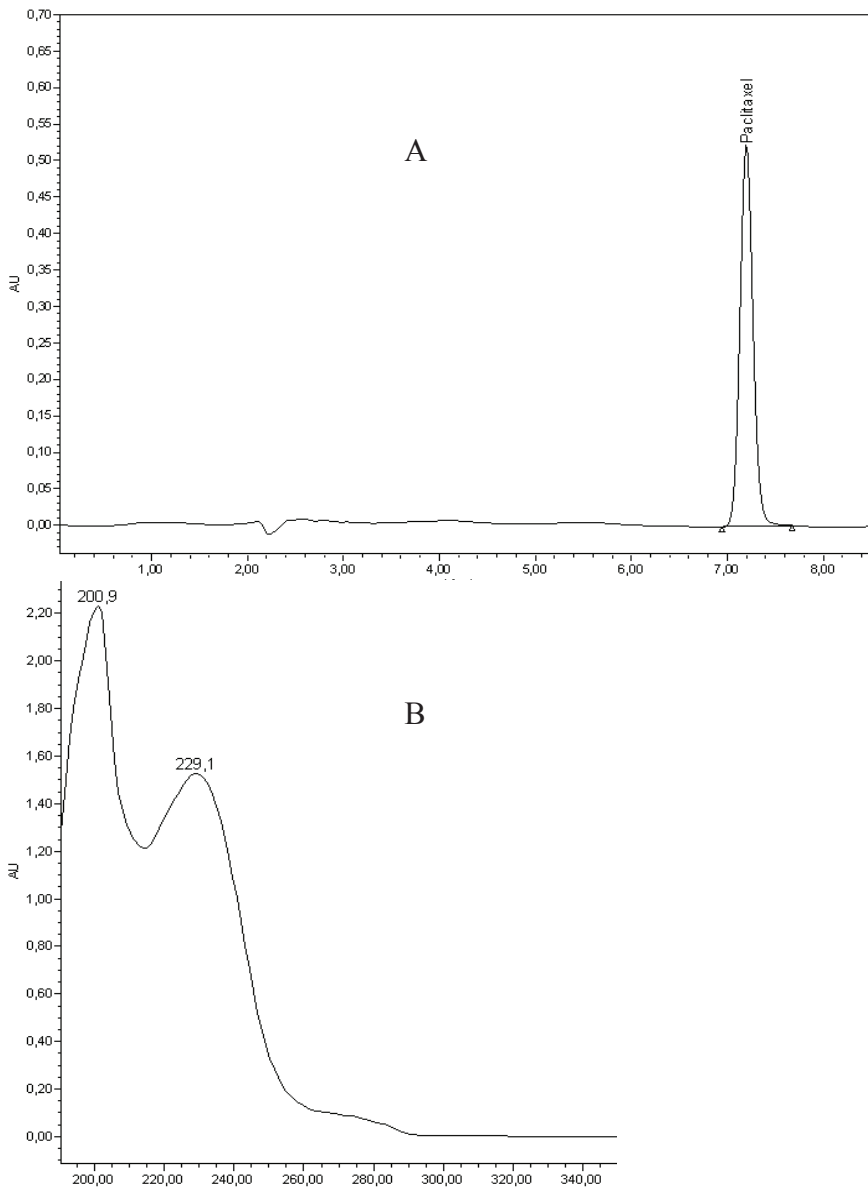


Figure 1. The chromatographic separation of paclitaxel
Paklītaksela hromatogrāfiskais profils (A) un UV absorbcijas spektrs (B)

Method validation. The first validation step was to check the specificity of the developed method. Figure 2 shows overlay chromatograms of deionized water (A), pure human serum (B), and paclitaxel standard solution (C). These chromatograms show that the developed method is specific because it does not have any troublesome factors.

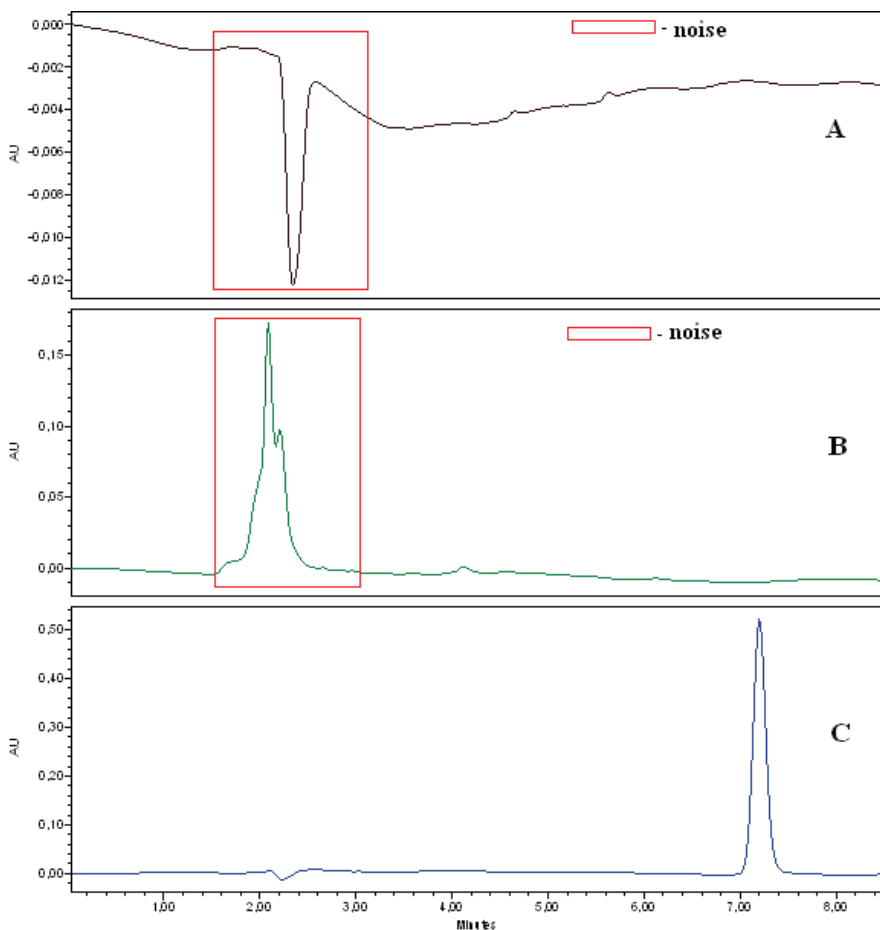


Figure 2. The specificity of the method for determination of paclitaxel in human serum
Metodes specifiskums paklitaksela noteikšanai cilvēka asins serumā

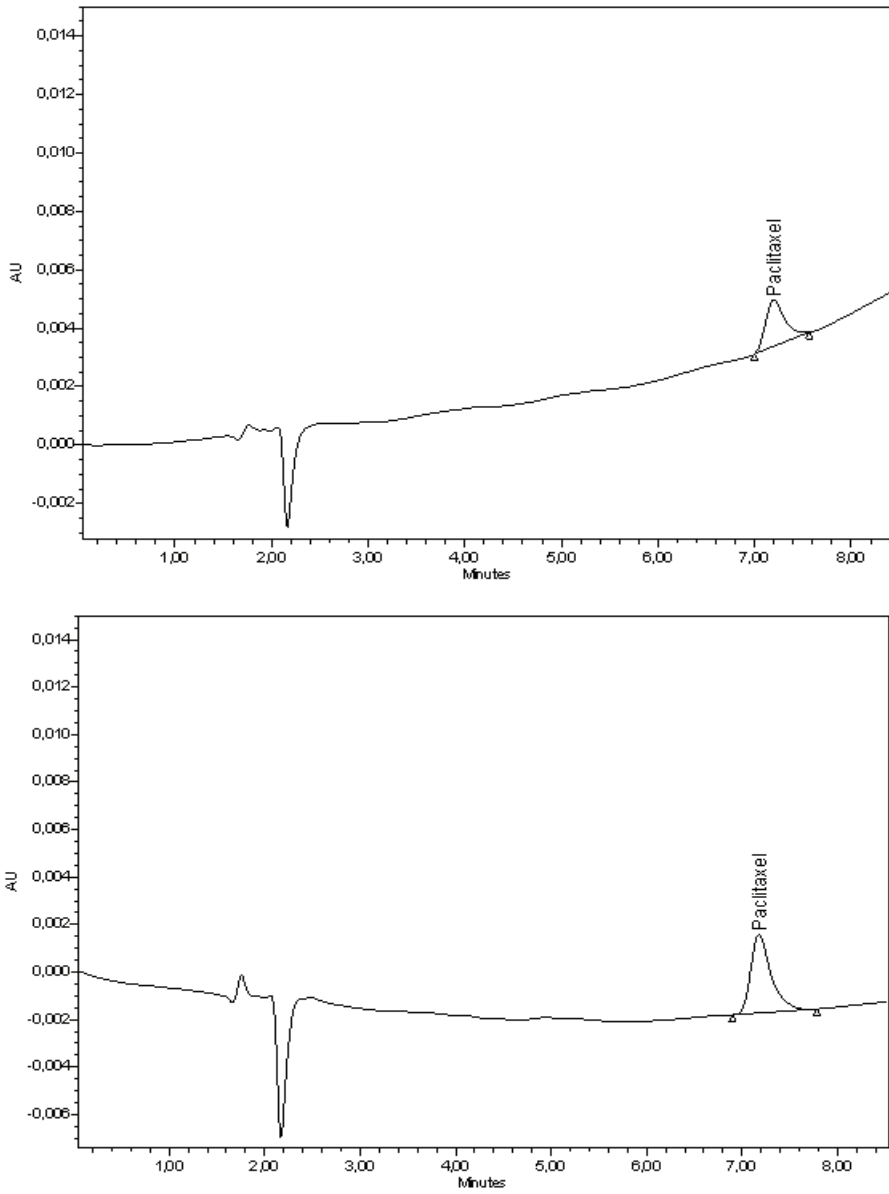


Figure 3. The limit of detection and quantitation of paclitaxel in human serum
Paklitaksela detektēšanas (A) un kvantitēšanas (B) robeža cilvēka asins serumā

Calibration curve was prepared with paclitaxel solutions with a specific concentration range (Table 1). The linear relationship for serum was obtained with good linearity. Figure 3 shows chromatogram samples for the limit of detection (LOD) (A) and the limit of quantitation (LOQ) (B) of paclitaxel in human serum. Relative standard deviation (RSD), %, between 3 parallel injections was 1.9% and 0.3%, respectively.

Table 1

Calibration curve and the limits of detection and quantitation of the promoted method

Concentration range, mg/ml	Equation	R ²	LOD (S/N = 3), mg/ml	LOQ (S/N = 10), mg/ml
1 × 10 ⁻³ – 1.0	y = 1.96 × 10 ⁷ × x	0.9992	7.0 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻³

Accuracy and precision results are summarized in Table 2. We got satisfactory accuracy results. The degree of accuracy for six results was ranging from 95.7 to 104.1%. Precision does not exceed RSD 0.2% for both retention time T_R and paclitaxel area. This part of validation gave us clear conviction that our proposed method can give accurate and precise results, with good recovery.

Table 2

Accuracy and precision of human serum

Run	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Mean	RSD, %
Added concentration to human serum, 10.00 × 10 ⁻³ mg/ml								
Found concentration	10.41	10.32	10.09	9.57	9.64	9.61	9.94	3.8
Accuracy, %	104.1	103.2	100.9	95.7	96.4	96.1	99.4	3.8
Precision, T _R	7.20	7.21	7.20	7.20	7.18	7.17	7.19	0.2
Precision, area	1.77 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	1.78 × 10 ⁶	0.1

In Figure 4, the examined stability of the paclitaxel standard solution (A) and spiked human serum sample solution (B) at 25° C during 24 hours is shown. It was detected that both standard and sample solutions are not stable at room temperature. RSD, %, between the first and last results for the standard solution is more or less acceptable – 2.9%, but degradation of sample solution occurs more often, RSD – 10.2%. The developed method needs freshly prepared solutions for analyses, which complicates these analyses. Further investigations with sample cooling would be advisable.

Conclusions

According to the results of the current study, we conclude that it is possible to separate and perform quantitative determination of paclitaxel both in standard

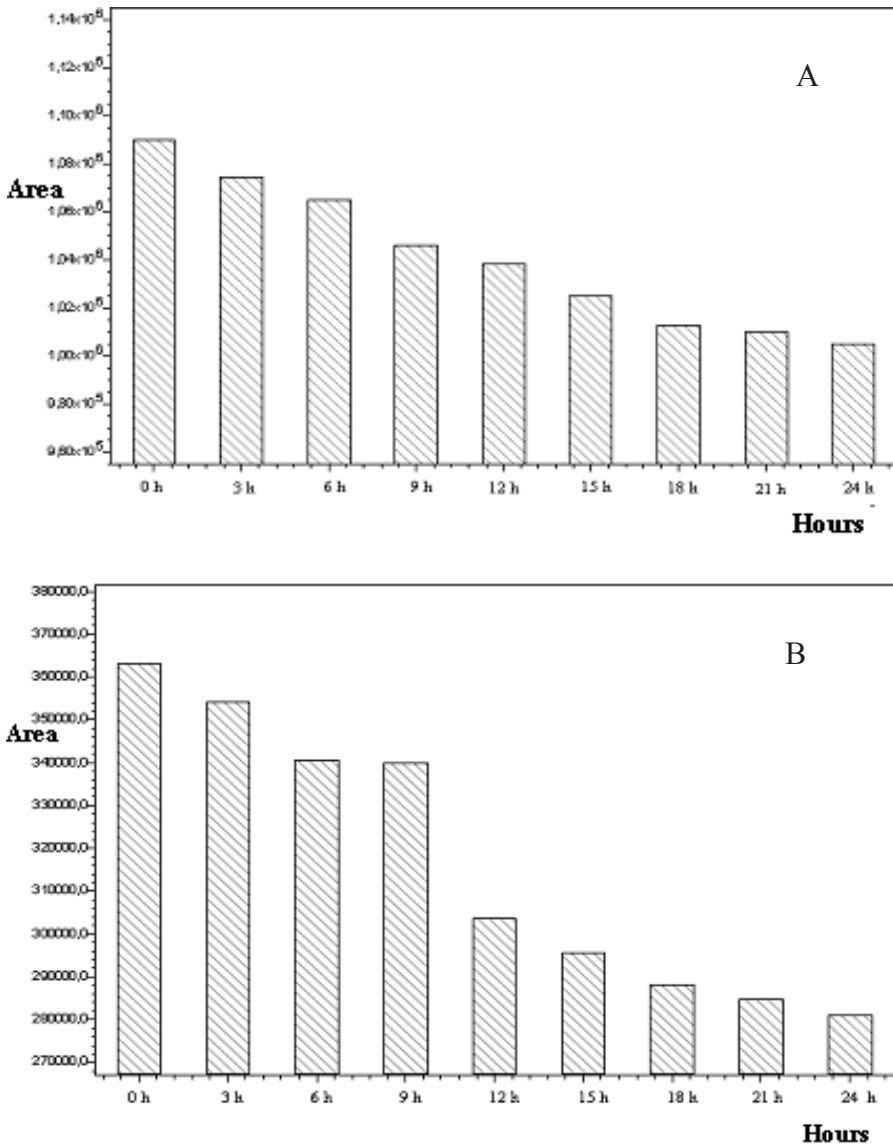


Figure 4. Stability of paclitaxel in solutions during 24 hours at 25 °C
Paklitaksela stabilitāte standartšķīdumā (A) un analizējamā parauga šķīdumā (B)
24 stundu ilgumā istabas temperatūrā

solution and human serum using HPLC without any liquid-liquid extraction, in spite of paclitaxel being highly involved with blood proteins. The validation results demonstrate that paclitaxel concentrations can be accurately and precisely quantified in human serum, with a very low limit of detection 7.0×10^{-4} mg/ml. The proposed method is not completely adapted and the pilot validation needs improvement in stability studies. Using the HPLC method with sample cooling, it is possible to avoid

degradation of sample and standard solutions. The proposed method could be applied to determine paclitaxel in the blood samples of ovary cancer patients using *Paxene* as treatment medicament, and it might be useful in the further study of drug therapeutic interaction and monitoring of paclitaxel.

Acknowledgements

The work was supported by the research grant of the University of Latvia (2007/ZP-83), State Research Programme in Health No. 8 (project No. 3). The authors would like to thank European Social Foundation for financial support and research fellowship (I. N.) to perform this research.

References

1. S. Budavari. Eton Bioscience Inc. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, NJ, Merck & Co, 1989, pp. 1–2.
2. S. Rao, N. E. Krauss, J. M. Heerding, C. S. Swindell, I. Ringel, G. A. Orr, S. B. Horwitz, *J Biol Chem* 1994, 269, pp. 3132–3134.
3. A. Sparreboom, P. de Bruijn, K. Nooter, W. J. Loos, G. Stoter, J. Verweij, *J Chromatogr B* 1998, 705, pp. 159–164.
4. H. Y. Aboul-Enein, V. Serignese, *Ann. Chim. Acta* 1996, 319, pp. 187–190.
5. S. H. Lee, S. D. Yoo, K. H. Lee, *J. Chromatogr. B* 1999, 724, pp. 357–363.
6. T. Nguyen, J. Eshraghi, G. Gonyea, R. Ream, R. Smith, *J. Chromatogr. A* 2001, 911, pp. 55–61.
7. J. Ciccolini, J. Catalin, M. F. Blachon, A. Durand, *J. Chromatogr. B* 2001, 759, pp. 299–306.
8. M. Habeck, Hunting for the real cancer genes. *Drug discovery today* 2003, 8, pp. 959–960.
9. B. Monsarrat, E. Chatelut, I. Royer, P. Alvinerie, J. Dubois, A. Dezeuse, H. Roche, S. Cros, M. Wright, P. Cannal, *Drug Metabolism and Disposition* 1998, 26, pp. 229–233.
10. Haruo Yonemoto, Seiko Ogino, Mihoko N. Nakashima, Mitsuhiro Wada, and Kenichiro Nakashima, *Biomedical Chromatography* 2007, 21, pp. 310–317.
11. A. Andersen, D. J. Warren, P. F. Brunsving, S. Aamdal, Gunnar B. Kristensen, H. Olsen, *BMC Clinical Pharmacology* 2006, 6-2.
12. E. Stokvis, M. Ouwehand, L. A. H. Nan, E. M. Kemper, O. Van Tellingen, H. Rosing, J. H. Beijnen, *Journal of Mass Spectrometry* 2004, 39, pp. 1506–1512.
13. F. Gritti, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A* 2006, 1132, pp. 51–66.

Kopsavilkums

Paklitaksels ir viena no plašāk pazīstamajām bioaktīvām vielām, kas iegūta no īves koka un ko izmanto medicīnā kā pretvēža līdzekli apmēram 22% vēža gadījumos. Paklitakselam ir izstrādātas analītiskās noteikšanas metodes, bet katrā zāļu formā bez aktīvās vielas ir vēl citas sastāvdaļas, kas var ietekmēt paklitaksela farmakokinētiskos rādītājus. Tāpēc ikviena zāļu forma ir jāpārbauda klīniskos pētījumos, un katrai jaunai zāļu formai ir jāizstrādā aktīvās vielas un tās galveno metabolītu noteikšanas metodes cilvēka asins serumā. Šī darba mērķis

bija validēt ātru, ērtu un drošu analītisku metodi kvalitatīvai un kvantitatīvai paklitaksela noteikšanai ar apgrieztās fāzes augstefektīvās šķidruma hromatogrāfijas metodi to cilvēku asins serumā, kuru ārstēšanai izmanto zāļu formu Paxene bez īpašas parauga iepriekšējas sagatavošanas. Šī metode tika veiksmīgi validēta, un ir ieteikts to izmantot klīniskajos pētījumos iesaistīto pacientu terapeitiskam monitoringam.

Comparison of Pre-Operative Diagnostics and Outcomes of Surgery in Patients with Primary Hyperparathyroidism in Two University Hospitals in Israel and Latvia

Primārās hiperparatireozes preoperatīvās diagnostikas un ķirurģiskās ārstēšanas rezultātu salīdzinājums divās universitātes slimnīcās Izraēlā un Latvijā

Isabella Yaroslavsky¹, Valdis Pīrāgs^{1,2}

¹University of Latvia, Faculty of Medicine, Šarlotes iela 1a, Rīga,

²Centre of Endocrinology, Pauls Stradiņš Clinical University Hospital,

Pilsoņu iela 13, Rīga

E-mail: pirags@latnet.lv

The aim of our study was to evaluate effectiveness of different approaches of pre-operative diagnostics and surgical treatment of primary HPT (Hyperparathyroidism) at the two leading national University Hospitals in two different countries (Pauls Stradiņš Clinical University Hospital in Rīga, Latvia and the Rambam Medical Centre in Haifa, Israel). For that purpose, medical records of 23 patients with primary HPT surgically treated at the Pauls Stradiņš Clinical University Hospital (PSCUH) and 152 similar patients from the Rambam Medical Centre (RMC) have been reviewed.

Newer nuclear medicine imaging with ^{99m}Tc-tetrofosmin (MyoView) predicted the location of the parathyroid adenoma with the same accuracy as ultrasound imaging at the PSCUH – about 50%, which is a relatively low rate. The most common complication was post-surgical hypocalcaemia, recorded in almost half of the operated patients. 24% of patients were hypocalcaemic when discharged after 2–10 days of hospitalisation, and one patient (4%) had permanent hypocalcaemia 18 months after surgery. Post-surgical recurrent laryngeal nerve damage was reported in 2 patients (8%), and one of them had permanent vocal cord damage (4%). Similarly, among 128 patients surgically treated in RMC, 12 patients (9%) had vocal cord disturbances, and one patient (1%) had permanent loss of speech. In PSCUH, surgery failure rate measured by calcium drop after the first parathyroidectomy was 13%, after the second parathyroidectomy – 67%, and no treatment failure after the third parathyroidectomy. In RMC, the failure rate of the first parathyroidectomy by calcium concentration was 5%, and there was no treatment failure after the second parathyroidectomy.

In conclusion, at PSCUH, the location of the parathyroid adenomas was not predicted accurately by the pre-operative imaging techniques (Ultrasound, MyoView, CT, and MRI) in this study; therefore, the quality of existing diagnostic methods should be improved or other techniques should be introduced. A comparatively high surgery failure rate of the first operation and especially the repeated operation shows the need for improved pre-operative diagnostics and intra-operative PTH measurement in all patients during the parathyroid surgery at the PSCUH.

Keywords: primary hyperparathyroidism, parathyroidectomy, pre-operative diagnostics.

Introduction

Primary hyperparathyroidism (HPT) is characterized by hypercalcaemia and elevated parathyroid hormone (PTH) levels. The disease today bears little resemblance to the severe disorder of “stones, bones, and groans” described by Fuller Albright in 1934 (1). Osteitis fibrosa cystica was a hallmark of classic primary HPT. Nephrocalcinosis was present in 80% of patients, and neuromuscular dysfunction with muscle weakness also was common. With the advent of the automated serum chemistry autoanalyzer in the 1970s, the diagnosis of primary HPT became much more common, with a four- to five-fold increase in incidence (2). Classic symptomatology, concomitantly, became much less common. Primary HPT, thus, is a disease which has evolved from its classic presentation to a quite different one. Nephrolithiasis is still seen, although much less frequently than in the past. Radiologically evident bone disease is rare, but bone involvement is readily detected by bone mass measurement (3). The diagnosis of primary HPT is confirmed by demonstrating an elevated PTH level in the presence of hypercalcaemia. Further biochemical assessment should include serum phosphorus, alkaline phosphatase, vitamin D metabolites, albumin, and creatinine.

Parathyroidectomy remains the only currently available option for cure of primary HPT. As the disease profile has changed, questions have been raised concerning advisability of surgery in asymptomatic patients. If asymptomatic patients have a benign natural history, the surgical alternative is not an attractive one. In contrast, asymptomatic patients may display levels of hypercalcaemia or hypercalciuria that cause concern for the future. To address this issue, in 1990 the National Institutes of Health (NIH) together with the National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases (USA) convened a consensus conference on the Diagnosis and Management of Asymptomatic Primary HPT (4). They concluded that there may be a subgroup of “asymptomatic” primary HPT patients who can be safely managed without surgical intervention, and defined a set of guidelines for operative intervention in these patients. The difficulties with these conclusions are 2-fold: first, the definition of “asymptomatic” HPT is not clear, and second, the criteria for surgical intervention are not well-defined (5).

A variety of imaging techniques have been developed to help localize abnormal gland(s) prior to surgery. The accuracy of these techniques assumes even greater importance in patients who have already undergone exploratory neck surgery. Techniques used include high-resolution ultrasound (US), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), selective venous sampling, and a variety of nuclear medicine techniques. ^{99m}Tc -hexakis-2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -sestamibi) imaging is now the technique of choice for parathyroid localization. These scans encourage correct surgical exploration, especially if the scan is convincingly positive and the initial exploration by the surgeon fails to localize the gland. Newer radiopharmaceuticals are under investigation, including ^{99m}Tc -tetrofosmin (MyoView) because tetrofosmin is retained in the thyroid; dual-phase imaging (similar to the ^{99m}Tc -sestamibi technique) cannot be routinely used and a subtraction technique is required.

Technical innovations have also been used to aid the surgeon in the minimally invasive approach, giving substantial cost saving due to a sevenfold reduction in the length of hospital stay as well as a 50% reduction in operating time (6). Minimally invasive techniques are more acceptable to patients since the hospital stay is shorter and the operation scar is much smaller (7).

The purpose of this paper was to evaluate the effectiveness of primary hyperparathyroidism treatment at the Pauls Stradiņš Clinical University Hospital in Rīga, Latvia and to compare the results regarding diagnostics, operative and post operative complications with the data obtained from the Rambam Medical Centre in Haifa, Israel.

Subjects and Methods

23 patients' files of 20 female patients (87%) and 3 male patients (13%) with diagnosis of primary hyperparathyroidism who had parathyroidectomies between 2000 and 2004 in Pauls Stradiņš Clinical University Hospital (PSCUH) and 152 patient files of 124 female patients (82%) and 28 male patients (18%) with similar diagnosis in Rambam Medical Centre (RMS) were reviewed. The files in PSCUH were collected from the archive, and the files in RMS were collected mainly from the computerised archive data base. The average age of operated patients was 59.1 ± 10.2 (ranging 34–74) years in Latvia, and 56.9 ± 12.9 (ranging 20–80) years in Israel.

As this is a retrospective study, we encountered the common problem in such studies – lack of some of the required data. Therefore although 177 files were reviewed, we do not have the same number for each parameter. To evaluate operations, medical records were checked. From the clinical diagnosis, through the description of the operation by the surgeon and the pathologist's answer, it was possible to learn how many glands were excised partially or totally in each operation and how many were sent for pathological evaluation. After the operation the PTH was measured, and the results were received the following day. During the operation, the frozen section procedure was not performed to evaluate the excised glands. There was only a final diagnosis in the patient's file. In all the cases in which a clinical diagnosis of hyperparathyroidism was made, the histopathologic examination confirmed it (an adenoma or hyperplasia was found).

In order to collect more information about late complications, letters were sent to all patients in Latvia asking them for their recent laboratory tests. They were also invited for the free consultation at the Endocrinology Centre. The rate of response of those who received the letter and could respond was 50% (11 answers received, 1 letter returned due to patients' death).

For statistical tests and visual data presentation, *Excel* and *Graphpad-Prism* were used. A paired t-test for statistical significance was performed. The figures that show statistical difference between groups are marked by asterisk and represent mean and SEM (standard error of mean).

Results

1. Pre-operative diagnostics and patient selection for surgery

According to the data obtained from the pre-operative diagnostic procedures in Pauls Stradiņš Clinical University Hospital, symptomatic patients ($n = 15$) were divided into 5 groups according to the classical clinical features of primary HPT (Table 1). All surgically treated asymptomatic patients ($n = 8$) were divided into 6 groups according to the NIH 1990 consensus criteria for parathyroidectomy (Table 2). 52% of the Latvian patients (12/23) had both symptomatic and asymptomatic criteria for a surgical treatment. 5 patients were operated because of abnormalities of the thyroid such as nodular goitre or solitary nodule. Another 2 patients had subtotal thyroidectomy before primary hyperparathyroidism was diagnosed. In total, 9 patients had combined thyroid and parathyroid pathology in their records.

Table 1

Clinical manifestations of HPT in symptomatic patients before parathyroidectomy (PSCUH data)

Symptoms	Number of patients	% of patients
Bone fractures	10	67%
Nephrolithiasis	3	20%
Gastrointestinal disturbances	4	27%
Neuromuscular disturbances (weakness of muscles, memory disturbances)	3	20%
Total number of patients	15	100%

Table 2

Other criteria for surgical treatment in asymptomatic patients before parathyroidectomy (PSCUH data)

Criteria for parathyroid surgery	Number of patients	% of patients
Markedly elevated serum calcium	8	100%
Markedly elevated urine calcium (> 400 mg/24h)	0	0%
Age < 50 years	1	13%
Medical surveillance not possible	0	0%
Thyroid abnormalities (e.g., nodular goitre)	5	63%
Total	8	100%

Creatinine clearance was not calculated in this group of patients because there was no information in the files on the weight of the patients. This value was not used as a criterion for the operation; at least, as it seems according to the records. Bone mineral density was not performed routinely before the operation, so there were just three patients with a confirmed diagnosis of osteoporosis before the operation.

PTH was checked in all subjects except two patients diagnosed with nodular goitre, and during the thyroidectomy the parathyroid adenoma was identified and ex-

cised (Table 3). 5 other patients were operated because of thyroid abnormalities such as nodular goitre or suspected thyroid malignancy. These patients were diagnosed with primary hyperparathyroidism before the operation took place.

Table 3

Serum markers of bone metabolism before the parathyroid operation (PSCUH data)

Average	% out of range	Patients out of range	
3.1 ± 0.3 mmol/L	100%	23(23)	Elevated calcium
40.6 ± 63.6 pmol/L	96%	22(23)	Elevated PTH
155.8 ± 131.1 U/L	50%	7(14)	Elevated alkaline phosphatase
0.9 ± 0.2 mmol/L	30%	3(10)	Lowered phosphates

2. Accuracy of pre-operative imaging for localisation of parathyroid adenomas

Ultrasound imaging, MyoView™ (technetium Tc-99m tetrofosmin), and magnetic resonance imaging (MRI) were used to locate the pathologic parathyroid gland before the operation in PSCUH. Computed tomography (CT) was unsuccessfully used in only one case. Some of the patients had only one imaging, and others had a combination of imaging techniques to locate the adenoma. The pre-operative parathyroid imaging in RMC contained ultrasound, ^{99m}Tc-sestamibi imaging (MIBI), MIBI PET-scan (MIBI SPECT), CT, MRI, and fine needle aspiration (FNA) biopsy. During the operation, additional tests were performed, such as PTH measurements (after each excision of gland), frozen section, venous calcium measurements, and, in some operations, radioactive marking was done to assist in localizing the adenoma. However, the radioactive-marking was stopped because the results were not as good as reported in other centres. The accuracy of the technique was evaluated by the location of the pathologic gland confirmed by the operation.

In order to evaluate the rate of precision, the outcome was scored according to the matching of the location during the imaging and surgery (Table 4). For example, score 1 (maximal precision) was given if, according to the imaging and the operation data, the pathologic gland was in the same location. Score 2 (partial precision) was given if the imaging predicted the correct side but not the correct location. Score 3 was given if the imaging predicted the wrong side. The ultrasound imaging had the same accuracy as MyoView when predicting the location of the adenoma – about 50%, which is a very low rate. If we focus on the side prediction (score 1 + 2), the result is better with MyoView – 75%, compared to ultrasound – 67%. The most surprising result was the 0% accuracy of MRI – 0/5.

Table 4

Accuracy of various pre-operative imaging techniques (PSCUH data)

Score				Imaging technique (number of records)
3	2	1	1+2	
7 (33%)	3 (14%)	11 (52%)	14 (67%)	Ultrasound (21)
2 (25%)	2 (25%)	4 (50%)	6 (75%)	MyoView (8)
4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	1 (20%)	MRI (5)

3. Results of the parathyroid surgery

Almost all operations at the PSCUH were performed by conventional method of bilateral exploration of the neck under general anaesthesia. Just two operations were performed by minimally invasive methods before 2004; one of them by a video assisted method. During the operation there were no parathyroid hormone measurements to confirm the pathologic gland.

The surgically confirmed location of parathyroid adenomas at the PSCUH did not correspond to previously reported results, probably due to the small group of patients in this study (Figure 1). In the literature, the locations of the pathologic glands are: 75% – lower adenomas, 15% – upper adenomas, and 10% – ectopic adenomas. In the RMC cohort the location was closer to the previously described: 70.5% of glands were lower adenomas (Figure 2).

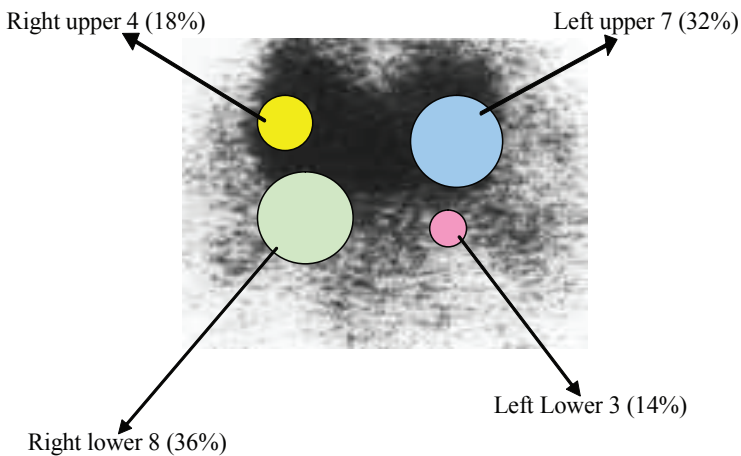


Figure 1. Location of the pathologic parathyroid glands at the PSCUH (n = 22).

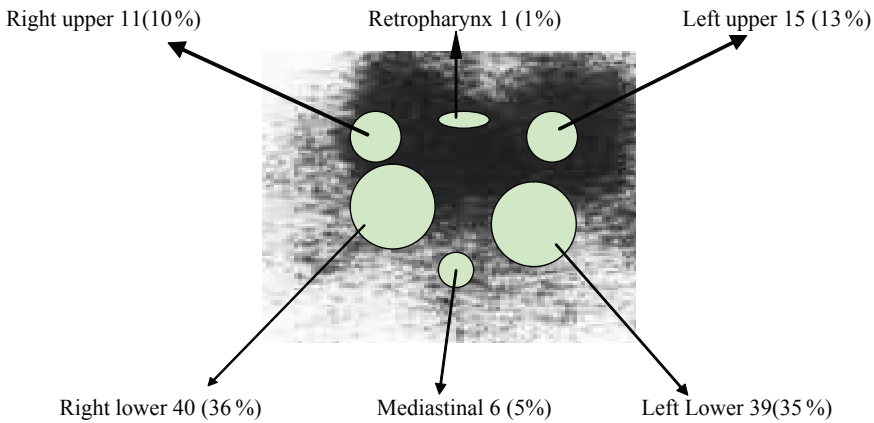


Figure 2. Location of the pathologic parathyroid glands at the RMC (n = 112)

Post-operative complications in the PSCUH cohort are presented in Table 5. The most common complication was hypocalcaemia, recorded in almost half of the operated patients, followed by neuromuscular disturbances (e.g., paraesthesia) in 24% of patients, and damage of recurrent laryngeal nerve in 8% of patients. 10 patients had no complications after the surgery (40%).

One patient with serious prolonged hypocalcaemia was treated in the ICU for three days. Hypocalcaemia was transient in at least 50% of the patients (6/12), as confirmed by the calcium level in the serum. The others had hypocalcaemia after discharge from the hospital, and we have not received any other data from them. 6 patients (24%) were still hypocalcaemic when discharged from the hospital after 2–10 days of hospitalisation. One of these patients (4%) can be considered as having permanent hypocalcaemia – after 18 months serum calcium was still below the normal range.

Neuromuscular disturbances such as cramps and paraesthesia were reported in 6 patients post-operatively (24%). These symptoms could be considered symptomatic hypocalcaemia in 2 of 6 patients with hypocalcaemia and neuromuscular disturbances. The other 4 had normal serum calcium and the exact reason for these disturbances remains unclear. These neuromuscular disturbances can be explained by usage of various drugs, smoking, and lack of vitamins (e.g., B₁₂ deficiency) – just to name a few probabilities.

Recurrent laryngeal nerve damage was reported only in 2 patients (8%) that were surgically treated in PSCUH. One patient had permanent damage and other transient damage (4%). Similarly, among 128 patients surgically treated in RMC, 12 patients (9%) had vocal cord disturbances such as hoarse voice. One patient (0.7%) had a permanent loss of speech.

Table 5

Complications after parathyroidectomy (PSCUH data)

Complications	Total	After the 1st parathyroidectomy	After the 2nd parathyroidectomy
Hypocalcaemia	12 (48%)	11 (55%)	1 (33%)
Neuromuscular disturbances	6 (24%)	4 (19%)	2 (67%)
Recurrent laryngeal nerve damage	2 (8%)	0 (0%)	2 (67%)

One of the first signs for a successful operation is a drop in serum calcium in the first days after the operation (Figure 3). The average calcium level drop a day after the surgery was 19.7% (from 3.0 ± 0.2 mmol/L to 2.4 ± 0.2 mmol/L) in PSCUH and 18.7% (from 2.9 ± 0.2 mmol/L to 2.3 ± 0.2 mmol/L) in RMC. Surgery failure rate measured by calcium concentration after the first parathyroidectomy in PSCUH was 13% (3/23 patients), after second parathyroidectomy – 67% (2/3 patients), after third parathyroidectomy – 0% (0/1 patient). The failure rate of the first parathyroidectomy by calcium concentration in RMC was 5% (7/135 patients) and after the second parathyroidectomy – 0% (0/8 patients). All the patients in RMC who had the second parathyroidectomy had their first parathyroidectomy in other Israeli hospitals.

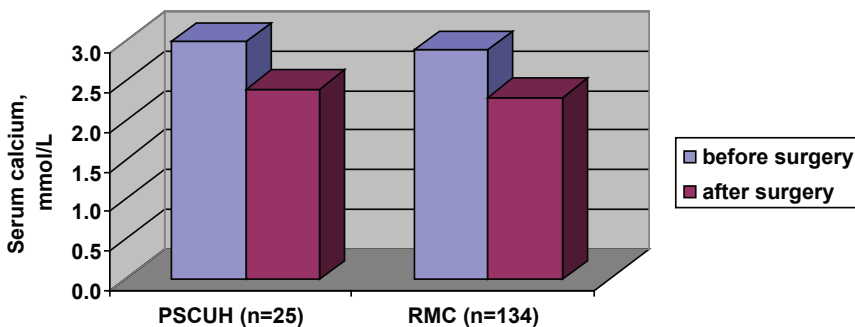


Figure 3. Serum calcium level before and after surgery at Pauls Stradiņš Clinical University Hospital (PSCUH) and Rambam Medical Centre (RMC)

Among the causes for failed first parathyroidectomy in these patients were ectopic adenoma in mediastinum or type 1 multiple endocrine neoplasia (MEN1).

The drop of PTH is a good indicator of successful removal of parathyroid adenoma. There was an average drop of PTH by 82.1% (from 39.8 ± 14.6 pmol/L to 7.1 ± 1.8 pmol/L) after the surgery in PSCUH cohort, and by 78.6% (from 15.9 ± 4.8 pmol/L to 3.4 ± 1.0 pmol/L) in RMC cohort (Figure 4). If the drop is not significant, then the operation should be continued. What is a 'significant drop' is a

controversial issue. A drop of at least 50–60% from the baseline after 10–15 minutes after excision is a good indicator that the gland that was excised was responsible for the elevated levels of PTH (30). In RMC, the average number of PTH tests done during an operation were 1.46 ± 0.93 (ranging 1–6). No PTH measurement during the surgery was performed in PSCUH.

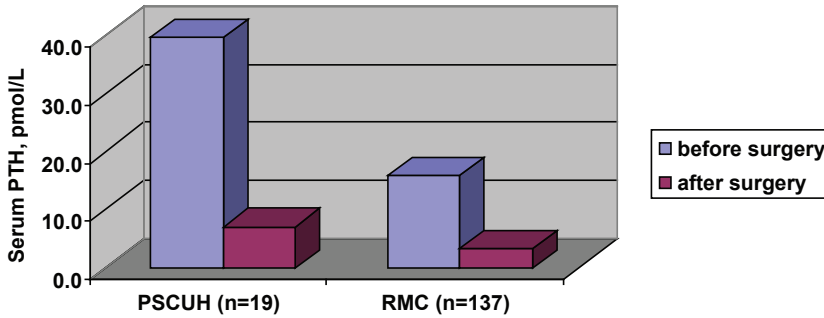


Figure 4. Serum PTH level before and after surgery at Pauls Stradiņš Clinical University Hospital (PSCUH) and Rambam Medical Centre (RMC)

Another criterion for a successful operation is the number of days spent in the hospital after the operation. The average number of hospitalisation days after the surgery in PSCUH was 4.1 ± 1.9 days for conventional operations ($n = 23$) and 2.0 ± 0.0 days for minimally invasive operations ($n = 2$).

All parathyroidectomies that were performed at RMC were done by minimally invasive methods. The hospitalisation days after the operation are about half the average in PSCUH for the conventional parathyroidectomies (2.1 ± 1.3 days). However, for minimally invasive operations in Pauls Stradiņš Clinical University Hospital, the duration of hospitalisation days was exactly the same as in Rambam Medical Centre.

Discussion

Both groups of patients from Pauls Stradiņš Clinical University Hospital in Latvia and Rambam Medical Centre in Israel had many similarities: the majority of patients were females (approximately 4:1) in their 50s and 60s. In the literature, the ratio between female and male is approximately 3:1. Most of the patients in the Latvian group were symptomatic. This is similar to the literature, as this was a group that met the surgical criteria. It has to be mentioned that in the asymptomatic group, 5 out of 8 patients had combined parathyroid and thyroid pathology as an additional indication for surgical treatment.

There were differences found in location of adenomas between the groups during the surgery. However, these results may depend on the small size of Latvian group – we obtained data on localisation of parathyroid adenoma in only 22 patients

compared to 112 patients in the Israeli group. The Israeli adenomas' distribution (70.5% lower, 23.1 % upper, and 6.2% ectopic adenomas) was closer to the distribution described in the literature – 75% lower, 15% upper, 10% ectopic (8).

The accuracy of pre-operative imaging used in PSCUH was surprisingly low for ultrasound (52.4%), MyoView (50.0%), CT (0.0%), and MRI (0.0%). The reason for such low accuracy rates may be the small size of the study group. Another possible explanation is the fact that 7 patients had thyroid pathologies which could have interfered with the imaging of pathologic parathyroid glands; for example, 2 out of 5 patients having MRI scans before the operation also had a thyroid pathology. Unfortunately, all the available imaging methods have some limitations, and there is a need for experienced radiology staff. In other words, as Dr. Voldemārs Brūns, one of the leading Latvian parathyroid surgeons, commented, “The best pre-operative imaging technique is to locate a good surgeon.” In the published literature, the use of US has reported sensitivities between 43% and 92%. It is not capable of distinguishing thyroid from parathyroid adenomas, and it is particularly difficult when a previous neck surgery has been performed, and in thymic and upper mediastinal lesions. CT has reported sensitivity of 35–76%, but probably its major use lies in examining the mediastinum. Venous sampling is a relatively invasive technique requiring a high degree of operator dependency and may be useful in persistent or recurrent disease. MRI has reported sensitivity of 50–93%, and it is still undergoing further evaluation. These techniques have similar ranges of sensitivity of detection, and this is partly determined by the size of the lesion. However, it is noticeable that with all the techniques, there is a wide variation in accuracy of localization between the reported results of different centres.

The cost effectiveness of localizing techniques in recurrent disease has been evaluated by Nilsson et al. (9) There is a debate, however, regarding the most appropriate technique for the demonstration of recurrence. Gotway et al. showed that the sensitivity and positive predictive value for MRI in 98 consecutive patients were 82% and 89%, respectively, and for sestamibi 85% and 89% (10). There was no significant difference between the techniques. Furthermore, venous sampling should be used if there is a failure of localization or discrepancy between equivocal tests. Lumachi et al. compared a variety of imaging techniques including $^{201}\text{Tl}/^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ subtraction, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi/ $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ subtraction, selective venous sampling with a parathyroid hormone assay, US imaging, MRI, and CT (11). The sensitivity and positive predictive value of ultrasound were 82.9% and 93.8%, respectively, and 85% and 96.1% of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi/ $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ subtraction. The results of the use of other techniques were not so good. The combination of US and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi/ $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ subtraction resulted in an improvement in sensitivity to 94%.

Given the inherent problems with the various imaging modalities, other techniques are being explored. Parathyroid-specific antibodies have been labelled and shown to have uptake in the parathyroid gland in animal studies (12). Human studies have not yet been performed. Although the use of ^{131}I -toluidine blue has been reported to be a successful parathyroid-localizing agent, a similar compound, ^{123}I -methylene blue, has proved to be unsuccessful. Whilst many parathyroid adenomas

can be demonstrated with unsophisticated imaging techniques, there is evidence that by optimizing scanning protocols, improvements can be achieved both in sensitivity of detection and in anatomical localization, the latter being particularly important with the trend towards minimally invasive surgery. The use of an intra-operative probe has been described. A variety of groups have used pre-operative injection of MIBI followed by a gamma probe, with the probe's success in identifying the abnormality varying between 67% and 100% (13). Furthermore, endoscopic removal of parathyroid tissue has been achieved, albeit in small numbers, again helped by lateralizing techniques using either MIBI or ultrasound (6). As already mentioned, US, MyoView, and MRI have a low accuracy rate and will not be of value when considering minimally invasive operations based on the imaging techniques alone. Therefore, to rely on other techniques for localization and confirming of adenomas seems reasonable. From this study it is clear that during at least 2 failed operations it was possible to know that the adenoma was not a single adenoma, and to predict a long-term operative failure (and to avoid the second operation, or the third, by intra-operative PTH measurement). Today in PSCUH, these biochemical measurements are done post-operatively and they give no advantage over the calcium measurements after the operation.

Calcium level drop after the operation is a good indicator for the success of the surgery; however, severe and permanent hypocalcaemia is a life-threatening complication of parathyroid surgery. Formerly, post-operative hypocalcaemia was a routine and sometimes a serious short-term complication ("hungry bone syndrome"). The acute reversal of hyperparathyroidism was associated with a robust deposition of calcium into the skeleton at a pace that could not be compensated for by supplemental calcium. Occasionally, post-operative hypocalcaemia still occurs, especially if pre-operative bone turnover markers are elevated. More typically, however, the early post-operative course is not complicated by symptomatic hypocalcaemia. In this study, 48% of the patients had hypocalcaemia after the operation. Recurrent laryngeal nerve damage is another important complication of parathyroidectomy. Reported prevalence of this complication was rather high in both university hospitals – 8% in PSCUH and 9% in RMC, which reflects the experience of surgeons and the severity of operated cases. In leading centres, less than 1% of vocal cord damage in first parathyroidectomies is reported. However, in one French study 8% of the patients had permanent unilateral vocal cord paralysis in a small sample of re-operated patients (14). To avoid such complications, every effort should be made to succeed in the first parathyroidectomy. Another method that could be adopted to reduce the failure rate is to use frozen section procedure during the operation to confirm that indeed a parathyroid tissue was excised. Another general suggestion is to evaluate the calcium level and PTH in each patient with pathologic findings of thyroid. In the future, this can reduce problems due to formation of adhesions after each cervicotomy.

Despite that the primary aim of parathyroid surgery is to achieve normocalcaemia after the operation, sufficient decline in intraoperative PTH level has been associated with excellent early and long-term results (15). Calcium level before and after the operations is statistically highly significant in both Latvian ($P < 0.001$) and Israeli ($P < 0.0001$) groups. PTH levels before and after the operation were also statistically significant in the Latvian ($P < 0.001$) and Israeli ($P < 0.0001$) groups. In

this study, 9 of the Latvian patients who had successful operations had an average of 90.5% drop in PTH values (70.9–99.3%). The correlation between a successful operation and a significant PTH drop was 100%. The other 2 patients with failed operations had an average drop in PTH levels by 32.2%. In this case, the correlation between failed operation and insignificant PTH drop is 100%. However, in Latvian group, not all the patients had PTH measurements in their files. Sadly, in 3 out of 5 failed operations there was no measurement of PTH before and after the operation, and PTH drop could not be calculated. The measurement of intra-operative PTH accurately differentiates between single and multiple gland disease. The efficiency of the method relies primarily on a decline of PTH in 15 minutes of 60% or more of the baseline value, or a decline of 50% in 10 minutes as a criterion for prediction of normocalcemia.

Conclusions

Primary hyperparathyroidism is a disease that affects more women than men. In this study, the ratio is approximately 4:1 both at Pauls Stradiņš Clinical University Hospital and at Rambam Medical Centre, with a peak incidence at 59 years in Latvian and 57 years in Israeli study cohort. Under the study, at PSCUH, locations of the pathologic adenomas were not predicted accurately by pre-operative imaging techniques (Ultrasound, MyoView, CT, and MRI); therefore, the quality of pre-operative diagnostics should be improved, or other techniques should be introduced.

The failure rate of the first parathyroidectomy by calcium concentration drop after the surgery was 13% in PSCUH and 5% in RMC, 20.0% for all the parathyroidectomies. The failure rate of the second parathyroidectomy in more difficult cases was 67% in PSCUH and 0% in RMC, which shows the need for improved pre-operative diagnostics and intra-operative PTH measurement in all patients during the parathyroid surgery.

Acknowledgments

The study was performed as part of the graduation paper of Isabella Yaroslavsky at the University of Latvia. We are grateful to Dr. Voldemārs Brūns and Dr. Zenons Narbutis from the Clinic of Surgery at the Pauls Stradiņš Clinical University Hospital for their assistance with the surgical part of the study and provision of data on operated patients. We also wish to thank Dr. Sophia Ish-Shalom from the Metabolic Bone Disease Unit and Professor Michael Kraus, Head of the Surgery Department at the Rambam Medical Centre in Haifa, Israel, for their assistance in the Israeli part of the study. Special thanks to Professor Simons Svirskis and Dr. Juris Rumaks from the University of Latvia for helping with the statistical analyses and to Antra Plane for her help with writing the patients' letters in Latvian and Russian.

References

1. Albright F, et al. Hyperparathyroidism: a common clinical and polymorphic condition as illustrated by 17 proven cases from one clinic. *J Am Med Assoc* 1934, 102: 1276–1287.
2. Wermers RA, et al. The rise and fall of primary hyperparathyroidism: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1965–1992. *Ann Intern Med* 1997, 126: 433–440.
3. Mundy GR, et al. Primary hyperparathyroidism: changes in the pattern of clinical presentation. *Lancet* 1980, 1: 1317–1320.
4. Consensus development conference statement. *J Bone Miner Res* 1991, 6: S9–S13.
5. Silverberg SJ and Bilezikian JP. The diagnosis and management of asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2006, 2, 494–503.
6. Howe JR. Minimally invasive parathyroid surgery. *Surg Clin North Am* 2000, 80: 1399–1426.
7. Udelsman R., et al. One hundred consecutive minimally invasive parathyroid explorations. *Ann Surg*, 2000, 232: 331–339.
8. Rosai J. Parathyroid glands. In: Ackerman's Surgical Pathology. Rosai J. (Ed.), Mosby Year Book 8th ed., 1996, Vol. 1: 569–588.
9. Nillson B., et al.: Effects of pre-operative parathyroid localization studies on the cost of operations for persistent hyperparathyroidism. *Eur J Surg* 167: 587–591.
10. Gotway M., et al.: Comparison between MR imaging and ^{99m}Tc MIBI scintigraphy in the evaluation of recurrent or persistent hyperparathyroidism. *Radiology* 2001, 218: 783–790.
11. Lumachi F. et al.: Localization of parathyroid tumors in the minimally invasive era: which technique should be chosen? Population-based analysis of 253 patients undergoing parathyroidectomy and factors affecting parathyroid gland detection. *Endocrine-Related Cancer* 2001, 8: 63–69.
12. Ell PJ, Gambhir SS. Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment (Vol. 1). Churchill Livingstone, 2004.
13. Ben Haim M., et al. Novel approach to parathyroid adenoma: Minimally invasive, focused, scan guided parathyroidectomy – experience from the first 100 patients. *J Israel Medicine Assoc* 2003, 142: 242–245.
14. Mariette C., et al. Re-operation for persistent or recurrent primary hyperparathyroidism. *Langenbecks Arch Surg* 1998, 383 (2): 174–9.
15. Westerdahl J., et al. Measurement of intraoperative parathyroid hormone predicts long-term operative success. *Arch Surg* 2002, 137: 186–189.

Kopsavilkums

Pētījuma mērķis bija izvērtēt dažādu primārās hiperparatireozes (HPT) preoperatīvās diagnostikas un ķirurģiskās ārstēšanas paņēmienu efektivitāti divos galvenajos universitātes centros divās dažādās valstīs (Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā Rīgā, Latvijā un Rambama Medicīnas centrā Haijā, Izraēlā). Šim nolūkam tika izvērtētas 23 Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā (PSKUS) ķirurģiski ārstētu primārās HPT pacientu vēstures un salīdzinātas ar 152 līdzīgu pacientu ārstēšanas vēsturēm Rambama Medicīnas centrā (RMC).

PSKUS jaunajai scintigrāfiskajai izmeklēšanai ar ^{99m}Tc-tetrofosmīnu (MyoView) bija līdzīga precizitāte epitēlijķermenīšu lokalizācijā kā ultrasonogrāfijai – tikai aptuveni pusē gadījumu adenoma tika lokalizēta precīzi. Biežākā komplikācija PSKUS bija pēcoperācijas hipokalcēmija,

kas tika konstatēta gandrīz pusei operēto pacientu. Pēc 2–10 dienu hospitalizācijas 24% pacientu tika izrakstīti no slimnīcas ar hipokalcēmiju, bet vienam pacientam (4%) hipokalcēmija saglabājās 18 mēnešus pēc operācijas. Rekurentā balsenes nerva bojājums tika diagnosticēts 2 pacientiem (8%), pie tam vienam no viņiem (4%) saglabājās pastāvīgs balss saišu defekts. Līdzīgi dati par komplikācijām tika iegūti no 128 pacientu vēsturēm RMC, no kuriem 12 pacientiem (9%) bija balss saišu funkcijas traucējumi un vienam pacientam (1%) bija pastāvīgs balss zudums. Par neveiksmīgas ķirurģiskas ārstēšanas indikatoru tika izvēlēta pastāvīga hiperkalcēmijas saglabāšanās pēc operācijas, kas PSKUS gadījumā nozīmēja operācijas neveiksmi 14% gadījumu pēc pirmās paratireoīdektomijas un 67% neveiksmi otrās paratireoīdektomijas laikā. Pirmā paratireoīdektomija RMC bija neveiksmīga 5% gadījumu, taču otrā paratireoīdektomija bija veiksmīga.

Autori secina, ka PSKUS pacientiem apsekotajā laika periodā (2000–2004) bija grūti precīzi lokalizēt epitēlijķermenīšu adenomas pirms operācijas, pat izmantojot visas iespējamās izmeklēšanas metodes (ultrasonogrāfiju, scintigrāfiju ar MyoView, datortomogrāfiju un magnētorezonanses izmeklēšanu), tādēļ būtu jāuzlabo esošās metodes vai arī jāievieš citas epitēlijķermenīšu vizualizācijas metodes. Relatīvi augstais pirmās paratireoīdektomijas un it īpaši atkārtotās paratireoīdektomijas neizdošanās īpatsvars liecina par nepieciešamību uzlabot preoperatīvo diagnostiku un ieviest PTH mērīšanu epitēlijķermenīšu operācijas laikā visiem pacientiem ar primāro hiperparatireozi.

Atslēgvārdi: primārā hiperparatireoze, paratireoīdektomija, preoperatīvā diagnostika.

Cilvēka ādas cilmes šūnu iegūšana un pavairošana *in vitro*

Isolation and Propagation of Human Skin Stem Cells *in vitro*

Una Riekstiņa¹, Ruta Muceniece¹, Inese Čakstiņa², Jānis Ancāns^{2,3}

¹Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001
E-pasts: Una.Riekstina@lu.lv

²Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultāte
Kronvalda bulvāris 4, Rīga, LV-1586

³Latvijas Universitātes Bioanalītisko metožu laboratorija
Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1069

Ādas cilmes šūnām piemīt spēja diferencēties par citu orgānu šūnām, kas ļautu tās izmantot šūnu terapijā. Dažādu autoru publikācijās minētie ādas cilmes šūnu izolēšanas, pavairošanas un diferencēšanas apstākļi atšķiras, tāpēc ir būtiski izveidot standartizētas metodes ādas cilmes šūnu raksturošanai *in vitro*.

Šī pētījuma mērķis ir cilmes šūnu izolēšana no cilvēka ādas un to imūnhistoķīmiska raksturošana *in vitro*. Iegūtie rezultāti ir ļoti nozīmīgi, jo tie apliecina, ka no ādas paraugiem iegūtās šūnas ekspresē cilmes šūnu marķieri CD34, kā arī to, ka ādas cilmes šūnu morfoloģiju un virsmas antigēnu ekspresiju būtiski ietekmē dažādu augšanas faktoru klātbūtne audu kultūru barotnē.

Atslēgvārdi: cilmes šūna, šūnas morfoloģija, CD34, imūnhistoķīmija.

Autologās cilmes šūnas (sauktas arī par somatiskām un/vai pieaugušām cilmes šūnām) ir nediferencētas šūnas, kas atrodas pieauguša cilvēka audos vai orgānos. Tām piemīt spēja pašatjaunoties *in vivo* un veidot dažādas diferencētu meitasšūnu populācijas, kuras nodrošina orgāna homeostāzi visas dzīves garumā (6). Autologās cilmes šūnas ir atrastas smadzenēs, kaulu smadzenēs, asinīs, asinsvados, skeleta muskuļos, ādā, plaušu epitēlijā, zarnu epitēlijā, aknās, aizkuņģa dziedzerī u. c. (8). Lai gan cilmes šūnu audos un orgānos ir maz – to blīvums variē atkarībā no audu tipa, nepārsniedzot vienu uz 10 000 šūnām, – tās piesaista lielu uzmanību iespēju dēļ, ko sniegtu to potenciālais izmantojums biomedicīnā, piemēram, dopamīna neironu aizvietošanas terapija Parkinsona slimības gadījumā, I tipa diabēta ārstēšana, sirds funkciju uzlabošana pēc infarkta u. c. Autologām cilmes šūnām ir būtiskas praktiskā lietojuma priekšrocības, jo, izmantojot šūnu terapijai paša pacienta šūnas, nepastāv audu nesaderības un ētiska rakstura problēmas (9). Līdz šim veiktie klīniskie izmēģinājumi ar cilmes šūnām ir devuši daudzsoļus rezultātus vairāku smagu patoloģiju ārstēšanā, kā, piemēram, miokarda infarkts, sirds išēmiskā slimība, ar novecošanu saistīta asinsvadu sistēmas funkciju pasliktināšanās, B un C vīrushepatīta

izraisītie hepatodeģeneratīvie procesi, retinopātija, plaušu audu distrofija, insults un neurodeģeneratīvās slimības u. c. (10, 9, 15, 7).

Cilmes šūnas cilvēka ādā tika atklātas nesen – 2004. gadā (3). Jaunākie pētījumi rosina domāt, ka ādas epidermā ir vismaz trīs veidu cilmes šūnas – epidermas bazālās šūnas, mata saknes šūnas un dermas šūnas (4, 14, 5). Pierādījumi liecina, ka ādas cilmes šūnas ir multipotentas – tām piemīt spēja pārveidoties par citam orgānam raksturīgu šūnu. Piemēram, no dermā un matu saknēs sastopamām cilmes šūnām ir iegūti neironi, Švāna šūnas, gludās muskulatūras šūnas, melanocīti un hondrocīti (12, 13). Ņemot vērā to, ka āda ir visvieglāk pieejamais un vislielākais cilvēka orgāns (pieaugušam cilvēkam no 1,5 līdz 2 m² platībā) un gandrīz visa tās virsma ir salīdzinoši blīvi noklāta ar matu saknēm vai to aizmetņiem, ir saprotama plašā zinātnieku interese par ādas cilmes šūnu pētījumiem.

Ādas cilmes šūnu izmantojumam medicīnā nepieciešams detalizēts šo šūnu raksturojums. Dažādu autoru publikācijās minētie ādas cilmes šūnu izolēšanas, pavairošanas un diferencēšanas apstākļi ir atšķirīgi, tāpēc ir būtiski izveidot standartizētas metodes ādas cilmes šūnu raksturošanai *in vitro*. Darba mērķis ir ādas cilmes šūnu iegūšanas metožu optimizācija un imūnhistoķīmiska raksturošana *in vitro*.

Materiāli un metodes

Ādas cilmes šūnu iegūšana

Cilvēka ādas paraugi tika iegūti no pēcoperāciju materiāliem saskaņā ar Centrālās ētikas komisijas atļauju. Ādas paraugi (1–2 cm²) tika ievietoti sterilā konteinerā ar sterilu PBS šķīdumu, kam pievienoja fungizonu 0,5 µg/ml (*Invitrogen*) un penicilīna, streptomicīna maisījumu (100 u/ml un 100 µg/ml; *Invitrogen*), un uzglabāti +4 °C temperatūrā. Pēc ādas parauga apstrādes dispāzes (*Roche*) šķīdumā 2 h 37 °C temperatūrā epiderma tika atdalīta no dermas. Derma tika sagriezta mazos gabaliņos un apstrādāta ar liberāzi (*Roche*) vai kolagenāzi (*Sigma*) 2–4 h 37 °C temperatūrā. Reakcijas maisījumu filtrēja caur 70 µ neilona sietu un centrifugēja 10 min 1500 rpm. Virsnogulšņu šķīdumu atsūca un nogulsnes skaloja ar 10 ml PBS un centrifugēja 5 min 1500 rpm. Pēc skalošanas šūnām pievienoja seruma vai bezseruma audu kultūru barotni.

Ādas cilmes šūnu audzēšana *in vitro*

Dermas šūnas tika audzētas trīs veidu barotnēs:

- 1) seruma barotnē DMEM/F12 (attiecībā 3:1) ar 10% teļa serumu (*Invitrogen*) un penicilīnu, un streptomicīnu (100 u/ml un 100 µg/ml; *Invitrogen*);
- 2) bezseruma barotnē DMEM/F12 3:1 ar 2% seruma aizvietotāju B27 (*Invitrogen*), penicilīnu un streptomicīnu (100 u/ml un 100 µg/ml; *Invitrogen*) un augšanas faktoriem bFGF (bazālais fibroblastu augšanas faktors; 40 ng/ml) un EGF (epidermas augšanas faktors; 20 ng/ml) (*R&D Systems*);

- 3) bezseruma barotnē DMEM/F12 3:1 ar 2% seruma aizvietotāju B27 (*Invitrogen*), antibiotikām un augšanas faktoriem bFGF (40 ng/ml) un EGF (20 ng/ml) (*R&D Systems*) un leikēmijas inhibīcijas faktoru 10 ng/ml (LIF; *Chemicon*).

Šūnas audzēja 25 cm² šūnu kultūru traukos (*Costar*) 37 °C temperatūrā inkubatorā ar 90% mitruma un 5% CO². Šūnu augšana tika novērota ar mikroskopu (*Leica*). Sasniedzot 100% konfluenci, piestiprinājušās šūnas tripsinizēja ar 0,25% tripsīna/EDTA maisījumu (*Invitrogen*) 2 min 37 °C temperatūrā, reakciju apstādināja, pievienojot 0,5 ml teļa seruma vai tripsīna inhibitora (*Invitrogen*). Iegūto šūnu suspensiju centrifugēja 5 min 1500 rpm un atsūca šķidrumu. Nogulsnēm uzlēja 1 ml PBS un suspendēja. Tāpat arī suspensiju šūnu kultūras centrifugēja, nogulsnēm uzlēja 1 ml PBS un suspendēja. No šūnu suspensijas atsūca 50 μl, kam pievienoja 50 μl tripānzilā krāsvielas šūnu dzīvotspējas noteikšanai, un šūnas skaitīja Gorjajeva šūnu skaitīšanas kamerā. Pēc pārsēšanas šūnas ievietoja 37 °C temperatūrā inkubatorā ar 90% mitruma un 5% CO².

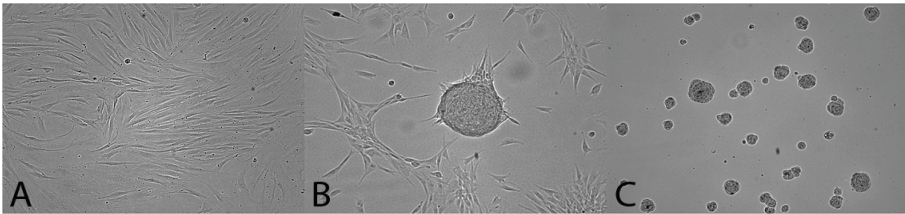
Imūnhistoķīmijas analīze

Ādas šūnas izsēja uz 4-kameru priekšmetstikliņa (*Nunc*) koncentrācijā 10⁴ šūnas/lauciņā 0,5 ml audu kultūru barotnes un audzēja, līdz šūnas sasniedza 70% konfluenci. Šūnām atsūca barotni un skaloja vienu reizi ar 0,5 ml PBS, pēc tam šūnas 20 min fiksēja 4% formaldehīda šķīdumā istabas temperatūrā. Pēc fiksēšanas šūnas apstrādāja ar bloķēšanas un permeabilizācijas buferi (PBS buferis ar 5% liellopa seruma albumīna un 0,03% Tritona X-100) 45 min istabas temperatūrā. Pēc tam paraugiem pievienoja CD34 (DAKO) un tirozināzes antivielas, un atstāja inkubēties pa nakti 4 °C temperatūrā. Par negatīvo kontroli tika izmantots paraugs, kuru inkubēja ar atšķaidījuma buferi bez primārās antivielas. Pēc inkubēšanas ar primārajām antivielām paraugus 3 reizes skaloja ar PBS buferi, kam pievienots 1% liellopa seruma albumīna. Imūnhistoķīmijas analīzei izmantoja sekundāro mērrutku peroksīdāzes (HRP) reaģentu un diaminobenzidīna (DAB) substrāta komplektu (*DakoCytomation LSAB+ System-HRP* no DAKO) saskaņā ar ražotāja instrukcijām. Krāsošanas reakciju apstādināja, atsūcot substrāta šķīdumu no paraugiem. Paraugus iemērc hematoksilīnā (*Lillie's modification*, DAKO) uz 30 sekundēm un pēc tam vairākas reizes skaloja destilētā ūdenī, pēdējo reizi skalojot ar krāna ūdeni. Paraugiem uzklāja fiksējošu šķīdumu (*Mounting media*, DAKO), uzlika priekšmetstikliņu un aplūkoja ar mikroskopu (*Leica DMI4000 B*). Attēlus apstrādāja programmā *Image-Pro® Express*.

Rezultāti

Pēc ādas parauga apstrādes ar kolagenāzi vai liberāzi parasti ieguva apmēram 3 x 10⁵ šūnu. Parauga apstrāde ar kolagenāzi vai liberāzi neietekmēja šūnu skaitu un dzīvotspēju, novērtējot ar tripānzilā krāsošanu (dati nav parādīti). Pēc izsēšanas audu kultūru barotnē tika novērots, ka ādas cilmes šūnām piemīt īpašība veidot atšķirīgu morfoloģiju atkarībā no barotnes, kurā tās tiek kultivētas (sk. 1. attēlu). Barotnē DMEM/F12 ar 10% teļa seruma piedevu audzētas šūnas ir adherentas šūnas ar

fibroblastiem līdzīgu morfoloģiju (1. att. A). Ja ādas cilmes šūnas tiek audzētas bezseruma barotnē DMEM/F12 ar bFGF un EGF faktoru piedevu, tās veido adherentu monoslāni ar izceltām, sfēriskām šūnu kolonijām (1. att. B). Turpretim bezseruma barotnē DMEM/F12 augšanas faktoru bFGF, EGF un LIF klātbūtnē šūnas veido peldošas sfēriskas kolonijas (1. att. C). Kopumā ādas cilmes šūnu augšanu var raksturot kā ļoti lēnu, jo viena 25 cm² šūnu kultūru trauka pieaudzēšanai līdz 100% konfluencī (apmēram 4 x 10⁵ šūnas) no 1–2 cm² parauga bija vajadzīgas 3–4 nedēļas.



1. attēls. Ādas cilmes šūnu morfoloģiskās atšķirības 100x palielinājumā dažādās barotnēs: A – barotne DMEM/F12 ar 10% teļa seruma, B – bezseruma barotne DMEM/F12 ar augšanas faktoriem bFGF un EGF, C – bezseruma barotne DMEM/F12 ar augšanas faktoriem bFGF, EGF, LIF

Morphological differences of skin-derived precursor cells cultivated in: A – DMEM/F12 supplemented with 10% FBS; B – DMEM/F12 supplemented with serum replacement B27, bFGF, EGF; C – DMEM/F12 supplemented with serum replacement B27, bFGF, EGF, and LIF

Veicot cilmes šūnu marķieru ekspresijas imūnhistoķīmisku analīzi ādas cilmes šūnās, tika konstatēts, ka tās ekspresē CD34 antigēnu, kas apstiprina to, ka iegūtās šūnas patiešām ir cilmes šūnas (sk. 2. attēlu). Interesanti, ka CD34 virsmas antigēna ekspresija bija novērojama tikai pirmās pasāžas šūnām un tikai bezseruma barotnē. Atkārtoti tripsinizējot un pārsējot šūnas, kā arī audzējot tās seruma barotnē, CD34 marķiera ekspresija vairs netika konstatēta. Krāsojums ar anti-tirozināzes antivielām bija negatīvs, apliecinot, ka tās nav melanocītu izcelsmes šūnas.

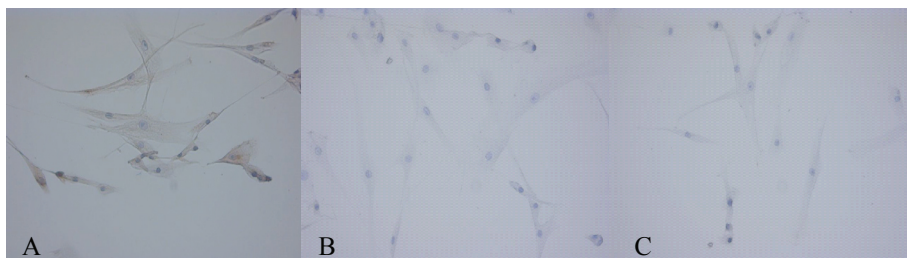
Saskaņot iekrāsotās šūnas mikroskopa redzeslaukā, tika konstatēts, ka CD34 ekspresija ir 88% šūnu, savukārt tirozināzes un negatīvās kontroles paraugos iekrāsotās šūnas netika novērotas. Eksperimenti tika atkārtoti vairākas reizes ar dažādām šūnu līnijām. Tabulā ir parādīti reprezentatīvi rezultāti.

1. tabula

Pozitīvo šūnu daudzums mikroskopa redzeslaukā pēc CD34 un tirozināzes ekspresijas imūnhostoķīmiskas analīzes (reprezentatīvi dati), %

Percentage of skin-derived precursor cells, positively staining for CD34 and tyrosinase markers by immunohistochemical analysis (data from a representative experiment shown)

Šūnas marķieris	CD34	Tirozināze	Negatīvā kontrole
Pozitīvo šūnu skaits	88	0	0



2. attēls. CD34 marķiera ekspresija ādas cilmes šūnās, noteikta ar imūnhistoķīmijas metodi 200x palielinājumā. A – ādas cilmes šūnas krāsotas ar CD34 antivielu, B – ādas cilmes šūnas krāsotas ar tirozināzes antivielu, C – negatīvā kontrole
Immunohistochemical analysis of stem cell marker CD34 expression in skin-derived precursor cells (magnitude 200x). A – CD34 staining, B – tyrosinase staining, C – negative control

Diskusija

Cilvēka āda satur cilmes šūnas, kuras ir iespējams izolēt un neierobežoti pavairot *in vitro* (3). Literatūrā ir atrodami dati par ādas cilmes šūnu iegūšanu gan no jaundzimušo priekšādiņas, gan arī no pieaugušu cilvēku ādas. Pieauguša cilvēka ādas cilmes šūnām piemīt cilmes šūnām raksturīgās iezīmes – tās vairojas *in vitro* kultūrā un diferencējas citu orgānu šūnās *in vitro* un *in vivo* (12, 13, 16). Ādas cilmes šūnu iegūšana balstās uz enzimatisku ādas parauga apstrādi ar kolagenāzi vai liberāzi. Kā tika novērots, ar kolagenāzes vai liberāzes metodi iegūto šūnu skaits un dzīvotspēja neatšķiras, līdz ar to abas pieejas ir izmantojamas vienlīdz veiksmīgi. No ādas parauga iegūto šūnu skaits ir apmēram 3×10^5 šūnu no 1–2 cm² liela parauga. Spriežot pēc šūnu blīvuma kultūrā un augšanas ātruma, cilmes šūnu proporcija varētu būt neliela. Tas secināts saskaņā ar iepriekš publicētiem datiem, ka pieauguša cilvēka ādā apmēram 1 no 30 000 šūnām ir cilmes šūna (1). Literatūrā publicētajos eksperimentos norādīts, ka ādas cilmes šūnas tiek kultivētas barotnē DMEM, kurai pievienota piedeva F12 attiecībā 1:1 vai 3:1. Novērojumi liecina, ka ādas cilmes šūnas uzrāda ātrāku augšanu un tendenci veidot suspensiju kultūru, ja izmanto barotni DMEM/F12 attiecībā 3:1, kaut gan bieži tiek uzsvērts, ka cilmes šūnu morfoloģija un diferenciācija ir atkarīga no augšanas faktoru klātbūtnes. Šajā darbā pirmo reizi tiek salīdzināta no viena ādas parauga izolētu šūnu augšana un morfoloģija dažādās barotnēs. Kā izrādās, ādas cilmes šūnu morfoloģija dažādās barotnēs kardināli atšķiras – tā var būt adherenta šūnu kultūra seruma barotnē un suspensiju kultūra bezseruma barotnē, kurai pievienoti augšanas faktori bFGF, EGF un LIF. Eksperimentu rezultāti liecina, ka barotnes sastāvam ir ļoti liela ietekme arī uz cilmes šūnu marķieru ekspresiju. Piemēram, CD34 ekspresija tika konstatēta tikai bezseruma barotnē audzētām ādas cilmes šūnām agrīnās pasāzās, turpretim seruma barotnē audzētās un atkārtoti tripsinizētās šūnās CD34 ekspresija

netika novērota. Šie rezultāti sakrīt ar autoru iepriekšējiem pētījumiem par virsmas marķieru ekspresijas zudumu pie šūnu tripsinizēšanas un vairākkārtējas šūnu iesaldēšanas un atkausēšanas (11). Līdz šim vēl nav atrasts marķieris, pēc kura būtu iespējams šķirot ādas cilmes šūnas ar plūsmas citometru. Ir mēģināts šķirot ādas cilmes šūnas pēc CD133 ekspresijas, taču nav datu par šķirošanu pēc CD34 ekspresijas (2). Veiktajos eksperimentos ar imūnhistoķīmijas metodi autoriem ir izdevies parādīt, ka no ādas izdalītās cilmes šūnas ekspresē CD34 marķieri. Nākamais solis būtu veikt CD34 pozitīvo ādas cilmes šūnu atlasu un raksturot to diferenciāciju neironālo un mezenhimālo šūnu līnijās, kā arī proliferāciju dažādu augšanas faktoru klātbūtnē.

Pateicības

Pateicamies *Dr. A. Stengrevicam* par sadarbību. Paldies par atbalstu ERAF projektam VPD/ERAF/CFLA/05/APK/2.5.2./000072/036 un ESF grantam doktorantiem un jaunajiem zinātniekiem.

Literatūra

1. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, want not. *Genes Dev* 2003, May 15, 17 (10):1189–200.
2. Belicchi M, Pisati F, Lopa R, Porretti L, Fortunato F, Sironi M, Scalapogna M, Parati EA, Bresolin N, Torrente Y. Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res* 2004, Aug 15, 77 (4): 475–86.
3. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, and Fuchs E. Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell*, 2004, Sept. 3, Vol. 118, 635–648.
4. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, Sep 27.
5. Cotsarelis G. Gene expression profiling gets to the root of human hair follicle stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* January 2006, Volume 116: No. 1.
6. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, June 2006, Vol. 441, 1061–1067.
7. Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, Poll L, Voelkel T, Mohammad Hasani MR, Piechaczek C, Feifel N, Stockschlaeder M, Burchardt ER, Kar BJ, Gregoric I, Gams E. Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg Forum* 2007, 10 (1): E66–9.
8. Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003, Aug 7, 349 (6): 570–82.
9. Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica* Mar 2005, 90 (3): 360–81.
10. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006, Jun 29, 441 (7097): 1094–6.

11. Muceniece R, Riekstina U, Vrublevska Kr, Krigere L, Saleniece Kr, Čakstina I, Ancāns J. Primary human fibroblastic cells in vitro loose ability to express cell surface melanocortin receptors. *Proc. Latv. Acad. Sci.*, 2007, submitted.
12. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* Aug 2005, 23 (7): 1012–20.
13. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Millera FD. Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. *Stem Cells* 2005, 23: 727–737.
14. Watt FM, Celso CL, and Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006, 16: 518–524.
15. Wollert KC and Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005, 96: 151–163.
16. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, Zimmermann DR, Dufour S, Thiery JP, Meijer D, Beermann F, Barrandon Y, Sommer L. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 2006, 175 (6): 1005–15.

Summary

Intense studies on stem cells have confirmed their general properties: capability of dividing and renewing themselves for long periods, maintenance of unspecialized status, and ability to differentiate into specialized cell types. Future stem cell therapy is focused on using patient's own adult stem cells to regenerate tissue and treat a large variety of disorders. Skin has attracted special attention due to the fact that skin stem cells serve as a reservoir for numerous cell lineages. It has been reported that multipotent cells from the human skin, named skin-derived precursor cells, could generate neural and mesenchymal cells in the special differentiation media. Thus, stem cells from skin are potential candidates for the regenerative therapy. However, knowledge on how to obtain the most suitable donor skin specimen is still insufficient. Such information is critical for scientists to be able to grow large numbers of unspecialized stem cells in the laboratory for further experiments.

The aim of the study was to characterize stem cell marker expression in human skin-derived precursor cells and to analyze their growth in different cell culture media. Our results show that human skin-derived precursor cells express CD34, as detected by immunohistochemical analysis. We were able to demonstrate for the first time that human skin-derived precursor cell cultures have pronounced morphological differences depending on the cell culture medium conditions.

Keywords: *stem cell, CD34, cell morphology, immunohistochemistry.*

**Kvercetīna un kemferola ietekme uz iNOS ekspresiju
kontroles un LPS inducēta iekaisuma gadījumā *Wistar*
līnijas žurku aknās**
***Effect of Quercetin and Kaempferol on iNOS Expression
in Control and LPS-Induced Inflammation Cases in the
Liver of Wistar Line Rats***

Evita Salna¹, Karīna Siliņa², Jeļena Šaripova¹, Aija Linē³, Nikolajs Sjakste^{1,3}

¹Latvijas Organiskās sintēzes institūts
Aizkraukles iela 21, Rīga, LV-1006
E-pasts: evita.salna@gmail.com

² Latvijas Universitātes Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs
Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1067

³Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001
E-pasts: nikolajs.sjakste@lu.lv

Darbā pētīta divu flavonoīdu – kvercetīna un kemferola – ietekme uz slāpekļa oksīda sintēzes ekspresijas līmeni *Wistar* līnijas žurku aknās normā un ar lipopolisaharīdu (LPS) izraisītajā iekaisuma modelī. Izmantojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas metodi, pierādīts, ka kvercetīns (50 mg/kg) un kemferols (50 mg/kg) inhibē iNOS gēna ekspresiju gan intaktās žurkās, gan iekaisuma modelī.

Atslēgvārdi: slāpekļa oksīds, flavonoīdi, kvercetīns, kemferols, lipopolisaharīds, iekaisums.

Ievads

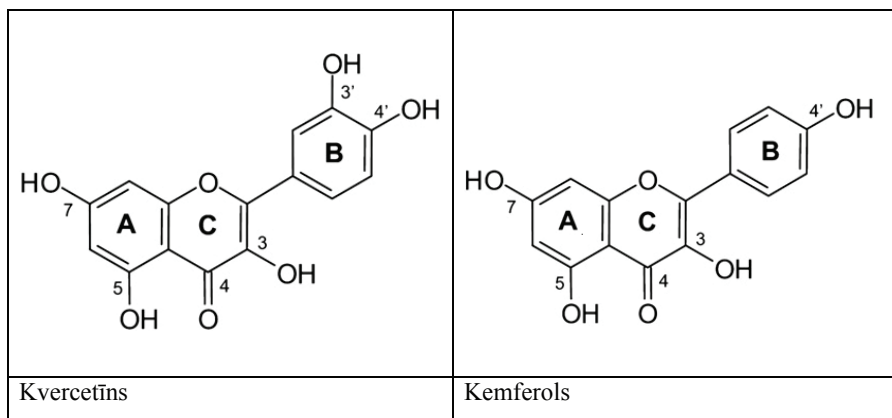
NO (slāpekļa oksīds) tiek sintezēts no L-arginīna ar slāpekļa oksīda sintēzes (NOS, *nitric oxide synthase*) palīdzību dažādos audos un orgānos. iNOS (*inducible nitric oxide synthase*, NOS 2) ir vienīgā līdz šim atklātā inducējamā izoforma, kas tiek no jauna sintezēta, iedarbojoties tādiem aktivācijas signāliem kā LPS (lipopolisaharīds) un/vai citokīni (24, 26). iNOS producē mikromolāru NO daudzumu laika periodā, kamēr tas ir inducēts. Šādā veidā ražotais NO izraisa citotoksiskus efektus un audu bojājumus, turpretī NO nanomolārā koncentrācija, ko ražo konstitutīvās NOS formas, ir būtiska, lai uzturētu normālu šūnu darbību (24, 18). NO ir iesaistīts vairākos bioloģiskos procesos, ieskaitot iekaisumu un imūnregulāciju (36, 10). Tādējādi iNOS atkarīgās NO producēšanas nomākšanai var būt potenciāla terapeitiska vērtība iekaisumu un septiskā šoka novēršanā (9).

Flavonoīdi ir bieži sastopami augos kā sekundāri metabolīti, kas tiek uzskatīti par relatīvi netoksiskām bioaktīvām substancēm un piedalās daudzos bioloģiskos

efektos. Flavonoīdi ir piesaistījuši lielu uzmanību ar plaša spektra aktivitāti, kas neļauj sirds slimību, vēža, kuņģa un zarnu darbības traucējumu un iekaisuma rašanos (20). Pierādīts, ka flavonoīdiem, kas atšķiras pēc ķīmiskās struktūras, ir dažāda pretiekaisuma un antioksidatīva aktivitāte (25). Tomēr ārpus šūnām veiktie pētījumi rāda, ka flavonoīdu antioksidantu īpašības ir atkarīgas no to strukturālām īpašībām, piemēram, hidroksilgrupu izvietojums pie benzola gredzena (28, 40). Nav zināms, vai to struktūra ietekmē šīs īpašības arī šūnā (7).

Dažādi pētījumi *in vitro* apliecina, ka flavonoīdi nomāc NO produkciju un iNOS ekspresiju (16), kas apstiprinājās arī pētījumos *in vivo* (32, 19). NO sintēzes nomākšanas mehānisms nav īsti skaidrs. Daži pētījumi, kuros izmantoti gan atsevišķi attīrīti flavonoīdi, gan viss augs vai tā daļas ar bioloģiski aktīvajām vielām, norāda, ka flavonoīdu inducētā inhibīcija notiek kodola faktora NFκB (*Nuclear factor kappa B*) transkripcijas līmenī, samazinot IκB (*inhibitor of κB*) fosforilāciju (37, 12), kaut ir arī dati par citiem aktivēšanas ceļiem un veidiem (3). NFκB ir viens no galvenajiem transkripcijas inducētājiem, kas ir būtiski iesaistīts iekaisuma gēnu ekspresijā un kura modulācija izraisa signālu kaskādi, kurā daži posmi ir potenciāli mērķi, lai iejauktos iekaisuma procesos.

Darbā tika pētīti divi flavonoīdi: kvercetiņš (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavonols), kas atrodas daudzos augu izcelsmes produktos, piemēram, sīpolos, ābolos, lapu dārzeņos, pupās, zaļajā un melnajā tējā, sarkanvīnā, āboliņa ziedos, ziedputekšņos, un kemferols (3, 4', 5, 7-tetrahidroksiflavonols), kas atrodas brokoļos, kāpostos, sīpolos, pupās, asajos piparos, melnās un zaļās tējas lapās. Tiem piemīt plašs modulējošs efekts.



1. attēls. Kvercetiņa un kemferola ķīmiskā struktūra
Chemical structure of quercetin and kaempferol

Darba mērķis

Darba mērķis ir izvērtēt ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas metodi flavonoīdu (kvercetinā un kemferolā) ietekmi uz iNOS ekspresiju aknu šūnās gan LPS izraisītā iekaisuma modelī, gan kontroles žurkām.

Materiāli un metodes

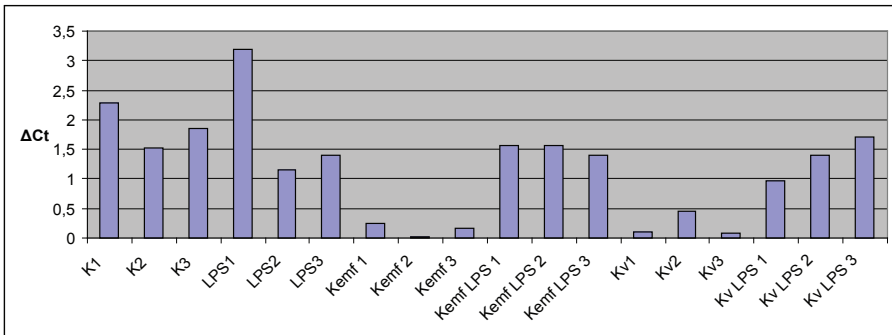
Ekspierimentos tika izmantoti pieauguši balto žurku tēviņi (līnija *Wistar*, svars 250–300 g). Dzīvnieki saņemti no Rīgas Stradiņa Universitātes eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas. Žurkas saņēma granulēto barību līdz sātām (*Lactamin*, Zviedrija) un dzeramo ūdeni. Katrā grupā bija 3 dzīvnieki. Ekspierimenti veikti saskaņā ar LR Zemkopības ministrijai pakļautās Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomes izstrādātajiem noteikumiem. Iekaisuma reakcija tika izraisīta, injicējot LPS i/p 10 mg/kg. *E. Coli* (serotips 055 : B5) lipopolisaharīds (LPS) iepirkts *Sigma-Aldrich* (Vācija). Pētāmie flavonoīdi: kvercetīns (Kv), kemferols (Kemf) (*Dayang Chemical Co., LTD*, Taivana). Flavonoīdi tika injicēti vienlaikus ar LPS i/p 50 mg/kg. Pēc 4 stundām dzīvniekus dekapitēja ar četrnažu giljotīnu (Japāna), pēc tam tika gatavoti žurku aknu homogenāti, RNS izdalīti ar TRI reaģenta (*Sigma*, Vācija) palīdzību. Iegūtais materiāls tika apstrādāts ar DNāzi I, kurai nav RNāzes piemaisījumu (*Fermentas*, Lietuva), lai atbrīvotos no DNS klātbūtnes. Iegūstot tīru RNS maisījumu, veikta reversā transkripcija ar *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*, Lietuva). cDNS tika izmatota reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanai, izmantojot *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (*Qiagen*) ar *Applied Biosystems 7500 real-time PCR* aparātu. Amplifikācija notika 96-aku platēs, kurās ienests *SYBR green master mix* (*QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (*Qiagen*)) maisījums un pievienots tiešais un atgriezeniskais praimeris. Reakcija atkārtota 40 ciklus, izmantojot šādus parametrus: 50 °C 2 min, 95 °C 15 min, 94 °C 15 s un 60 °C 30 s. Prameru sekvences: iNOS 5'-GCTACACTTCCAACGCAACA-3' un 5'-CATGGTGAACACGTTCTTGG-3' (116 bp). Kā references gēns izmantots RNS polimerāze II 5'-GCCAGAGTCTCC-CATGTGTT-3' un 3'-GTCGGTGGGACTCTGTTTGT-5' (135 bp). Iegūtie iNOS ekspresijas dati normalizēti pret references gēnu RNS polimerāze II, kura ekspresiju teorētiski neiespaido iekaisuma faktori (LPS) un pētāmie flavonoīdi. Datu analīzē izmantota Delta-Delta Ct (*Delta-Delta CT METHOD*) metode. Cikls, kurā transkripts kļūva nosakāms (sliekšņa cikls – Ct), bija normalizēts pret tā paša parauga RNS polimerāzes II sliekšņa ciklu, attiecinot to kā $\Delta Ct = 2^{-(Ct(iNOS)-Ct(RNS\ polimerāze\ II))}$, tādā veidā izvērtējot visus paraugus (15).

Rezultāti

Iegūtie dati ļauj secināt, ka iNOS ekspresija aknu šūnās (K 1- 2,28; K 2- 1,53; K 3- 1,86 ΔCt) (2. att.) notiek arī normā. Ievērojamas iNOS ekspresijas svārstības iekaisuma modeļa kontroles grupā var izskaidrot ar katra dzīvnieka individuālām īpatnībām. Modeļi nosacīti var uzskatīt par izdevušos, jo iNOS ekspresijas pieaugums ir novērots vienai žurkai (LPS1-3,19 ΔCt), bet pārējām tas ir samazinājies (LPS 2-1,15; LPS 3- 1,40 ΔCt) salīdzinājumā ar kontroles (K) žurkām.

Flavonoīdu ietekmi uz iNOS ekspresiju nav iespējams skaidri novērtēt, jo mazajās grupās izkļiede ir ļoti liela, taču var redzēt, ka, normalizējot iNOS ekspresiju pret RNS polimerāzes II ekspresiju, vislielākā iNOS ekspresija ir žurku grupā, kas saņēma kvercetiņu kopā ar LPS (Kv LPS 3- 1,71). Pārējām žurkām iNOS ekspresija ir samazinājusies (Kv LPS 1- 0,96; Kv LPS 2- 1,39) (2. att.). Salīdzinot grupu vidējos lielumus (LPS E ΔCt - 1,92; Kv LPS E ΔCt - 1,35), tomēr ir novērota iNOS ekspresijas samazināšanās. Ievadot kvercetiņu veselām žurkām, iNOS ekspresija aknās samazinās (Kv 1- 0,10; Kv 2- 0,45; Kv 3- 0,08 ΔCt ; Kv E ΔCt - 0,21) salīdzinājumā ar kontroles grupu (2. att.).

Līdzīgas tendences ir novērotas žurku grupās, kurām tika ievadīts kemferols. Kemferols samazina iNOS ekspresiju grupā, kurai tika ievadīts vienīgi kemferols (Kemf 1- 0,24; Kemf 2- 0,02; Kemf 3- 0,16 ΔCt), un samazina to grupā, kurai ievadīts kemferols un LPS (Kemf LPS 1- 1,57; Kemf LPS 2- 1,56; Kemf LPS 3- 1,39 ΔCt) salīdzinājumā ar kontroles grupu un iekaisuma modeļa kontroles grupu (2. att.). Tomēr, ja salīdzina vidējos lielumus, grupā, kas saņēma kemferolu un LPS, iNOS ekspresija ir lielāka nekā dzīvnieku grupā, kas saņēma kvercetiņu un LPS (Kemf LPS E ΔCt - 1,50). Grupās, kurām tika ievadīts vienīgi flavonoīds, iNOS ekspresija ir nedaudz lielāka nekā dzīvniekiem pēc kvercetiņa ievadīšanas (Kv E ΔCt - 0,21; Kemf E ΔCt - 0,14) (2. att.).



2. attēls. iNOS mRNS ekspresija attiecībā pret referenes gēnu RNS polimerāze II, ΔCt . K 1, K 2, K 3 – kontroles dzīvnieku iNOS ekspresija aknās; LPS 1, LPS 2, LPS 3 – iekaisuma modeļa kontroles grupa; Kemf 1, Kemf 2, Kemf 3 – grupa, kurai ievadīts vienīgi kemferols; Kemf LPS 1, Kemf LPS 2, Kemf LPS 3 – grupa, kurai ievadīts kemferols un LPS; Kv 1, Kv 2, Kv 3 – grupa, kurai ievadīts vienīgi kvercetiņš; Kv LPS 1, Kv LPS 2, Kv LPS 3 – grupa, kurai ievadīts gan kvercetiņš, gan LPS

iNOS mRNA expression anent to reference gene RNA polymerase II, ΔCt . K group shows iNOS expression level in liver of control animals (K1, K2, K3); LPS1, LPS2, LPS3 shows iNOS expression level in LPS-induced inflammation model control group; group where is only kaempferol injected (Kemf 1, Kemf 2, Kemf 2); group where are kaempferol and LPS injected (Kemf LPS 1, Kemf LPS 2, Kemf LPS 3); group where is only quercetin injected (Kv 1, Kv 2, Kv 3) and group where both quercetin and LPS are injected (Kv LPS 1, Kv LPS 2, Kv LPS 3)

Diskusija

Salīdzinot iegūtos rezultātus ar citu pētījumu datiem, kvercetinā un kemferola ietekmē uz iNOS ekspresiju žurku aknās pretruna netiek novērota (39, 40). Tomēr izskaidrot iegūtos rezultātus, pamatojot tos molekulārā līmenī, ir grūti.

Iepriekšējos pētījumos tika novērota flavonoīdu ietekme uz NO līmeni dažādos audos, kas noteikta ar elektronparamagnētiskās rezonanses spektroskopiju (EPR). Kvercetīns lielākajā devā (50 mg/kg) palielina NO koncentrāciju aknās, sēkliniekos, asinīs un liesā, bet mazākajā devā (25 mg/kg) – skeleta muskuļos. Intaktiem dzīvniekiem kvercetīns NO līmeni pazemina nierēs un asinīs. Kemferols intaktām žurkām stimulē NO sintēzi aknās un plaušās (17, 34, 35), kaut gan tam būtu jāinhibē iNOS (32, 2), bet nierēs, asinīs un smadzeņu garozā NO koncentrācija samazinājās. LPS izraisīto NO sintēzi preparāts neietekmēja (17, 34). Salīdzinot šos datus ar veiktajām pētījumā iegūtajiem, ir novērotas nesakritības, kas norāda uz flavonoīdu atšķirīgo aktivitāti dažādā koncentrācijā un dažādos audos. Daudzu farmakoloģisko preparātu efekti dažādos orgānos un kultivētos audu paraugos var atšķirties.

Ir pētījumi, kuri pierāda, ka gan kemferols, gan kvercetīns samazina iNOS proteīnu līmeni aktivētās *Chang* aknu šūnās, kaut gan kemferols ir labāks inhibitors zemākā koncentrācijā (7). Atšķirības inhibējošā aktivitātē starp šiem diviem flavonoīdiem, iespējams, skaidrojamas ar to strukturālajām atšķirībām. Abiem ir hidroksilgrupas pie C3 un C4, 2-3 dubultsaite un 4', 5, 7- trihidroksiflavons, kurš tiek uzskatīts par nepieciešamu pretiekaisuma un antioksidatīviem flavonoīdu efektiem (31, 38). Galvenā strukturālā atšķirība ir vēl vienas hidroksilgrupas esamība kvercetinam B3' pozīcijā (1. att.). Tiek uzskatīts, ka kvercetinā inhibējošais efekts uz iNOS gēna ekspresiju slēpjas 3', 4'-hidroksilgrupās pie B gredzena (1). Taču ir arī izpētīts, ka kemferolam mazās koncentrācijās salīdzinājumā ar kvercetinā ir nedaudz labāka pretiekaisuma aktivitāte. Tas parāda, ka B3'-hidroksilgrupa nav nepieciešama savienojuma inhibējošai spējai. Kaut gan arī citi izskaidrojumi nevar tikt izslēgti, jo iespējams, ka pārmērīgs hidroksilgrupu skaits samazina hidrofobiju (30). Ir daudz ziņojumu, kuros aprakstīts, ka polifenoli var darboties kā prooksidanti. Tas var izskaidrot, kā samazinās spēja inhibēt iekaisuma mediatorus, ko parāda kvercetīns augstās koncentrācijās (7). Tādā veidā kvercetīns un citi flavonoīdi, piemēram, miricetīns, palielina OH⁻ radikāļu veidošanos un DNS bojājumus koncentrācijā > 30 mK (14). Kvercetinā koncentrācijai sasniedzot 75 mK, parādās daži raksturīgi citotoksiski efekti kultivētās nieru kanāliņu šūnās (13), un kvercetīns lielās devās var būt genotoksisks (6).

Ziņojumi par flavonoīdu saistību ar NFκB ceļu ir pretrunīgi. Ir pētījumi, kuros pierādīts, ka kvercetīns *per os* nesamazina NFκB aktivāciju nieru garozā žurkām ar hronisku glomerulonefītu (29) un ka gan kemferols, gan kvercetīns samazina iNOS ekspresiju, bet nesamazina NFκB aktivāciju (11). Ziņots, ka tieši kemferols, nevis kvercetīns nomāc dažus tirozīnkināzes medītētos signālceļus prostatas vēža šūnās (41), kā arī nomāc TNFα produkciju un TNFα (*tumor necrosis factor alfa*) inducēto NFκB translokāciju osteoblastos (27). Tomēr ir arī dati, ka gan kemferols, gan kvercetīns samazina IκBα (*inhibitor of kappa B alfa*) degradāciju, nomācot IKK (IκB kināze) darbību, un šis efekts uz IKK/IκB kaskādi pastiprina NFκB aktivācijas

inhibīciju (7). Ir ziņojumi, kas norāda, ka kvercetīns novērš LPS-IκB fosforilāciju kaulu smadzeņu izcelsmes makrofāgos (5), nomāc NFκB aktivāciju, ko inducē IL-1 peļu fibroblastu 1-TK šūnās (21) vai H₂O₂ Hep G2 šūnās (22), kā arī būtiski samazina IκBa un IκBβ (*inhibitor of kappa B beta*) fosforilācijas līmeni mononukleārās šūnās perifērās asinīs (23). Kvercetīns nomāc arī LPS inducēto iNOS gēna transkripciju peļu BV-2 mikroglijā ar IκB fosforilācijas samazināšanu (4) un nepieļauj iNOS pārmērīgu ekspresiju IL-1β (*interleikin-1 beta*) aktivētos žurku hepatocītos (16).

Secinājumi

Apkopojot pētījumā iegūtos rezultātus un iepriekš minēto ziņojumu datus, var secināt, ka kvercetinam un kemferolam ir tendence nomākt iNOS ekspresiju žurku aknās, tādējādi samazinot LPS izraisīto iekaisuma reakciju, kā arī ir tendence samazināt iNOS ekspresiju veselām žurkām. Konstatētā iNOS ekspresija veselām žurkām prasa turpmāku izpēti.

Literatūra

1. Banerjee T, Valacchi G, Ziboh VA, van der Vliet A. Inhibition of TNFα-induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-κB activation in A549 cells. *Mol Cell Biochem* 2002, 283, 105–110.
2. Blonska M, Bronikowska J, Pietsz G, Czuba ZP, Scheller S, Krol W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2004, 91, 25–30.
3. Chang Hwa Jung, Ji Hye Kim, Myung Hee Hong, Ho Moon Seog, Seong Hoon Oh, Pan Jae Lee, Gyung Jun Kim, Hyung Min Kim, Jae Young Um, Seong-Gyu Ko. Phenolic-rich fraction from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) suppress inflammatory response via NF-κB and JNK pathway in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2006.
4. Chen J, Ho FM, Chao PL, Chen CP, Jeng KG, Hsu HB, Lee ST, Wen Tung W, Lin WW. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IκB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* 2005, 52, 9–20.
5. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J, Zarzuelo A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves releases of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* 2005, 35, 584–592.
6. Da Silva J, Hermann SM, Heuser V, Peres W, Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann H. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002, 40, 941–947.
7. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang liver cells. *Europ J Pharmacol* 2007, 557, 221–229.
8. García-Mediavilla V, Sánchez-Campos S, González-Pérez P, Majano PL, López-Cabrera G, Clemente G, García-Monzon C, González-Gallego J. Differential contribution of HCV

- NS5A and core proteins to oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *J Hepatol* 2005, 43, 606–613.
9. Hee Kee Kim, Bong Sun Cheon, Young Ha Kim, Sung Yong Kim, Hyun Pyo Kim. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Bioch Pharmacol* 1999, 58, 759–765.
 10. Ialenti A, Moncada S and Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1992, 211, 177–182.
 11. Kim BH, Cho SM, Reddy AM, Kim YS, Min KR, Kim Y. Down-regulatory effect of quercetrin gallate on nuclear factor- κ B-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 2005, 69, 1577–1583.
 12. Kim IT, Park YM, Shin KM, Hab JH, Choi JW, Jung HJ, Park HJ, Lee KT. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol* 2004, 94, 165–173.
 13. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol* 1998, 72, 536–540.
 14. Loughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Houlst JRS. Antioxidant and pro-oxidant action of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem Pharmacol* 1989, 38, 2859–2865.
 15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 5, 2001, 402–408.
 16. Martínez-Flórez S, Gutiérrez, MB, Sánchez-Campos S, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in interleukin- 1β -activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005 135, 1359–1365.
 17. Meirena D., Baumane L., Šaripova J., Ļauberte L., Dzintare M., Sjakste N., Kalviņš I. Dažu flavonoīdu ietekme uz NO saturu žurku audos. *Latvijas Universitātes Raksti*. 712. Medicīna. 2007, 148–155.
 18. Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43, 109–142.
 19. Morales AI, Vicente-Sánchez C, Jerkic M, Santiago JM, Sánchez-González PD, Pérez-Barriocanal F, López Novoa JM. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, 210, 128–135.
 20. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, González-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF- κ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004, 268, 1939–1946.
 21. Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Tani T, Izumumi R, Miwa K, Yamamoto K. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- κ B. *Transplant Proc* 2002, 34, 1335–1340.
 22. Musonda CA, Chipman JK. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced NF- κ B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1583–1589.
 23. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (Tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clin Vaccine Immunol* 2006, 13, 319–328.
 24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992, 6, 3051–3064.

25. Odontuya G, Hoult JRS, Houghton PJ. Structure–activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res* 2005, 19, 782–786.
26. Olszanecki R, Gebcka A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 2002, 53, 4, 571–584.
27. Pang JL, Ricupero DA, Huang S, Fatma N, Sing DP, Romero JS, Chattopadhyay N. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. *Biochem Pharmacol* 2006, 71, 818–886.
28. Peng IW, Kuo SM. Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *J Nutr* 2003, 133, 2184–2187.
29. Rangan GK, Wang Y, Harris DC. Dietary quercetin augments activator protein-1 and does not reduce nuclear factor-kappa B in the renal cortex of rats with established chronic glomerular disease. *Nephron* 2002, 90, 313–319.
30. Sadik CD, Sies H, Schewem T. Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 2003, 65, 773–781.
31. Sartor L, Pezzato E, Dell’Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for antiinflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 2002, 64, 229–237.
32. Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, Chen YC. In vivo and in vitro inhibitory activities of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol* 2002, 446, 187–194.
33. Shen SC, Lin CW, Lee HM, Chien LL, Chen YC. Lipopolysaccharide plus 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate induction of migration and invasion of glioma cells in vitro and in vivo: differential inhibitory effects of flavonoids. *Neuroscience* 2006, 140, 477–89.
34. Sjakste N, Andrianov VG, Boucher JL, Shestakova I, Baumane L, Dzintare M, Meirena D, Kalvinsh I. Paradoxical effects of two oximes on nitric oxide production by purified NO synthases, in cell culture and in animals. *Nitric Oxide*, 2007a, Jul 12.
35. Sjakste N, Sharipova J, Baumane L, Sjakste T, Dzintare M, Isajevs S, Gordjushina V, Salna E, Meirena D, Kalvinsh I. Modifications of NO synthesis by flavonoids in rat organs studied by means of EPR spectroscopy. In: *The 40th Annual International Meeting of the Electron Spin Resonance Group of the Royal Society of Chemistry, New College, Oxford, 25–29 March, 2007b*, 128.
36. Stichtenoth DO, Frolich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998, 37, 246–257.
37. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutation Res* 2001, 480/481, 243–268.
38. Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-α production. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004, 68, 119–125.
39. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact* Jul 31 2001, 137 (1): 43–58.
40. Wang Lisu, Yi-Chen Tu, Tzi-Wei Lian, Jing-Ting Hung, Jui-Hung Yen, Ming-Juan Wu. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem* 2006, 54, 9798–9804.
41. Wang S, DeGroff VL, Clinton SK. Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase. *J Nutr* 2003, 133, 2367–2376.

Summary

The authors of the article studied the effect of two flavonoids – quercetin and kaempferol – on the expression level of nitric oxide synthase in the liver of normal and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation cases in the liver of Wistar line rats. The real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses showed that quercetin (50 mg kg⁻¹) and kaempferol (50 mg kg⁻¹) inhibit iNOS gene expression both in intact rats and in inflammation model rats.

Keywords: nitric oxide, flavonoids, quercetin, kaempferol, lipopolysaccharide, inflammation.

Management of Risk Factors for Hypertension in a Family Practice in a Rural Area of Latvia *Hipertensija un tās riska faktoru apzināšana ģimenes ārsta praksē vienā no Latvijas lauku rajoniem*

Gunta Ticmane

PhD student, Riga Stradins University, general practitioner

Jānis Jirgensons

Professor, Riga Stradins University

In most European countries and Northern America, cardiovascular diseases induced by atherosclerosis are the most common cause of death in elderly and middle age people (1,2).

People surviving acute myocardial infarction or stroke often suffer from disabilities. Lifelong care of such patients is expensive and plays a major role in increment of costs in public health systems (3, 4).

Prevention of atherosclerosis will reduce cardiovascular morbidity and mortality, enhance the quality of life and prolong the lifespan of patients; therefore, the worldwide accepted risk factors for atherosclerosis have to be treated consequently and early enough within the framework of primary prevention; and we are sure that the first step in this prevention work must be taken by GPs (5, 6, 7, 8).

All therapeutic strategies are based on lifestyle change, which covers weight reduction, sodium restriction, controlled alcohol consumption, and increase in physical activity.

There is a strong evidence that reduction in blood pressure is followed by a decrease in the incidence of myocardial infarction, stroke, heart failure, nephropathy, and even in cardiovascular mortality. The success of antihypertensive therapy is greater in high risk patients like elderly people, patients with isolated systolic hypertension, or diabetics. Risk reduction correlates well with the degree of blood pressure reduction. However, to minimize cardiovascular risk in hypertensives, all additional risk factors also have to be treated.

The structure of the main causes of death in Latvia in the last years has not changed. The main cause of death is circulatory system diseases (constitutes 53.5% of all deaths). Circulatory system diseases were registered as the cause of death in females more often than males. Mortality rate for females was 768.8 deaths per 100 000 females and for males 761 per 100 000 males. The situation is opposite at the working age – mortality is even 3 times higher among males. Mortality caused by heart ischemic diseases is 3 times higher among males. GPs are the first-level specialists who do preventive work and educate patients about the risk factors for cardiovascular diseases

Keywords: hypertension, cardiovascular heart disease, risk factors, cholesterol, body mass index.

Materials and Methods

The main aim of the research is

- to verify the role of GP as an expert in family medicine,
- to find patients who suffer from hypertension and explore indicators of their health,
- to study the effectiveness of treatment in patients with hypertension,
- to research the quality of life of these patients.

Examinations and questionnaires covered 154 patients with hypertension. Physical (BMI, EKG) and laboratory (cholesterol fractions, triglycerides, creatinine) examinations were done during the first visit. Patients received a questionnaire about their medical record, treatment of hypertension, quality of life, etc.

Results

In total 154 patients were involved in the study. 139 of them (90.25%) agreed to carry out laboratory tests. Physical examinations were done for all (154) patients.

81.8% (126) of the questionnaires were returned completed and data analysis was done for all these patients – 40 men (31.7%) and 86 women (68.3%) at the age from 15 to 86 years.

- The average age of patients – 63.1 years.
- The average age of men – 58 years.
- The average age of women – 65.5 years.

Table 1

Weight/height indicators of respondents

Respondentu svars un garums

Indices	Minimum	Maximum	Average	SD
Height /cm	147	192	166.4	9.2
Weight /kg	47.5	158	85.79	19.04
BMI/ kg/m ²	20.23	48.00	31.01	6.04

Average BMI kg/m²: men – 29.5, women – 31.7

Table 2

Body mass index of respondents

Respondentu ķermēņa masas indeksi

BMI	Number	%
Normal	19	15.1
Overweight	85	67.4
Obesity	22	17.5

Average BMI kg/m²: men – 29.5, women – 31.7

During the last years we have observed that obesity epidemics has come to Europe. In Latvia in 2005 the results were the following:

- 40% of the population was overweight,
- 16.5% of women had obesity,
- 9.5% of men had obesity.

If we take the results of physical examinations of the patients with hypertension from rural area, we see that the results are similar compared to the results in Latvia in general (Figures 1, 2).

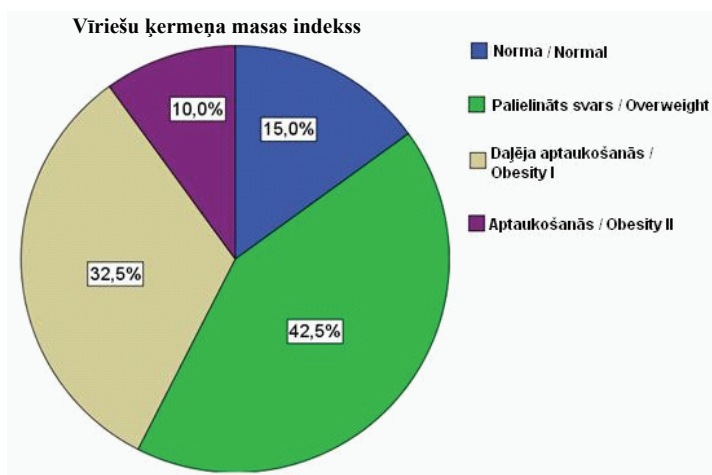


Figure 1. BMI – males
Vīriešu ķermeņa masas indekss

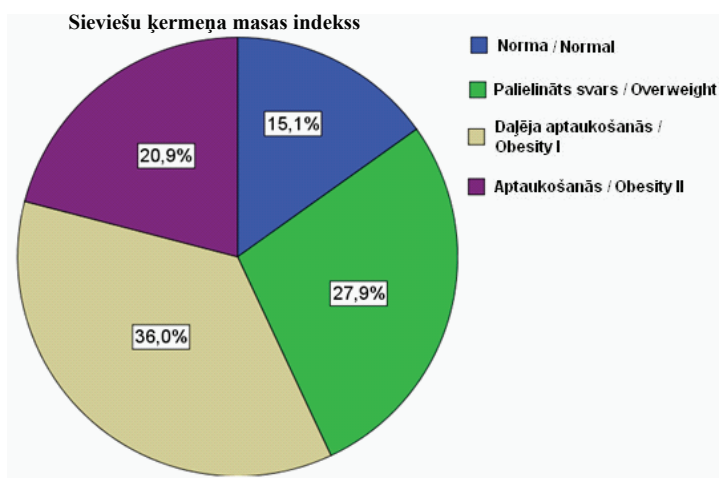


Figure 2. BMI – females
Sieviešu ķermeņa masas indekss

Plasma lipoproteins

Another modifiable risk factor for coronary heart disease (CHD) is the level of plasma lipoproteins. In hyperlipidemia, elevated levels of lipids or lipoproteins are abnormal because genetic and environmental conditions alter the production, breakdown, or clearance of plasma lipoproteins from the circulation.

We compared the results of analyses of the level of cholesterol, low density lipoproteins (LDL), and high density lipoproteins (HDL) of our respondents with normal reference interval (cholesterol: 3.9–6.0 mmol/L; HDL: 0.9–1.93 mmol/L; LDL: 1.55–4.4 mmol/L) (Figures 3, 4, 5).

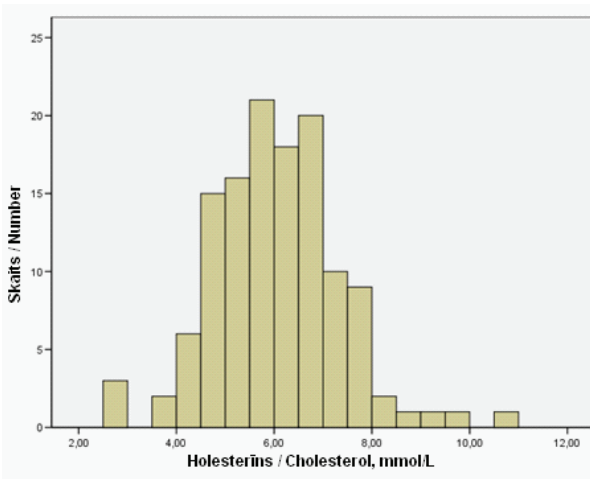


Figure 3. The level of cholesterol
Holesterīna līmenis

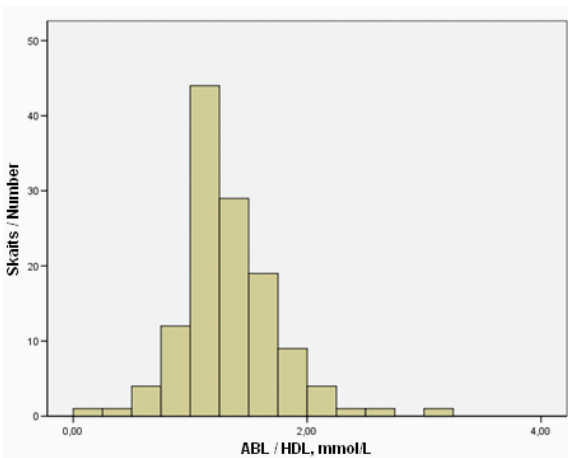


Figure 4. The level of HDL
Augsta blīvuma holesterīna līmenis

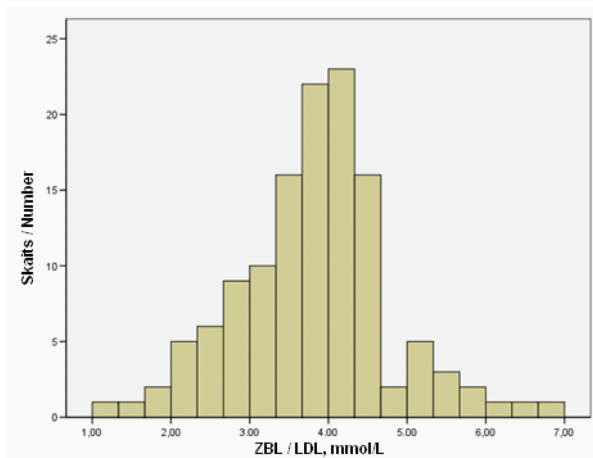


Figure 5. The level of LDL
Zema blīvuma holesterīna līmenis

The level of triglycerides. A recent meta-analysis found that hypertriglyceridemia was an independent risk factor for coronary heart disease (CHD). The level of triglycerides in our patients in comparison with the normal reference interval of triglycerides (0.55–1.9 mmol/L) is shown in Figure 6.

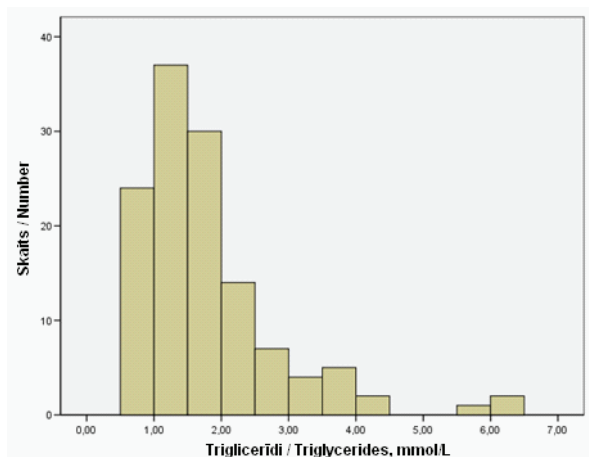


Figure 6. The level of triglycerides
Triglicerīdu līmenis

Discussion

Figure 3 shows that the level of cholesterol (3.9–6.0 mmol/L) is normal just in 50.8% (64) of the respondents. In 40.2% (62) of the respondents it is higher.

The level of triglycerides is normal in 68.25% (86) of respondents, above the normal rate – in 31.75% (40) of the respondents.

A large part of patients with hypertension evaluate their quality of life as medium or low. 19.8% answered that they frequently had disturbance of daily activities, 5.6% regularly had disturbance of daily activities, but 9.5 % of the respondents felt so bad they could not work.

51.6% of the respondents reported that they sometimes had problems with their nervous system, 19% reported having problems frequently, and 7.1% of the respondents usually were very irritable.

GPs are the first persons who talk to patients about their state of health, about family habits, addictions, physical activities, ask the patient what they are expecting from the doctor and whether they are ready to collaborate with the GP during treatment.

The greatest challenge of a GP during the first visit is to draw patients attention to his/her main health problem, talk to the patient about the possibilities and need to change his/her lifestyle, and only then discuss treatment of hypertension.

Conclusions

Examination of 154 hypertension patients demonstrated that a large number of patients are overweight and suffer from obesity, 50% of the patients have elevated levels of cholesterol. 54.8% of the respondents never do physical activities, 25.4% do very rarely, 11.9% sometimes, 7.9% – 1 to 2 times a week (but notice that the average age of the patients is 63.1 years, they come from rural area, and usually their daily activities are combined with physical work).

General practitioners are the first who talk to patients and their families about the importance of preventive measures early in life – physical activities in the family, at school; GPs also assess the socioeconomic situation in a family and help to choose the best way to implement preventive measures, find stimulation that makes patients think about their health. Hence, GPs play an important role in influencing the patients' lifestyle. GPs never administer treatment in isolation, they assess all the risk factors – smoking, blood pressure, alcohol consumption, diabetes mellitus, and other chronic diseases as well as the family history.

The benefits of treatment must be evaluated in the light of the cost and imposition of diets and medicine taking.

References:

1. Hollenberg Steven M., MD, Walker Tracy, MD. Cardiology in Family Practice. 2006, 105–110.
2. Longmore Murray, Wilkinson Ian B., Rajagopalan Supraj R. Oxford Handbook of Clinical Medicine, Sixth Edition. 2004, 140–142, 676–677, 704–705, 714–715.
3. Beers Mark H., Porter Robert S., Jones Thomas V., Kaplan Justin V., Berkwitz Michael. The Merck Manual of Diagnosis and Treatment. Eighteenth Edition. 604–607, 1305–1307.
4. Marshall Martin, Campbell Stephen, Hacker Jenny, Roland Martin. Quality Indicators for General Practice. 2003, 22–25, 46–53.
5. Boelen Charles, Haq Cynthia, Hunt Vincent, Rivo Marc, Shahady Edward. Improving Health Systems: The Contribution of Family Medicine. 2002, 37–46.
6. Yearbook of Health Care Statistics in Latvia, 2007, 11, 25, 31.
7. Public Health Analysis in Latvia. 2004, 32–33.
8. South-Paul Jeannette E., Matheny Samuel C., Lewis Evelyn L. Current Diagnosis and Treatment in Family Medicine. 2004, 231–252, 411–423.

Kopsavilkums

Latvijā attīstoties ģimenes medicīnai, aktuāls kļūst jautājums par ģimenes ārsta kā speciālista lomu pacientu aprūpē. Publikāciju dati liecina, ka šī problēma ģimenes medicīnas attīstības pirmsākumos ir bijusi aktuāla lielākajā daļā valstu. Pasaules pētījumu dati rāda, ka 70–80% pacientu aprūpi veic ģimenes ārsti, un tas liecina par šīs specialitātes stabilitāti.

Lai izvērtētu ģimenes ārsta nozīmi savā nozarē, tika veikts pētījums, kurā iesaistīti 154 hipertensijas pacienti no viena Latvijas lauku rajona. Pacientiem tika veikti fizikālie (EKG, svara, auguma mērījumi) un laboratoriskie izmeklējumi (asins analīzes, holesterīns un tā frakcijas, triglicerīdi), kā arī izdalītas aptaujas anketas ar jautājumiem par slimības anamnēzi un pacientu dzīves kvalitāti. Iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar vidējiem rādītājiem Latvijā un Eiropas valstīs. Vairumam pacientu tika konstatēts svara palielinājums, holesterīna līmeņa paaugstināšanās, daudzi pacienti maz nodarbojas ar sportu.

Darba nobeigumā apstiprināta izvirzītā hipotēze par ģimenes ārsta lomu un iespējām veikt profilaktiskos pasākumus, kā arī ietekmēt un uzlabot hipertensijas pacientu dzīves kvalitāti.

Atslēgvārdi: hipertensija, kardiovaskulārās slimības, riska faktori, holesterīns, ķermeņa masas indekss.

Summary

Physical and laboratory examinations of 154 hypertension patients in a rural area in Latvia revealed that a large number of patients are overweight and suffer from obesity, 50% of the patients have elevated levels of cholesterol. 54.8% of the respondents never do physical activities, 25.4% do very rarely, 11.9% sometimes, 7.9% – 1 to 2 times a week. General practitioners are the first who talk to patients and their families about the importance of preventive measures early in life – physical activities in the family, at school; GPs also assess the socioeconomic situation in a family and help to choose the best way to implement preventive measures, find stimulation that makes patients think about their health. Hence, GPs play an important role in influencing the patients' lifestyle. GPs never administer treatment in isolation, they assess all the risk factors – smoking, blood pressure, alcohol consumption, diabetes mellitus, and other chronic diseases as well as the family history.

Nosocomial Infections Etiology of Surgical Site Infection *Nozokomiālās infekcijas. Brūču infekcijas izraisītāji*

Aija Žileviča^{1,2}, Rita Treimane²

¹University of Latvia, Faculty of Medicine, 1a Šarlotes Str., LV-1001, Rīga, Latvia

E-mail: aija.zilevica@tos.lv

<http://www.lza.lv/scientists/zilevica.htm>

² Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia

The infections most commonly acquired in hospitals are urinary tract infections, followed by surgical site infection, which is the second most common nosocomial syndrome among hospitalized patients and a significant public health problem worldwide. Infections caused by multiresistant microorganisms are of special concern because of the treatment difficulties.

1,117 cultures of different gram-positive and gram-negative microorganisms were isolated from clinical samples. The leading agents were *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, and other coagulase-negative *staphylococci*. Methicillin resistance among *S. aureus* was low, whereas it exceeded 50% in CoNS. From Gram-negative bacteria, representatives of the family *Enterobacteraceae* and non-fermenting rods from genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were isolated in similar amounts. ESBL producers among *E. coli* and *K. pneumoniae* were not registered. Vancomycin-resistant *Enterococcus* was not identified.

Keywords: nosocomial infections, hospital-acquired infections, healthcare-associated infections, Gram-positive and Gram-negative microorganisms, methicillin resistance, coagulase.

Introduction

Nosocomial infections (hospital-acquired infections or healthcare-associated infections (HCAI)) are a major source of morbidity and mortality today. Annually, 5–25% (depending on the country) of patients admitted to acute care hospitals acquire an infection that was neither present nor incubating on their admission.

HCAI represent an important worldwide public health problem and are of increasing interest not only for medical staff but also for the general public and politicians. HCAI pose medical as well as financial and psychological problems (14, 15, 17, 18, 20).

The most frequent types of infection in hospitals occur in the urinary tract, bloodstream, chest, and in surgical wounds.

Surgical site infection (SSI) is the second most common (after urinary tract infections) nosocomial infection among hospitalized patients. The reported SSI rates vary from 2.8 to 20%, depending on the hospital characteristics, patient

characteristics, and surgical procedures. Even antibiotic prophylaxis does not always reduce the occurrence of SSI (2, 5, 7, 10).

Almost any microbe can cause a hospital-acquired infection. HCAI are caused by a great variety of different Gram-positive and Gram-negative microorganisms, mainly opportunists. The pattern of hospital-acquired infections has changed over the years, reflecting advances in medicine and the development of antimicrobial agents. One of the most prominent features of nosocomial infections is polyresistance to antimicrobials. So, they, particularly those caused by multiresistant microorganisms, which are difficult to treat, are one of the main causes of concern for modern medicine all over the world (2, 4, 5, 6, 7).

The aim of the present study was to assess the frequency of healthcare-associated surgical site infections caused by different Gram-positive and Gram-negative microorganisms in a surgical hospital with a special emphasis on Gram-positive microorganisms.

Materials and Methods

The study was carried out during 2003–2006 at the Hospital of Traumatology and Orthopaedics, in Rīga, Latvia. Samples from patients with hospital-acquired purulent surgical site infections were examined. Most of the cultures were isolated from wounds, skin, abscesses, indwelling artificial devices, and joints. Culture of the samples was performed by conventional methods. The BBL Crystal Gram-positive and Gram-negative ID System (Becton, Dickinson) was used for identification of isolates at the species level. Resistance to a panel of antimicrobials was tested by the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards. Methicillin resistance in *Staphylococci* was confirmed by the agar screening method on agar plates supplemented with 6 mg/ml oxacillin. The presence of the *MecA* gene was tested by the PCR technique. As complementary tests, the E-test (*AB Biodisk*) and Slidex MRSA (*Bio Merieux*, France) reaction, detecting the production of PBP2a encoded by the *MecA* gene, were used (16, 20). In some experiments, Chromagar MRSA was used.

For detection of production of extended-spectrum beta lactamases (ESBL), we systematically screened all isolated *Enterobacteriaceae* strains. The mini API ATB Expert system was used for screening. For confirmation, the following methods were applied:

1. A double-disk synergy test as suggested for *Enterobacteriaceae*. We used ceftazidime disk 30 µg (CAZ), ceftazidime/clavulanate 30/10 µg (CAZ/CL) and cefotaxime 30 µg (CTX), cefotaxime/clavulanate 30/10 µg (CTX/CL).
2. E-test. For E-test, ceftazidime/ceftazidime + clavulanate and cefotaxime/cefotaxime + clavulanate (AB Biodisk) were used (14, 16, 17).

Results and Discussion

During the years 2005–2006, 1,117 cultures were isolated (556 and 561, respectively) from 1,484 clinical samples. The leading etiological agents of SSI were gram-positive microorganisms.

The ratio of Gram-positive and Gram-negative flora isolated from SSI in 2005 and 2006 was the following: in 2005, altogether 388 cultures of Gram-positive microorganisms (79.67%), and only 99 cultures (20.33%) of Gram-negative microorganisms were isolated. The results in 2006 were similar – altogether 429 cultures of Gram-positive (76.47%), and 132 cultures (23.53%) of Gram-negative microorganisms were isolated.

The results demonstrate that the situation was rather stable in the two years.

The analysis of Gram-positive microorganisms revealed the leading role of *Staphylococci*, both coagulase-positive and coagulase-negative (CoNS)

In total 220 strains of *S. aureus* were isolated from SSI in 2005. It is 56.7% of all Gram-positive cultures. 141 culture (36.34%) were identified as coagulase-negative *Staphylococci*, 27 cultures (6.96%) as other Gram-positive microorganisms.

In 2006, 202 cultures (47.08%) of *S. aureus* were isolated, 155 cultures (36.3%) of CoNS and 72 cultures (16.62%) of other Gram-positive microorganisms were registered.

From the 220 cultures of *S. aureus* isolated in 2005, 8 were methicillin-resistant, whereas from the 220 cultures isolated in 2006, 12 were methicillin-resistant.

S. aureus is a major cause of hospital-acquired infections for several decades worldwide. Methicillin-resistant *S. aureus* has spread since the late 1970s. Due to its polyresistance, infections caused by MRSA lead to substantial morbidity and mortality as well as high healthcare costs (1, 3, 11, 16, 20).

No outbreaks of the MRSA infection in our hospital were registered. Bloodstream infection caused by MRSA was documented in 1 patient in 2006. No bacteremia caused by MRSA was previously detected.

Coagulase-negative *Staphylococci* were frequently isolated. The leading agent was *S. epidermidis* – in 2006 *S. epidermidis* made up 56.03% of all coagulase-negative *Staphylococci*. The situation in the previous three years was rather similar – in 2005, *S. epidermidis* made up 56.0% of CoNS, in 2004 – 55.05%, in 2003 – 64.0%.

Concerning the other CoNS, the results are the following (the information of the year 2006 is presented; in brackets there are data from the years 2005, 2004, 2003):

S. haemolyticus – 14.18 % (14.18 %, 14.1%, 11.2%).

S. saprophyticus – 5.0% (5.7%, 5.98%, 2.8%).

S. hominis – 10.2 % (12.2%, 7.86%, 8.4%).

S. capitis – 4.1 %, (2.1%, 6.74 %, 10.5 %).

S. warneri – 2.9 %, (0.7%, 5.62%, 3.5%).

S. simulans – 2.9 % (3.5%, 2.24%, 0.7%).

Less frequently, cultures of *S. intermedius*, *S. vitulinus*, *S. cohnii*, *S. felis*, *S. saccharolyticus* were isolated.

The average methicillin resistance among CoNS was more than 50%, being especially high in *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*.

In total, the incidence rate of methicillin resistance among CoNS in the years 2005 and 2006 was 53.9% and 51.23%, respectively.

Other Gram-positive organisms were rarely isolated. The following species are *Enterococcus faecalis* (2.9%), *Enterococcus faecium* (2.6%), *Streptococcus agalactiae* (1.8%), *Corynebacterium spp.* (0.7%), *Lactococcus spp.* (0.7%), *Micrococcus spp.* (1.1%), etc. Vancomycin-resistant *Enterococci* were not registered.

Over the past 25 years, Gram-positive infections have become a serious clinical problem because of an unrelenting increase in antimicrobial resistance. The emergence of pathogens such as methicillin-resistant *staphylococci* and vancomycin-resistant *enterococci* has had a significant impact on the treatment of diseases and created a substantial economic burden.

S. aureus causes a wide spectrum of infections – skin/soft tissue infections, bone/joint infections, prosthetic valve, and other infections (8, 9, 12, 20).

Coagulase-negative *Staphylococci*, particularly *S. epidermidis*, the most frequently isolated member of the CoNS group, are involved in catheter-related and bloodstream infections, infections of the ear, nose, throat, eye, etc (13, 19).

From Gram-negative microorganisms causing SSI, mainly non-fermenting rods and representatives of the family *Enterobacteriaceae* were isolated

From the family *Enterobacteriaceae*, the most frequently isolated were *Enterobacter spp.* (16.2%), followed by *Klebsiella spp.* (10.1%), *E. coli* (8.1%) and *Serratia*, *Morganella*, *Citobacter spp.*

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers among *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* were not registered.

In the 2 years, there had been a tendency for the number of isolates belonging to non-fermenting rods to increase in our hospital – from 48.48% in 2005 to 59.1% in 2006. The leading agents were *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter baumannii*. Their ratio changed insignificantly – 52.9% and 41.2% in 2005, and 48.7% and 43.5% in 2006, respectively.

Changes in the epidemiology of non-fermenting Gram-negative rods, especially *A. baumannii*, have been witnessed in recent years in many countries. The infections caused by these microorganisms have become increasingly common among critically ill patients in intensive care units (ICU) (4, 6). The main problem is polyresistance.

Conclusions

In the studied hospital, HCAI surgical site infections were caused mainly by Gram-positive microorganisms – the leading agents were *Staphylococcus aureus*, followed by coagulase-negative *Staphylococci* *S. epidermidis*, *S. haemolyticus a.o.*

Methicillin resistance among *S. aureus* was low, and outbreaks were not registered. Methicillin resistance among CoNS was over 50%.

Gram-negative agents of SSI, representatives of the family *Enterobacteriaceae*, and non-fermenting genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were registered in similar amounts.

ESBL producers among *E. coli* and *K. pneumoniae* were not documented. Vancomycin-resistant *Enterococci* were not identified.

Acknowledgements

This study was supported by the Projects No. 04. 1034 and 06.0035.11.1 of the Latvian Council of Science.

References

1. Berzina D., Grave I., Balode A. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* isolated in Pauls Stradins Clinical University Hospital. 7th Nordic-Baltic Congress on Infectious Diseases, Rīga. Abstract Book, 2006, 43.
2. Bratzler DW, Houck PM. Surgical Infection Prevention Guidelines. *Clin Infect Dis* 2004, 38, 1706–1715.
3. Cunha BA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11 (4), 33–42.
4. Da Silva G, Dijkshoorn L, Van der Reijden T, Van Strijen B, Duarte A. Identification of Widespread, Closely Related *Acinetobacter Baumannii* Isolates in Portugal as a Subgroup of European Clone II. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13 (2), 190–195.
5. Emmanuel J. C. Surgical Techniques, Prophylaxis. In: *Surgical Care at the District Hospital*. Wtto, Geneva, 4 (10), 2004, 11.
6. Falagas ME, Karveli EA. The Changing Global Epidemiology of *Acinetobacter Baumannii* Infections: a Development with Major Public Health Infections. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13 (2), 117–119.
7. Fehr J, Hatz C, Soka I, Kibatala T, Urassa H, Battegay M, Jeffrey Z, Smith T, Frei R, Widmer A. Antimicrobial Prophylaxis to Prevent Surgical Site Infections in a Rural Sub-Saharan Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (12), 1224–1227.
8. Finch R. Gram-positive Infections: Lessons Learnt and Novel Solutions. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (8), 3–8.
9. Humphreys H, Smyth ETM. Prevalence Surveys of Health-care Associated Infections: What Do They Tell Us, if Anything. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (1), 2–4.
10. Ligan-Garcia M., Garcia-Caballero J., Vegas A. Risk Factors for Surgical-wound Infection in General Surgery: a Prospective Study. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997, 18 (5), 310–315.
11. Schito GC. The Importance of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (1), 3–8.
12. Tattevin P, Arvieux C, Michelet C, What is the Place of Teicoplanin and Linezolid in the Treatment of Prosthetic Joint Infections? *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (12), 1241–1242.
13. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus Epidermidis* Infections. *Microbes and Infection* 2002, 4, 481–489.

14. Žileviča A. Hospital-acquired and community-acquired uropathogens; modelling of infection. *Bioautomation*, 3, 63–67.
15. Zilevica A., Paberza R. Etiological Agents of Nosocomial Urinary Tract Infections. *Acta Universitatis Latviensis*, 694, 2006, 136–144.
16. Zilevica A., Tracevska T. Staphylococcal Infections in a Surgical Hospital. *Acta Universitatis Latviensis*, 694, 2006, 145–153.
17. Zilevica A., Viesturs U. Modelling of the Etiological Structure of Urinary Tract Infections. Proceedings of the Conference Bioprocess Systems BioPS'05, 25–26 October 2005, Sofia, Bulgaria, III.1–III.6.
18. Zilevica A., Treimane R., Viesturs U. Etiological agents of healthcare-associated surgical site infections. *Bioautomation 2007*, In publishing.
19. Weinstein R. A. Device-related Infections. *Healthcare Epidemiology* 2001, 33, 1386.
20. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillinresistance in mecA-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007, 33, 4, 408–412.

Kopsavilkums

*No klīniskā materiāla paraugiem kopā izdalītas 1117 gram-pozitīvu un gram-negatīvu mikroorganismu kultūras. Galvenā bija gram-pozitīvā mikroflora. Visbiežāk sastopamais brūču infekcijas izraisītājs bija *Staphylococcus aureus*, kā arī koagulāzes negatīvie stafilokoki *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* u. c. Meticilīna rezistence *S. aureus* celmos bija zema, bet starp koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem tā pārsniedza 50%.*

Vankomicīna rezistentie enterokoki netika konstatēti.

*No gram-negatīvajām baktērijām kā brūču infekcijas ierosinātāji visbiežāk bija sastopami *Enterobacteriaceae* dzimtas pārstāvji un divas nefermentējošās ģintis *Pseudomonas* un *Acinetobacter*. Paplašinātā spektra beta laktamāžu produkcija netika konstatēta.*

**Staru terapijas komplikāciju attīstība pēc krūts vēža
ārstēšanas: radiobioloģiskie aspekti**
*Development of Radiation Therapy Complications after
Breast Cancer Treatment: Radiobiological Aspects*

Olga Utehina

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Rīgas Stradiņa universitāte; Latvijas Universitāte
E-pasts: olgautehina@mits.lv

Sergejs Popovs

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Rīgas Tehniskā universitāte; Latvijas Universitāte
E-pasts: sergey.popov@aslimnica.lv

Dace Purīna

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Latvijas Universitāte
E-pasts: dace.purina@aslimnica.lv

Lāsma Koškina

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Latvijas Universitāte

Ilga Vēvere

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Latvijas Universitāte
E-pasts: ilga.vevere@aslimnica.lv

Dzintars Emziņš

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Latvijas Universitāte
E-pasts: dzintars@apollo.lv

Juris Bērziņš

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta 4, Rīga, LV-1079
Latvijas Universitāte
E-pasts: juris.berzins@aslimnica.lv

Tā kā krūts vēzis tiek laikus atklāts, pieaug I un II stadijas krūts vēža pacientu skaits, un tas ļauj prognozēt lielu dzīvildzi šīm pacientēm. Tās laikā paspēj attīstīties un manifestēties vēlīnas staru reakcijas. Lai atrastu komplikāciju varbūtības samazināšanas iespējas, ir nepieciešams izprast komplikāciju rašanās radiobioloģiskos mehānismus. Lai nodrošinātu augstu dzīves kvalitāti pēc terapijas beigšanas, ir jāmeklē un jāizstrādā jaunas saudzējošas staru terapijas metodes, kas ļautu nodrošināt līdzsvaru starp nepieciešamo ārstēšanas agresivitāti un neizbēgamām staru terapijas komplikācijām.

Atslēgvārdi: krūts vēzis, staru terapija, komplikācijas, radiobioloģija, orgānsaudzējošā ārstēšana.

Ievads

Latvijā krūts vēzis ļaundabīgo audzēju saslimstības struktūrā ieņem 2. vietu visā populācijā, un sievietēm tas ir konstatēts visbiežāk no visiem ļaundabīgajiem audzējiem. 2006. gadā ar krūts vēzi saslima 1004 sievietes. Kā liecina statistikas dati, saslimstība ar krūts vēzi Latvijā palielinājās no 58,6–100 000 iedzīvotājiem 1995. gadā līdz 81,1–100 000 iedzīvotājiem 2006. gadā. Mirstības ziņā krūts vēža pacientes atrodas 3. vietā – 1995. gadā 27,4 sievietes no 100 000 un 2006. gadā 37,9 sievietes no 100 000. Pēc mirstības pirmajā gadā pēc ļaundabīgā audzēja diagnosticēšanas krūts vēzis atrodas 8. vietā, un šim rādītājam ir tendence mazināties: 2000. gadā – 12,2% un 2006. gadā – 11,7%. Latvijas vēža reģistra uzskaitē 2006. gadā bija 10 490 sieviešu – no tām 29,2% ar krūts vēzi I stadijā un 49,8% ar krūts vēzi II stadijā (1).

Tā kā kopš 1995. gada klīniskajā praksē tiek izmantots mamogrāfijas skrīnings, uzlabojas agrīna krūts vēža diagnostika un ar katru gadu pieaug sieviešu skaits ar krūts vēzi agrīnā stadijā (1).

Pēdējā desmitgadē Latvijā un visā pasaulē krūti saglabājošās operācijas ar visa orgāna ārējo apstarošanu krūts vēža agrīnās stadijās ir standarta metodika, kura, kā pierādīts klīniskos pētījumos, pēc bezrecidīvu perioda ilguma un kopējās dzīvildzes ir ekvivalenta mastektomijai (2, 3, 4).

No 1973. līdz 1980. gadam U. Veronezi (*Veronesi et al.*) veica pētījumu, kura mērķis bija salīdzināt radikālo mastektomiju (pēc Holsteda) ar krūti saglabājošo operāciju ar sekojošo radioterapiju un ķīmijterapiju pēc indikācijām (4). Tika randomizēta 701 sieviete ar krūts vēzi, ne lielāku par 2 cm diametrā. 349 pacientēm veikta radikāla mastektomija un 352 pacientēm – kvadrantektomija ar visas ipsilaterālās krūts apstarošanu. Divdesmit gados kopējā mirstība bija 41,2% radikālas mastektomijas grupā un 41,7% krūti saudzējošas terapijas grupā. Mirstība ar krūts vēzi veidoja attiecīgi 24,3% un 26,1%.

No 1976. līdz 1984. gadam B. Fišers (*Fisher et al.*) veica multiklīnisko pētījumu, kura mērķis bija salīdzināt radikālo mastektomiju (pēc Holsteda) ar krūti saglabājošu operāciju ar sekojošu radioterapiju un ķīmijterapiju pēc indikācijām (3). Tika randomizētas 2163 sievietes ar T_1-T_2 (T_1, T_2 – tumora stadija pēc izmēra) krūts vēzi. 713 pacientēm veikta radikāla mastektomija, 731 pacientei – kvadrantektomija ar visas ipsilaterālās krūts apstarošanu un 719 pacientēm – tikai kvadrantektomija. 10 gadu dzīvildze bija 65% pēc sektorālās rezekcijas ar aksilāro rezekciju un 71%

pēc sektorālas rezekcijas ar aksilāro rezekciju un radioterapiju, bet 68% pēc mastektomijas. Tas pierāda, ka sektora rezekcija ar radioterapiju, spriežot pēc dzīvildzes, ir ekvivalenta mastektomijai, bet dzīvildze pēc sektorālās rezekcijas bez radioterapijas ir mazāka par 6%. Šajā pētījumā tika arī salīdzināta sektorāla rezekcija un sektorāla rezekcija ar radioterapiju pēc recidīvu kumulatīvā biežuma. Visos gadījumos rezekcijas līnijās audzēja šūnu nebija. Lokālais recidīvs parādījās 39,2% gadījumu pēc sektorālās rezekcijas un 14,3% gadījumu pēc sektorālās rezekcijas ar radioterapiju. Šie dati pārliecinoši pierāda radioterapijas ietekmi uz lokālā recidīva parādīšanās biežumu.

H. Bartelinka (*Bartelink et al.*) veiktajā multiklīniskajā pētījumā pēc lokāla recidīvu biežuma tika salīdzinātas patientes, kuras saņēma visas krūts apstarošanu, ar pacientēm, kurām izdarīja visas krūts apstarošanu un papildu dozu uz audzēja ložu. Lokālā recidīva biežums piecu gadu laikā bija daudz augstāks grupā, kura nesaņēma lokālo papildu dozu: 7,3% salīdzinājumā ar 4,3% grupā, kas saņēma papildu dozu (5, 6).

Minētie pētījumi pierāda, ka orgānsaudzējošo operāciju ar sekojošu visas krūts apstarošanu var droši izmantot agrīna krūts vēža gadījumā un lokālā recidīva parādīšanās biežums ir atkarīgs no pievadītās jonizējošā starojuma dozas.

Pēc orgānsaglabājošas operācijas visos gadījumos ir nepieciešama krūts apstarošana. Pēcoperācijas staru terapijas doza veido vidēji 50 Gy, 2 Gy frakcijā, 5 frakcijas nedēļā (standarta frakcionēšanas režīms) (2, 7, 8). Pēc indikācijām dažos gadījumos pacientei pēc visas krūts pēcoperācijas apstarošanas audzēja ložai var tikt pievadīta papildu doza vidēji 16 Gy (6).

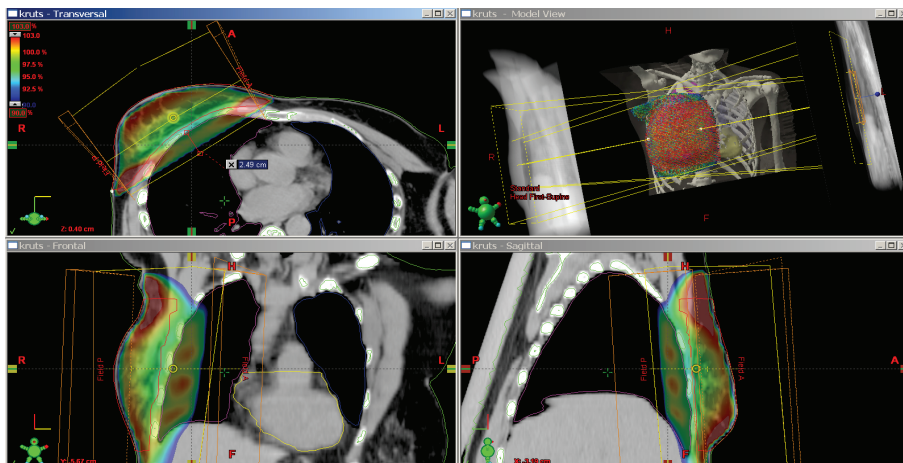
Krūti saglabājošas operācijas apstarojamā apjomā var būt iekļauta ne tikai krūts, bet arī reģionālie limfmezgli pēc noteiktām indikācijām (2).

Parasti staru terapiju veic ar diviem pretējiem tangenciāliem fotonu laukiem (7, 9). Mūsdienās visām pacientēm veic datortomogrāfisku topometriju (7). Ar datorizētas dozu plānošanas sistēmas palīdzību ir izveidotas trīsdimensiju anatomijas rekonstrukcijas, un uz to pamata apzīmē apstarojamos apjomus un kritiskos blakus orgānus. Par staru terapijas mērķa apjomu apzīmē visu ipsilaterālo krūti, ietverot krūškurvja priekšējo sienu līdz ribu priekšējai virsmai (9). Kā standartu lieto trīsdimensiju dozu plānošanu ar individuālo dozu optimizāciju katrai pacientei (2, 7, 9). 1. attēlā ir parādīta krūts vēža staru terapijas klasiskā metodika.

Staru laukā tika iekļauti arī blakus esošie orgāni: plauša un kreisās krūts apstarošanas gadījumā arī sirds. Daļa no šo orgānu apjoma saņem klīniski nozīmīgu jonizējošā starojuma dozu, kura var izraisīt nopietnas staru komplikācijas. Lai atrastu komplikāciju varbūtības samazināšanas iespējas, nepieciešams saprast komplikāciju rašanās radiobioloģiskos mehānismus.

Jonizējošā starojuma iedarbības radiobioloģiskie aspekti

Jonizējošais starojums izraisa izmaiņas šūnās, audos, orgānos un organismā kopumā (10, 11). Jebkuras bioloģiskās sistēmas apstarošana ar jonizējošo starojumu izraisa noteikta efekta attīstību noteiktā secībā. Jonizējošā starojuma iedarbību var sadalīt trīs lielās fāzēs (sk. 2. attēlu) (11).



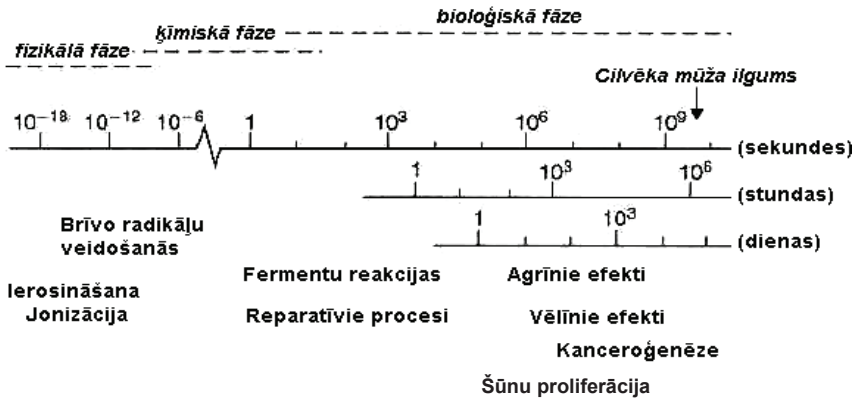
1. attēls. Pēcoperācijas visas krūts apstarošanas kliniskais piemērs ar diviem pretējiem slīpiem laukiem

A clinical example of post-operative whole breast irradiation using tangential fields

Sākumā jonizējošais starojums absorbējas dzīvā objektā, un sākas pirmā – fiziskā fāze. Lādētās daļiņas izraisa atoma jonizāciju un ierosināšanu. Jonizējošā starojuma doza 1 Gy var izraisīt 10^5 jonizāciju katrā šūnā. Fiziskā fāze ilgst ap 10^{-15} sekunžu. Nākamajā – ķīmiskajā fāzē jonizētie un ierosinātie atomi un molekulas veido brīvos radikāļus, kuri reaģē ar šūnas komponentiem straujās ķīmiskās reakcijās. Jonu radikāļu dzīves ilgums ir ap 10^{-10} sekunžu, un brīvo radikāļu dzīves ilgums ir 10^{-5} sekundes.

Bioloģiskajā fāzē iekļauti visi turpmākie procesi, sākot ar fermentatīvām reakcijām pēc palikušiem ķīmiskiem bojājumiem. Šajā fāzē sākas arī bojājumu reparācijas procesi. Lielākā daļa bojājumu veiksmīgi atjaunojas, bet ne visi bojājumi var izraisīt šūnas bojāeju. Cilmes šūnu bojāeja ar turpmāko šūnu skaita samazināšanos izraisa normālo audu bojājuma manifestāciju neilgi pēc apstarošanas (pirmā nedēļa, mēnesis). Sekundārais šūnu bojāejas efekts ir kompensatora paaugstināta šūnu proliferācija, kura notiek gan normālos audos, gan audzējā. Pēc apstarošanas veidojas vēlnās normālo audu reakcijas (fibroze, ādas teleangiektāzijas, muguras smadzeņu un asinsvadu bojājumi). Radiācijas kancerogēneses dēļ pēc ilgāka laika var manifestēties sekundārie audzēji. Bioloģiskā fāze ilgst no dažām minūtēm līdz pat vairākiem gadiem pēc apstarošanas.

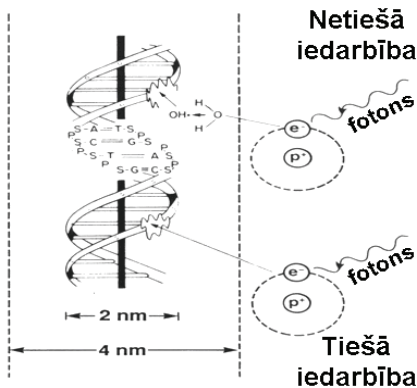
Starojums ietekmē visus šūnas dzīvības procesus, tomēr galvenā loma ir izmaiņām, kas rodas DNS struktūrā un genomā (7, 11), lai gan šūnā ir arī citas struktūras, kuru bojājums var izraisīt šūnas bojāeju (12). Jonizējošais starojums iedarbojas uz šūnas kritiskajām struktūrām tiešā un netiešā veidā (sk. 3. attēlu). Iedarbojoties tieši, lādētās daļiņas izraisa DNS molekulas atomu jonizāciju ar DNS bojājumiem. Iedarbojoties netieši, DNS bojājumus izraisa brīvie radikāļi, kuri parādās pēc jonizējošā starojuma mijiedarbības ar ūdens molekulām.



2. attēls. Jonizējošā starojuma iedarbība uz bioloģisko objektu (11)
Interaction of ionizing radiation with the biological object (11)

Netiešā iedarbībā lādētā daļiņa, virzoties cauri videi, iedarbojas uz atsevišķām ūdens molekulām, izraisot to jonizāciju vai ierosināšanu. Rodas radiolīzes produkti, ieskaitot brīvos radikāļus: e^-_{aq} , H^* , OH^* . Apmēram 2/3 no rentgenstarojuma bojājumiem zīdītāju DNS izraisa OH^* . Izšķīdušā skābekļa klātbūtnē notiek dažu brīvo radikāļu transformācija ($R^* + O_2 \rightarrow RO^*_2$). Šādi radikāļi ir stabilāki un ar ilgāku dzīves laiku, tāpēc spēj selektīvāk reaģēt ar šķīdumā esošajām organiskajām molekulām. Brīvie radikāļi reakcijās ar organiskajām vielām veido ūdeņraža peroksīdu, kas var turpināt reaģēt ar organiskajām vielām: $OH^* + OH^* \rightarrow H_2O_2$. Hipoksijas apstākļos radiojutība var krasi samazināties, savukārt ar skābekli pietiekami apgādātā vidē radiojutība paaugstinās – to sauc par *skābekļa efektu* (11). Skābekļa efekts ir atkarīgs no skābekļa spiediena vidē.

Galvenie bojājumi, kurus izraisa jonizējošais starojums DNS molekulā, ir vienas spirāles bojājums un dubultspirāles bojājums (sk. 4. attēlu) (7, 11, 12). Lielākā daļa



3. attēls. Jonizējošā starojuma tiešā un netiešā iedarbība uz DNS molekulu (12)
Direct and indirect impact of ionizing radiation on DNA (12)

no tiem veiksmīgi atjaunojas specifiskos DNS procesos, bet plaši un neatjaunojami DNS bojājumi izraisa šūnu nāvi. Šūnas radiojutība ir paaugstināta M un G2 šūnas cikla fāzēs, bet viszemākā radiojutība ir S fāzē.



4. attēls. **DNS molekulas vienas spirāles bojājums un dubultspirāles bojājums**
DNA single- and double-strand break

Šūnu bojājumi, ko izraisa jonizējošais starojums, tiek iedalīti trīs kategorijās (11, 12):

- 1) letālie bojājumi – neatgriezeniskie, neatjaunojamie, kas izraisa šūnu bojāeju;
- 2) subletālie bojājumi – var tikt atjaunoti dažu stundu laikā, ja netiks radīti papildu subletāli bojājumi, kas novedīs pie letāliem bojājumiem;
- 3) potenciāli letālie bojājumi – var tikt atjaunoti ar šūnu reparācijas mehānismiem, ja šūna aizkavējas interfāzē un nepāriet dalīšanās fāzē.

Dzīvā organismā pēc jonizējošā starojuma iedarbības sākas atbildes reakcijas gan veselos, gan neoplastiskos audos. Galvenos bioloģiskos faktorus, kuri ietekmē normālo audu un audzēja audu atbildi uz radioterapiju, sauc par „radioterapijas četriem R” (11, 12):

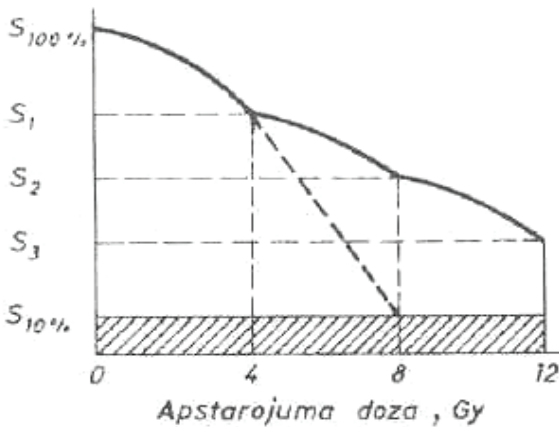
- radioreparācija (*Repair*) – atveseļošanās no apstarojuma, kurā normalizējas šūnu iekšējā vielmaiņa un struktūra;
- repopulācija (*Repopulation*) – kompensatori palielinās šūnu proliferācijas spēja, tādēļ šūnas vairojas;
- reoksigenācija (*Reoxygenation*) – pēc pirmās radiācijas dozas samazinās audzēja šūnu skaits, sevišķi perifērijā, kas savukārt uzlabo audzēja asinsapgādi un skābekļa piegādi audzējā, it sevišķi centrā, kur agrāk bija hipoksija. Pamatojoties uz minēto skābekļa efektu, palielinās audzēja radiojutība;
- sinhronizācija (*Reassortment*) – šūnas, kas izdzīvojušas pēc pirmās radiācijas dozas, dažas stundas atrodas šūnas cikla radiorezistentā fāzē G₀, bet pēc tam sinhronizēti pāriet šūnu ciklā – pret jonizējošo starojumu jutīgā fāzē, kas nākamajā apstarošanas frakcijā ļaus iznīcināt vairāk audzēja šūnu.

Radioreparācija un repopulācija pazemina audu radiojutību, bet reoksigenācija un sinhronizācija paaugstina radiojutību (11, 12).

Atveseļošanās reakcijas (radioreparācija) sākas šūnās tūlīt pēc apstarojuma, tādēļ šūnas var atjaunot subletālus bojājumus. Audzēja šūnas reparācijas mehānismi salīdzinājumā ar veselām šūnām ir izmainīti, un tādēļ ļaundabīgām šūnām ir paaugstināta radiojutība. Tomēr ļaundabīgais audzējs kopumā ir radiorezistents, jo tam ir neviendabīga asinsapgāde un skābekļa nepietiekamība (12).

Staru terapijas dozu parasti sadala daļās (frakcijās), atstājot starp tām zināmu laika intervālu. Šajā laikā šūnās notiek atveseļošanās reakcijas un daļa no pirmā apstarojuma radītajiem bojājumiem likvidējas. Jo ilgāks laiks paiet kopš pirmās apstarošanas, jo pilnīgāk šūnas atveseļojas no radītajiem bojājumiem. Arī starp frakcijām notiek šūnu repopulācija. Paralēli audzēja audos notiek reoksigenācija un sinhronizācija, kas palielina audzēja radiojutību (12).

Tipiskā šūnu izdzīvošanas līkne frakcionētai staru terapijai ir parādīta 5. attēlā (10). Ja šūnas nespēj atjaunoties no subletāla bojājuma, dozas–efekta sakarība tiek attēlota kā taisne, jo bojāgājušo šūnu skaits ir tieši proporcionāls apstarojuma dozai. Ja pēc apstarojuma šūnās notiek reparācijas procesi, tad dozas–efekta līkne izveido “pacēlumu”, kura lielums atkarīgs no reparācijas procesu lieluma. Tas ir raksturīgi, ja radioterapijā lieto frakcionētu apstarošanu. Frakcionētā starojuma efekts ir ievērojami mazāks par vienlaidu apstarojuma efektu, kaut gan apstarojuma doza ir vienāda. Dažos gadījumos terapeitiskais efekts uz audzēju būtu labāks, ja varētu pievadīt lielu dozu vienā reizē, taču tas nav iespējams, jo nepieciešams pasargāt veselos blakus audus un orgānus. Tāpēc radioterapijā pārsvarā izmanto dažādus frakcionēšanas režīmus.

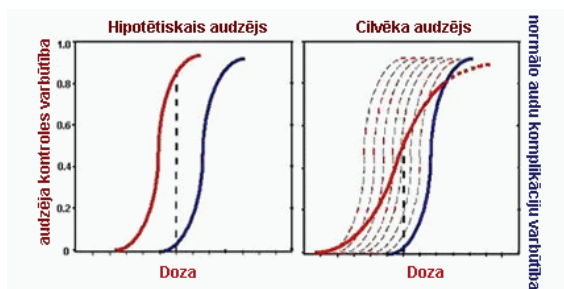
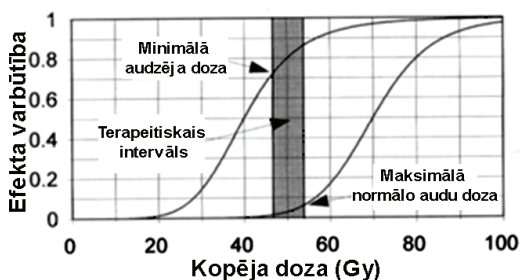


5. attēls. Šūnu populācijas mainība frakcionētas staru terapijas laikā (10)
Cell survival course during fractionated radiotherapy (10)

Radiobioloģija staru terapijā

Staru terapijas mērķis ir pievadīt pietiekami lielu starojuma dozu audzējam, lai to iznīcinātu, pasargājot veselos blakusesošos audus (7). Lai novērtētu veselo audu tolerances resursus un starojuma dozu audzēja iznīcināšanai, izmanto divus parametrus: normālo audu komplikāciju varbūtību (NTCP – *Normal Tissue Complication Probability*) un audzēja kontroles varbūtību (TCP – *Tumor Control Probability*) (7, 11, 12, 13). Par audzēja kontroles varbūtību uzskata visu audzēja cilmes šūnu, kas varētu izraisīt audzēja turpmāko augšanu un bojāejas varbūtību (7, 11, 12). Šo parametru grafisks attēlojums ir dozas–atbildes reakcijas līknes. 6. attēlā ir parādītas dozas–atbildes līknes normāliem audiem un hipotētiska audzēja ideālam modelim. Līkne pa kreisi atspoguļo audzēja šūnu bojāejas varbūtību atkarībā no pievadītās dozas. Līkne pa labi atspoguļo normālo blakus audu komplikāciju varbūtību. Radioterapeitam ir jāizvēlas tāda doza, no kuras iedarbības iet bojā iespējami daudz audzēja šūnu un maksimāli tiek pasargāti veselie blakus audi. Staru terapijā izmanto jonizējošā starojuma dozu terapeitisko intervālu, lai normālo audu komplikāciju varbūtība nepārsniegtu 5% piecu gadu laikā. Visiem normāliem audiem ir savs noteikts jonizējošā starojuma dozas sliekšnis, kuru pārsniedzot, parādās neatgriezenisku staru terapijas komplikāciju attīstības varbūtība (sk. 6. attēlu). Jonizējošo starojuma dozu, kādā neatgriezenisko komplikāciju varbūtība ir klīniski pieņemama, sauc par *tolerances dozu* (TD) (11, 12).

Tik liela atšķirība šajās dozas–atbildes līknēs audzējam un veselīem audiem ir izskaidrojama ar palielināto audzēja radiojutību, kas saistīta ar straujo šūnu dalīšanos un citiem iepriekš minētiem radiobioloģiskiem faktoriem.



6. attēls. **Dozas un atbildes līknes audzējam un normāliem audiem**
Dose-response curves of tumor and normal tissues

Cilvēka audzējā ir šūnu grupas ar dažādu jutību pret jonizējošo starojumu (6. att.). Tāpēc audzēja kontroles varbūtības līkne ir vidējā līkne visām audzēja šūnu populācijas grupām. Šai līknei būs mazāks pacēlums nekā normālo audu komplikāciju varbūtības līknei. Reālā situācijā ar vienādām dozām un normālo audu komplikāciju varbūtībām audzēja kontroles varbūtība vienmēr būs mazāka nekā paredzēts, izmantojot hipotētiskos audzēja modeļus.

Pat izmantojot ļoti precīzas mūsdienu staru terapijas metodes, jonizējošā starojuma iedarbībai tiek pakļauti normālie audi. Blakus esošo normālo audu apjoms, kas saņem ārstniecisku dozu, var pārsniegt audzēja apjomu. Vēl lielāks ir veselo audu apjoms, kas saņem starojuma dozu, kura ir mazāka par ārstniecisko, taču spēj izraisīt staru komplikācijas. Izmantojot staru terapiju vēža ārstēšanai, staru komplikācijas ir neizbēgamas, un galvenais uzdevums ir iespējami samazināt to smaguma pakāpi (7, 9, 11).

Staru terapijas komplikāciju radiobioloģiskie un klīniskie aspekti

Jonizējošā starojuma iedarbību uz normāliem audiem pēc reakcijas parādīšanās laika, attīstības mehānisma un sekām var iedalīt divās kategorijās: *agrīnās reakcijas* un *vēlīnās komplikācijas* (14).

Agrīnās reakcijas vairāk izpaužas ātri atjaunojošos audos, tādos kā āda, kuņģa-zarnu trakts, kaulu smadzenes. Tās parādās vidēji pēc 3–9 nedēļām no staru terapijas kursa sākuma. Agrīnās reakcijas ir pārejošas, to pamatā ir organisma aizsargreakcijas uz šūnu bojāeju (11).

Vēlīnās komplikācijas var parādīties visos normālajos blakus audos – tādos, kas atjaunojas gan ātri, gan lēni (plaušas, muguras smadzenes, galvas smadzenes, nieres). Vēlīnās komplikācijas sāk parādīties apmēram 90 dienas pēc radioterapijas kursa pabeigšanas, parasti 0,5–5 gadu laikā. Vēlīnās komplikācijas ir neatgriezeniskas (11).

Kā atsevišķu apakšgrupu var izdalīt vēlīnās komplikācijas, kas attīstās pēc īpaši smagām agrīnām staru reakcijām: *sekojošas vēlīnās komplikācijas* (11).

Vēlīno komplikāciju attīstības mehānismi pilnībā nav noskaidroti pat līdz mūsdienām. Ilgus gadus viena no galvenajām teorijām komplikāciju attīstībai bija šūnu teorija – cilmes šūnu bojāeja un to atjaunošanās spēju samazināšanās. Pastāv vie-doklis, ka paralēli šūnu mehānismiem organismā notiek arī humorālas reakcijas – tiek noteiktas iekaisuma mediatoru un citokīnu kaskādes, kas iniciējas uzreiz pēc apstarošanas (15). Šīs teorijas pamatā ir dažādu šūnu populāciju mijiedarbība, kuru izraisa citokīnu un augšanas faktoru ietekme – humorālā teorija. Vēlīno komplikāciju attīstības patofizioloģiskie ceļi dažādos audos atšķiras, bet eksistē daži kopīgi mehānismi. Jonizējošā starojuma izraisīts endotēlija bojājums rada trombu veidošanos, kas savukārt palielina asinsvadu sienīgas caurlaidību un intersticiālo tūsku. Šīs izmaiņas var tikt izraisītas gan tieši, gan ar iekaisuma mediatoriem, kurus ražo makrofāgi vai specifiskās parenhīmas šūnas.

Komplikāciju attīstībai katrā orgānā ir savas īpatnības, kas ir atkarīgas ne tikai no orgāna audu uzbūves, bet arī no tā struktūras (11). Strukturālā tolerance ir atkarīga no šūnu radiojutības un cilmes šūnu spējām uzturēt funkcionālo šūnu populāciju

virs kritiskā līmeņa. Funkcionālā tolerance ir orgāna spēja pildīt savu funkciju, un tā ir atkarīga gan no orgāna uzbūves, gan no šūnu jutības. Katram orgānam un audiem ir gan strukturālā tolerance, gan funkcionālā tolerance.

Staru terapijas komplikāciju smaguma pakāpi var ietekmēt audu apjoms, kas tiek pakļauts jonizējošā starojuma iedarbībai. Tādos gadījumos funkcionālā tolerance ir tieši atkarīga no apstarotā apjoma, taču strukturālā tolerance no tā nav atkarīga. Funkcionālās tolerances atkarību no apstarotā orgāna apjoma sauc par *apjoma efektu* (16).

Funkcionālās tolerances noteikšanai tika ieviests nosacīts orgānu sadalījums pēc to strukturālās uzbūves: *orgāni ar paralēlo uzbūvi* un *orgāni ar virknes uzbūvi*.

Virknes uzbūves orgāna viena apakšelementa inaktivācija var izraisīt visa orgāna funkcijas zaudējumu. Šiem orgāniem eksistē sliekšņa doza, kuru pārsniedzot, iestājas pilna funkcijas zaudēšana. Pie šiem orgāniem pieder muguras smadzenes, *n. opticus*, zarnas.

Paralēlās uzbūves orgāniem maza funkcionālo apakšelementu daudzuma inaktivācija neizraisa orgāna funkcijas zaudēšanu. Funkcijas zaudēšana iestājas, kad tiek inaktivēts kritiskais funkcionālo apakšelementu daudzums. Šiem orgāniem eksistē sliekšņa apjoms, zem kura neattīstās funkcionālais bojājums pat pēc apstarošanas ar augstām dozām. Virs šī sliekšņa bojājumu pakāpes palielināšanās notiek pakāpeniski, līdz ar dozas palielināšanu. Bojājumu smagums ir atkarīgs no funkcionālo apakšelementu daudzuma, ko iznīcina ar jonizējošo starojumu. Komplikāciju attīstības risks ir atkarīgs no dozas sadalījuma visā orgānā, nevis tikai no maziem orgāna apjomiem, kuri saņem lielas dozas.

Krūts apstarošanas gadījumā staru reakcijas var būt ādā, plaušās un kreisās krūts apstarošanas gadījumā arī sirdī (7, 9, 17).

Ādas tolerance ir augstāka par ārstnieciskām dozām, ko lieto krūts vēža ārstēšanā. Pēc 2–3 nedēļām no staru terapijas sākuma ādā parasti attīstās akūtas staru reakcijas, kas izpaužas kā eritēma, pārejošais sausais vai mitrais dermatīts un ādas hiperpigmentācija. Vēlīnās komplikācijas ādā izpaužas kā fibroze, kas var attīstīties pēc 60–65 Gy un teleangiektāzija, kas var attīstīties pēc 55–60 Gy (18).

Plaušas pieder pie vidēji un vēlu reaģējošiem audiem. Jonizējošais starojums izraisa divas dažādas reakcijas – akūto pneimonītu, kas parādās 2–6 mēnešus pēc staru terapijas beigšanas, un fibrozi, kas lēni attīstās vairākus mēnešus vai pat gadus (19). No vēlu reaģējošiem orgāniem plaušas ir visjutīgākās pret jonizējošo starojumu.

Plaušas ir orgāns ar paralēlo strukturālo uzbūvi. Tās ir ļoti jutīgas pret visa orgāna apjoma apstarošanu, bet mazus apjomus var apstarot ar daudz lielākām dozām (18, 20, 21, 22, 23). 7. attēlā shematiski parādīta procentuālā komplikāciju attīstības varbūtība atkarībā no dozas un apstarotā plaušu apjoma (7). Tas izskaidrojams ar funkcionālā apjoma rezervi. Tikai ap 30% no orgāna ir nepieciešams, lai uzturētu atbilstošu elpošanas funkciju normālos fizioloģiskos apstākļos.

Klīniskie dati par plaušu komplikāciju attīstību pēc krūts apstarošanas ir pretrunīgi. S. Makdonalda (*McDonald et al.*) dati parāda, ka rentgenogrāfiskās izmaiņas plaušās ir konstatētas 27–40% pacienšu, bet pneimonīta simptomi manifestējas tikai 0–10% pacienšu (24). T. Rankati (*Rancati et al.*) 28% pacienšu novēroja klīnisko

pneimonītu, un 35% pacienšu bija rentgenoloģiskas izmaiņas (25). Klīniskie dati pierāda staru terapijas komplikāciju attīstību plaušās dažādā smaguma pakāpē pēc krūts vēža staru terapijas.

Doza (Gy)	60	≥ 20%		≥ 75%	
	50	10 - 20%		20 - ≥ 50%	
	40	≤ 10%		≤ 30 - 50%	≥ 50%
	30	≤ 5%		≤ 10 - 20%	20 - 40%
	20	< 5%		≤ 5 - 10%	
	10	≤ 5%			
	0	33%	66%	100%	
	Orgāna apjoms				

7. attēls. Procentuālā komplikāciju attīstības varbūtība atkarībā no dozas un apstarotā plaušu apjoma (7)

Probability of complication development in lungs in relation to dose and irradiated volume, % (7)

Akūtas reakcijas sirdī parasti gaidāmas no perikarda, tās izpaužas kā dažāda smaguma pakāpju perikardīti. Šīs komplikācijas parādās diezgan ātri. Kreisās krūts vēža staru terapijas gadījumā sirds apjoms, kurš tiek iekļauts apstarojamā apjomā, nav tik liels, lai izraisītu nopietnu perikardītu vai pankardītu. Šajā gadījumā nozīmīgākas ir vēlīnās komplikācijas, kuras var izraisīt koronārās sirds slimības (KSS) attīstību. Histopatoloģiski vēlīnās komplikācijas miokardā raksturo dominējoša difūza intersticiālā un perivaskulārā fibroze, kā arī kardiomiocītu daudzuma samazināšanās. Jonizējošais starojums izraisa kapilāru endoteliālo šūnu latentu bojājumu; nopietnas izmaiņas miokarda kapilāros, ieskaitot endoteliocītu membrānas nevienādīgumu/nestabilitāti, citoplazmas izbrīšanu, trombozi un sienīgas plīsumu (26). 8. attēlā shematiski parādīta procentuālā komplikāciju attīstības varbūtība atkarībā no dozas un apstarotā sirds apjoma (7).

Doza (Gy)	60	5 - 25%	25 - 40%	> 40%	
	50	5 - 10%	10 - 25%	25 - 40%	
	40	5 - 15%		15 - 25%	
	25	≤ 5%	5 - 15%		
	20	< 5%			
		0	33%	66%	100%
	Orgāna apjoms				

8. attēls. Procentuālā komplikāciju attīstības varbūtība atkarībā no dozas un apstarotā sirds apjoma (7)

Probability of complication development in heart in relation to dose and irradiated volume, % (7)

Krūts vēža kombinētas ārstēšanas gadījumā gan vienlaicīga, gan sekojošā staru-
ķīmijterapija krasi palielina staru komplikāciju attīstības ātrumu un smaguma pakāpi
(27, 28).

Pēdējā laikā parādījušies dati par palielinātu KSS un akūta miokarda infarkta
(AMI) biežumu krūts vēža pacientēm, kuras saņēmušas staru terapiju (29, 30). Visā
pasaulē notiek kā prospektīvie, tā arī retrospektīvie pētījumi ar mērķi noskaidrot pēc-
operācijas staru terapijas ietekmi uz sirds slimības attīstību (31).

Skandināvijas pētnieku dati parāda paaugstinātu KSS biežumu pacientēm, kuras
saņēma pēcoperācijas apstarošanu, salīdzinājumā ar pacientēm, kurām tika veikta
tikai ķirurģiskā ārstēšana. Ilgtermiņā novērotām pacientēm pierādīts, ka starojuma
izraisītā KSS relatīvais risks ir 3,2 (32, 33).

Mičiganas Universitātē ASV tika veikts retrospektīvais pētījums, kura ietvaros
analizēja veselības stāvokli 834 sievietēm, kuras saņēma pēcoperācijas staru terapi-
ju krūtīj laika periodā no 1983. līdz 2000. gadam (34). Vidējais novērošanas laiks
bija 6,8 gadi, vidējais sieviešu vecums – 55,7 gadi. Vismaz viens AMI bija 1,4%
gadījumu un 2,4% gadījumu bija vismaz viens AMI vai KSS, kuru ārstēšanai ne-
pieciešama ķirurģiskā iejaukšanās. Šie dati tika salīdzināti ar standarta populāci-
jas datiem. Daudzfaktoru analīzes dati parādīja, ka kreisās krūts vēža pacientēm,
kas saņēmušas staru terapiju, bīstamības attiecība (HR – *hazard ratio*) bija 7,92
($p = 0,049$), piemēram, ar cukura diabētu slimām sievietēm HR bija 4,42 ($p = 0,03$)
un aktīvām smēķētājām HR bija 6,95 ($p = 0,004$). Autori secināja, ka, neņemot vērā
nelielus absolūtus skaitļus, risks saslimt ar KSS un AMI ir statistiski ticami palieli-
nāts pacientēm, kuras saņēma staru terapiju kreisās krūts vēža ārstēšanai. Tāpēc ir
svarīgi veikt pētījumus, kas vērsti uz jaunu staru terapijas metodiku izstrādāšanu un
kas ļautu samazināt KSS risku.

Pagaidām pārliecinoši netika parādīti dati, kāda ir kreisās krūts apstarošanas
ietekme uz KSS progresiju sievietēm, kuras slimo ar KKS, pirms vēža diagnozes
noteikšanas. Interesants pētījums tika veikts Merilendas Universitātē ASV (35). Tika
retrospektīvi analizēti 41 sievietes dati, šīs sievietes no 1980. līdz 1994. gadam sa-
ņēma staru terapiju pēc orgānsaudzējošas I un II stadijas krūts vēža operācijas. Tika
salīdzināti dati pacientēm ar kreisās un labās krūts vēzi. Vidējais novērošanas ilgums
bija 9,6 gadi. Pēc analīzes datiem, vienīgais parametrs, kurš statistiski nozīmīgi at-
šķīrās, bija mirstība ar KSS. Pacientēm ar kreisās krūts vēzi tā bija 49% un ar la-
bās – 9% ($p = 0,08$). Šie dati pārliecinoši pierādīja staru terapijas nozīmīgo ietekmi
uz jau esošas KSS gaitu.

T. Rankati *et al.* veica multiklīnisko retrospektīvo pētījumu ar mērķi noskaidrot,
kāds ir risks saslimt ar AMI pēc krūts vēža staru terapijas (25). Tika analizēti 6680
sieviešu dati, kuras ārstējās Ontārio, Kanādā no 1982. līdz 1988. gadam. Pacientes
iedalīja trīs grupās: ar elektrokardiogrāfijas metodi un asins enzīmu noteikšanu pie-
rādīts AMI; ar AMI diagnozi, kas noteikta pēc nāves; bez AMI. Pētījuma mērķis
bija noteikt riska faktoros, kas izraisa AMI pirmajām divām grupām. 191 sievietei
AMI diagnoze tika verificēta, un 92 AMI diagnozes tika noteiktas pēc nāves. Tika
atrasti trīs parametri, kas statistiski ticami palielina AMI risku: kreisās krūts vēzis
(HR = 1,96), parasternālo limfmezglu zonas apstarošana ar taisno priekšējo lauku,
kas ietver sirdi (HR = 1,9), un papildu doza uz audzēja ložu, kas atrodas mediālos

kvadrantos vai centrāli ($HR = 1,02/cm^2$ no papildu dozas lauka platības). Autori secināja, ka AMI attīstības risks pēc staru terapijas atkarīgs no tā, kuras krūts vēzis tas ir, no papildu dozas lauka platuma kreisās krūts gadījumā un no parasternālās limfmezglu zonas apstarošanas.

Dati parāda, ka sievietēm ar kreisās krūts vēzi pēc staru terapijas ir augsta KSS un AMI attīstības riska varbūtība.

Sakarā ar krūts vēža savlaicīgu atklāšanu pieaug I un II stadijas krūts vēža pacientu skaits, kas ļauj prognozēt ilgu dzīvildzi šīm pacientēm; tās laikā iespējams attīstīties un manifestēties vēlīnas staru reakcijas (36). Tāpēc ir svarīgi atrast jaunas staru terapijas metodes, kas ļautu pilnīgi izvairīties no staru terapijas komplikācijām vai būtiski samazināt tās.

Secinājumi

Pēdējos gados pieaug agrīno stadiju krūts vēža pacientu skaits. Biežāk izmanto orgānsaudzējošas operācijas ar staru terapiju. Agrīno stadiju krūts vēža pacientēm ir sagaidāma liela dzīvildze, kuras laikā var attīstīties un klīniski parādīties smagas vēlīnās staru komplikācijas. Tas var negatīvi ietekmēt sievietes dzīves kvalitāti un dažos gadījumos pat kļūt par nāves cēloni. Ārstēšanas mērķis ir ne tikai izārstēt pacienti no vēža, bet arī nodrošināt augstu dzīves kvalitāti pēc terapijas pabeigšanas. Ir jāmeklē un jāradā jaunas saudzējošas staru terapijas metodes, kas ļautu nodrošināt līdzsvaru starp nepieciešamo ārstēšanas agresivitāti un tās izraisītām komplikācijām.

Literatūra

1. Atskaite onkoloģijā, Valsts SIA „Latvijas Onkoloģijas centrs”, Latvijas Republikas Veselības ministrija, 2006.
2. Budach W, Dunst J, Feyer P, Haase W, Harms W, Sautter-Bihl ML, Souchon R, Wenz F. Mannheim Radiotherapie des Mammakarzinoms (DEGRO 2005). Strahlentherapie und Onkologie, Feb 2006; 182 (I): 1–28.
3. Fisher B, Anderson S, Bryant J et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002, 347: 1233–1241.
4. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002, 347: 1227–1232.
5. Bartelink H, Horiot J-C, Poortmans P, Struikmans H et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Breast Cancer Groups. Recurrence Rates after Treatment of Breast Cancer with Standard Radiotherapy with or without Additional Radiation. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1378–1387.
6. Antonini N, Jones H, Horiot JC et al. Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881–10882. *Radiother Oncol* 2007, 82: 265–271.
7. Perez CA, Brady LW, Halperin EC et al. Principles and Practice of Radiation Oncology, Fourth Edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2004, 2527 p.

8. Bethesda handbook of clinical oncology. Abraham J, Gulley JL, Allegra CJ (Eds.) 2nd ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2005, 687 p.
9. Practical essentials of intensity modulated radiation therapy. Chao KSC (Ed.) Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2005, 362 p.
10. Millers A, Rūse I. Vispārīgā radiobioloģija un praktiskā radioekoloģija, Rīga: Latvijas Universitāte, 1995, 313. lpp.
11. Basic clinical radiobiology. Gordon Steel G. (Ed.) London: Arnold, 2002, p. 262.
12. Hall EK. Radiobiology for Radiologist, Fifth Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 588.
13. Brahme A. Optimized radiation therapy based on radiobiological objectives. Semin Radiat Oncol 1999, 9, 35–47.
14. Klīniskā onkoloģija. Baltiņa D. (Ed.) Rīga: Zvaigzne ABC, 1999, 533. lpp.
15. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995, 33: 99–109.
16. Withers HR, Taylor JMG, Maciejewski B. Treatment volume and tissue tolerance. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988, 14: p. 751.
17. Archambeau JO, Pezner R, Wasserman T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995, 31: 1171–1185.
18. Emami B, Lyman J, Brown A et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991, 21: 109–122.
19. Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE. Radiation pathology. New York: Oxford University Press, 2001.
20. Lind PARM, Marks LB, Hardenbergh PH, et al. Technical factors associated with radiation pneumonitis after local ± regional radiation therapy for breast cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002, 52: 137–143.
21. Lingos TI, Recht A, Vicini F et al. Radiation pneumonitis in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991, 21: 355–360.
22. Graham MV, Purdy JA, Emami B et al. Clinical dose-volume histogram analysis for pneumonitis after 3D treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999, 45: 323–329.
23. Kwa SL, Lebesque JV, Theuws JC et al. Radiation pneumonitis as a function of mean lung dose: an analysis of pooled data of 540 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998, 42: 1–9.
24. McDonald S, Rubin P, Phillips TL et al. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring system. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995, 144: 160–169.
25. Rancati T, Wennberg B, Lind P et al. Early clinical and radiological pulmonary complications following breast cancer radiation therapy: NTCP fit with four different models. Radiother Oncol 2007, 82: 308–316.
26. Fajardo LF, Stewart JR. Pathogenesis of radiation-induced myocardial fibrosis. Lab Invest 1973, 29: 244–257.
27. Fajardo LF, Eltringham JR, Stewart JR. Combined cardiotoxicity of adriamycin and x-radiation. Lab Invest 1976, 34: 86–96.
28. Fajardo LF, Eltringham JR, Stewart JR. Experimental radiation-induced heart disease: I. Light microscopic studies. Am J Pathol 1970, 59: 299–316.
29. Borger JH, Hooning MJ, Boersma YLJ, et al. Cardiotoxic effects of tangential breast irradiation in early breast cancer patients: the role of irradiated heart volume. Int J Radiation Oncology Biol Phys. In press.

30. Paszat LF, Vallis KA, Benk VMA et al. A population-based case-cohort study of the risk of myocardial infarction following radiation therapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2007, 82: 294–300.
13. Hoening MJ, Aleman BMP, Van Rosmalen AJM et al. Cause-specific mortality in long-term survivors of breast cancer: a 25-year follow-up study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, 64: 4: 1081–1091. lpp.
32. Host H, Brennhovd IO, Loeb M. Postoperative radiotherapy in breast cancer: long-term results from the Oslo study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986, 12: 727–732.
33. Rutquist LE, Lax I, Fornander T et al. Cardiovascular mortality in a randomized trial of adjuvant radiation therapy versus surgery alone in primary breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992, 22: 887–896.
34. Jagsi R, Griffith K, Koelling T et al. Rates of Myocardial Infarction, Coronary Artery Disease, and Risk Factors in Breast Cancer Patients Treated With Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, 66: Suppl. 3. S106.
35. Gutt R, Hwang W, Solin LJ et al. Cardiac Morbidity and Mortality after Breast Conservation Treatment in Early Stage Breast Cancer Patients with Pre-existing Cardiac Disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, 66: Suppl. 3. S106.
36. Poortmans PA. Bright future for radiotherapy in breast cancer. *Radiother Oncol* 2007, 82: 243–246.

Summary

Due to improvement of early diagnostics of breast cancer, the number of I and II stage breast cancer patients is growing. These patients have excellent survival estimation. During the lifespan of a patient after the therapy, radiotherapy complications can arise and manifest. To find methods for reduction of the probability of complications, it is essential to understand the radiobiological pathways of the induction of complications. To assure a high quality of life after completion of the therapy, it is necessary to investigate and create new methods of breast conserving therapy capable to provide balance between the needed therapeutic effect and complications.

Liver Function as Determined by ^{13}C Methacetine Breath Test Following the Admission of Paclitaxel-based Chemotherapy

Ar ^{13}C metacetīna elptestu noteikta aknu funkcija pacientēm pēc paklitakselu saturošas ķīmijterapijas

Mārcis Leja^{1,3}, Žanete Zvirbule², Agnese Sudraba^{1,2}, Ilva Nakurte¹, Ilze Plinte¹,
Pēteris Mekšs¹, Ivars Tolmanis³, Viesturs Boka², Uldis Vikmanis¹

¹ University of Latvia, Raiņa bulvāris 19, Rīga, e-pasts: cei@latnet.lv

² Riga Eastern Clinical University Hospital, Hipokrāta iela 4, Rīga

³ Digestive Diseases Centre GASTRO, Linezera iela 6, Rīga

The currently used diagnostic methods do not allow prediction of adverse events caused by systemic chemotherapy compounds that are metabolized via liver cytochrome P450 (CYP450) pathways. The current study is aimed to investigate whether the results of ^{13}C methacetine breath test (MBT) are altered by paclitaxel-containing chemotherapy regimen since both substances are metabolized via CYP P450.

Seven female patients (aged 45–66 years) undergoing complex treatment for ovarian cancer were tested by MBT before admission of paclitaxel therapy and during the 1st, 2nd, and 28th day following the therapy. There was no common trend of MBT result dynamics, nor decreased MBT results were observed following paclitaxel treatment in this group of patients. The drawn conclusion is that administration of paclitaxel-based systemic chemotherapy does not alter MBT performance in the majority of patients.

Keywords: chemotherapy, paclitaxel, liver, breath test, methacetine.

Introduction

Administration of systemic chemotherapy is frequently associated with toxic adverse effects, and in most of the cases it is hardly possible to predict the toxicity of the planned therapy in a particular patient. A number of pharmaceuticals being used in systemic chemotherapy may be hepatotoxic; disturbed microsomal liver function by involving cytochrome P450 enzymes is among the most important mechanisms for the development of toxic adverse effects.

Taxanes are among potentially hepatotoxic chemotherapy medications being metabolised via hepatic cytochrome P450 (CYP 450) pathways. The current routinely used diagnostic approaches do not allow predicting toxicity of drugs, including taxanes; therefore, a diagnostic method allowing predicting severe adverse effects or adjusting the dose of the drug for the particular patient would be of clinical importance. The phenotype of CYP 450 or its subtypes may be indicative of the pharmacokinetics of the drug substances used in cancer chemotherapy^{1,2}.

Paclitaxel is a widely used drug for systemic chemotherapy, being used in a number of clinical situations. For ovarian cancer, paclitaxel is included in the first-line medication according to the international guidelines (e.g., ESMO guidelines). Paclitaxel administration is causing hepatic adverse effects in up to 39% of the patients (AST increase – 39%, alkaline phosphatase increase – 36%, grade 3 or 4 GGT increase – 14%); additionally, the drug is responsible for sensory neuropathy in 71%, nausea – 30%, diarrhea – 27%, vomiting – 18%, ECG abnormalities – 60% and alopecia – in 90% of the cases as well as for other adverse effects³.

The terminal half-life elimination period of paclitaxel is 27 hours³. Paclitaxel is metabolized via the liver CYP P450 pathways to minor metabolites, in particular by the CYP3A4 and CYP2C8 primarily to 6- α -hydroxypaclitaxel.

Methacetin, a derivate of phenacetin, is a substrate commonly used in liver breath testing, having demonstrated good correlation to liver fibrosis and *Child-Pugh* staging⁴⁻⁶. Decreased liver breath test results while using methacetin were also found in healthy older age population⁷.

Methacetin is metabolised via the liver CYP P450 pathways, primarily via CYP1A2⁸.

We hypothesized that methacetin metabolism as determined by the ¹³C breath-test may become substantially altered after the admission of paclitaxel since both substances are undergoing CYP450 metabolism.

The Objective

The objective of the study was to perform comparison of ¹³C-methacetin liver breath test (MBT) results before and after the admission of paclitaxel-based cancer chemotherapy.

Patients & Methods

The principle of ¹³C breath-testing

The performance of stable isotope (¹³C) breath-testing is based on the detection of ¹³C-labeled carbon dioxide (¹³CO₂) in the exhaled air after administering ¹³C labeled substrate. The substrate is chosen depending on which enzyme activity is going to be measured, and is expected to be metabolized by the target enzyme. Based on the measurements of ¹³CO₂ in the exhaled air, it is possible to have indirect judgment on the activity of the target enzyme.

A number of different substrates have been used to measure the functional activity of the liver; these could be classified in three major groups depending on the liver function the tests are targeting, i.e., microsomal, cytosolic, or mitochondrial.

Breath-testing applications in oncology

Until recent time, breath test applications have been limited in oncology, in particular in the field of testing the liver functions. A few years ago, Paul Watkins' group in the USA published their results on the erythromycin breath test and doxetaxel (another drug of the taxane family) clearance. Erythromycin (^{14}C -N-methylerythromycin) is a substrate metabolized via CYP 450 (CYP3A4 subtype), similarly to doxetaxel. The authors have demonstrated good correlation between the results of the erythromycin test and clearance of doxetaxel⁹.

More recent studies in oncology have also used erythromycin breath test for CYP 450 3A phenotyping to seek the correlation to CYP3A4 genomic DNA variants in cancer patients¹⁰.

Description of the method

75mg ^{13}C -methacetine (99% ^{13}C enrichment) was administered in a gelatinous capsule after an overnight fast; the measurements of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in the exhaled air were performed by isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry (*IRIS, Wagner Analyzen Technik, GmbH, Germany*) at baseline as well as at 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, and 120 min. intervals after the admission of the substrate. Cumulative ^{13}C dose recovered over 120 min period and expressed as percentage of the total ^{13}C dose administered (CUM 120) was used for comparison between the MBT results.

Patients

Altogether seven female patients (aged 45–66 years) scheduled for paclitaxel based chemotherapy treatment due to ovarian cancer were involved before starting the 1st cycle of chemotherapy. They were tested by MBT before the admission of the therapy as well as on the 1st, 2nd, and 28th day after the administration of the initial therapy, i.e., prior to the 2nd chemotherapy cycle. The administered chemotherapy regimen consisted of paclitaxel (75 mg/m²) and carboplatin (300 mg/m²)

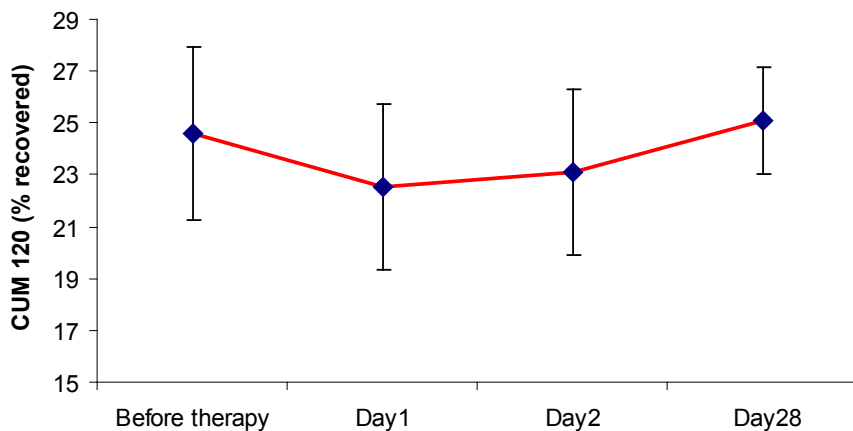
Results

Considerable variations of baseline MBT results were observed in the tested patients (range of CUM 120: 11.8 – 35.8), although only one patient could be diagnosed with pathologically decreased liver function, following the criteria suggested by the manufacturer (CUM 120 – 11.8).

There was no liver disease history reported in the previous disease histories, nor abdominal ultrasound and liver clinical chemistry tests were indicating liver disease in any of the patients referred to therapy and diagnostic work-up (neither in the patient with decreased MBT results at the inclusion).

The mean value (CUM 120) of the MBT results prior to the therapy was 24.6% recovered with SD 8.82; Day 1 after the treatment – 22.54% recovered with SD 8.51; Day 2 – 23.07% recovered with SD 8.46; and Day 28 – 25.07% recovered with SD 5.46.

There was no common trend observed in MBT results according to CUM 120 following the drug administration for the studied patients. Only two patients demonstrated decreased MBT results on the first day after the treatment.



*Figure 1. Distribution of ^{13}C methacetine breath test results (CUM 120) before and after the admission of chemotherapy treatment (mean values, standard deviation)
 ^{13}C metacefīna elptestu rezultāti (CUM 120) pirms un pēc ķīmijterapijas preparātu ievadīšanas (vidējās vērtības, standarta novirze)*

Statistical Analysis

The statistical analysis by ANOVA did not demonstrate significant differences between the MBT results obtained at different times, i.e., before the therapy and 1, 2, and 28 days after the admission of paclitaxel-containing therapy (p-value 0.921; F critical value 3.009).

To evaluate whether paclitaxel-containing therapy has influenced the results of the MBT, the breath test results prior to the therapy and on the first day after the therapy were compared by t-test for equality of means, and no statistical significance between the two test results was confirmed (t Stat = 1.01; p = 0.35).

Discussion

The obtained results do not confirm our hypothesis that admission of paclitaxel-containing chemotherapy may alter the results of MBT. We did not find any common pattern of MBT results following the admission of paclitaxel-based chemotherapy. There might be a possibility of subgroup differences, but the small experiment group size does not allow distinguishing between subgroups.

Further studies involving a larger group size and adding information on the substance elimination speed to the MBT results would be needed to address the potential role of MBT in paclitaxel chemotherapy.

Conclusions

The administration of paclitaxel in combined cancer patient chemotherapy does not significantly alter the results of ¹³C-methacetin breath test in the majority of patients.

Acknowledgements

The work was supported by the research grant of the University of Latvia (2007/ZP-83), State Research Program on Health No. 8 (project No. 3), as well as by an EU Social Fund project.

The authors thank Prof. Uldis Teibe for his valuable support to statistical analysis of the data.

References

1. Mathijssen RH, de Jong FA, van Schaik RH, et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1585–92.
2. Dees EC, Watkins PB. Role of cytochrome P450 phenotyping in cancer treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1053–5.
3. Lexi-Comp., Inc. Paclitaxel (Protein-bound): Drug information. Accessed September, 2007. Copyright 1978–2008 Lexi-Comp, Inc. http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=drug_1_z/53931
4. Zipprich A, Meiss F, Steudel N, Sziegoleit U, Fleig WE, Kleber G. 13C-Methacetin metabolism in patients with cirrhosis: relation to disease severity, haemoglobin content and oxygen supply. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17: 1559–62.
5. Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review. *J Breath Res* 2007; 1.
6. Braden B, Lembcke B, Kuker W, Caspary WF. (13)C-breath tests: Current state of the art and future directions. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 795–805.
7. Ciccocioppo R, Candelli M, Di Francesco D, et al. Study of liver function in healthy elderly subjects using the 13C-methacetin breath test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 271–7.
8. Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, et al. Review article: breath testing for human liver function assessment. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1977–96.
9. Hirth J, Watkins PB, Strawderman M, Schott A, Bruno R, Baker LH. The effect of an individual's cytochrome CYP3A4 activity on docetaxel clearance. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1255–8.
10. Baker SD, van Schaik RH, Rivory LP, et al. Factors affecting cytochrome P-450 3A activity in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8341–50.

Kopsavilkums

Ķīmijterapijā lietojamie medikamenti, t. sk. taksānu grupa (pie tās pieder arī plaši lietotais paklitaksels), kuri tiek metabolizēti aknu citohroma P450 sistēmā (CYP450), nereti izraisa nopietnas blaknes. Pašlaik nav pieejama neviena metode, ar kuras palīdzību būtu iespējams prognozēt iespējamo ķīmijpreparātu toksicitāti. Metacetīnu, kura metabolisms arī notiek caur CYP450, iespējams izmantot diagnostiskā stabilo izotopu (¹³C) elptestā (MBT) ar mērķi noteikt

aknu funkcionālo spēju. Autori izvirzīja hipotēzi, ka MBT rezultāts varētu būtiski izmainīties pēc paklitakselu saturošas ķīmijterapijas ievades.

Septiņām sievietēm (vecumā 45–66 gadi), kurām bija ordinēta paklitakselu saturoša ķīmijterapija olnīcu vēža ārstēšanai pirms terapijas un 1., 2. un 28. dienā pēc ķīmijterapijas medikamentu ievades, tika veikts MBT. Iegūtie rezultāti neapstiprināja statistiski ticamas atšķirības starp izmeklējumu rezultātiem, kas bija veikti minētajos laika intervālos. Netika konstatēta arī pārliecinoša MBT rezultāta izmaiņa pirmajā dienā pēc preparāta ievades.

Ir iespējams plānot turpmākus pētījumus, meklējot iespējamo MBT rezultātu korelāciju ar paklitaksela eliminācijas ātrumu, kā arī palielinot izmeklējamo pacientu skaitu apakšgrupu analīzes veikšanai.

The EMT Phenomenon: Special Emphasis on Analysis of Hepatic Fibrosis and Hemosiderosis

EMT fenomens aknu fibrozes un hemosiderozes apstākļos

**Jurijs Markovs¹, Sergejs Isajevs², Baiba Rozentāle⁵,
Gundega Knipše³, Darja Svirina⁴**

¹Faculty of Medicine, University of Latvia. Department of Anatomy and Histology.
Lielvārdes street 68, Rīga, LV-1006
E-mail: george@pit.lv

²Faculty of Medicine, University of Latvia. Department of Pathology.
Lielvārdes street 68, Rīga, LV-1006
E-mail: sergisajevs@inbox.lv

³Faculty of Medicine, University of Latvia. Department of Anatomy and Histology.
Lielvārdes street 68, Rīga, LV-1006
E-mail: gundegaknipse@lu.lv

⁴Faculty of Medicine, University of Latvia. Department of Anatomy and Histology.
Lielvārdes street 68, Rīga, LV-1006
E-mail: darjasvirina@inbox.lv

⁵Infectology Center of Latvia. Linezera street 3, Rīga, LV-1006
E-mail: lic@lic.gov.lv

Background: Structural changes of microenvironment caused by chronic liver disease contribute to the formation of the molecules and cellular signals that influence human liver progenitor cell behavior, leading to subsequent formation of ductular reactions. These reactions are primarily composed of intermediate hepatocytes. Specific phenotypic hepatic cell markers were employed to analyze the presence of ductular hepatocytes biology in the portal tracts of cirrhotic liver.

Methods: We investigated the expression of TGF- β -1, CK-7, vimentin, and iNOS in the liver tissues of 23 biopsies of patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis (12 cases). The stage of fibrosis was evaluated according to the METAVIR system.

Results: Ductular hepatocytes are a unique group of epithelial cells, perhaps, under pathological conditions, representing a transient amplifying population with tripotential differentiation into hepatocytes, cholangiocytes, and myofibroblasts (through EMT (epithelial to mesenchymal transition)). It is likely that EMT of ductular hepatocytes can occur only if the differentiation of these cells into mature hepatocytes and cholangiocytes is impaired.

Keywords: fibrosis, liver hemosiderosis, EMT, ductular hepatocytes, microenvironment.

Specific Molecular Signals that Mediate Epithelium-Driven Fibrosis: a Review

Epithelial to mesenchymal transition is a process that is characterized by loss of cell-cell contacts, downregulation of E-cadherin and expression of epithelial cells' specific differentiation markers. As a consequence, cells become more motile and change epithelial phenotype to mesenchymal. Activation of EMT is vital during embryogenesis, as it contributes to the formation of such structures like mesoderm and neural tube. Normally, EMT does not occur in adult species. However, under pathological conditions, EMT not only transpires but also stimulates the development of fibrosis. The reverse process to EMT is MET (mesenchymal to epithelial transition). The idea of the change of the cell's phenotype was first proposed in 1989 by scientists from the Laboratory of Development of Physiopathology of the National Center for Scientific Research, France, headed by Brigitte Boyer (1).

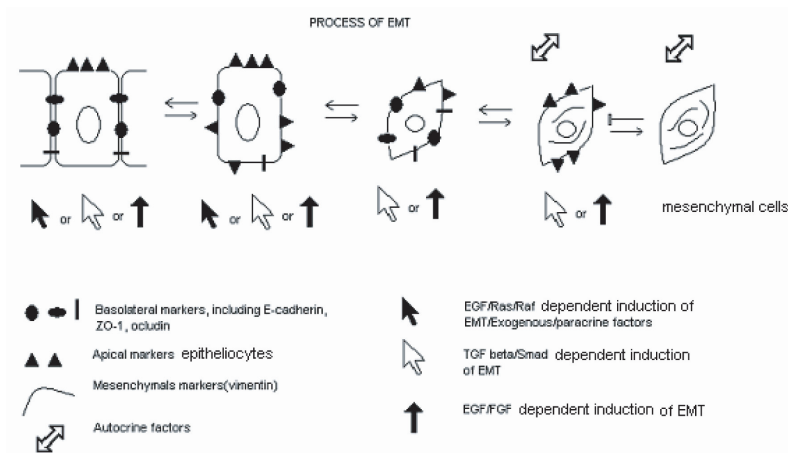


Fig. 1. Changes of EMT-related markers in epitheliocytes
Ar epiteliocītu transformāciju par mezenhīmocītiem saistītu marķieru ekspresijas izmaiņas epiteliocītos

During EMT changes occur in gene expression profiles associated with stepwise progression of mesenchymal cell differentiation. These changes are controlled by many factors working in cohort, such as nitric oxide (NO), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), transformed growth factor beta 1 (TGF beta 1), etc (19, 22).

NO plays an important role in smooth myocytes relaxation, signal transduction, and regulation of trombocytes' activation. Exposure to high concentration of NO leads to an immediate and severe irritation of the tissue and activation of the immune system. Down-regulation of NO is associated with hypertension, obesity, diabetes (25), heart failure (26), atherosclerosis (19), aging, and cigarette smoking (31, 34). Catalysis of NO synthesis depends on NO synthetase (NOS). There are three types of NOS: eNOS (epithelial NOS), nNOS (neural NOS), and inducible NOS (iNOS).

NO also may attenuate the expression of TGF beta 1. Asymmetric DiMethylArginine (ADMA) – antagonist of eNOS – leads to the increase in the expression of TGF beta 1 (Fig. 2) (9). NO mainly derives from eNOS. During idiopathic pulmonary fibrosis, the number of alpha smooth muscle actin (alpha-SMA) and type I collagen positive cells expressing eNOS, is considerably lower than the number of fibroblasts expressing TGF beta 1. Presumably, NO is necessary for maintenance of epithelial phenotype (30). At the same time, low concentration of NO contributes to profibrotic stimulation and EMT.

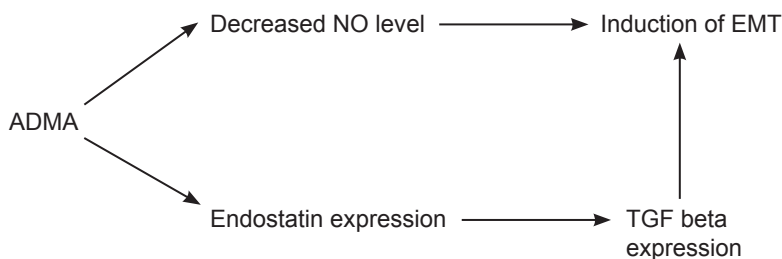


Fig. 2. Influence of ADMA on the expression of the TGF beta 1
ADMA (Asimetriskā dimetilarginīna) ietekme uz TGF beta 1 ekspresiju

All three known isoforms of NOS cooperate, thus modifying the expression of each other. Some intermediate molecules in these signaling pathways are NF- κ B, INF-gamma (interferon gamma), and TNF alpha (tumor necrosis factor alpha) (21). For instance, nNOS can decrease the expression of iNOS via suppression of NF- κ B gene. Notably, expression of only one isoform of NOS is almost never observed. More often two or all three molecules are expressed together, for instance, during Alzheimer's disease (iNOS and eNOS) (6).

In inflammation-related disease (IRD), iNOS produces the highest levels of NO. Usually, iNOS is expressed by macrophages that contribute to antimicrobial and antibacterial functions of phagocytes. However, iNOS may also be expressed by hepatocytes and dermal fibroblasts. Such expression may be induced by cytokines and bacterial infections. In hepatocytes, iNOS expression is LPS- (bacterial lipopolysaccharide) dependent. Interestingly to note, during HCV (hepatitis C) virus infection, levels of iNOS are increased not only in hepatocytes, but also in B-cells. DNA-double stranded breaks, in combination with NO oxidative activity, highly increase the probability of gene mutation (27, 25). Expression of iNOS correlates with the progression of renal fibrosis. Renal fibrogenesis is characterized by progression of EMT and oxidative stress (7, 8).

Induction of EMT depends on activation of many factors. One of the important growth factors is TGF- β -1, which seems to be involved in the majority of signaling pathways (Fig. 3, 4)

TGF- β -1 regulates such processes as cell proliferation, apoptosis, and EMT during embryogenesis and numerous pathological conditions. TGF- β -1 cooperates with oncogenic Ras (rat sarcoma viral oncogene) proteins and RTK (receptor tyrosine kinase) to induce tumor metastasis or EMT. TGF- β signaling pathway is initiated when TGF- β binds to Type I and Type II receptor kinases. Next, Smad2 (Homolog of drosophila protein – Mothers Against Decapentaplegic) and Smad3 are phosphorylated. These phosphorylated molecules bind to Smad4. Heterodimeric and heterotrimeric complexes are formed. The above mentioned complexes accumulate in the nucleus; then bind to two dozen different transcription factors, co-activators, and co-repressors, thus promoting or inhibiting the expression of target genes.

There is an alternative pathway of TGF- β -1 signaling that involves Tak1 (TGF activated kinase 1), ERK/MAPK (mitogen-activated kinase), and RhoA (Ras homolog gene family member A). Smad7 is a natural inhibitor of TGF- β -1 signaling pathway. Smad7 is expressed or even overexpressed during the response to TGF- β -1 signaling and specific target gene expression. Smad7 binds not only to TGF- β -1 first-type receptor, but also to BMP first-type receptor. Such binding inhibits the phosphorylation of R-Smad. Overexpression of Smad7 leads to suppression of pro-survival functions of NF- κ B and initiation of apoptosis through MAPK signaling pathway. Smad7 provides the environment for forming the Tak1-MKK3 (TGF- β -1-activated kinase – mitogen activated kinase 3) and p38 MAPK complex. Further activation of p38 MAPK inactivates GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta), which phosphorylates β -catenin, thus stabilizing it, and induces β -catenin-mediated apoptosis (24, 35, 36).

Some other signal molecules which induce EMT include EGF (epidermal growth factor) family members, FGFs (fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) and IGF1/2 (insulin-like growth factor). TGF- β -1 regulates multiple effectors involved in PDGF (platelet-derived growth factor) signaling pathway – STAT1 (signal transducer and activator of transcription) and STAT3b. Notably, PDGF/PDGF-R loop is essential for completing EMT (7, 14).

Apart from iNOS and TGF- β -1, NF- κ B have been shown to induce EMT. Activation of NF- κ B pathway induces the expression of genes whose code cytokines, cytokine receptors, and cell-adhesion molecules, as well as genes, are responsible for proliferation and oncogenesis. Binding of NF- κ B to DNA is possible only in hetero- or homo-dimers that also include RelA/p65, cRel, RelB, p50, and p52. These molecules act in a way homological to Rel domains. This factor family mediate DNA binding and dimerization, its interaction with inhibitory factors such as I κ B, which inhibits the action of NF- κ B. There are three common molecules controlling the activity of NF- κ B: I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ , and they act as negative regulators. Stimulation of the cell by inflammatory molecules, such as TNF- α (tumor necrosis factor) or IL-1, induces the phosphorylation of I κ B. This leads to the release of NF- κ B; thus, NF- κ B may bind to target genes. I κ B kinase (IKK) complex plays the most important role in the phosphorylation of I κ B, which consists of 2 domains – IKK1 and IKK2 and NF- κ B essential modulator (NEMO). NF- κ B may also act in Ras-dependent manner.

NF- κ B may play a role in cell survival and EMT during TGF- β -1-induced apoptosis. Nevertheless, overexpression of NF- κ B leads to induction of EMT, even in the absence of TGF- β -1. NF- κ B also maintains mesenchymal phenotype after EMT induction, but down-regulation of NF- κ B leads to reversible EMT – MET (Fig. 1). TGF- β 1 induces the expression of NF- κ B, meanwhile NF- κ B activates genes which are required for TGF- β -1-induced EMT. Therefore, collaboration between TGF- β -1 and NF- κ B signaling pathways takes place. TGF- β -1 can function in Smad-independent manner (epitheliocytes of the liver) through Tak1. Tak1, in response to TGF- β -1 expression, phosphorylates IKK complex, thus promoting activation of NF- κ B. Interactions between TGF- β and NF- κ B signaling pathways are reflected in Fig. 3. There are alternative signaling pathways that induce EMT. Such a diversity of signaling pathways is needed to increase the effectiveness of EMT induction (13).

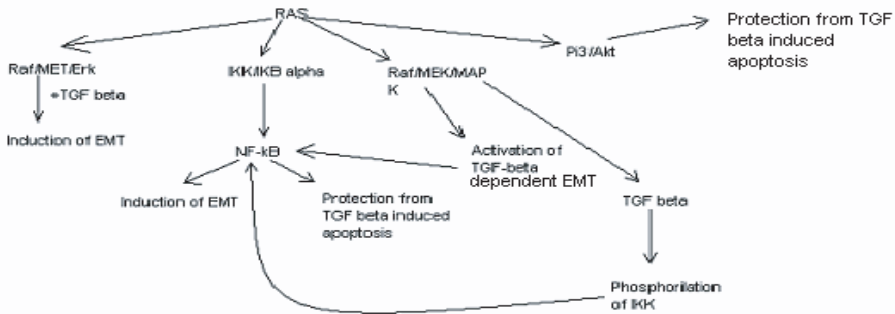


Fig. 3. Ras-dependent induction of EMT

No Kirstena žurku sarkomas vīrusa onkogēna homologa atkarīga epiteliocītu transformācijas indukcija par mezenhīmocītiem

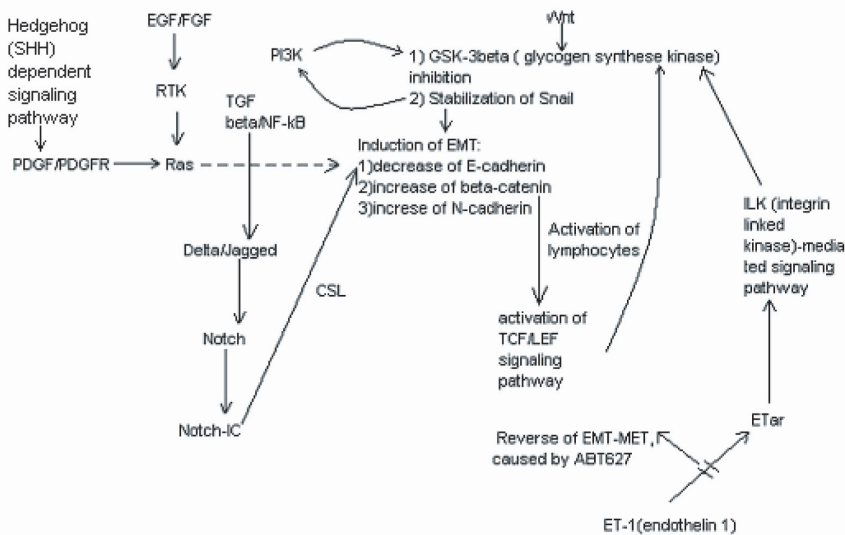


Fig. 4. Ras-independent signaling pathways, involved in induction and promotion of EMT

No Kirstena žurku sarkomas vīrusa onkogēna homologa neatkarīgi signāļceļi, kas iesaistīti epiteliocītu transformācijā par mezenhīmocītiem

In the embryo, EMT is essential to a normal development of several organs. Moreover, EMT is a well-known mechanism for various organ (lung, liver, kidney, and eye) fibrosis (17, 31).

It is still not completely proved whether alveolar epithelial cells (AEC) undergo EMT during idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). IPF is characterized by an increasing number of fibroblasts, abnormal deposition and remodeling of ECM. Probably, expansion of fibroblasts occurs in a response to injury and immune reaction. These fibroblasts have heterogeneous phenotypes and differ from normal lung fibroblasts. Weak expression of pro-SPC (marker of AEC) proves that AEC detach from BM and migrate to ECM. What is more, a diffuse expression of laminin receptor – integrin $\alpha 3\beta 1$ – normally restricted to the basal pole of epithelia, indicates that AEC lose polarity. At the same time, some but not all EMT-derived fibroblasts become alpha-SMA-positive. Such co-expression of mesenchymal and epithelial markers is a characteristic feature of EMT. In IPF, EMT is induced in TGF- β -dependent manner. Furthermore, in lungs TGF- β 1 signalling pathway to great extent depends on some metal ions. For example, Fe stimulates EMT, but Mg inhibits this process. Notably, fibroblasts which come from epithelial cells through EMT are more prone to cell death than normally developed fibroblasts (12).

During kidney embryogenesis, not only EMT but also MET takes place. Renal tubular epithelial cells are able to undergo EMT during chronic kidney disease (CKD). Morphologically, CKD is characterized by overdeposition of ECM, which consequently leads to activation of vicious cycle and, finally, cell death. The main cause of fibrosis in CKD is activation of alpha-SMA-positive myofibroblasts. Not only local interstitial fibroblasts give rise to myofibroblasts. It might be that tubular epithelial cells are able to change their phenotype by means of EMT. During early stages of kidney fibrosis, epithelial cells expressed Fsp1 and HSP47 – markers of fibroblasts. Furthermore, with progression of fibrosis, the loss of polarity of the cell, decreased expression of E-cadherin, increased expression of alpha-SMA and vimentin was observed in epithelial cells as well as deposition of type I collagen and fibronectin. In a chronically injured kidney, glomerular parietal epithelial cells also possibly undergo EMT. During renal fibrosis EMT is activated via TGF- β -1 signaling pathway. Experiments on animals (mice) show that tissue-type plasminogen activator (tPA) selectively blocks EMT in tubular epithelial cells, not affecting myofibroblast activation. Not much is known about the fate of the cells generated by EMT. Some cells undergo apoptosis, but some proliferate, thus supplying local fibroblast population. Moreover, some cells are able to undergo transdifferentiation via MET, gaining epithelial phenotype (18).

In hepatic diseases, some myofibroblasts appear to arise from both hepatocytes and biliary epithelial cells (BEC) (10, 11, 20). As mentioned above, TGF- β -1 is a positive regulator of EMT. Not only TGF beta 1 but also fetal bovine serum (FBS) promotes EMT. After induction of EMT, hepatocytes do not express cytokeratin 18 and E-cadherin but continue to express albumin and begin to express vimentin. Indeed, a decrease in the level of E-cadherin leads to hepatocytes' inability to reestablish cell-cell contacts. Moreover, hepatocytes start to express hepatic progenitor cell marker (OV6). Both TGF- β and FBS induce Snail expression (Fig. 2, 3) (20).

Several studies have shown that BEC undergo EMT during fibrosis or cirrhosis of the liver. These conditions are the main complications of many known chronic diseases. Firstly, BECs transform into alpha-SMA-positive cells. EMT in BECs is induced via TGF- β -1 signaling pathway. HGF inhibits TGF- β -1 during bile duct ligation. As the disease progresses, the expression of TGF- β receptors increases. In contrast, the expression of HGF receptors decreases. HGF decreases both expression of TGF- β and its receptors in hepatocytes (10).

Another important observation is the appearance of S100A4 (early fibroblast marker, used as a marker of EMT) and Smad 2/3 positive BECs in primary bile cirrhosis. Probably, this is a result of EMT (11). S100 is a calcium-binding protein, which regulates cell growth, motility, differentiation, cell cycle and transcription, transduction of the Ca signal in temporal and spatial manner (14, 7).

All in all, there are many mechanisms that induce EMT; however, the involvement of ductular hepatocytes and other factors, like hemosiderosis, remains to be investigated.

Materials and Methods

The study comprised 35 liver biopsies from patients suffering chronic hepatitis C, cirrhosis, and hemosiderosis. For immunohistochemistry, the formalin-fixed paraffin-embedded tissue was cut in 4 μ m thick sections on Histobond electrostatic slides (*Menzel-Glasser*, Germany). Antigen retrieval was achieved by treatment in a domestic microwave for 30 min in citrate buffer pH = 6. Endogenous peroxidase activity was blocked by 0.5% H₂O₂. Antibodies against cytokeratin 7 (CK-7), S100, TGF- β -1, iNOS, and vimentin were used.

Assesment of iron (Perl's reaction) was performed by a semiquantitative cytochemical method (15).

Possible Clues from the Studies of Ductular Hepatocytes

Usually, undifferentiated liver progenitor cells do not take part in liver regeneration after an acute injury. Under such circumstances the mentioned process develops on the account of mature residual liver cells. However, stem cells are still required in chronic injury responses, especially when the regenerative capacity of residual cells is impaired. Liver function and regeneration are severely compromised in chronic hepatic disease, such as viral infection and alcoholic, drug, or chemical toxicity; a common sequela is cirrhosis. The pathogenesis of liver cirrhosis is characterized by the excess production and deposition of extracellular matrix (ECM).

The origin of the primary effector cells of fibrosis in the liver, myofibroblasts, is not clearly established. Four potential sources have been hypothesized. Although activation of resident fibroblasts, migration of liver pericytes (also called stellate cells) into regions of injury, and differentiation of circulating bone-marrow-derived progenitors are likely to play a role, we consider that myofibroblasts may also come from

epithelial cells through an EMT. Whether under pathologic conditions, proliferating hepatic cells with intermediate (hepatocyte/biliary) morphologic features contribute to the myofibroblast pool via EMT is an intriguing question. Such ductular reactions primary composed of oval cells are also known as intermediate hepatobiliary cells or ductular hepatocytes, resembling ductal plate cells in the developing human liver. The development of intrahepatic biliary system begins with the formation of the ductal plate, a cylindrical bilaminar layer of small epithelial cells surrounding portal vein mesenchyme. Finally, the ductal plates undergo transformation into the intrahepatic bile ducts.

We have recently demonstrated that hepatocytes showed a widespread staining for TGF- β -1, a positive regulator of EMT. This article summarizes the evidence supporting a possible role of EMT in the pathogenesis of liver fibrosis, the potential for EMT in ductular hepatocytes, and the role of TGF- β -1 in this process (22, 32).

Cirrhotic liver biopsy showed portal tract with bile duct-like structures composed of small ductular cells (SDC) and strands of more differentiated ductular hepatocytes. SDC and ductular hepatocytes were often intermingled. The epithelial cells of Herring's canals and SDC stained intensively with CK7, while most ductular hepatocytes were less strongly positive or negative for CK7. In contrast, single ductular hepatocytes or loosely organized clusters of these cells, showing weak CK7 and vimentin staining, reside next to the ductular structures within the connective tissue. Since abundant myofibroblasts were detected in the portal tracts of cirrhotic liver, we believe that the loss of cell-cell contact and presence of vimentin expression were induced by the conversion of ductular cells phenotype during its differentiation into myofibroblasts. Moreover, there is a high probability that ductular hepatocytes can also be induced to transdifferentiate into duct-like cells.

The mechanisms leading to the EMT of the ductular hepatocytes have yet to be established. It is known that TGF beta 1 may play the central role in ductular hepatocyte differentiation into myofibroblasts. Our previous study showed that immunostaining for TGF beta 1 is particularly prominent in terminal plate hepatocytes in intermediate and advanced lesions of parenchyma (16). Moreover, there was a significant correlation between the stage of fibrosis and expression of TGF beta 1 in liver stromal cells. Since TGF beta has been proposed a major candidate regulating the termination of constitutive DNA synthesis in hepatocytes, we hypothesized that interaction between TGF beta 1 and proliferating ductular hepatocytes can induce phenotypic transition of these cells into myofibroblasts.

Obviously, we need to know the mechanism of the pro-fibrotic effect of liver hemosiderosis. TGF beta 1 is a pro-apoptotic cytokine for hepatocytes. TGF beta 1-induced apoptosis is mediated via free hydroxyl radical dependent mechanism. Peroxidative decomposition of cellular membrane lipids is a postulated mechanism of liver cell injury in parenchymal iron overload. Histochemically hepatocytes and Kupffer cells had intracellular deposits of ferritin. In the stage of mild iron overload (22 patients), scarce siderosomes of various dimensions were identified in hepatocytes of all acinar zones. In moderate overload (7 patients), pericanalicular siderosomes were abundant especially in acinar zone 1. Furthermore, occasional Kupffer cells also showed siderosis. In severe overload (6 patients), hepatocytes and Kupffer

cells were filled with large siderosomes. Marked fibrosis was observed in this stage. We have shown that chronic excess iron deposition in liver parenchyma is associated with hepatic fibrosis. We speculate that in chronically iron-loaded hepatocytes with increased intracellular reactive oxygen species generation, pro-apoptotic events could be prevented via upregulation of cytokines, contributing to an anti-apoptotic phenotype. Increased resistance of iron-loaded liver cells to TGF beta 1-induced apoptosis may facilitate inappropriate cell proliferation, formation of ductular hepatocytes and predisposition to EMT.

Strong NF- κ B expression emerges in Kupffer cells and endotheliocytes; whereas, hepatocytes and bile ducts remain largely negative. NF- κ B has been implicated in hypertension – induced vascular injury and angiotensin II-induced signal transduction. We propose that factors co-secreted by activated Kupffer cells enhance NF- κ B-mediated endothelial activation.

The macrophages and hepatocytes of patients with hepatitis C without hemosiderosis exhibited weak, variable expression of S100 protein. In contrast, in patients with hemosiderosis, S100 protein-positive macrophages and hepatocytes showed strong and diffuse staining in the cytoplasm. There is a high probability that S100 protein may be involved in iron resistance of liver cells by mediating intracellular diffusion and deposition of metal ions (37).

In hepatitis C patients, iNOS overexpression was detected mainly along bile canaliculi. Since nitric oxide has been shown to attenuate viral infectivity, we speculate that iNOS contribute to the bile sterility. However, during iNOS overexpression, the promotion of apoptosis and mitochondrial dysfunction may explain the occurrence of liver cell injury. At the same time, the induction of DNA damage may lead to EMT and mutagenesis.

Conclusion

Structural changes caused by cirrhosis create microenvironment which contributes to the activation and proliferation of human liver progenitor cells in the epithelium of Herring's canals, with the subsequent development of ductular reactions. Ductular hepatocytes are a unique group of epithelial cells, representing a transient tripotential amplifying population that after a severe parenchymal injury was perhaps able to differentiate into hepatocytes, cholangiocytes, or myofibroblasts via EMT (23, 34).

Our data support the concept of EMT in liver epithelial cells and suggest the need for further studies to investigate the role of ductular hepatocytes, iNOS, and TGF- β -1 in the pathogenesis of fibrotic disease. Based on this knowledge, potential therapeutic strategies (including inactivation of lipid peroxidation and TGF- β -1 signaling in hepatocytes) could be developed.

References

1. Boyer B., Tucker G., Vallés A., Franke W., Thiery J. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *J Cell Biol*, 1989, Oct. 109 (4 Pt 1): 1495–509.
2. Wanless I. R. Pathogenesis of cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2004) 19, S369–S371.
3. Flagga A., Judy U., Svensson E. FOG-2 attenuates endothelial-to-mesenchymal transformation in the endocardial cushions of the developing heart. *Developmental Biology* Vol. 304, Issue 1, 1 April 2007, Pages 308–316.
4. Gove C., Hughes R. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut*, 1991, September; 32 (Suppl): S92–S96.
5. Heizmann W. The importance of calcium-binding proteins in childhood diseases. *J. Pediatrics* 147, 2005, 731–738.
6. Chou, Tz-Chong. New Insights and Strategies in Treating Inflammation-Related Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, Volume 12, Number 27, September 2006, pp. 3495–3495.
7. Arjang D., Shannon R., Joseph Y., Terry O., Debra H., Bryan B. Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *American Journal of Transplantation*, 2005, Vol. 5, No. 3, pp. 500–509.
8. Geller D., Charles J., Lowenstein R., Shapiro, A., Nussler K., Di Silvio M., Wang S., Nakayama K., Simmons R., Snyder S. Molecular Cloning and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase from Human Hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, No. 8 (Apr. 15, 1993), pp. 3491–3495.
9. O’Riordan E., Mendeleev N., Patschan S., Patschan D., Eskander J., Cohen-Gould L., Chander P., Goligorsky M. Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H285–H294, 2007.
10. Schulze F., Konze E., Petmecky K., Schardt K., Dirsch O., Töx U., Schievenbusch S., Dienes H., Odenthal M. Epithelial-mesenchymal transition of biliary epithelial cells during cholestatic fibrosis. *Gastroenterol*, 2007, 45.
11. Robertson H., Kirby J., Yip W., Jones D., Burt A. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, Volume 45, Issue 4, Pages 977–981.
12. Kasai H., Allen J., Mason R., Kamimura T., Zhang Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. 2005; 6(1): 56
13. Huber M., Azoitei N., Baumann B., Grunert S., Sommer A., Pehamberger H., Kraut N., Beug H., Wirth T. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation (J Clin Invest)*, Vol. 114, No. 4, pp. 569–581.
14. Marenholz J., Heizmann C., Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology. *Biochem Biophys*, 2004, *Res Commun* 322, 1111–1122
15. Markovs J., Freda M., Isajevs S., Rozentale B., Berzina N., Knipse G. The Role of TRPV1 in Iron Homeostasis – Implications to Hemosiderosis. *Acta Universitatis Latviensis*, 2007, Vol. 712.
16. Markovs J., Isajevs S., Rozentale B., Knipshe G., Svirina D. Gender and Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C: Role of the TGF – β 1. *Virchow’s Archive* Volume 451, No. 2/August 2007.
17. Oliver A. J. New player in epithelial-mesenchymal transition. *Kidney International*, 2006, 70, 1895–1896.
18. Jun-ichi-hanai. Reversing EMT. *Kidney International*, 2005, 68, 1970–1970.

19. Kaesemeyer W., Caldwell R. Atherosclerosis and nitric oxide production. *Circulation*, 2000, Sep 12; 102.
20. Kaimori, Potter, Wang, Mezey, Koteish. TGF-beta 1 induces an Epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in-vitro. *J Biol Chem*, 2007.
21. Kashem A., Endoh M., Yano N., Yamauchi F., Nomoto Y., Sakai H. Expression of inducible NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int*, 1996, 392.
22. Katoonizadeh A., Nevens F., Verslype C., Pirenne J., Roskams T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver International*, Volume 26, No. 10, December, 2006, pp. 1225–1233.
23. Lowes K., Brennan B., Yeoh G., Olynyk J. Oval Cell Numbers in Human Chronic Liver Diseases Are Directly Related to Disease Severity. *Am J Pathol*, 1999, 537–541.
24. Shimabukuro M., Ohneda M., Lee Y., Unger R. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest*, 1997, 290–295.
25. Poljakovic M., Karpman D., Svanborg C., Persson K. Human renal epithelial cells express iNOS in response to cytokines but not bacteria. *Kidney International*, 2002, 444–455.
26. Oyama J., Frantz S., Blais C., Kelly R., Bourcier T. Nitric Oxide. Cell Death, and Heart Failure. *Heart Failure Reviews*. Volume 7, No. 4, October 2002, pp. 327–334.
27. Failli P., Nistri S., Quattrone S., Mazzeti L., Bigazzi M., Sacchi T., Bani D. Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *The FASEB Journal*, 2002, 252–254.
28. Dong R., Wang Q., He X., Chu Y., Lu G., Ma Q. Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-a-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 1071–1078.
29. Vyas-Read S., Shaul S., Yuhanna I., Willis B. Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, 2007.
30. Siles E., Martínez-Lara E., Cañuelo A., Sánchez M., Hernández R., López-Ramos J., Del Moral M., Esteban F., Blanco S., Pedrosa J., Rodrigo J., Peinado M. Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Res*, 2002, 385–92.
31. Ikegami T., Zhang Y., Matsuzaki Y. Liver Fibrosis: Possible Involvement of EMT. *Cells Tissues Organs*, 2007, 213–221.
32. Tarlá M., Ramalho F., Ramalho L., Castro-e-Silva T., Brandão D., Ferreira J., Castro e Silva O., Zucoloto S. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras*, 2006.
33. Terada T., Kitamura Y., Nakanuma Y. Normal and abnormal development of the human intrahepatic biliary system: a review. *Tohoku J Exp Med*, 1997, 19–32.
34. Veming W., Rambali B., Opperhuizen A. The role of nitric oxide in cigarette smoking and nicotine addiction. *Nicotine & tobacco research*, 2002, Vol. 4, 341–348.
35. Burns W., Twigg S., Forbes J., Pete J., Tikellis C., Thallas-Bonke V., Thomas M., Kantharidis C. Connective Tissue Growth Factor Plays an Important Role in Advanced Glycation End Product-Induced Tubular Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Diabetic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 2484–2494.
36. Inagaki Y., Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*, 2007, 284–292.
37. Svirina D., Rozentale B., Isajevs S., Knipshe G., Markovs J. Possible Role of S100 Protein in Iron Resistance of Liver Cells. *Eur J Med Res*, Vol. 12/Suppl. IV 170–171, 2007.

Kopsavilkums

Darbā apkopoti dati par EMT mehānismiem. Patoloģiskajos gadījumos EMT aktivizācija veicina dažādu orgānu parenhīmas fibrotizāciju. Tika pētīta TGF beta 1 un iNOS ietekme uz duktulāro hepatocītu transformāciju par miofibroblastiem vīrusa hepatīta C slimniekiem uz aknu hemosiderozes fona. Pētījumā tika konstatēta korelācija starp TGF beta 1 ekspresijas pakāpi aknu šūnās un siderosomu daudzumu hepatocītos. Apkopojot pētījuma rezultātus, izveidojusies hipotēze par brīvo skābekļa radikāļu iespējamo ietekmi uz EMT.

Intraoperatīva un ekstraoperatīva galvas smadzeņu garozas stimulācija un tās loma epilepsijas ķirurģijā *Intraoperative and Extraoperative Cortical Stimulation and Its Role in Epilepsy Surgery*

Aksels Rībenis^{1,3}, Igors Aksiks¹, Justus Kleine², Peter A. Winkler³

¹Neiroķirurģijas klīnika, Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca

²Epilepsijas centrs, Neuroloģijas klīnika, Ludviga-Maksimiliana
Universitātes slimnīca Minhenē

³Neiroķirurģijas klīnika, Ludviga-Maksimiliana Universitātes slimnīca Minhenē

Rībenis A. (akselribenis@yahoo.co.uk)

Aksiks I. (neirokirurgija@stradini.lv)

Kleine J. (Justus.Kleine@med.uni-muenchen.de)

Winkler P. A. (peter.winkler@med.uni-muenchen.de)

Par epilepsijas ķirurģiju sauc jebkuru neiroķirurģisku iejaukšanos, kuras primārais mērķis ir atvieglot medicīniski refraktāru epilepsiju (*European Federation of Neurological Societies Task Force*, 2000). Epilepsijas ķirurģijas mērķis ir reducēt lēkmju skaitu un intensitāti, samazināt neiroloģisko morbiditāti un antiepileptisko medikamentu toksicitāti, kā arī uzlabot dzīves kvalitāti. Pēc definīcijas epilepsijas ķirurģija neiekļauj intrakraniālo bojājumu normālu ķirurģisku ārstēšanu, kuras primārais mērķis ir diagnosticēt un, iespējams, izdalīt patoloģisko objektu (bieži vien – pieaugošu audzēju). Šiem pacientiem epilepsijas lēkmes ir tikai šīs patoloģijas simptoms un tiks ārstētas vienlaikus ar tās izdalīšanu (1).

Mūsdienīgā epilepsijas ķirurģijā izšķir trīs fāzes: neinvazīva izmeklēšana, invazīva izmeklēšana un ķirurģija (2). Pirmsoperācijas izmeklēšana (invazīva vai neinvazīva) ir vērsta uz epilepsiju izraisošā perēkļa (vai perēkļu) meklēšanu galvas smadzenēs. Rūpīga pirmsoperācijas izmeklēšana ir nepieciešama, lai noteiktu operācijas risku un izvērtētu iespējamo ārstniecisko ieguvumu pēc tās. Ņemot vērā, ka epilepsija nav letāla patoloģija, tās operēšanai vienmēr nevar noteikt absolūtas indikācijas. Tomēr operācija būtu jāapsver kā nākamais solis epilepsijas ārstēšanā visiem pacientiem, kuriem divu gadu laikā nav sasniegta lēkmju kontrole ar medikamentiem, taču šīs lēkmes būtiski ietekmē dzīves kvalitāti.

Pirmsoperācijas izmeklēšanas procesā tiek izmantotas dažādas metodes, un katrai no tām ir atšķirīgas indikācijas un nozīme. Šajā rakstā autori iztirzājuši intraoperatīvas un ekstraoperatīvas galvas smadzeņu garozas stimulācijas būtību un izmantošanu epilepsijas ķirurģijā.

Atslēgvārdi: epilepsija, neiroķirurģija, epilepsijas ķirurģija, garozas kartēšana.

Galvas smadzeņu garozas stimulācijas vēsture

Pirmie zinātnieki, kas pierādīja neironu uzbudināmību, bija Luidži Galvani (*Lui-gi Galvani*) un Alesandro Volta (*Alessandro Volta*) 18. gadsimta otrajā pusē Itālijā. 1800. gadā A. Volta pierādīja, ka nervu šūnu uzbudināšana panākama ar elektriskas dabas signālu (3).

Pirmos smadzeņu garozas stimulācijas eksperimentus ar dzīvniekiem veica Gustavs Fričs (*Gustav Fritsch*) un Eduards Hiciģs (*Eduard Hitzig*) 1870. gadā. Viņu galvenais secinājums bija, ka galvas smadzeņu garoza ir elektriski uzbudināma. Nākamais svarīgākais šo zinātnieku secinājums bija funkcionālo zonu esamība galvas smadzeņu garozā (4).

Pirmos cilvēka galvas smadzeņu stimulācijas datus 1874. gadā publicēja amerikāņu ārsts Roberts Bārtolovs (*Robert Bartholow*). Savukārt pirmais ārsts, kurš izmantoja intraoperatīvu galvas smadzeņu stimulāciju, bija epilepsijas ķirurgijas pamatlicējs Sers Viktors Horslijs (*Sir Victor Horsley*) 1886. gadā. Viņš pirmais noteica operācijā rezecējamo rajonu, stimulējot smadzeņu garozu un izraisot pacienta epilepsijas lēkmei raksturīgos sākotnējos simptomus (5).

Neiroķirurgs Fedors Krauze (*Fedor Krause*) 1932. gadā 900 lappušu publikācijā par epilepsiju pirmo reizi norādīja, ka vienīgais nozīmīgais risinājums epilepsijas ķirurģijā ir epileptiskā fokusa rezekcija (6).

Kā pirmo veiksmīgo epilepsijas ķirurģijas gadījumu Krauze min 1893. gadā operēto 15 gadus veco pacientu, kura cieta no biežām Džeksona tipa epilepsijas lēkmēm pēc divu gadu vecumā pārslimotā meningīta. Operācija tika veikta ar intraoperatīvu elektrisku galvas smadzeņu stimulāciju, kas pirms elektroencefalogrāfijas (EEG) atklāšanas bija vienīgā metode epileptiskā fokusa noteikšanai. Pēc šīs operācijas pacientei lēkmes vairs neatkārtojās visā viņas dzīves laikā, kā arī ievērojami uzlabojās mentālās spējas.

Jauns periods smadzeņu garozas stimulācijā sākās ar subdurālo elektrodu (šie elektrodi tiek novietoti t. s. subdurālajā telpā, kas atrodas starp galvas smadzeņu cieto un mīksto apvalku) rūpnieciskas ražošanas uzsākšanu 70. gados. To izmantošana sāka attīstīties reizē ar neuroattēldiagnostiku un epilepsijas ķirurģiju kopš 80. gadu vidus.

Galvas smadzeņu stimulācijā izmantojamie elektrodi un stimulācijas indikācijas

Intraoperatīvā stimulācija

Intraoperatīvā stimulācija jeb neiroķirurģiskas operācijas laikā veiktā smadzeņu garozas stimulācija notiek ar koagulācijas pincetei līdzīgu elektrostimulācijas pinceti, kura ir savienota ar stimula devēju.

Indikācijas intraoperatīvai stimulācijai

1. Ja ķirurģiski rezecējamais fokuss (tumors, epileptiskais fokuss) atrodas tuvu funkcionāli nozīmīgām garozas zonām, kuras nedrīkst traumēt rezekcijas laikā, nepieciešams noteikt šo funkcionāli būtisko zonu lokalizāciju un attiecību pret rezecējamo rajonu.

- Šādi tiek nodrošināta ne tikai funkcionālo zonu ķirurģiska saglabāšana, bet arī patoloģisko audu maksimāla izdalīšana (7).
2. Var tikt lietota, lai noteiktu cerebrotomijas vietu – galvas smadzeņu garozas rajonu, kuram nav funkcionāli būtiskas nozīmes un caur kuru var piekļūt zemgarozā esošiem patoloģiskiem audiem.
 3. Intraoperatīvu stimulāciju var izmantot epilepsijas ķirurģijas pacientu kontrolei pēc ekstraoperatīvas garozas stimulācijas. Ja ekstraoperatīvās garozas stimulācijas dēļ (stimulējot garozu intensīvās palātas apstākļos ar subdurāli novietotiem elektrodiem) iegūtā garozas funkcionālā karte norāda rezecējamā epilepsijas perēkļa pārklāšanos ar funkcionāli nozīmīgām zonām vai atrašanos to ciešā tuvumā, šie punkti var tikt atkārtoti pārbaudīti, stimulējot tos intraoperatīvi. Tādējādi var precīzāk noteikt un saudzēt funkcionāli būtiskās garozas zonas un panākt pilnīgāku patoloģisko audu rezekciju līdz šo zonu robežām.
 4. Veicot subkortikālu intraoperatīvu stimulāciju, var noteikt subkortikāli lokalizētus funkcionālus traktus, saglabājot tos ķirurģiski un funkcionāli neskartus.

Ekstraoperatīvā stimulācija

Ekstraoperatīvā stimulācija tiek veikta laika posmā starp divām operācijām, palātas apstākļos ilgstoši novērojot pacientus un izmantojot EEG metodi. Pirmajā operācijā uz smadzeņu virsmas tiek novietoti subdurālie elektrodi, pēc tam no tiem tiek pierakstīta tiešā garozas EEG un nepieciešamības gadījumā veikta arī garozas funkcionālā kartēšana / stimulācija ar strāvas impulsiem. Otrajā operācijā elektrodi tiek izņemti un tiek veikta epileptisko audu rezekcija.

Šie elektrodi ir veidoti no bioloģiski inerta, fleksibla materiāla (*Silastic, Teflon*), un elektrisko kontaktu skaits tajos atšķiras. Elektriskie kontakti (5 mm lieli diski) var būt izgatavoti no nerūsējoša tērauda vai platīna. Katra elektrodu plate tiek lietota tikai vienu reizi.

Parasti izšķir vienas rindas elektrodu plates (*strip electrodes*), kurās elektrodu kontakti novietoti vienā rindā, un vairāku rindu elektrodu plates (*grid electrodes*), kurās elektriskie kontakti novietoti vairākās rindās. Vajadzīgā lieluma elektrods tiek izvēlēts atkarībā no pētāmā galvas smadzeņu garozas rajona lieluma un/vai vietas, kur plānots novietot šo elektrodu. Katra elektroda elektriskie kontakti ir savienoti ar elektrisku kabeli, kuru pēc operācijas pieslēdz pie EEG pierakstīšanas un stimulācijas aparātūras.

Indikācijas ekstraoperatīvai stimulācijai

1. Ja pirmsepilepsijas ķirurģijas izmeklēšanas neinvazīvajā posmā iegūti nesaņķīgi rezultāti par epilepsijas fokusa atrašanās vietu, kā arī precīzākai perēkļa lokalizācijai nepieciešams reģistrēt invazīvu EEG.
2. Ja fokālais epilepsijas perēklis atrodas tuvu funkcionāli nozīmīgām garozas zonām vai pārklāj tās, nepieciešams noteikt to precīzu lokalizāciju garozā, lai netraumētu funkcionāli nozīmīgos audus (šī ir t. s. galvas smadzeņu garozas kartēšana (*cortical mapping*)) (8).

Intraoperatīvas un ekstraoperatīvas stimulācijas procedūras apraksts

1. Intraoperatīva stimulācija

Lielāka uzmanība jāpievērš pacienta psiholoģiskai sagatavošanai pirms operācijas – nepieciešams sīki pārrunāt operācijas gaitu, stimulācijas procedūru un iespējamās komplikācijas. Šāda psiholoģiska sagatavošana nepieciešama, jo pacients vismaz līdz stimulācijas pabeigšanai atrodas nomoda stāvoklī. Tāpat nepieciešams sagatavoties arī stimulācijas procedūrai, lai tā noritētu bez sarežģījumiem, kas atvieglotu rezultātu izvērtēšanu. Šajā sagatavošanās posmā jātrenējas dažādu objektu nosaukšanā. Vēlāk stimulācijai tiek izvēlēti tie objekti, kurus pacients ir nekļūdīgi pazinis un nosaucis sagatavošanās posmā. Tādējādi tiek izslēgta iespēja, ka atsevišķi pirmsoperācijas runas traucējumi varētu ietekmēt intraoperatīvās stimulācijas procedūras norisi un izvērtēšanu.

Tātad būtiskākā šīs stimulācijas metodes iezīme ir tās norise operācijas laikā un tas, ka pacients atrodas nomodā vismaz līdz stimulācijas pabeigšanai. (Atsevišķos neiroķirurģijas centros tiek izmantota arī vispārēja pacienta narkoze līdz stimulācijas brīdim.)

Autoru praksē pacients operācijas laikā saņem vieglu sedatīvu terapiju un lokālu intrakutānu anestēziju (ar 0,25% karbostenīnu (*Carbostenin*) un ornipresīnu (*Ornipresin*), POR 8[®], 10 IE/100 ml) kraniotomijas vietā. Pirms cietā smadzeņu apvalka atvēršanas uz tā analģēzijas nolūkā tiek turēta komprese ar 0,25% karbostenīnu.

Ļoti svarīga ir arī ērta pacienta pozicionēšana operācijas laikā (galva netiek fiksēta *Mayfield* fiksatorā), lai viņš varētu mierīgi nogulēt visu operācijas laiku (aptuveni 4–6 stundas).

Pēc cietā smadzeņu apvalka atvēršanas pacientam tiek lūgts nosaukt vairākus priekšmetus, kas redzami uz ekrāna, lai noteiktu, vai kraniotomija un/vai pacienta galvas pozīcija nerada kādus runas traucējumus, kurus varētu kļūdaini piedēvēt stimulācijas radītiem runas traucējumiem.

Operācijas turpinājumā uz galvas smadzeņu garozas tiek secīgi novietoti sterili marķējuma numuriņi, kuri iezīmē stimulācijai paredzētās lokalizācijas. Tiek iestatīti stimulācijas parametri (50 stimuli sekundē, katra taisnstūra impulsa ilgums 0,2 ms, strāvas stiprums no 2 līdz 16 mA) un sagatavota bipolārā stimulācijas pincete. Procedūru uzsāk ar 2 mA stipru strāvu un secīgi stimulē visas atzīmētās garozas lokalizācijas. Katrs punkts tiek stimulēts tikai vienu reizi.

Pacienta acu priekšā atrodas monitors, uz kura stimulācijas laikā attēlo dažādus objektus. Katrs no tiem pacientam ir jānosauc ar pilnu teikumu, piemēram: “Tas ir suns”, “Tā ir māja”. Pacienta atbildes vēro un izvērtē blakus stāvošais neirofiziologs.

Lai pacients nezinātu, kurā brīdī tiek stimulēts, starp katru garozas stimulācijas punktu viņam ir jānosauc vēl viens uz ekrāna redzamais objekts.

Ja kādā no punktiem neirofiziologs konstatē runas traucējumus, tas tiek atzīmēts protokolā. Kad katrs punkts ir vienu reizi stimulēts, strāvas stiprumu palielina par 2 mA un turpina stimulāciju. Kā funkcionāli nozīmīgi punkti tiek atzīmēti tikai tie,

kuros ir izdevies radīt funkcionālus traucējumus vismaz trīs stimulācijas mēģinājumos.

Tiek izšķirti četri stimulācijas radīti runas funkcijas defekti.

- Afāziska pārtraukšanās – (*aphasic arrest*), ja tiek pareizi izrunāta teikuma pirmā daļa, bet pacients nespēj nosaukt objektu.
- Afāziski traucējumi – (*aphasic disturbance*), ja tiek pareizi izrunāta teikuma pirmā daļa, bet netiek pareizi izrunāts / nosaukts redzamais objekts. Šajā gadījumā var novērot gan semantiskas, gan fonētiskas parafāzijas.

Parafāzijas novēro, ja cilvēks, mēģinot runāt, pasaka kādas sākotnēji negribētas, netīšas zilbes, vārdus, frāzes.

Literāras / fonoloģiskas / fonētiskas parafāzijas – pacients pasaka vairāk nekā pusi no iecerētā vārda pareizi, piemēram, vārda “māja” vietā pasaka “āja”. Var novērot arī skaņu pārvietošanu šajos gadījumos, piemēram, vārda “televīzija” vietā saka vārdu “tevilīzija”.

Semantiskās parafāzijas ir daļa no verbālām parafāzijām – vārds, kuru pacients vēlas teikt, tiek aizvietots ar citu (īstu) vārdu.

Patlaban vēl nav īsti skaidrs, kurš no vārdu nosaukšanas posmiem (objektu percepcija, vārdu atcerēšanās, vārda “atsauksana” no to “glabātuves” vai vārdu veidošana) ir traucēts šajos runas funkcijas defektos.

- Runas traucējumi – (*speech disturbance*), ja pacients izrunā visu teikumu nesaprotami vai dizartriski, t. i., pacients izrunā vārdus lēni, vāji, neprecīzi, nekoordinēti.
- Runas pārtraukšanās – (*speech arrest*), ja pacients stimulācijas dēļ vispār nevar parunāt.

Runas traucējumi un runas pārtraukšanās var būt saistīti ar stimulācijas radītiem bojājumiem artikulācijas orgānu (mēle, lūpas, u. c.) laika un telpas koordinātās.

Punkti ar afāzisku pārtraukšanos un afāziskiem traucējumiem ir t. s. valodas punkti, savukārt punkti ar runas pārtraukšanos un runas traucējumiem tiek definēti kā runāšanas punkti.

Pozitīvie valodas un runāšanas punkti iezīmē runas funkcijai nozīmīgās garozas lokalizācijas un patoloģisko audu rezekcijas maksimālo robežu, pati procedūra tātad ir garozas (runas) funkcionāla kartēšana. Pēc tās pabeigšanas ķirurgs var rezecēt patoloģiskos audus, netraumējot runas funkcijai nozīmīgos punktus (9).

Kopējais stimulācijas procedūras laiks ir aptuveni 40 minūtes.

2. Ekstraoperatīvā garozas stimulācija

Būtisks nosacījums, lai plānotu ekstraoperatīvu garozas stimulāciju, ir rūpīga neinvazīva pirmsoperācijas izmeklēšana ar mērķi izteikt hipotēzi par iespējamo epileptiskā perēkļa lokalizāciju. Subdurālo elektrodu veidu, skaitu un intrakraniālo pozīciju katram pacientam nosaka, vadoties no klīniskajiem, attēldiagnostikas, neiropsiholoģijas, elektroencefalogrāfijas un videoencefalogrāfijas datiem (14). Tikai tad, ja pēc šo datu izvērtēšanas vēl nav pilnīgas skaidrības par epilepsiju izraisīto fokusu, tomēr pastāv hipotēze par iespējamo perēkļa atrašanās vietu vai vietām

vienas puslodes ietvaros, ir vērts mēģināt to apstiprināt ar invazīvajiem subdurālo elektrodu novadījumiem.

Nākamais posms ir kraniotomijas operācija, kuras laikā uz smadzeņu virsmas tiek novietoti t. s. subdurālie elektrodi. To izvietojumus tiek izplānots pirms operācijas, tomēr var rasties korekcijas attiecīgā rajona anatomijas dēļ (piemēram, ja ar cieto smadzeņu apvalku ir cieši saaugušas kortikālās vēnas, šajā apvidū elektrodu nevar novietot). Pēc elektrodu novietošanas (izmanto dažādus subdurālo elektrodu variantus) uz galvas smadzeņu garozas tie tiek fiksēti pie cietā smadzeņu apvalka. Tad cietais smadzeņu apvalks tiek rūpīgi noslēgts, lai nepieļautu likvoreju, kas var izraisīt brūces inficēšanos. Rūpīgi tiek slēgta arī zemāda un āda, elektrodu kabeļus uz ādu izvada caur zemādu nedaudz tālāk no kraniotomijas brūces.

Pirmo nakti pacients pavada intensīvās terapijas palātā un nākamajā dienā tiek pārvests uz ilgstošas video-EEG novērošanas palātu. Ar pirmo pēcoperācijas dienu tiek samazināta arī antiepileptisko medikamentu deva.

Pēc antiepileptisko medikamentu devas samazināšanas aptuveni 3–4 dienas no elektrodiem tiek pierakstīti EEG dati starplēkmju un lēkmju laikā. Šī informācija palīdz daudz precīzāk lokalizēt epileptisko fokusu. Nākamajās 4–6 dienās tiek veikta smadzeņu garozas stimulācija. Tās fizikālie parametri ir tādi paši kā intraoperatīvajā stimulācijā.

Pirmajā stimulācijas posmā tiek atrasts t. s. references elektrods – to elektriski stimulējot, netiek izraisīta nekāda reakcija. Pēc tam vēlreiz tiek stimulēti visi elektrodi plates elektrodi, salīdzinot ar atrasto references elektrodu. Stimulācijas laikā pacientam ir jāveic dažādas darbības atkarībā no stimulējamās lokalizācijas (piemēram, jāskaita gada mēneši pēc kārtas, jālasa grāmata, jākustina rokas pretējā virzienā, jākustina mēle u. c.).

Simptomi stimulācijas laikā var iekļaut pozitīvus motoros fenomenus (toniskas vai kloniskas muskuļu grupas kontrakcijas), negatīvus motorus fenomenus (patvaļīga mēles, pirkstu kustību inhibēšana u. c.), somatosensorus fenomenus (tirpšana, spiediena sajūta, nejutīgums kādā ķermeņa daļā u. c.) vai valodas traucējumus, līdzīgi kā intraoperatīvajā stimulācijā (10). Pozitīvās atradnes tiek atzīmētas īpašā trīsdimensionālā smadzeņu garozas kartē, kura izveidota, saplūdinot kopā pirmsoperācijas galvas smadzeņu magnētiskās rezonanses attēlus ar pēcoperācijas kompjūtertomogrāfijas attēliem (18). Tādā veidā tiek iegūta galvas smadzeņu garozas karte ar precīzu attiecīgo elektrodu un funkcionālo zonu novietojumu.

Pievienojot informāciju par lēkmju izcelsmes zonu/-ām, var uzskatāmi attēlot un novērtēt epileptiskā fokusa (vai vairāku fokusu) lokalizāciju, apjomu, attiecības pret funkcionāli nozīmīgām garozas lokalizācijām, veikt pirmās aplēses par rezekcijas apjomu, kā arī aptuveni prognozēt operācijas iznākumu. Nākamais solis šo pacientu ārstēšanā ir atkārtota kraniotomijas operācija ar elektrodu izņemšanu un rezekciju, ja ķirurģiski ir iespējams izdalīt epileptisko fokusu, netraumējot funkcionāli nozīmīgās garozas lokalizācijas. Ja rezecējamais rajons pārklājas ar runas zonām vai atrodas tām ļoti tuvu, operāciju var veikt lokālā anestēzijā ar intraoperatīvu runas zonu stimulāciju. Tādējādi var panākt maksimālu patoloģisko audu rezekciju, netraumējot runas funkcijai nozīmīgās garozas lokalizācijas.

Kopējais invazīvās izmeklēšanas laiks ar subdurālajiem elektrodiem variē no 7 līdz 10 dienām. Tas ir atkarīgs no epileptisko lēkmju skaita, stimulācijas panākumiem, pacienta līdzdarbības un personāla iespējām (11).

Intraoperatīvās un ekstraoperatīvas galvas smadzeņu garozas stimulācijas komplikācijas

1. Intraoperatīvās stimulācijas komplikācijas

Komplikācijas ir tādas pašas kā jebkurai neiroķirurģiskai operācijai. Pagaidām nav publicēti pierādījumi tam, ka stimulācijas dēļ pagarinātais operācijas laiks palielinātu pēcoperācijas komplikāciju biežumu.

2. Ekstraoperatīvās stimulācijas komplikācijas

Komplikāciju iespējamība, veicot subdurālu stimulāciju, ir tieši proporcionāla ievietoto elektrodu skaitam (14).

Galvenā ar subdurālu elektrodu ievietošanu saistītā komplikācija ir likvora fistula, un visbiežākā tās lokalizācijas vieta ir elektrodu kabeļu izvadīšanas vieta no zemādas uz ādu (15).

Likvora fistula lielākoties izraisa infekcijas attīstību, kas ir visbiežākais potenciālas morbiditātes cēlonis pacientiem, kuriem ievietoti subdurāli elektrodi. Literatūrā minētais sastopamības biežums ir aptuveni 7% vairāku rindu elektrodiem un 0,85% vienas rindas elektrodiem (12). Tik liela komplikāciju biežuma atšķirība, izmantojot atšķirīgus elektrodus, izskaidrojama ar lielāku operācijas (kraniotomijas) apjomu vairāku rindu elektrodu ievietošanai. Vienas rindas elektrodus bieži vien ievieto caur vienkāršu frēzes atveri.

Ja attīstās meningīts, elektrodi ir jāizņem.

Iespējamas arī citas komplikācijas, piemēram, smadzeņu tūska, kas saistīta ar elektrodu novietošanu virs tām. Lielāks elektrodu skaits un ilgāks izmeklējuma laiks tieši proporcionāli saistāms ar smadzeņu tūskas pakāpi (13).

Bieži novērota arī tāda komplikācija kā subdurāla un/vai epidurāla hematoma. Neliela izmēra subdurāli saasiņojumi novērojami gandrīz vienmēr.

Diskusija

Mūsdienās strauji attīstās funkcionālās attēldiagnostikas metodes (funkcionālā magnētiskā rezonanse (fMR), magnetoencefalogrāfija (MEG)), kuras piedāvā neinvazīvas galvas smadzeņu funkcionālo zonu kartēšanas iespējas (16). Arvien lielāku nozīmi neiroradioloģiskajos izmeklējumos iegūst pozitronu emisijas tomogrāfija (PET) un viena fotona emisijas kompjūtertomoģrāfija (SPECT), ko savukārt var izmantot neinvazīvai epileptiskā fokusa meklēšanai.

Patlaban, pateicoties šīm modernajām izmeklēšanas metodēm, tikai nelielai daļai epilepsijas ķirurģijas pacientu ir nepieciešama invazīvā intraoperatīvā vai ekstraoperatīvā izmeklēšana (piemēram, tikai 20% deniņu daivas epilepsijas pacientu (1)).

Tomēr katrai no minētajām metodēm ir priekšrocības un trūkumi epilepsijas pacientu izmeklēšanā. Piemēram, funkcionāla magnētiskā rezonanse var tikt veiksmīgi izmantota, lai noteiktu runas lateralizāciju un motoro garozu, tomēr runas kartēšanai to neiesaka lietot, jo ar šo metodi drīzāk var noteikt runas funkcijā iesaistītās, nevis būtiskās garozas lokalizācijas (21). Tādēļ ar fMR veikta runas zonu kartēšana pārādītu plašākus garozas rajonus, kas iesaistīti runas funkcijā, un vairāk ierobežotu iespējas rezecēt epileptisko zonu pilnībā. Savukārt SPECT tiek uzskatīta par neatbilstošu metodi, lai precīzi lokalizētu būtiskās epileptogēnās zonas robežas, it īpaši, ja tām ir neliels izmērs (22, 23). Turklāt, strādājot ar šīm metodēm, vēl nav uzkrāta pietiekami liela pieredze, lai izdarītu skaidrus secinājumus. Vēl aizvien sastopami pacienti ar nepārliecinātiem, neviendabīgiem neinvazīvo izmeklējumu rezultātiem, tādēļ šajos gadījumos par definitīvās izmeklēšanas metodi jāizvēlas invazīvā garozas stimulācija. Invazīvā garozas stimulācija vēl aizvien tiek uzskatīta par “zelta standartu” funkcionāli būtisko garozas lokalizāciju un epileptisko fokusu noteikšanā (24, 25). Tas tiek pamatots ar to, ka šai metodei, lietojot pareizus fiziskus parametrus, nav maldīgi pozitīva (*false positive*) rezultāta. Katras funkcionālās garozas struktūras darbība, lai kāda arī būtu tās funkcionālā nozīme, tiks traucēta ar elektrisko stimulāciju, tādā veidā izraisot funkcionālas sekas (26). Vienīgais nosacījums ir noteiktu fizisko parametru ievērošana stimulācijas procesā, jo vissīkākā tehniskā novirze var novest pie maldīgi negatīva rezultāta (27, 28).

Šo invazīvo izmeklējumu nozīmi neiroķirurģijā varētu pārskatīt tālākā nākotnē, kad būs vairāk datu un pieredzes darbā ar neinvazīvajām smadzeņu funkcionālās izmeklēšanas metodēm (18).

Būtiski vēlreiz uzsvērt garozas stimulācijas nozīmi neiroonkoloģijā – gadījumos, kad audzējs atrodas tuvu pie funkcionāli nozīmīgas garozas zonas vai daļēji pārklājas ar to. Šajās situācijās intraoperatīva stimulācija dod iespēju maksimāli izdalīt tumora audus, neskarot šīs būtiskās lokalizācijas. Ja šajos gadījumos funkcionālajai kartēšanai izmantotu nevis intraoperatīvo stimulāciju, bet gan fMR, nelielajā operācijas ložā nebūtu iespējams tik precīzi noteikt rezekcijas robežu un līdz ar to panākt maksimālu audzēja izdalīšanu.

Pierādījums tam, ka invazīvās galvas smadzeņu stimulācijas metodes ne tikvien nezaudē savu nozīmi neiroķirurģijā, bet pat attīstās un pilnveidojas, ir pašreizējā intraoperatīvās subkortikālās stimulācijas attīstība. Tās pamatā ir atzinums, ka runas funkcijas saglabāšanā svarīga nozīme ir ne tikai kortikālajām runas un valodas zonām, bet arī no tām izejošajiem subkortikālajiem traktiem (17, 20). Subkortikālajā smadzeņu stimulācijā, līdzīgi kā garozas stimulācijā, tiek stimulētas dažādas smadzeņu baltās vielas zonas vienlaikus ar runas funkcijas izvērtēšanu. Lokalizācijas, kurās reģistrē kādus funkcionālus defektus, iezīmē tumora rezekcijas robežu.

Ņemot vērā šos un iepriekš minētos apsvērumus, secināts, ka galvas smadzeņu invazīvā stimulācija aizvien ir nozīmīga modernās neiroķirurģijas sastāvdaļa, un iespēja veikt šādus izmeklējumus neiroķirurģijas klīnikā liecina par tās atbilstību labākajiem mūsdienu ārstniecības un zinātnes centra kritērijiem. Autori cer, ka arī pacientiem Latvijā drīzumā būs iespējams piedāvāt šāda līmeņa procedūras.

Literatūra

1. Immonen A, Jutila L, Vapalahti M et al. (2004) Preoperative Clinical Evaluation, Outline of Surgical Technique and Outcome in Temporal Lobe Epilepsy, *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, Vol 29, 88–124.
2. Noachtar S, Winkler P, Lueders HO. (2003) *Surgical Therapy of Epilepsy, Neurological Disorders: Course and Treatment, Second Edition*, Elsevier Science.
3. http://www.bidmc.harvard.edu/display.asp?node_id=4638
4. http://findarticles.com/p/articles/mi_m2405/is_n1_v120/ai_14174315 (Thomas RK, Donaldson Young C. (1993) *Journal of General Psychology*)
5. Lueders HO, Najm I, Nair D, Widdess-Walsh P, Bingman W. (2006) The epileptogenic zone: general principles, *Epileptic Disorders*, 8 (Suppl. 2): 51–59.
6. Wolf P. (1991) The history of surgical treatment of epilepsy in Europe. *Epilepsy surgery*, Raven Press, New York, 2: 9–16.
7. Wyllie E, Awad I. (1993) Intracranial EEG and localization studies, *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practices*, Lea & Febiger, Philadelphia, 87: 1023–1037.
8. Lesser RP, Gordon B, Fisher R, Hart J, Uemats S. (1991) Subdural grid electrodes in surgery of epilepsy, *Epilepsy Surgery*, Raven Press, New York, 46: 399–408.
9. Winkler PA. (2002) *Intraoperatives Sprachmonitoring*, Klinische Hirnanatomie, Muenchen, Pflaum.
10. Benbadis S, Wyllie E, Bingman WE. (2001) Intracranial electroencephalography and localisation studies, *The Treatment of Epilepsy*, 3rd edition, edited by E. Wyllie, Lippincott, Williams & Wilkins.
11. Harkness WFJ, McEvoy A. (2005) Methods of epilepsy surgery, <http://www.e-epilepsy.org.uk/pages/articles/text.cfm?id=63>
12. Wyler AR, Walker G, Simes G. (1991) The morbidity of long-term seizure monitoring using subdural strip electrodes, *J Neurosurg*, 74: 734–737.
13. Hamer HM, Morris HH, Mascha EJ et al. (2002) Complications of invasive video-EEG monitoring with subdural grid electrodes. *Neurology*, Jan 8, 58 (1): 97–103.
14. Alarcon G, Valentin A, Watt C, Selway RP et al. (2006) Is it worth pursuing surgery for epilepsy in patients with normal neuroimaging? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77: 474–480.
15. Roper SN. (1995) Implantation of grid and strip electrodes, *Techniques in Neurosurgery*, New York, Raven Press, 1: 5–10.
16. Kamada K, Sawamura Y, Takeuchi F et al. (2007) Expressive and receptive language areas determined by a non-invasive reliable method using functional magnetic resonance imaging and magnetoencephalography, *Neurosurgery* 60: 296–306.
17. Bello L, Galluci M, Carraba G, Giussani C et al. (2007) Intraoperative subcortical language tract mapping guides surgical removal of gliomas involving speech areas, *Neurosurgery* 60: 67–82.
18. Winkler PA, Vollmar C, Krishnan KG, Pfluger T, Brückmann H, Noachtar S. (2000) Usefulness of 3-D reconstructed images of the human cerebral cortex for localization of subdural electrodes in epilepsy surgery, *Epilepsy Research*, 41: 169–178.
19. Winkler PA, Herzog CH, Henkel A, Arnold S, Werhahn KJ, Yousry TA, Uttner I, Ilmberger J, Tatsch K, Weis S, Bartenstein P, Noachtar S. (1999) Nichtinvasives Protokoll für die epilepsiechirurgische Behandlung fokaler Epilepsien, *Nervenarzt*, 70: 1088–1093.
20. Bello L, Acerbi F, Giussani C, Baratta P et al. (2006) Intraoperative language localisation in multilingual patients with glioblastomas, *Neurosurgery* 59: 115–125.
21. Silbergeld DL. (2001) Cortical mapping, *Epilepsy Surgery*, edited by Lüders HO, Comair YG, Second edition, Lippincott Williams & Wilkins, 633–635.

22. Ho SS, Berkovic SF, Berlangieri SU, Newton MR, Egan GF, Tochon-Danguy HJ, McKay WJ. (1995) Comparison of ictal SPECT and interictal PET in the presurgical evaluation of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*; 37: 738–745.
23. Spencer SS. (1994) The relative contributions of MRI, SPECT, and PET imaging in epilepsy. *Epilepsia*; 35: 72–89.
24. Ojemann GA, Ojemann JG, Lettich E et al. (1989) Cortical language localisation in left dominant hemisphere: an electrical stimulation mapping investigation in 117 patients, *J Neurosurg* 71: 316–326.
25. Penfield W. (1937) The cerebral cortex and consciousness, in *The Harvey Lectures*, Baltimore, Williams & Wilkins Co., p 35–69.
26. Duffau H, Gatignol P, Mandonnet E, Peruzzi P, Tzourio-Mazoyer N, Capelle L. (2005) New insights into the anatomo-functional connectivity of the semantic system: a study using cortico-subcortical electrostimulations, *Brain* Apr; 128 (Pt 4): 797–810
27. Taylor MD, Bernstein M. (1999) Awake craniotomy with brain mapping as a routine surgical approach to treating patients with supratentorial intraaxial tumors: a prospective trial of 200 cases, *J Neurosurg*; 90: 35–41.
28. Leuthardt EC, Miller K, Anderson NR, Schalk G, Dowling J, Miller J, Moran DW, Ojemann JG. (2007) Electrocorticographic frequency alteration mapping: a clinical technique for mapping the motor cortex, *Neurosurgery* 60 [ONS Suppl 2]: ONS-260-ONS-271.

Pirmā paciente

53 gadus veca sieviete ar automotoriskām un ģeneralizētām toniski kloniskām lēkmēm, kā arī kompleksām motorām aurām pēc 17 gadu vecumā pārciestas galvas traumas. Automotorās lēkmes atkārtojās 2–3 reizes mēnesī, ģeneralizētās – vairākas reizes gadā. Kopš 2004. gada lēkmes ir kļuvušas biežākas un stiprākas. Uz antiēpileptiskās terapijas fona (pirms operācijas lieto 4 medikamentus) lēkmes atkārtojās.

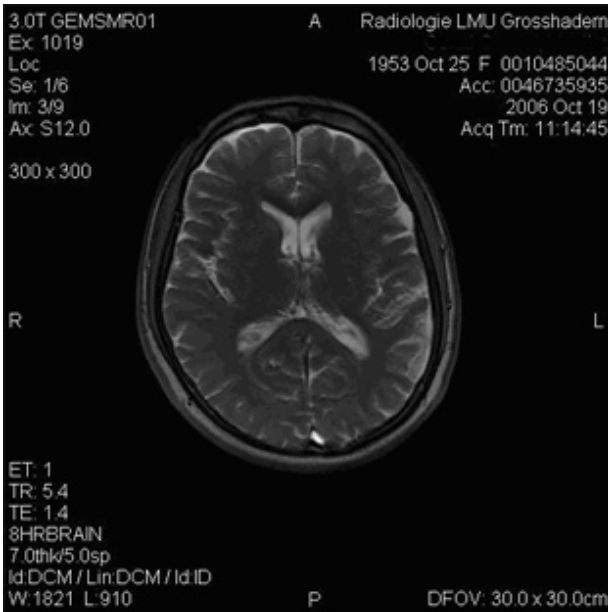
Interiktāli video-EEG novērošanā ar virsmas un sfenoidāliem elektrodiem redzama epileptiska aktivitāte kreisajā meiotemporālajā rajonā un iktāli – kreisās pusēs deniņu rajonā.

Magnētiskajā rezonansē redzams plašs kortikāls hipodenss postkontūzijas rajons kreisās puslodes temporo-parietālajā rajonā.

Ņemot vērā to, ka kontūzijas (lēkmju izcelsmes) rajons ir plašs un tas varētu ietvert arī motorās runas zonu (*Broca*), tiek nolemts runas funkcijas lokalizēšanai ievietot subdurālu elektrodu plati virs magnētiskās rezonanses (MR) hipodensā rajona.

Patient No. 1

53 years old lady, suffering from epileptic seizures (automotor seizures 2–3 times a month, generalized tonic-clonic seizures several times a year) after a severe head trauma at the age of 17.



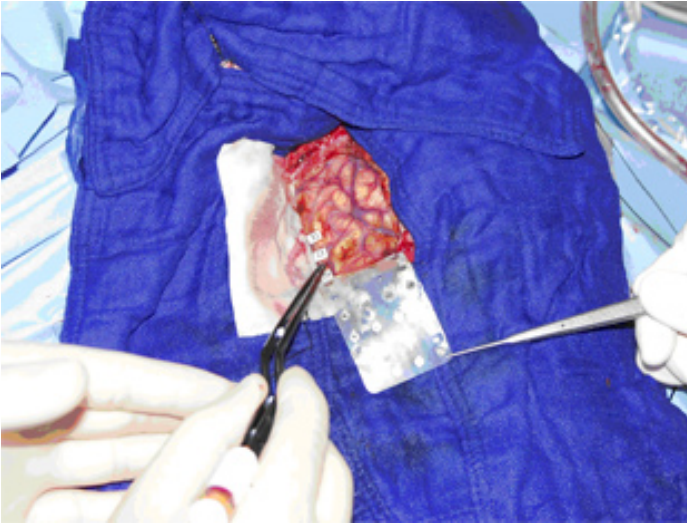
1. attēls **Plašs kortikāls hipodenss postkontūzijas rajons kreisajā temporo-parietālajā apvidū**

Extent cortical hypodense post-contusion region in the left temporoparietal region



2. attēls. **Rezektijas (otrā) operācija ar intraoperatīvo garozas stimulāciju. Attēlā redzams garozas rajons ar vairāku rindu subdurālo elektrodu plati, kā arī trīs atzīmētie runas punkti, kuri atrodas rezektijas zonā.**

Awake craniotomy with resection of epileptogenic focus. We see the 3 cortical points where speech was elicited during extra-operative stimulation. The points are located in the zone planned for resection.



3. attēls. Attēlā redzama garozas intraoperatīvās stimulācijas procedūra. Subdurālā elektrodu plate tiek noņemta un intraoperatīvi stimulēti trīs iepriekš atrastie runas punkti. Vienlaikus ar stimulāciju pacientes runas funkciju izvērtē neirofiziologs. Atšķirībā no ekstraoperatīvās stimulācijas rezultātiem intraoperatīvi šajos trīs punktos runas funkciju tomēr nekonstatēja un tādējādi rezekciju varēja veikt visā sākotnēji noteiktajā epileptiskajā zonā. Pēc operācijas pacientei epileptiskās lēkmes hospitalizācijas un rehabilitācijas laikā netika novērotas, bija nelieli iniciāli runas (vārdu “atrašanas”) un atmiņas traucējumi, kas novērošanas periodā mazinājās.

We see the intra-operative cortical stimulation procedure in the 3 speech points. Intra-operatively, there were no speech functions found in these points and we could include them in the planned resection of epileptic tissue. After the operation, during the hospitalization period, there were no more seizures and only light, regressive word-finding and memory disturbances.

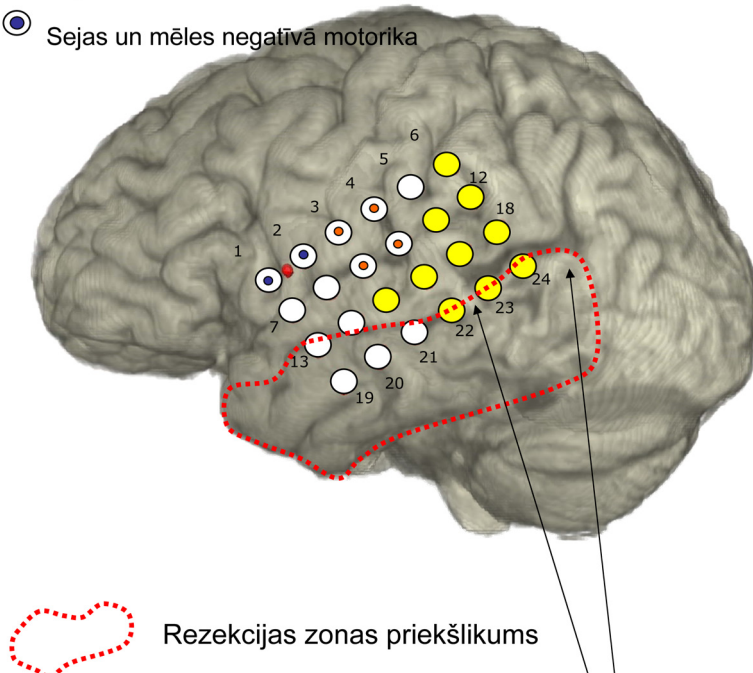
Subdurālas stimulācijas protokola apraksts

Epilepsijas lēkmes ģenerējošais, rezecējamais rajons (sarkanā punktveida līnija) daļēji pārklājas ar runas punktiem (22., 23., 24. punkts). Lai panāktu maksimālu epileptiskās zonas rezekciju, neskarot runas zonas, tiek nolemts operāciju veikt, pacientei esot nomoda stāvoklī, un rezekcijas robežas noteikt ar intraoperatīvo garozas stimulāciju.

Description in the subdural stimulation protocol: region that is responsible for generation of epileptic seizures (red dotted line) partially overlaps with the speech localizations (points 22, 23, 24). To acquire maximum resection of the epileptic zone, not damaging the speech points, it is also decided to perform an intra-operative cortical stimulation with awake surgery. During the intraoperative stimulation, surgeon tries to determine the exact border of resection close to these 3 speech points.

Pac. Nr. 1
Stimulācijas kopsavilkums
un rezekcijas priekšlikums

- Runa
- Sejas un mēles motorika
- Sejas un mēles negatīvā motorika



Rezekcijas zonas priekšlikums

3 runas punkti, kuros nepieciešams veikt intraoperatīvu garozas stimulāciju, lai precizētu rezekcijas robežu

Otrais pacients

14 gadus vecs zēns, kuram epilepsijas lēkmes pirmo reizi sākušās pirms pieciem gadiem. Klīniski novērotas auras ar dialeptiskām lēkmēm un samaņas zudumu. Jau divus gadus pirms tam bija zināms, ka zēnam ir mediāls veidojums kreisajā deniņu daivā.

Nemot vērā, ka lēkmes turpinājās, atkārtojoties vairākas reizes dienā, un bija zināms par veidojuma esamību kreisās puses deniņu daivā, 2001. gadā veikta operācija – veidojuma daļēja izdalīšana. Histoloģiski konstatēts disembrioplastisks neiroepitēliāls tumors (DNET). Pēcoperācijas MR kontroles uzņēmumos redzami reziduāli tumora audi posterolaterālajā deniņu daivas daļā, tomēr lēkmes neatkārtojās.

Pirmās pēcoperācijas lēkmes parādījās 2006. gada vidū, atkārtojās vairākas reizes nedēļā. Tām raksturīga 1–2 minūtes ilga „iestrēgšana” kādā kustībā, ar zēnu šajā brīdī nav iespējams kontaktēties. Lēkmes ietekmē bērna psihosociālo attīstību un dzīves kvalitāti.

Veikta video-EEG izmeklēšana, kas liecina par epileptisku aktivitāti mugurējā deniņu daivā. Lēkmju izcelsmes vieta tāpat sakrīt ar tumora reziduālo audu lokalizāciju.

Interiktālā PET izmeklējumā redzama hipometabolisma zona (raksturīga epilepsijas perēklim interiktāli) mugurējā deniņa daivā, tumora lokalizācijas vietā.

Iktālā SPECT izmeklējumā novērots perfūzijas defekts kreisajā deniņu rajonā *G. temporalis inferior* rajonā. Relatīva hiperperfūzija iktāli, galvenokārt *G. temporalis medius*.

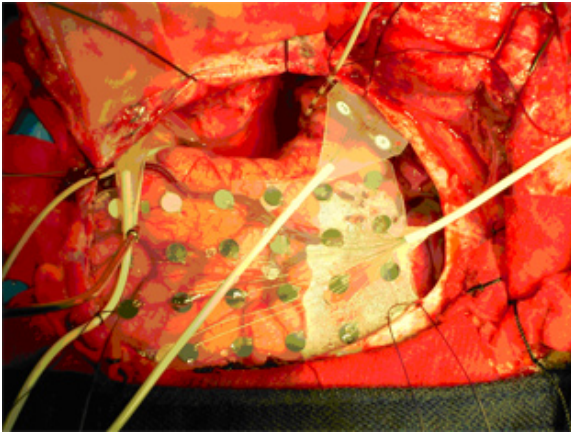
Nemot vērā blakus epileptisko lēkmju iespējamai izcelsmes zonai esošo runas zonu (*Wernicke* – sensorā runa), kā arī meziotemporālo tumora lokalizāciju, tiek nolemts veikt ekstraoperatīvu garozas un meziotemporālo daļu stimulāciju, lai precizētu lēkmju izcelšanās rajonu, noteiktu runas zonas, kā arī rezekcijas robežas. Pirmajā operācijā uz smadzeņu virsmas tiek novietoti vairāki dziļie smadzeņu elektrodi (meziotemporālajās daļās), kā arī viens vienas rindas elektrods un divi vairāku rindu elektrodi.

Patient No. 2

A 14-year old boy with a seizure history of 5 years. Clinically – auras and dialeptic seizures with the loss of consciousness. As a reason for epilepsy we consider a disembrional neuroepithelial tumor (DNET) in the left temporomesial lobe. The first operation was performed in 2001. After the operation, seizures have repeated only since 2006, and we see some residual tumor tissue in the posterior-lateral part of the temporal lobe. Seizures have an impact on the quality of life and the child's psychosocial development. Taking into account that near the rest tumor tissue the *Wernicke* (sensor speech) region is located, we also decided to perform an intra-operative stimulation of cortex in awake craniotomy.

Subdurālās stimulācijas protokola apraksts

Pacientam tika verificēta plaša lēkmju iniciācijas zona ar tai apkārt esošu lēkmju izplatības zonu. Tā kā lielākā iniciācijas zonas daļa sakrīt ar runas funkcijas zonu,

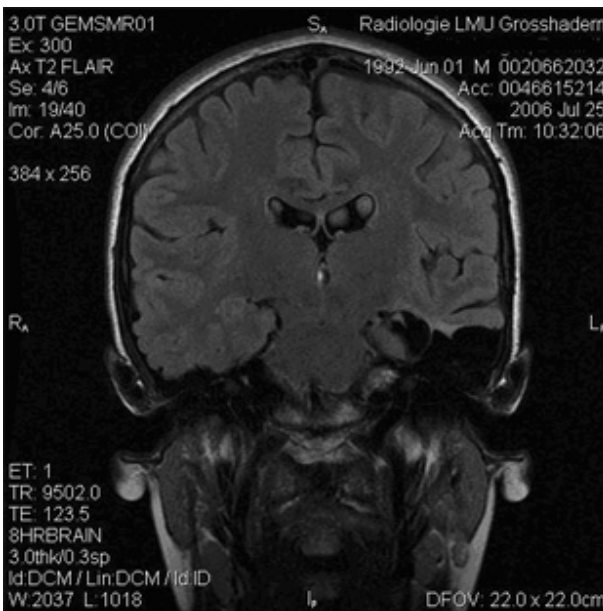


4. attēls. Rezekcijas operācijas laikā, pirms intraoperatīvās stimulācijas. Redzams agrāk veiktās smadzeņu audu rezekcijas dobums, vairāku rindu subdurālo elektrodu plates (2 un 4 rindu, viena vienas rindas elektrodu plate un divi dziļie smadzeņu elektrodi, kuri tika izmantoti ekstraoperatīvajā garozas kartēšanā.

Pēc elektrodu noņemšanas tika veikta arī intraoperatīva stimulācija precīzākai runas funkciju lokalizācijai un patoloģisko audu rezekcija tādā apjomā, lai neietekmētu funkcionāli nozīmīgos audus.

During the resection operation. We see the cavity left after the previous tumor resection operation as well as several subdural electrodes (strip and grid electrodes).

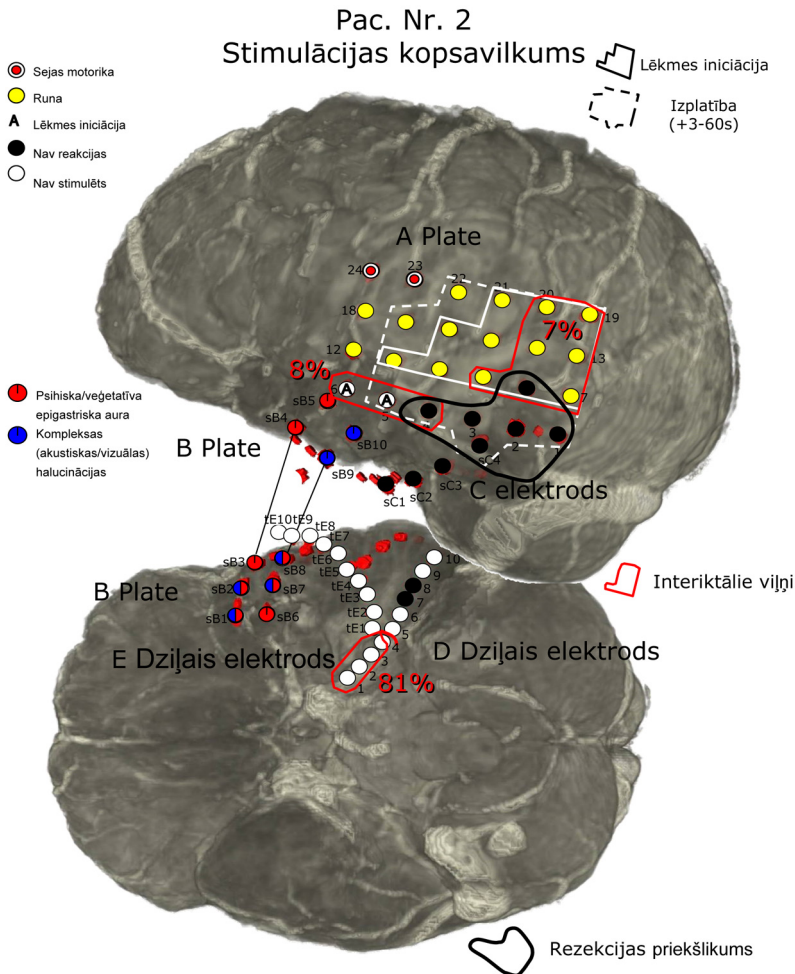
After removing the electrodes, cortical mapping for speech was performed.



5. attēls. Kreisajā meziotemporālajā rajonā vērojami reziduāli tumora audi
We see the residual tumor tissue in the left mesiotemporal region

tās rezekcija nav iespējama. Tika nolemts veikt maksimālu tumora reziduālo audu rezekciju, kā arī izdalīt to nelielo iniciācijas zonas daļu, kurā nav konstatēta runas funkciju lokalizācija. Ņemot vērā to, ka arī šeit plānotā rezekcijas līnija atrodas ļoti tuvu runas punktiem, tika nolemts veikt operāciju, pacientam esot nomoda stāvoklī, ar intraoperatīvu stimulāciju. Stimulācija tika lietota, lai noteiktu rezekcijas robežu pie apakšējiem runas punktiem (gar rezekcijas plāna augšējo robežu). Tādējādi tika panākta maksimāla patoloģisko audu rezekcija, netraumatisējot funkcionāli nozīmīgos audus.

Pēc operācijas netika novēroti būtiski funkcionāli traucējumi, lēkmes stacionēšanas laikā neatkārtojās. Sešu mēnešu laikā pēc operācijas pacientam ir bijušas vairākas epizodes ar epileptiskām aurām.



Description in the subdural stimulation protocol:

A broad epileptic zone was estimated, which overlaps with the speech zone. It was decided to remove part of epileptogen zone, which does not include cortical localizations responsible for speech. To determine the border of resection, intra-operative stimulation in awake surgery was used.

During the hospitalization period, no seizures occurred. In a time period of 6 months after the surgery, patient reported several episodes with epileptic auras.

Summary

By definition, epilepsy surgery is any neurosurgical intervention whose primary objective is to relieve medically intractable epilepsy. Contemporary epilepsy surgery consists of three phases: non-invasive investigations, invasive investigations, and surgery.

This article is devoted to two invasive investigations in the process of pre-surgical evaluation of epilepsy surgery candidates – intra-operative and extra-operative cortical stimulation.

In this article we shortly describe the history of brain stimulation, both ways of stimulation, their indications, stimulation procedures and possible complications. Additionally, we demonstrate 2 epilepsy patient cases, where cortical stimulation was used.

Although, thanks to modern investigation methods in neurosurgery, the need for invasive investigations is considerably diminished in the two past decades, they are still regarded as a “golden standard” for defining the functional zones of cerebral cortex (cortical mapping) and are used in situations when non-invasive investigation methods have failed to give sufficient information for surgery.

Keywords: *epilepsy, neurosurgery, epilepsy surgery, cortical mapping.*

LATVIJAS UNIVERSITĀTES RAKSTI
735. sējums, MEDICĪNA

Latvijas Universitātes Akadēmiskais apgāds
Baznīcas ielā 5, Rīgā, LV-1010
Tālr. 67034535