

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



**SMĒĶĒŠANAS IZRAISĪTO AGRĪNO PATOLOĢISKO
PĀRMAIŅU NOVĒRTĒŠANA PLAUSĀS UN TO SAISTĪBA AR
HRONISKAS OBSTRUKTĪVAS PLAUSŪ SLIMĪBAS
KANDIDĀTGĒNU POLIMORFISMIEM**

Agnese Kislina

PROMOCIJAS DARBS FARMĀCIJAS ZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA
IEGŪŠANAI FARMACEITISKĀS FARMAKOLOĢIJAS
APAKŠNOZARĒ

Rīga, 2015

Darba zinātniskais vadītājs:

Bioloģijas zinātņu doktore, LU asoc. profesore Gunta Strazda

Recenzenti:

Dr. habil. biol., prof. Ruta Muceniece

Dr. med., vad. pētn. Dagmāra Sprūdža

Dr. med., prof. Maria – Lieselotte Mlynek - Kersjes

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Dr. med., prof. Valdis Pīrāgs

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm., doc. Kristīne Saleniece

Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts:



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē».

This work has been supported by the European Social Fund within the project «Support for Doctoral Studies at University of Latvia».

KOPSAVILKUMS

Par darba hipotēzi izvirzījām, ka jauniem indivīdiem ar salīdzinoši mazu smēķēšanas stāžu un normāliem plaušu funkciju rādītājiem jau ir konstatējamas pārmaiņas inducēto krēpu imūno šūnu spektrā, kas liecina par agrīnu iekaisuma reakciju un minētās pārmaiņas varētu būt saistītas ar Hroniski Obstruktīvas Plaušu Slimības kandidātgēnu polimorfismiem.

Darba realizācijai izveidojām pētījumam atbilstošas nesmēķējošu (n=49) un smēķējošu (n=58) brīvprātīgu jauniešu grupas. Tā kā primārais HOPS diagnosticēšanas veids ir spirogrāfija, kura uzrāda elpceļu obstrukciju pirms simptomu parādīšanās, visiem pētījuma dalībniekiem novērtējām plaušu ventilācijas funkcijas rādītājus (FEV₁%, FVC% un FEV₁/FVC%). Smēķēšanas izraisīto iekaisumam raksturīgo pārmaiņu esamību elpceļos novērtējām pētot šūnas inducētajās krēpās. Tā kā tikai daļai smēķētāju attīstās HOPS, acīmredzot arī ģenētiskie faktori veicina tā attīstību. Mēs izvēlējāmies 4 populārākos gēnu polimorfismus (*CHRNA3/5* (rs1051730), *AGPHDI* (rs8034191), *IREB2* (rs2656069), *CHIT1* (rs2494303)), kuri, pēc literatūras datiem, visbiežāk tiek konstatēti HOPS ģenētiskajās pārbaudēs. Pētījuma dalībniekiem minēto polimorfismu esamību noskaidrojām, ņemot venozās asinis.

Spirometrija uzrādīja, ka neliels smēķēšanas stāžs (0,15 – 9 pakgadi) neietekmē plaušu ventilācijas funkcijas rādītājus. Šūnu izpēte inducētajās krēpās atklāja, ka pieaugot smēķēšanas stāžam, pieaug neitrofilo leukocītu, eozinofilo leukocītu un CD8⁺ T limfocītu daudzums. Noskaidrojām, ka inducētajās krēpās pieaug arī T regulatoro limfocītu skaits, kas iespējams ierobežo CD8⁺ T limfocītu citotoksisko iedarbību. Šāda imūno reakciju aina ir konstatēta arī inducētajās krēpās pacientiem ar HOPS, kas ļauj secināt, ka jauniem smēķētājiem ar nelielu smēķēšanas stāžu agrīni sāk attīstīties HOPS patoģenēzei raksturīgs iekaisums.

Novērtējot HOPS kandidātgēnu asociāciju ar pētījuma dalībnieku plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem un iekaisuma šūnām inducētajās krēpās konstatējām, ka indivīdiem *CHRNA3/5* un *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma gadījumā ir zemāki plaušu ventilācijas funkciju rādītāji. Gados jauniem smēķētājiem, kas ir *AGPHDI* gēna pētāmā polimorfisma, abu vai vienas riska alēles nēsātāji (C/C; C/T), ir

raksturīgs iekaisums elpceļos ar neitrofilo leukocītu dominanci. Individīdiem, ar *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfismu, kas ir abu vai vienas riska alēles nēsātāji (A/A; A/C), ir raksturīgs iekaisums elpceļos ar neitrofilo leukocītu un makrofāgu dominanci.

Mūsu pētījums apstiprināja izvirzīto hipotēzi, ka jauniem indivīdiem ar mazu smēķēšanas stāžu un normāliem plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem jau ir konstatējamas pārmaiņas inducēto krēpu imūno šūnu spektrā, kas liecina par agrīnu iekaisuma reakciju un minētās pārmaiņas ir saistītas ar HOPS kandidātģēnu polimorfismiem.

SUMMARY

In this thesis, we proposed a hypothesis that young individuals with relatively short smoking history and normal indicators of lung function will regardless exhibit changes in the spectrum of induced sputum cells. We speculated that the above could be interpreted as signs of an early inflammatory reaction and could be linked with polymorphisms of COPD candidate genes.

For this study, we assembled two groups of participants: non-smoking ($n = 49$) and smoking ($n = 58$) young volunteers. Since the primary method for COPD diagnosis is spirometry, which can reveal airway obstruction even before the symptoms are manifested, we evaluated the lung ventilation indicators (FEV_1 , %, FVC, % and FEV_1/FVC , %) of all participants. Analyzing cells in the induced sputum assessed the presence of smoking – caused changes in airways. The fact that only a certain number of smokers develop COPD suggests that genetic factors also play an important role in disease development. We chose 4 most common gene polymorphisms (*CHRNA3/5* (**rs1051730**), *AGPHD1* (**rs8034191**), *IREB2* (**rs2656069**), *CHIT1* (**rs2494303**)), which according to the literature, are being observed most often in the COPD genetic tests. We identified presence of the above polymorphisms among the participants by performing venous blood tests.

Spirometry results showed that a short smoking history (0.15 – 9 pack years) does not influence the indicators of lung ventilation. Analyses of the induced sputum cells revealed that increase in smoking history correlates with increasing numbers of neutrophil, eosinophil and $CD8^+$ T lymphocytes. We also observed an increase in numbers of the T regulatory lymphocytes in the induced sputum; it is possible that they neutralize the cytotoxic effect of $CD8^+$ T lymphocytes. Such immune reaction has also been observed in the induced sputum of COPD patients, which suggests that young smokers with short smoking history are already developing inflammation characteristic of COPD pathogenesis.

After evaluating the association between COPD candidate genes and indicators of participants' lung ventilation function on one hand and association between COPD candidate genes and the inflammation cells in the induced sputum on the other, we

arrived at a conclusion that homozygote individuals with single nucleotide polymorphism in *CHRNA3/5* and *CHIT1* genes exhibit a lower level of lung ventilation function. Young smokers with an *AGPHDI* gene single nucleotide polymorphism, who are carriers of one or both risk alleles (C/C; C/T), typically exhibit an airway inflammation with the dominance of neutrophil leukocytes. Individuals with *CHIT1* single nucleotide polymorphism, who are carriers of one or both risk alleles (A/A; A/C), exhibit an airway inflammation with the dominance of neutrophil leukocytes and macrophages.

Therefore our study has confirmed a hypothesis we have proposed that young individuals with short smoking history and normal lung function indicators display changes in their induced sputum cell spectrum. This indicates an early stage of inflammatory reaction, triggered by COPD candidate gene polymorphisms.

SAĪSINĀJUMI

AGPHD1 – aminoglikozīda fosfotransferāzes domēnu saturošais proteīns 1

AP – 1 – aktivētājproteīns 1

APC – antigēnu prezentējošā šūna

BAFF – B limfocītu aktivējošais faktors

BAFF – R – B limfocītu aktivējošā faktora receptors

BAL – bronhu alveolārā lavāža

BW – bronhu skalojums

CCL – hemokīna CC ligands

CCR – hemokīna CC receptors

CHIT1 – hitināze 1 jeb hitotriozidāze 1

CHRNA3/5 – nikotīnskābes acetilholīna receptora alfa subvienība 3/5

COX – ciklooksigenāze

CTGF – saistaudu augšanas faktors

CTLA4 – citotoksisko T limfocītu asociētais proteīns – 4

CXCL – hemokīna CXC ligands

CXC – hemokīns CX

CXCR – hemokīna CXC receptors

DAB – 3,3' – diaminobenzidīns

dH₂O – destilēts ūdens

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

DTT – ditiotreitols

ECM – ekstracelulārais matrikss

ECN – eozinofilo leukocītu izdalītais neirotoksīns

ECP – eozinofilo leukocītu katjoniskais proteīns

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

EPO – eozinofilo leukocītu peroksidāze

Fas/FasL – tumora nekrozes faktora saimes II tipa transmembrānas proteīns

FEV₁ – forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē

FDC – folikuārās dendrītiskās šūnas

FoxP3 – transkripcijas faktors fork head box P3

FVC – plaušu vitālā kapacitāte

G – CSF – granulocītu koloniju stimulējošais faktors

GCS – glutamilsteīna sintāze

GM – CSF – granulocītu - makrofāgu koloniju stimulējošais faktors

GOLD – Globālās Obstruktīvās Plaušu slimības vadlīnijas (*Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*)

GRO – α – augšanas faktora receptora līdzīgais onkogēns α

GSH – glutations

GST – glutaciona S transferāze

GWAS – genoma mēroga asociācijas pētījumi

HBSS – Henksa balansētais sāļu šķīdums

H₂O₂ – ūdeņraža peroksīds

HLA – DR – leukocītu antigēna MHC kompleksa II klases virsmas receptors

HOPS – hroniska obstruktīva plaušu slimība

HYKK – hidroksilizīna kināze

IFN – γ – interferons γ

Ig – imūnglobulīns

IL – interleikīns

IP – 10 – interferona γ indukcijas proteīnu – 10

iPLA2 – kalcija atkarīgā fosfolipāze A2

IREB2 – dzelzs reaģējošā elementa saistošais proteīns 2

i – TAC – interferonu γ inducētā T limfocītu hemotakses faktors

LT – limfotoksīns

LtB₄ – leukotriēns B₄

LPS – lipopolisaharīds

MAP – mitogēna aktivētais proteīns
MAPK – mitogēnu aktivētā proteīnu kināze
MCP – 1 – monocītu hemotakses proteīns – 1
mEPHX1 – mikrosomālā epoksīda hidroksilāze 1
MHC – galvenais audu saderības komplekss
Mig – monokīnu inducētais interferons
MMP – matricas metalloproteāze

nAChRs – nikotīnskābes acetilholīna receptors
NADPH – adenīna dinukleotīda fosfāts
NF – κB – nukleārais faktors kapa B
NK – dabīgās galētājšūnas
NO – slāpekļa oksīds

O₂[·] – superoksīda anjons
OH[·] – reaktīvais hidroksila radikālis
ONOO[·] – peroksinitrīta anjons
OR – izredžu attiecība

p – statistiskā ticamība
PCR – polimerāzes ķēdes reakcija
PVO – Pasaules Veselības organizācija

r – korelācijas koeficients
r² – determinācijas koeficients
RNS – ribonukleīnskābe
ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi

SNP – viena nukleotīda polimorfisms
SOD – superoksīda dismutāze

TCR – T limfocītu receptori
TGF – β – transformējošais augšanas faktors β
TNF – α – tumora nekrozes faktors α

TLR – Toll – līdzīgais receptors

SATURA RĀDĪTĀJS

1. IEVADS.....	12
2. LITERATŪRAS APSKATS.....	14
2.1. Hroniska obstruktīva plaušu slimība.....	14
2.1.1. Definīcija un slimības raksturojums.....	14
2.1.2. Riska faktori.....	17
2.1.3. HOPS smaguma pakāpes (GOLD).....	19
2.1.4. HOPS diagnostika.....	20
2.1.5. Izplatība.....	22
2.2. HOPS patoģenēze.....	23
2.2.1. Iedzimtā jeb nespecifiskā imunitāte.....	25
2.2.2. Iegūtā jeb specifiskā imunitāte.....	34
2.2.3. Iekaisuma mediatori.....	41
2.2.4. Oksidatīvais stress.....	42
2.2.5. Proteāzes un antiproteāzes.....	46
2.3. Ģenētisko faktoru loma HOPS patoģenēzē.....	47
2.3.1. CHRNA3/5.....	48
2.3.2. IREB2.....	50
2.3.3. AGPHD1.....	51
2.3.4. CHIT1.....	52
3. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI.....	54
4. PACIENTU RAKSTUROJUMUS UN IZMANTOTĀS METODEDES.....	55
4.1. Pētījuma norise un pacientu izvēle.....	55
4.2. Plaušu ventilācijas funkcijas novērtēšana.....	56
4.3. Krēpu indukcija.....	58
4.4. Inducēto krēpu pirmapstrāde.....	61
4.5. Uztriepes preparātu krāsošana diferenciālā šūnu skaita noteikšanai... 	63
4.6. Uztriepes preparātu imūncitoķīmiskā krāsošana.....	64
4.7. Ģenētiskā materiāla iegūšana un apstrāde.....	65
4.8. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (Real-Time PCR).....	70
4.9. Datu statistiskā apstrāde.....	72
4.9.1. Inducēto krēpu iegūtā materiāla apstrādei.....	72
4.9.2. Ģenētiskā materiāla apstrādei.....	76

5. REZULTĀTI.....	77
5.1. Pētījumā iesaistīto dalībnieku raksturojums.....	77
5.2. Plaušu ventilācijas funkcijas raksturojums pētījuma dalībniekiem.....	78
5.3. Imūno šūnu spektra raksturojums inducētajās krēpās.....	80
5.3.1. Smēķēšanas izraisītās šūnu skaita pārmaiņas inducētajās krēpās.....	80
5.3.2. Smēķēšanas stāža ietekme uz imūnās sistēmas šūnām inducētajās krēpās...	83
5.3.3. Dažādu limfocītu skaita savstarpējās funkcionālās sakarības inducētajās krēpās.....	86
5.4. Gēnu polimorfismu raksturojums.....	88
5.4.1. HOPS kandidātģēnu polimorfismu mijiedarbība ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem.....	91
5.4.2. HOPS kandidātģēnu polimorfismu mijiedarbība ar plaušu morfoloģiskajiem rādītājiem.....	99
6. DISKUSIJA.....	118
6.1. Plaušu ventilācija funkcijas rādītāji gados jauniem smēķētājiem.....	118
6.2. Smēķēšanas izraisītās šūnu skaita pārmaiņas inducētajās krēpās.....	118
6.3. HOPS kandidātģēnu polimorfismi, to asociācija ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem un pārmaiņām inducētajās krēpās...	123
7. SECINĀJUMI.....	126
8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	127
9. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTUS ATSPoguļojošo PUBLIKĀCIJU SARAKSTS.....	140
10. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTU PREZENTĀCIJAS KONFERENCĒS.....	141
11. PATEICĪBAS.....	143

1. IEVADS

Hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS) ir ceturtais biežākais nāves iemesls pasaulē. Smēķēšana ir visbūtiskākais HOPS riska faktors. HOPS smaguma pakāpe ir tieši atkarīga no patērēto cigarešu daudzumu. Aptuveni 90% no visiem HOPS pacientiem ir pašreizējie vai bijušie smēķētāji. HOPS ir vienīgā hroniskā slimība no kuras mirstība ar katru gadu pieaug. To skaidro ar populācijas novecošanos, slimības riska faktoru ekspozīciju, kā arī ar smēķētāju skaita pieaugumu, kas ietver gan sievietes, gan jauniešus. Ir zināms, ka HOPS attīstības gaita ir nemanāma un smēķētājs parasti ir bez simptomiem aptuveni 20 vai vairāk gadus. Sūdzības par veselību, kas būtu saistāmas ar smēķēšanu, lielākoties neparādās ātrāk kā 40 gadu vecumā. Ir zināms, ka ne visiem smēķētājiem dzīves gaitā attīstās HOPS, bet gandrīz visi HOPS slimnieki ir smēķētāji. Līdz ar to joprojām ir aktuāls jautājums, kuri būs tie smēķētāji, kam smēķēšana izsauks HOPS? Vai smēķējošiem jauniešiem ar nelielu smēķēšanas stāžu var konstatēt HOPS attīstībai raksturīgo iekaisumu? Jau ilgstoši tiek veikti pētījumi HOPS iekaisuma patoģenēzes izpētē, izmantojot bronho-alveolāro lavāžu (BAL), bronhu biopsijas materiālu un arvien plašāk inducētās krēpas. Ir milzīgs publikāciju skaits par HOPS attīstības faktoriem un patoģenēzi – tajā iesaistītajām šūnām, to mediatoriem, proteāžu antiproteāžu disbalansu, oksidatīvo stresu. Lielākoties slimības patoģenēzes pētījumos ir iesaistīti pacienti ar diagnosticētu HOPS (pārsvarā ar smagu vai vidēji smagu gaitu), bet kontroles grupā līdzīga vecuma asimptomātiski smēķētāji (pakgadu skaits virs 20) un veseli nesmēķētāji. Praktiski literatūrā nav atrodami pētījumi kur būtu iesaistīti gados jauni smēķētāji ar nelielu smēķēšanas stāžu (līdz 10 pakgadiem) un veikta smēķēšanas izraisītu agrīnu pārmaiņu izpēte plaušās. Minētais arī noteica mūsu **pētījuma mērķi – noskaidrot smēķēšanas izraisītās iekaisīgās un funkcionālās pārmaiņas plaušās jauniem smēķētājiem un to saistību ar HOPS kandidātģenēm.**

Darba realizācijai nolēmām izveidot pētījumam atbilstošas nesmēķējošu un smēķējošu brīvprātīgo jauniešu grupas un ar spirogrāfijas metodes palīdzību novērtēt plaušu ventilācijas funkciju rādītājus visiem pētījuma dalībniekiem. Iekaisumam raksturīgo pārmaiņu esamību nolēmām novērtēt pētot šūnas inducētajās krēpās. Tā kā tikai daļai smēķētāju attīstās HOPS, acīmredzot arī ģenētiskie faktori veicina tā attīstību. Jau dažādos pētījumos ir identificēti aptuveni 200 ģēnu polimorfismi, kuri saistīti ar HOPS

attīstību. Mēs izvēlējamies 4 vispopulārākos gēnu polimorfismus (*CHRNA3/5* (rs1051730) – 15 hromosoma, *AGPHD1* (rs8034191) – 15 hromosoma, *IREB2* (rs2656069) – 15 hromosoma, *CHIT1* (rs2494303) – 1 hromosoma), kuri pēc literatūras datiem, visbiežāk tiek konstatēti HOPS ģenētiskajās pārbaudēs. Minēto polimorfismu esamību arī nolēmām noskaidrot pētījuma pacientiem, šim nolūkam ņemot venozās asinis, no kurām ieguvām genomisko DNS.

Darba uzdevumi tika izvirzīti sekojoši:

- Izvērtēt smēķēšanas izraisītas pārmaiņas plaušu ventilācijas funkcijā gados jauniem smēķētājiem.
- Novērtēt šūnu pārmaiņas jaunu smēķētāju inducētajās krēpās, salīdzinājumā ar jauniem nesmēķētājiem.
- Novērtēt iespējamo HOPS kandidātgēnu (*CHRNA3/5*, *CHIT1*, *AGPHD1*, *IREB2*) polimorfismus pētījuma dalībniekiem un to saistību ar plaušu funkcionālajiem rādītājiem un šūnu spektru inducētajās krēpās.

Par darba hipotēzi izvirzījām, ka jauniem indivīdiem ar salīdzinoši mazu smēķēšanas stāžu un normāliem plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem jau ir konstatējamas pārmaiņas inducēto krēpu imūno šūnu spektrā, kas liecina par agrīnu iekaisuma reakciju un minētās pārmaiņas varētu būt saistītas ar HOPS kandidātgēnu polimorfismiem.

2. LITERATŪRAS APSKATS

Ir zināms, ka ilgstoša smēķēšana daļai smēķētāju izraisa hronisku obstruktīvu plaušu slimību – HOPS. HOPS patogēnes pamatā ir hroniska iekaisuma veidošanās. Mūsu pētījuma mērķis bija noskaidrot vai iekaisumam raksturīgās pārmaiņas, kas iespējams laika gaitā būs pamatā HOPS izveidei, var konstatēt gados jauniem smēķētājiem ar īsu smēķēšanas stāžu. Tādēļ literatūras apskatā sevišķu uzmanību pievēršam jau veiktajiem pētījumiem par HOPS patogēzi, patoloģijā iesaistītajām šūnām un mediatoriem, kā arī jau atklātajiem slimības kandidātģenēm.

2.1. Hroniska obstruktīva plaušu slimība

2.1.1. Definīcija un slimības raksturojums

GOLD vadlīnijās hroniska obstruktīva plaušu slimība tiek definēta, kā novēršama un ārstējama slimība ar dažām raksturīgām ekstrapulmonārām izpausmēm, kas atsevišķiem pacientiem var saasināt slimības gaitu. Slimībai raksturīga elpceļu obstrukcija, kas nav pilnīgi atgriezeniska. Obstrukcija parasti ir progresējoša un saistīta ar plaušu iekaisumu, kā atbildi uz kaitīgām daļiņām vai ieelpotām gāzēm (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014).

HOPS tiek uzskatīta par heterogēnu slimību. Elpceļu obstrukcijas galvenie iemesli ir bronhiolīts – mazo elpceļu iekaisīga slimība un plaušu parenhīmas destrūkcija (emfizēma), kā rezultātā zūd plaušu elasticitāte un saplok mazie elpceļi, minēto faktoru relatīvā ietekme variē starp HOPS slimniekiem (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014). HOPS gadījumā veidojas arī krēpu hipersekrēcija, kas ne vienmēr izraisa plūsmas obstrukciju (Barnes, 2003).

Vairumam HOPS pacientu ir konstatējams visas trīs minētās slimības iezīmes - hronisks obstruktīvs bronhiolīts, emfizēma un krēpu korķi. Katras šīs iezīmes izteiktība var variēt (Barnes, 2003).

Papildus iekaisumam un proteāžu/antiproteāžu disbalansam plaušās, nozīmīgi ir arī oksidatīvā stresa radītie bojājumi, kas noved pie HOPS attīstības (Repine, 1997).

2.1.1.1. *Emfizēma*

Emfizēma ir viena no HOPS patoģenēzes komponentēm, kas konstatējama terminālajos elpceļos. Patoloģiski emfizēmu raksturo kā brīvās gaisa telpas palielināšanos terminālajās bronhiolās, līdz ar šo terminālo bronhiolu sieniņu destrukciju, bez acīmredzamas fibrozes (Kumar et al., 2003). Smēķētājiem ir konstatējama abu tipu emfizēmas, gan panacinārā (panlobulārā), ko raksturo alveolu sieniņu destrukcija, kurā iesaistās visas gaisa spraugas virs galvenās bronhiolas, gan centriacinārā (centrilobulārā), kuru raksturo fokāls bronhocentrisks bojājums, kas aptver respiratorās bronhiolas un acinusa centrālo daļu. Pastāv dažādu mehānismu viedi, kas HOPS gadījumā izsauc emfizēmas veidošanos. Proteāžu/antiproteāžu disbalansa gadījumā tiek aktivētas MMP – 9 un MMP – 12 (Finlay, 1997), kā arī notiek dažādu citu serīna proteāžu aktivācija, piemēram, neitrofilu elastāzes. Paralēli tiek konstatēta antiproteāžu, īpaši $\alpha 1$ antitripsīna inaktivācija. Aktivētie $CD8^+$ T limfocīti izdala perforīnu un granzīmus (Chrysofakis, 2004; Hodge, 2006). Tiek bojāti alveolocītu apoptozes mehānismi un notiek neefektīva apoptisko šūnu likvidācija, ko izraisa samazināti pretiekaisuma mehānismi un samazināta imūnās sistēmas darbība (Vandivier, 2006). Ir atklāta arī mitohondriju disfunkciju, ko izraisa palielināta oksidatīvā stresa iedarbību uz šūnām, kas noved pie pastiprinātas šūnu apoptozes (Chung, 2008).

2.1.1.2. *Sīko elpceļu slimība*

Sīko elpceļu slimība jeb bronhiolīts, ietver patoloģiskās izmaiņas, kas skar tieši sīkos elpceļus, bronhiolas, kuru diametrs ir mazāks par 2 mm. Šīs izmaiņas izsauc būtisku elpceļu obstrukciju HOPS gadījumā (Hogg, 2004). Bronhiolīta attīstības iemesls ir hroniska iekaisuma un fibrozes radītie bojājumi. Pētījumos ir secināts, ka strukturālās izmaiņas sīkajos elpceļos ir konstatējamās smēķētājiem gan ar, gan bez HOPS. Sīko elpceļu obstrukcijas veidošanos HOPS gadījumā skaidro ar elpceļu sieniņas sabiezēšanu, peribronhiālu fibrozi, nepareizu šūnu atjaunošanos un mukociliārās attīrīšanās disfunkciju, kas noved pie iekaisuma eksudāta uzkrāšanās elpceļu lumenā (Hogg, 2004).

Sīko elpceļu sašaurināšanās gadījumā konstatē arī jaunu limfoīdo folikulu formēšanos un kolagēna uzkrāšanos uz elpceļu ārējām sienām, kas arī ierobežot sīko elpceļu elasticitāti (Chu, 2003).

2.1.1.3. Hronisks bronhīts

Hronisku bronhītu neuzskata par vienu no HOPS komponentēm, bet ļoti bieži tā ir viena no slimībām, kas raksturīga lielākai daļai pacientu ar HOPS. Hronisku bronhītu konstatē vairumam smēķētāju, arī ja šiem smēķētājiem nav uzstādīta HOPS diagnoze un nav attīstījusies elpceļu obstrukcija. Hronisks bronhīts tiek definēts kā slimība, kuras simptomi ir 3 mēnešus ilgstošs klepus un pastiprināta krēpu izdalīšanās pēdējo 2 gadu laikā (Barnes, 2000).

2.1.1.4. HOPS sistēmiskā manifestācija un blakusslimības

Lai arī HOPS ir plaušu slimība, tā tiek asociēta arī ar sistēmiskām manifestācijām un citām blakus slimībām (Decramer, 2008) (Fabbri, 2008). HOPS gadījumā raksturīgākās blakusslimības ir išēmiskā sirds slimība, cor pulmonale, kaheksija, osteoporozes, skeleta muskuļu vājums, depresija, kā arī plaušu vēzis (Decramer, 2008). Minētās slimības var attīstīties pacientiem arī bez HOPS, bet to saistība ar smagas pakāpes HOPS liecina par līdzīgas izcelsmes riska faktoriem un attīstības mehānismiem. Cigarešu smēķēšana tiek uzskatīta par galveno riska faktoru ne tikai HOPS attīstībā, bet arī kardiovaskulāro slimību, osteoporozes un plaušu vēža gadījumā (Edwards, 2004). Par riska faktoru dažādu hronisku slimību gadījumā var uzskatīt ar novecošanu. Gandrīz pusei no cilvēku populācijas, kuru vecums ir lielāks par 65 gadiem, ir novērojamas divas vai vairākas hroniskas slimības (Boyd, 2005).

Viens no dominējošajiem faktoriem blakusslimību attīstībā ir sistēmisks iekaisums. Palielināts cirkulējošo citokīnu daudzums (TNF – α , IL – 6 un IL – 8), adipikīni (leptīns, grelīns) un akūtās fāzes proteīni (C – reaktīvais proteīns, fibrinogēns) ir konstatējami lielākajā daļā blakus slimību (Fabbri, 2007; Yanbaeva, 2007).

2.1.2. Riska faktori

HOPS ir viens no galvenajiem miršanas iemesliem pasaulē. Ir noskaidrots, ka tieši smēķēšana ir galvenais HOPS izraisītājs. Daudzi pētījumi liecina, ka apkārtējās vides iedarbība – dūmi, gāzes, putekļi, organiskie antigēni, antioksidantu deficīts, pasīvā smēķēšana var būt riska faktori slimības attīstībā (Salvi, 2009). Arī tādi faktori, kā nepietiekams un nesabalansēts uzturs un kaitīgi darba apstākļi var izraisīt HOPS (Barnes, 2003).

Lai arī cigarešu smēķēšana ir vislabāk izpētītais HOPS riska faktors, tas nav vienīgais. Daudzi epidemioloģiskie pētījumi atklāj, ka nesmēķētājiem arī var attīstīties hroniska elpceļu obstrukcija (Lamprecht, 2011), kas liek saprast, ka HOPS veidojas mijiedarbojoties ģenētiskiem un ārējās vides faktoriem. Par ģenētisko faktoru ietekmi liecina tas, ka ne visiem smēķētājiem ar vienādu smēķēšanas stāžu attīstīsies HOPS.

2.1.2.1. Ģenētiskie faktori

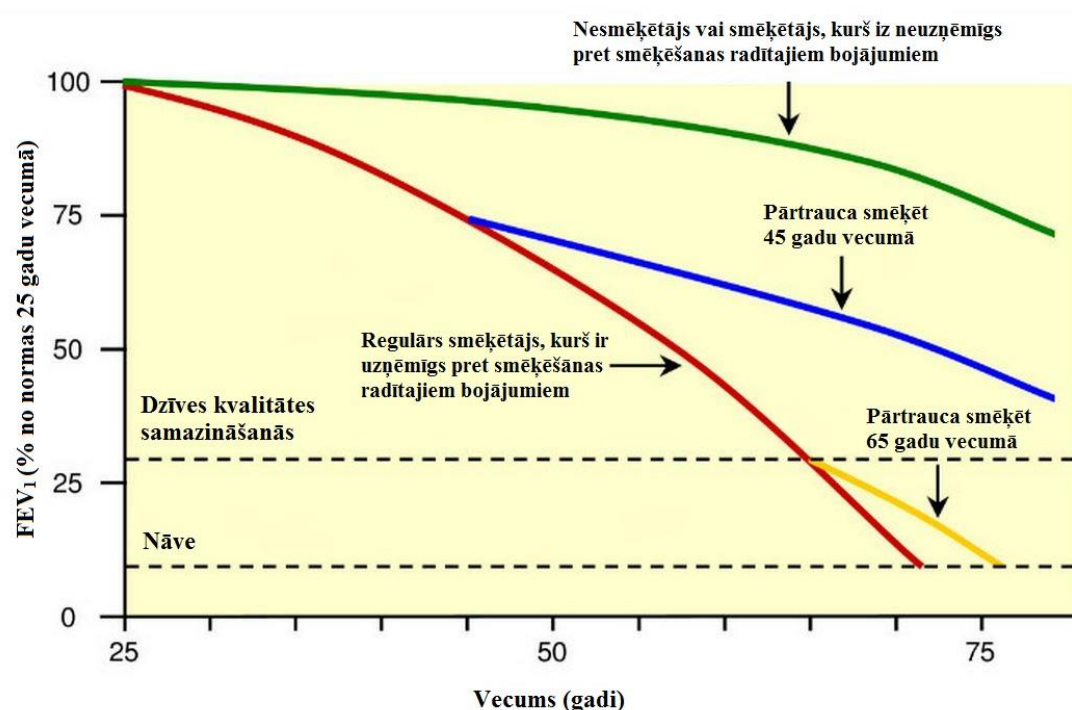
Cigarešu smēķēšana tiek uzskatīta par galveno HOPS ierosinātāju, bet ne visiem smēķētājiem attīstās HOPS. Literatūras avotos tiek minēts, ka HOPS attīstās aptuveni 15 – 20% smēķētāju, kas norāda arī uz ģenētisko faktoru nozīmīgumu, kas nosaka vai smēķētājam attīstīsies HOPS vai nē (Molfino, 2004). Jau zināms un ļoti labi izpētīts ģenētiskais iemesls, kas noved pie HOPS ir α – 1 antitripsīna trūkums, kas konstatējams 1 – 2% no visiem HOPS pacientiem (Gooptu, 2009). Genoma mēroga asociācijas pētījumi ir identificējuši vēl citu hromosomu reģionus, kuri, iespējams, ir atbildīgi par HOPS attīstības veicināšanu. Tā, piemēram, 4 hromosomas gēni *HHIP* un *FAM13A* un 15 hromosomas gēni *CHRNA* un *IREB2* (Hancock, 2010) (Pillai, 2009).

2.1.2.2. Vecums un dzimums

Vecums bieži tiek minēts kā viens no HOPS riska faktoriem. Ir veikti pētījumi, kuros noskaidrots, ka HOPS ir biežāk diagnosticējama un no tā vairāk mirst vīrieši, bet jaunākajos pētījumos šī atšķirība vairs nav tik krasa, jo visticamāk smēķējošu vīriešu un sieviešu skaits ir ar tendenci izlīdzināties. Daži pētījumi norāda, ka sievietes ir daudz uzņēmīgākas pret smēķēšanas izraisītajiem negatīvajiem efektiem (Sorheim, 2010).

2.1.2.3. Inhalējamās substances, kas veicina HOPS attīstību

Visā pasaulē cigarešu smēķēšana ir lielākais riska faktors HOPS attīstībā. Cigarešu smēķētāji biežāk slimo ar elpceļu slimībām, tiem biežāk konstatē plaušu ventilācijas funkcijas rādītāju novirzes no normas un ir lielāks mirstības līmenis, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Kohansal, 2009). Arī savādāka tabakas dūmu ieelpošana (pīpju pīpēšana, cigāru smēķēšana, ūdenspīpju lietošana un marihuānas smēķēšana) ir līdzvērtīgs riska faktors HOPS attīstībai. Viennozīmīgi, visefektīvākā metode, lai samazinātu HOPS radītos kaitējumus organismam ir smēķēšanas atmešana (skat. 1. attēlu).



1. attēls. Plaušu ventilācijas funkcijas rādītāja FEV₁ samazināšanās smēķēšanas ietekmē, kas uzskatāmi parāda elpceļu obstrukcijas progresiju (adaptēts no Fletcher, Peto, 1977).

Industriālais piesārņojums, organiskie un neorganiskie putekļi, ķīmikālijas un to izgarojumi arī tiek uzskatīti par nozīmīgiem riska faktoriem (Trupin, 2003; Matheson, 2005). Amerikas Torakālā biedrība informē, ka aptuveni 10 – 20 % indivīdiem, kuriem ir bijusi saskare ar minētajām substancēm, attīstās HOPS raksturīgie simptomi vai HOPS (Balmes, 2003).

Par riska faktoru var uzskatīt arī dažādu iekštelpu piesārņojumu, kas veidojas izmantojot biomasas kurināmo materiālu ēdiena pagatavošanai vai telpu apsildei, slikti vēdinātās telpās. Šādam piesārņojumam ir pakļauti līdz pat 3 miljardiem pasaules iedzīvotāju (Torres – Duque, 2008).

Augsts pilsētvides gaisa piesārņojums, kas ir augsti attīstītās valstīs, arī tiek uzskatīts par riska faktoru dažādu elpceļu slimību un HOPS attīstībā.

2.1.2.4. Sociālekonomiskā statusa saistība ar HOPS

Ir pierādījumi, ka sociālekonomiskais statuss ir apgriezti proporcionāls saslimšanas riskam ar HOPS (Prescott, 1999). Iemesli šai sakarībai nav līdz galam izprotami, bet visticamāk tie ir saistīti ar cilvēka saskarsmi ar ārējās vides un iekštelpu piesārņojumu, cigarešu dūmu ekspozīciju, sliktu uztura kvalitāti, palielinātu infekciju risku un pārāpdzīvotību (Prescott, 1999).

2.1.2.5. Infekcijas

Smagas elpceļu infekcijas agrā bērnībā var samazināt plaušu ventilācijas funkcijas rādītājus un palielināt respiratoro simptomu iespējamību pieaugušā vecumā. Uzņēmībai pret infekciju slimībām ir nozīmīga loma HOPS paasinājumu gadījumā. Tuberkuloze tiek uzskatīta par HOPS riska faktoru un raksturīgu blakusslimību (Jordan, 2010).

2.1.3. HOPS smaguma pakāpes (GOLD)

Globālajās Obstruktīvās Plaušu slimības (GOLD) vadlīnijās ir norādīts, ka HOPS smaguma pakāpes noteikšanai tiek izmantots FEV₁ rādītājs, kurš izteikts procentos no pacienta individuālās normas, minētais apkopots 1. tabulā. FEV₁ atspoguļo tikai plaušu ventilācijas funkcijas pārmaiņas. Pastāv iespēja, ka ņemot vērā citus slimības faktorus, pacientiem ar vienādiem FEV₁ rādītājiem ir iespējama atšķirīga HOPS smaguma pakāpe (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014).

1. tabula. Elpceļu obstrukcijas smaguma pakāpes klasifikācija pacientiem ar HOPS (vērā ņemti FEV₁ rādītāji % pēc bronhodilatora lietošanas).

GOLD1	Viegla pakāpes HOPS	FEV ₁ ≥ 80%	Viegli gaisa plūsmas ierobežojumi elpceļos. Parasti ir, bet var nebūt, klepus ar krēpām. Subjektīvi pacients neizjūt plaušu funkcijas samazināšanos.
GOLD2	Vidēji smagas pakāpes HOPS	50% ≤ FEV ₁ < 80%	Samazināta gaisa plūsma elpceļos. Klīniskie simptomi progresē, pacients izjūt elpas trūkumu slodzes laikā. Pacientam var rasties slimības saasinājumi, kā dēļ viņš griežas pie ārsta.
GOLD3	Smagas pakāpes HOPS	30% ≤ FEV ₁ < 50%	Elpceļu obstrukcija pieaug. Pastiprinās elpas trūkums un saasinājumu biežums, kas būtiski samazina pacienta dzīves kvalitāti.
GOLD4	Ļoti smagas pakāpes HOPS	FEV ₁ < 30%	Smaga elpceļu obstrukcija un elpošanas nepietiekamība. Elpošanas nepietiekamība var veicināt <i>cor pulmonale</i> attīstību. Pacienta dzīves kvalitāte ir izteikti pasliktinājusies un slimības saasinājumu var būt dzīvībai bīstami.

2.1.4. HOPS diagnostika

Hroniskais iekaisums pacientiem ar HOPS veicina mazo elpceļu strukturālās pārmaiņas un to sašaurināšanos. Iekaisīgo procesu izraisītā plaušu parenhīmas destrukcija noved pie alveolu saplūšanas un samazinātas plaušu elasticitātes. Elpceļi sāk saplakt izelpas laikā. Elpceļu sašaurināšanos visērtāk ir diagnosticēt ar spirometrijas palīdzību, jo tā ir vienkārša, viegli atkārtojama plaušu ventilācijas funkcijas novērtēšanas metode. Spirogrāfija ir svarīgākā HOPS diagnostikas pamatmetode. Ja spirogrāfija neuzrāda pārmaiņas elpceļos, par to var liecināt citi agrīni simptomi, piemēram, klepus, pastiprināta krēpu izdalīšanās, apgrūtināta elpošana fiziskas slodzes laikā. Spirogrāfija smēķētājiem, kam sāk veidoties HOPS,

uzrāda obstruktīva tipa pārmaiņas elpceļos. Pārtraucot smēķēšanu, ja HOPS jau ir diagnosticēts, obstrukcijas mazināšanās ir relatīvi niecīga. HOPS attīstības gaita ir nemanāma un pacienti var būt bez simptomiem aptuveni 20 vai vairāk gadus, līdz tiek diagnosticēts HOPS ar spirometrijas palīdzību, vai balstoties uz simptomiem. Simptomu parādīšanās laikā, kas izpaužas ar dispneju (elpas trūkumu) slodzes laikā vai hronisku klepu ar krēpu izdalīšanos, pat līdz 75% no plaušu ventilācijas funkcijas var būt zudusi. Tāpēc spirometrija ir ārkārtīgi nozīmīga, novērtējot pārmaiņas elpceļos gan asimptomātiskiem pacientiem, gan pacientiem kam jau ir noteikta diagnoze.

Lēni progresējošā gaisa plūsmas limitācija HOPS pacientus noved pie dažādiem ierobežojumiem ikdienas darbu veikšanai un priekšlaicīgas nāves.

Histopatoloģiski, HOPS gadījumā, konstatē bronhiolu obstrukciju ar fibrozi un makrofāgu, neitrofīlo leukocītu un T limfocītu infiltrāciju. Plaušu parenhīmā arī konstatē palielinātu makrofāgu un izteiktu CD8⁺ T limfocītu infiltrāciju. Raksturīga ir arī CD4⁺ T limfocītu infiltrācija, bet tā ir mazāk izteikta (Barnes, 2003).

Klīniskās diagnozes HOPS uzstādīšana būtu jāizvērtē tiem pacientiem, kuri sūdzas par elpas trūkumu, hronisku klepu vai pastiprinātu krēpu izdalīšanos, kā arī ja pacients ir bijis kontaktā ar HOPS riska faktoriem (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014).

Galvenie indikatori, kuru gadījumā būtu jāapsver HOPS diagnozes uzstādīšana ir: (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014):

- dispneja (elpas trūkums kas progresē, kas fiziskas slodzes laikā pastiprinās vai ir nepārejošs);
- hronisks klepus;
- hroniska krēpu izdalīšanās (jebkāda veida un intensitātes krēpas);
- saskarsme ar HOPS riska faktoriem (aktīva vai pasīva cigarešu smēķēšana, ilgstoša atrašanās vietās, kur ēdiena pagatavošanai izmanto biomasas kurināmo materiālu, kontakts ar industriālo piesārņojumu un ķīmikālijām);
- ģimenē ir/ir bijuši HOPS slimnieki.

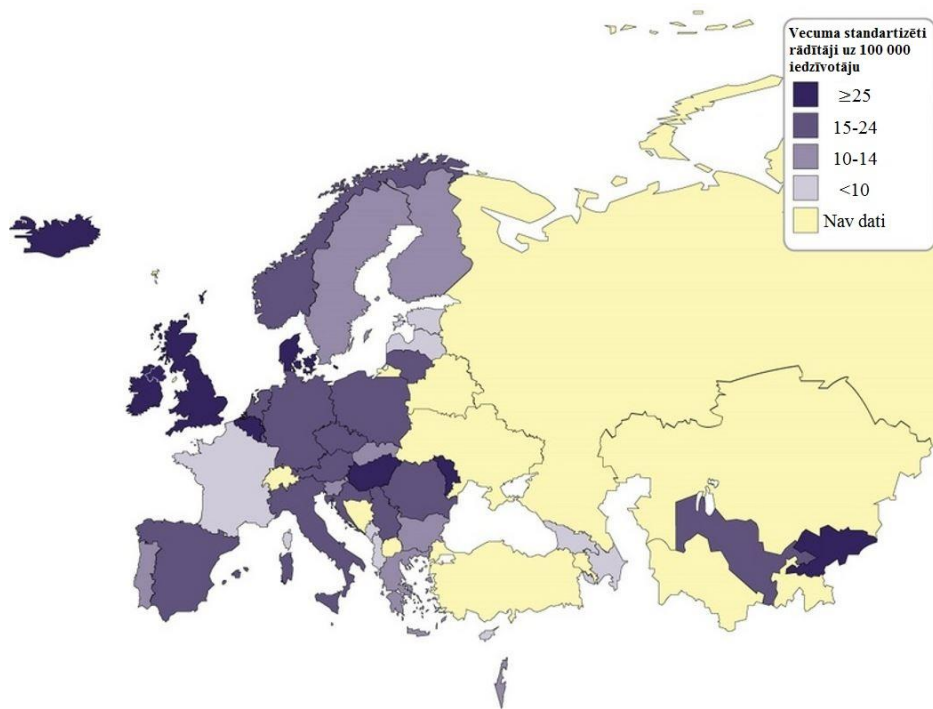
Spirometrija ir primārs izmeklējums HOPS diagnostikai. Ja spirogrāfijas rādītājs FEV_1/FVC , % (FEV_1 – forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē/ FVC – forsēto vitālo kapacitāti %) pēc bronhodilatora lietošanas, nokrīt zem 70%, tas liecina par patstāvīgu gaisa plūsmas limitāciju elpceļos, kura ir neatgriezeniska un norāda uz HOPS (Hardie, 2002; Cerveri, 2008).

Pacientiem ar HOPS, sākot ar II slimības stadiju, bez bronhodilatācijas testa būtu jāveic arī krūšu rentgens un arteriālo asiņu gāzu analīze. Ja $FEV_1 < 50\%$ no normatīvajiem rādītājiem pacientam var sākt veidoties *cor pulmonale* pazīmes (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat. 27.02.2014).

2.1.5. Izplatība

HOPS izplatība, saslimšana un mirstība ir atšķirīga dažādās valstīs. Bieži vien HOPS izplatība ir tieši saistīta ar tabakas smēķēšanas izplatību, lai arī daudzās valstīs par HOPS galveno risku tiek uzskatīts arī ārējās vides piesārņojums, iekšējo dzīvojamo telpu piesārņojums un dažāds ar specifisku nodarbošanos saistīts piesārņojums.

Pēc PVO (Pasaules Veselības organizācijas) aprēķiniem no tabakas lietošanas ik gadu mirst aptuveni 6 miljoni cilvēku (Eriksen, 2012). 2020. gadā šis skaits varētu tuvojies 7 miljoniem, 2030. gadā – 8 miljoniem iedzīvotāju (skat. 2. attēlu).



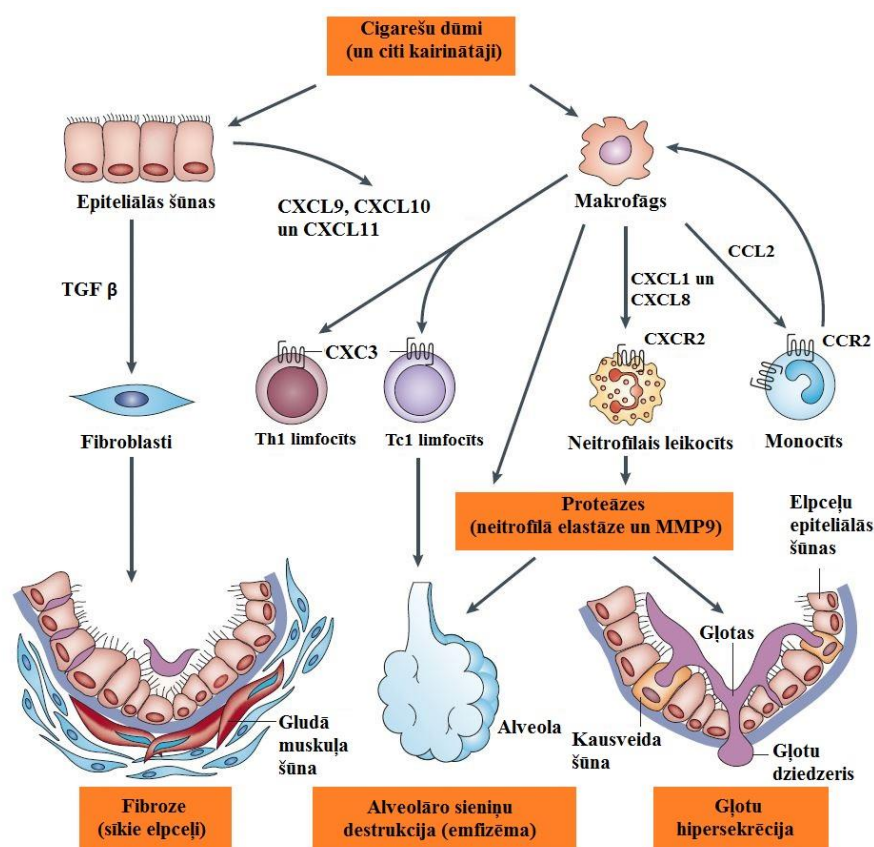
2. attēls. Mirstības rādītāji no Hroniskas obstruktīvas plaušu slimības (vecuma standartizēti rādītāji uz 100 000 iedzīvotāju). Informācija no Pasaules Veselības organizācijas mirstības datu bāzes (Eiropā), atjaunota 2011. gada novembrī (<http://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/> skatīts: 25.08.2014).

Dati, kas atspoguļo mirstību no HOPS Eiropā, rāda, ka Latvijā no 100 000 iedzīvotājiem ar HOPS nomirst vidēji 7,27 iedzīvotāji, Igaunijā 7,72, bet Lietuvā – 16,04. Visaugstākā mirstība ir Kirgizstānā – 69,31 iedzīvotājs no 100 000. Viszemākā mirstība no HOPS ir – Melnkalnē – 0,12 (<http://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/> skatīts: 25.08.2014). 2012. gadā Latvijā ikdienā smēķēja 34% iedzīvotāji vecumā no 15 – 64 gadiem, no tiem 52% vīriešu un 48% sieviešu. Smēķēšanu pēdējā gada laikā bija atmetuši tikai 1% no aptaujātajiem (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2013). Augstākais ikdienā smēķējošo vīriešu īpatsvars bija vecumā no 45 – 54 gadiem, sieviešu – 35 – 44 gadi.

2.2. HOPS patoģenēze

HOPS ir multifaktoriāla hroniska slimība, kurai raksturīga ir emfizēma un/vai hronisks bronhiolīts (skat. 3. attēlu). Gaisa plūsmas limitācija elpceļos parasti ir, progresējoša

un nav pilnībā atgriezeniska. Tā ir saistīta ar pastiprinātu iekaisumu reakciju, kas radusies dažādu kaitīgo savienojumu un gāzu ieelpošanas dēļ. HOPS galvenais iemesls ir cigarešu smēķēšana (Mortaz, 2010).



3. attēls. HOPS attīstības shēma. Ieelpotie cigarešu dūmi un citi ieelpotie kairinātāji aktivē epiteliālās šūnas un makrofāģus, kam seko dažādu hemotaktisko faktoru izdalīšanās. Hemotakses faktori veicina citu iekaisuma šūnu piesaisti. CC – hemokīna ligands 2 (CCL2), iedarbojas uz CC hemokīna receptoru – 2 (CCR2), kas piesaista monocītus. CXC – hemokīna ligands 1 (CXCL1) un CXC – hemokīna ligands – 8 (CXCL8), iedarbojas un neitrofilajiem leukocītiem un monocītiem (kuri diferencējas par alveolārajiem makrofāģiem). CXC – hemokīna ligands – 9 (CXCL9), CXC – hemokīna ligands – 10 (CXCL10) un CXC – hemokīna ligands – 11 (CXCL11), iedarbojas uz CX – hemokīna receptora – 3 (CXCR3), kas piesaista T1 helperu limfocītus (T_{h1}) un 1 tipa citotoksiskus T limfocītus (T_{c1}). Šīs iekaisuma šūnas kopā ar makrofāģiem un epiteliālajām šūnām, ierosina proteāžu izdalīšanos, tādu kā matricas metaloproteināze – 9 (MMP9), kas izsauc elastīna degradāciju un emfizēmu. Epiteliālās šūnas un makrofāģi izdala transformējošo augšanas faktoru – β (TGF - β), kas stimulē fibroblastu proliferāciju un veicina arī sīko elpceļu fibrozi (Barnes, 2008).

Gan iedzimtās, gan iegūtās imunitātes iekaisuma šūnas un to izdalītie mediatori iesaistās iekaisuma atbildes reakcijas veidošanā HOPS attīstības gadījumā. Galvenās iekaisuma šūnas, kuras ir konstatējamas HOPS pacientu plaušās ir neitrofilie leukocīti, makrofāgi un limfocīti, kuras izdala dažādas reaktīvas skābekļa daļiņas, pro-iekaisuma citokīnus un audu bojājumus izraisošus enzīmus. Šiem mediatoriem ir būtiska nozīme audu bojājumu izraisīšanā, emfizēmas ierosināšanā un hroniska iekaisuma veidošanā (Cosio, 2009).

Sīkajos elpceļos uzkrājas iekaisuma šūnu infiltrāts, kas noved pie sīko elpceļu diametra samazināšanās, tādējādi palielinot gaisa plūsmas rezistenci. Konstatējamas arī pārmaiņas alveolu sienīnās, kas noved pie alveolu sienīņu sabrukšanas un emfizēmas veidošanās (Cosio, 2009).

HOPS patogēnēzē iesaistīti arī vairāki citi procesi, tādi kā oksidatīvais stress, plaušu un sistēmisks iekaisums, proteāžu/antiproteāžu disbalanss, imunitātes sagraušana (autoantivielu ražošana), traucēti šūnu labošanas procesi (Rahman, 2011).

Elpceļu aizsargmehānismu darbība pret vīrusu, baktēriju un citu kaitīgu faktoru ietekmi uz cilvēka organismu notiek trīs līmeņos. Vispirms darbojas mehāniskās aizsargbarjeras, tad iedzimtā imunitāte un visbeidzot iegūtā imunitāte.

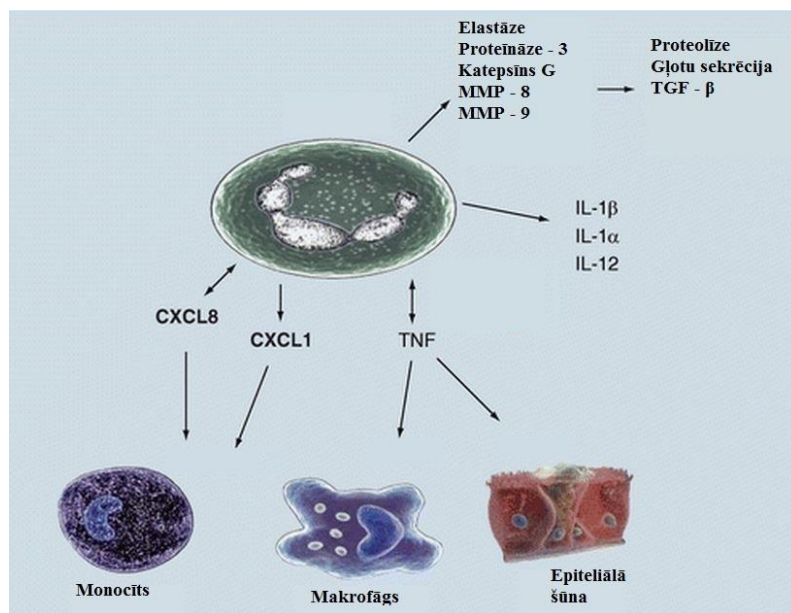
2.2.1. Iedzimtā jeb nespecifiskā imunitāte

Leukocīti jeb baltās asins šūnas ir iedzimtās imunitātes neatņemama sastāvdaļa un to pienākums ir aizsargāt organismu pret kaitīgiem aģentiem un infekciju slimību ierosinātājiem. Baltās asins šūnas attīstās kaulu smadzenēs un diferencējas no mieloīdajām cilmes šūnām par vairākiem leukocītu veidiem. Pie iedzimtās imūnas sistēmas leukocītiem pieskaita eozinofilos un bazofilos leukocītus un fagocitējošās šūnas, kas ietver makrofāgus/monocītus, neitrofilos leukocītus un dendrītiskās šūnas. Šīs šūnas savu darbību veic iedzimtās imunitātes sastāvā, identificējot un likvidējot patogēnus vai citus kaitīgos aģentus, kas varētu ierosināt saslimšanu.

2.2.1.1. Neitrofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Ir pierādīts, ka neitrofilie leukocīti ir primārās šūnas, kuras konstatē HOPS pacientu elpceļos (Barnes, 2007). Veiktajos pētījumos tiek ziņots par palielinātu neitrofilo leukocītu skaitu HOPS pacientu BAL (Keatings, 1997). Konstatēts arī būtiski paaugstināts neitrofilo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits ierosinātajās krēpās asimptomātiskiem smēķētājiem salīdzinot ar nesmēķētājiem, bet šī starpība nav tik izteikta (Jurka, 2006).

Aktivēti neitrofilie leukocīti ierosina audu bojājumus, izdalot dažādus proteīnus, tādus kā neitrofilo elastāzi, katepsīnu G, proteīnāzi – 3, MMP – 8 un MMP – 9 un skābekļa radikāļus – superoksīda anjonus, H₂O₂ un hipohaliādes (skat. 4. attēlu) (Di Stefano, 1994). Šīs izdalītās serīna proteāzes arī stimulē gļotu izdalīšanās. Neitrofilo leukocītu rekrutēšana elpceļos un parenhīmā ietver to adhēziju ar E-selektīna palīdzību, kas HOPS gadījumā ir palielinātā daudzumā uz endotēlija virsmas. Neitrofilo leukocītu nokļūšanu dziļāk elpceļos un parenhīmā nodrošina adhēzijas molekulas, kuras tiek aktivizētas dažādu hemotakses faktoru ietekmē, tādu kā IL – 8 (CXCL8) un LTB₄. Šie hemotakses faktori var tikt izdalīti no alveolārajiem makrofāgiem un epitēlija šūnām, kā arī šos faktorus izdala paši neitrofilie leukocīti (Bazzoni, 1991) (skat. 4. attēlu).



4. attēls. Neitrofilo leukocītu izdalītie mediatori, kuri ir iesaistīti HOPS patoģenēzē. Neitrofilie leukocīti izdala elastāzi, proteināzi – 3, katepsīnu G, matricas metaloproteināzi – 8 (MMP8), matricas metaloproteināzi – 9 (MMP9), kas veicina proteolīzi, gļotu sekrēciju un transformējošā augšanas faktora – β (TGF – β) veidošanos. Neitrofilie leukocīti izdala arī tādus mediatorus kā interleikīnu 1 β (IL - 1 β), interleikīnu 1 α (IL - 1 α) un interleikīnu – 12 (IL - 12). Izdalītais CXC – hemokīna ligands – 8 (CXCL8) un CXC – hemokīna ligands – 1 (CXCL1) veicina monocītu piesaistīšanu, tumora nekrozes faktors aktivē makrofāgus un epitelijšūnas (Larsson, 2007).

Neitrofilo leukocītu izdzīvošanu respiratorajā traktā nodrošina GM – CSF (granulocītu, makrofāgu koloniju stimulējošais faktors) un G – CSF (granulocītu stimulējošais faktors). CXCL8 un GM – CSF ir galvenie mediatori ne tikai akūta iekaisuma veidošanā, bet arī hroniska iekaisuma uzturēšanā HOPS un bronhiālās astmas gadījumā. CXCL8 tiek strauji ekspresēts, tādu iekaisuma stimulu ietekmē, kā TNF – α , LPS un cigarešu dūmi (Mortaz, 2010).

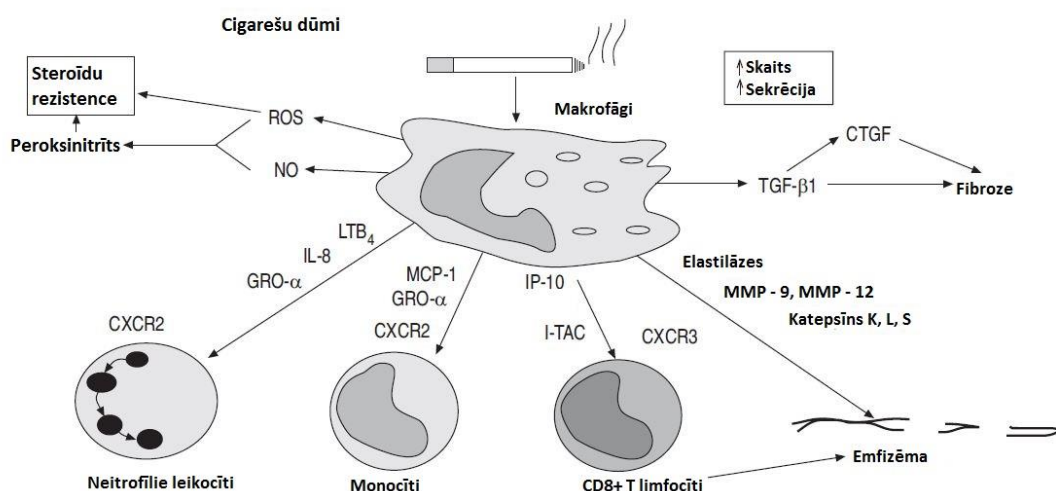
2.2.1.2. Makrofāgu nozīme HOPS patoģenēzē

Alveolārajiem makrofāgiem ir ļoti būtiska ietekme, kā iedzimtajā, tā iegūtajā imunitātē. Tie nodrošina aizsardzību pret alveolārajiem patogēniem, likvidē ieelpotos mikroorganismus un ģenerē iekaisumu (Medzhitov, 2000). Alveolāro makrofāgu

unikalitāti nodrošina to atrašanās vieta cilvēka ķermenī, tie ir vienīgie makrofāgi, kuri ir tiešā saskarsmē ar gaisu un nodrošina primāro aizsardzību pret ieelpotajām daļiņām, tās fagocitējot. Normālos apstākļos, alveolārie makrofāgi ir aptuveni 95% no visiem leukocītiem, kuriem ir tieša saskarsme ar ieelpoto gaisu, tālāk tiem seko 1 – 4% limfocītu un tikai 1% neitrofilo leukocītu, tādēļ tos uzskata par būtiskāko iedzimtās imunitātes sastāvdaļu plaušās, kas nodrošina aizsardzību pret kaitīgajiem aģentiem (Martin, 2005). Makrofāgiem ir būtiska nozīme iekaisuma veidošanā HOPS gadījumā. Makrofāgu skaits ir 5-10 reizes palielināts elpceļos, plaušu parenhīmā, BAL un ierosinātajās krēpās pacientiem ar HOPS (Finkelstein, 1995). Palielinātais makrofāgu skaits tieši koralē ar HOPS smaguma pakāpi (Di Stefano, 1998).

Makrofāgus var aktivēt tieša cigarešu dūmu iedarbība, kas izraisa iekaisuma mediatoru izdalīšanos. No makrofāgiem izdalās – TNF – α , IL – 8, citi CXC hemokīni, monocītu hemotaktiskais peptīds (MCP – 1), LTB₄ un dažādi reaktīvie skābekļa savienojumi (ROS), kas ir atbildīgi par iekaisumu HOPS gadījumā. Alveolārie makrofāgi izdala arī elastolītiskos enzīmus – MMP – 2, MMP – 9 (dominējošais elastolītiskais enzīms, ko sekretē alveolārie makrofāgi, HOPS gadījumā), MMP – 12, katepsīnu K, L un S un neitrofilo elastāzi (Punturieri, 2000) (skat. 5. attēlu).

Alveolārie makrofāgi pacientiem ar HOPS izdala daudz vairāk iekaisuma proteīnu un tiem piemīt daudz lielāka elastolītiskā darbība, salīdzinot ar veselu smēķētāju alveolārajiem makrofāgiem (Russell, 2002). Lielākā daļa no iekaisuma proteīniem, kuri ir palielinātā daudzumā konstatējami HOPS raksturīgajā iekaisumā, tiek regulēti pateicoties nukleārajam faktoram kappa B (NF – κ B), kas arī tiek aktivēts alveolārajos makrofāgos HOPS gadījumā (Di Stefano, 2002).



5. attēls. Makrofāgu loma HOPS patoģenēzē. Makrofāgi izdala IL – 8, GRO – α (augšanas faktora receptoram līdzīgais onkogēns – α) un leukotriēnu B₄ (LTB₄), kas piesaista neitrofilos leukocītus. Makrofāgu izdalītie monocītu hemotakses proteīni ir arī – 1 (MPC – 1). CD8⁺ T limfocīti tiek piesaistīti ar interferona γ indukcijas proteīnu – 10 (IP – 10) un interferonu γ inducētā T limfocītu hemotakses faktora (i – T AC) palīdzību. Elastolītisko enzīmu atbrīvošanās no makrofāgiem, tai skaitā matricas metaloproteināžu (MMP) un katepsīna, izsauc elastolīzi kā arī transformējošā augšanas faktora β (TGF – β) un saistaudu augšanas faktora (CTGF) izdalīšanos. Makrofāgi izdala skābekļa reaktīvos savienojumus (ROS) un slāpekļa oksīdu (NO), kas kopā var veidot peroksinitrīta savienojumu, kas attīsta rezistenci pret dažāda veida steroīdiem. CXCR2 – CX hemokīna receptors 2, CXCR3 – CX hemokīna receptors 3 (Barnes, 2003).

Palielināto makrofāgu daudzumu smēķētājiem un HOPS pacientiem varētu arī skaidrot ar palielināto monocītu rekrutēšanu, pateicoties monocītu selektīvajiem hemokīniem. Vēl viens no faktoriem varētu būt palielinātā monocītu proliferācija un pagarināta monocītu dzīvildze, kas izskaidro palielinātu makrofāgu daudzumu pacientiem ar HOPS (Traves, 2002).

2.2.1.3. Eozinofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Daudzi eozinofilo leukocītu mediatori, kas iesaistās elpceļu iekaisuma patoģenēzē, tiek uzglabāti šūnu granulās un tiek izdalīti šūnām aktivējoties. Būtiskākie mediatori ir galvenais proteīns (MBP) (Gleich, 2000), kas korelē ar bronhu epitēlija bojājumu, eozinofilo leukocītu katjoniskais proteīns (ECP), kas pieaug hroniskas astmas gadījumā un korelē ar elpceļu obstrukciju (Venge, 1999), eozinofilo leukocītu izdalītais neirotoksīns (ECN), kas stimulē fibroblastu proliferāciju (Rochester, 1996) un eozinofilo leukocītu peroksidāze (EPO), kas veicina toksisko slāpekļa savienojumu veidošanos veicinot astmai raksturīgo iekaisumu (Alving, 1993). Bez tam, aktivēti eozinofīlie leukocīti izdala ciklooksigenāzes (COX), lipoksigenāzes un fosfolipāzi A2, kas piedalās iekaisuma reakcijā, veidojot eikosanoīdus (Bandeira-Melo, 2002).

Aktivēti eozinofīlie leukocīti sintezē un izdala virkni iekaisumu veicinošus citokīnus, tādus kā interleikīnus IL – 1 α , IL – 6, IL – 8; tumora nekrozes faktoru – α (TNF – α); transformējošo augšanas faktoru (TGF) – α un β un eotaksīnus (Churg, 2002) (Kuschner, 1996). Visi minētie savienojumi, kas izdalās no aktivētiem eozinofīlajiem leukocītiem, var ierosināt iekaisuma kaskādi.

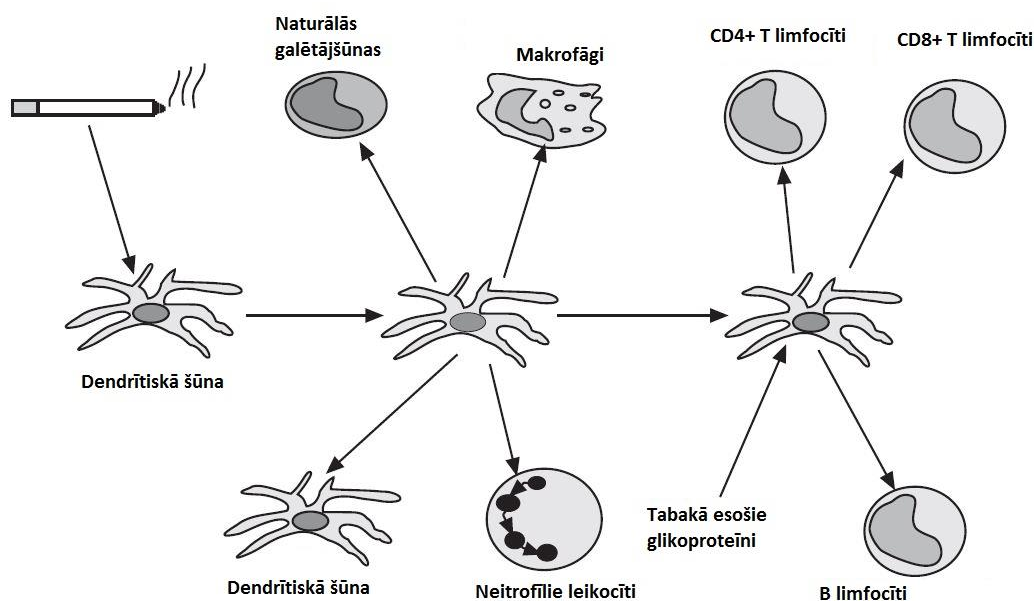
2.2.1.4. Epiteliālo šūnu nozīme HOPS patoģenēzē

Plaušu epiteliālās šūnas ir pirmās, kuras tiek pakļautas patogēnu un kaitīgo daļiņu iedarbībai, un tās regulē gan iedzimtās, gan iegūtās imūnās sistēmas darbību. Ilgstoša šo kaitīgo aģentu iedarbība uz epiteliālajām šūnām var veicināt iekaisuma veidošanos, izdalot lielu daudzumu pro-iekaisuma citokīnus, augšanas faktorus un hemokīnus, kas veicina iekaisuma veidošanos. Cigarešu dūmu ieelpošana var radīt jau tūlītējus bojājumus elpceļu epiteliālajām šūnām, kas noved pie dažādu endogēno intracelulāro savienojumu izdalīšanās. Šos signālus uztver Toll-līdzīgie receptori (TLRs) 4 un 2, kuri atrodas uz epiteliālo šūnu virsmas, kam seko nespecifiska iekaisuma ierosināšana (Opitz, 2010). Līdz ar pirmo citokīnu izdalīšanos (TNF – α , IL – 1 un IL – 8) notiek makrofāgu, neitrofilo leukocītu un dendrītisko šūnu piesaistīšana iekaisuma vietai, kas veicina iekaisuma attīstību un iedzimtās imūnās sistēmas aizsargmehānismu aktivēšanu (Demedts, 2007; Barnes, 2003).

TNF – α ir pro-iekaisuma citokīns, kam piemīt virkne iedarbības mehānismu, kas ir nozīmīgi HOPS attīstībā, neitrofilo leikocītu proliferācijā un aktivācijā. TNF α ir nozīmīgs šūnu apoptozes ierosinātājs. Alveolārās septas šūnu apoptoze ir viens no faktoriem kādēļ varētu attīstīties emfizēma (Tzortzaki, 2006).

2.2.1.5. Dendrītisko šūnu nozīme HOPS patoģenēzē

Tieši dendrītiskās šūnas ir celulārā saikne starp iedzimto un iegūto imūno sistēmu, šīs šūnas reaģē uz infekcijām vai audu bojājumiem un ierosina arī iegūtās imūnas sistēmas aizsargmehānismus, ja iedzimtā imūnā sistēma netiek ar to galā (Guermontprez, 2002) (Valladeau, 2002). Pētījumos atklāts, ka dendrītiskās šūnas aktivējas arī tiešu cigarešu dūmu iedarbības rezultātā, kas arī norāda uz viņu būtisko lomu HOPS patoģenēzē (skat. 6. attēlu).



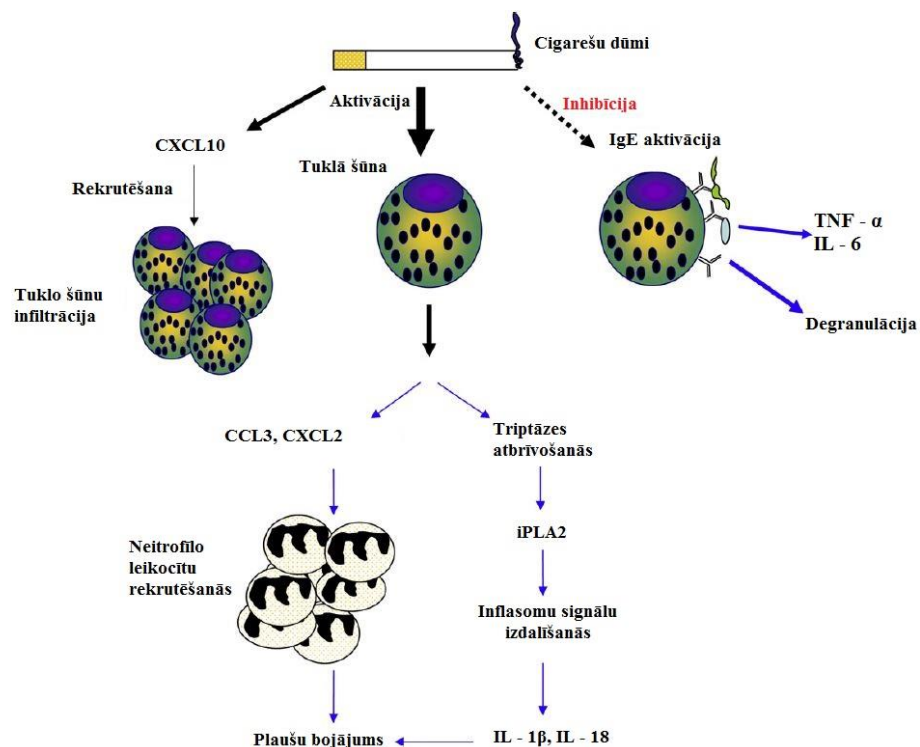
6. attēls. Dendrītisko šūnu iespējamā loma HOPS patoģenēzē. Dendrītisko šūnu aktivitāti var ierosināt ieloptie cigarešu dūmi un tabakā esošajiem glikoproteīni, kam seko neitrofilo leikocītu, makrofāgu, naturālo galētājšūnu, CD4⁺ T limfocītu, CD8⁺ T limfocītu un B limfocītu piesaistīšana (Barnes, 2003).

2.2.1.6. Galētājšūnu nozīme HOPS patoģenēzē

Naturālās galētājšūnas attīstās kaulu smadzenēs, tālāk tās brīvi cirkulē asinsritē. Izmēros tās ir lielākas par T un B limfocītiem, ar izteiktām citoplazmā redzamām granulām. Funkcionāli tām ir raksturīga spēja likvidēt noteiktu šūnu līnijas bez iepriekšējas imunizācijas vai aktivācijas. Šo šūnu darbības mehānismi ir līdzīgi citotoksiskajiem T limfocītiem. Galētājšūnas tiek aktivētas, kā atbildes reakcija uz interferonu un makrofāgu izdalītajiem citokīniem. Galētājšūnas spēj aktivēt arī T limfocītu helperu 1 apakštīpa šūnas (Th1), ekspresējot IFN – γ un T limfocītu helperu 2 apakštīpa šūnas (Th2) sekretējot IL – 4 (Goldsby, 2001).

2.2.1.7. Tuklo šūnu nozīme HOPS patoģenēzē

Lai arī tuklās šūnas tradicionāli tiek saistītas ar alerģiskās astmas patoloģiskajiem mehānismiem, pētījumos iegūtie pierādījumi norāda, ka tuklās šūnas varētu būt nozīmīga patoloģiskā mehānisma komponente arī HOPS gadījumā (skat. 7. attēlu). Histoloģiskajos plaušu pētījumos ir noskaidrots, ka pieaugot HOPS smaguma pakāpei, pieaug tuklo šūnu daudzums (Andersson, 2010).

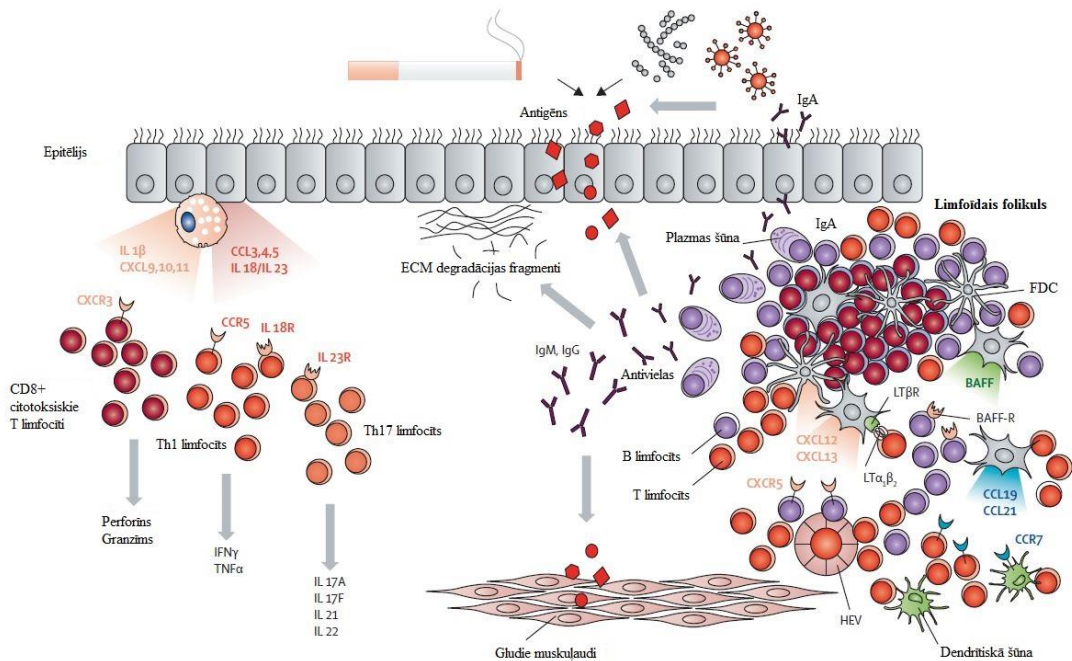


7. attēls. Cigarešu dūmi ierosināta tuklo šūnu aktivācija un iespējamā iedarbība uz plaušu audu bojājumiem HOPS gadījumā. CX – hemokīna ligands 10 (CXCL10) veicina tuklo šūnu piesaistīšanu, CC – hemokīna ligands 3 (CCL3) un CX – hemokīna ligands 2 (CXCL2) veicina neitrofilo leukocītu piesaistīšanu. Cigarešu dūmi var ierosināt triptāzes izdalīšanos no tuklajām šūnām, kas aktivē kalcijs atkarīgās fosfolipāzes A2 (iPLA2). Fosfolipāzes pakārtoti veicina interleikīna – 1 β (IL – 1 β) un interleikīna – 18 (IL – 18) veidošanos. Minētie procesi bojā plaušu audus un var novest pie HOPS attīstības (Mortaz, 2011).

Tuklajām šūnām ir būtiska nozīme alergiju patoģenēzē (Reuter, 2008; Galli, 2010), kā arī tās piedalās ar alergiju nesaistītos procesos (Weissler, 2008). Tuklās šūnas atrodas tuvu epitēlija slānim, asinsvadiem, nerviem, gludajiem muskuļaudiem un gļotas izdalošajiem dziedzeriem (Brinkman, 1968). Pētījumos atklāts, ka smēķētāju inducētajās krēpās ir lielāks tuklo šūnu daudzums salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (Wen, 2010). Aktivētas tuklās šūnas var izdalīt dažādus iekaisuma mediatorus, tām apkārtesošajos audos, kas var izraisīt iekaisumu (Krishnaswamy, 2006; Kalesnikoff, 2008). Tuklās šūnas arī izdala IL – 4 un IL – 13, kas spēj ietekmēt T limfocītu atbildes reakcijas, gļotu dziedzeru hiperplāziju kā arī gludo muskuļaudu hipertrofiju un hiperplāziju (Lazaar, 2002; Kumara, 2010).

2.2.2. Iegūtā jeb specifiskā imunitāte

Limfocīti ir baltās asins šūnas, kuras piedalās iegūtās jeb specifiskās imūnās sistēmas atbildes reakcijās, kad iedzimtās imūnās sistēmas efektivitāte ir ierobežota. Iegūtās imūnās sistēmas komponentes un darbība parādīta 8. attēlā.



8. attēls. Iegūtās imūnās sistēmas atbildes reakcijas HOPS gadījumā. Cigarešu dūmu antigēni un patogēni (no vīrusu vai baktēriju kolonijām un iekaisuma, kas atrodas zemākajā respiratorajā traktā), dažādu ekstracelulāro matricu (kologēna un elastīna fragmenti) un iespējamie plaušu audu antigēni spēj ierosināt specifiskās jeb iegūtās imūnās sistēmas atbildes reakciju pacientiem ar HOPS. Reakcijās iesaistās citotoksiskie CD8⁺ T limfocīti, T helperu 1 limfocīti (T_h1) un T_h17 CD4⁺ T limfocīti un B limfocīti, kas ierosina antivielu veidošanos. Bronhiolu limfoīdajos folikulos notiek T limfocītu un B limfocītu piesaistīšana ar limfocītu hemotakses hemokīna CC ligandu 19 (CCL19), CC – hemokīna ligandu 21 (CCL21), kas piesaista CCR7+ “naivos” T limfocītus un dendrītiskās šūnas, un CXC – hemokīna ligandu 12 un CXC – hemokīna ligandu 12 (CXL12), kas saistās ar CXC – hemokīna receptoriem 5 (CXCR5) uz B limfocītu virsmas. Limfoīdajos folikulos notiek arī intensīva imunoglobulīnu veidošanās (IgA, IgM, IgG). FDC – folikulārās dendrītiskā šūnas, BAFF – B limfocītu aktivējošais tumora nekrozes saimes faktors, BAFF – R – B limfocītu aktivējošā tumora nekrozes saimes faktora receptors, HEV – endotēlija venula, LT – limfotoksīns, ECM – ekstracelulārais matricss.

2.2.2.1. T šūnas

Limfocīti ir galvenās iegūtās imūnās sistēmas šūnas. Tie nodrošina organisma iegūto, kā arī iedzimto imunitāti (Dālmane, 2004). Limfocīti ir apaļas šūnas, kurām ir apaļš vai nedaudz ieliekts kodols, kurš krāsojas tumšs, jo hromatīns izvietojas difūzi pa visu kodolu. Limfocīti veic specifiskās imunitātes reakcijas, izmantojot virsmas īpašās struktūras. Tās ļauj atpazīt antigēnu un izraisīt pret to vērsto specifisko imūnreakciju.

T limfocīti izdala limfokinīnus, kuri nodrošina T limfocītu iedarbību. T limfocīti iedalās vairākās klasēs. Agresīvie jeb citotoksiskie limfocīti ($CD8^+$) iznīcina „inficēto” šūnu, realizējot specifisko jeb iegūto imunitāti. Līdzētājšūnas jeb helperi ($CD4^+$), kuri regulē B limfocītu darbību un supresori (T_s), kuri nomāc imūnreakcijas, radot toleranci (Dālmane, 2004).

Limfocītu specifiskumu un atšķirību nosaka procesi, kurā veidojas T šūnu receptori (TCR), ar kuru palīdzību tiek aktivēta un nodrošināta iegūtās imūnās sistēmas darbība.

Agrīnie T limfocītu prekursori neekspresē $CD4$ vai $CD8$ (dubultnegatīvo) ko-receptorus, bet sāk kombinēties ar kādu no 4 gēnu segmentiem – α , β , γ vai δ , kas tālāk nodrošina T šūnu receptoru izveidi. Rekombinācija aizsākas ar δ , γ vai β lokusiem, un ja γ/δ TCR ekspresija norit veiksmīgi, izveidojas γ/δ T šūnu līnija (Larosa, 2008). Šīs šūnas pēc izveidošanās pamet tīmusu un migrē uz limfoīdajiem audiem un elpceļu epitēliju. Progresējot T limfocītu attīstībai, tās kļūst par dubult-pozitīviem ($CD4^+CD8^+$) timocītiem. Timocītiem pilnībā attīstoties tie veidojas par $CD4^+CD8^-$ vai $CD4^-CD8^+$ T limfocītiem, kuri no tīmusa tiek izdalīti un nokļūst perifērajos audos, piemēram, plaušās.

TCR kompleksu saistīšanās ar MHC molekulām ir atkarīga no specifisko TCR esamības uz šūnas virsmas un T šūnu co-receptoru esamību. T helperu limfocīti ($CD4^+$) saistās ar MHC I klases molekulām, citotoksiskie ($CD8^+$) T limfocīti – ar MHC II klases molekulām. Tikai 2% no $CD4^+CD8^+$ T limfocītiem izdzīvo, lielākā daļa šo limfocītu iet bojā apoptozē (Germain, 2002).

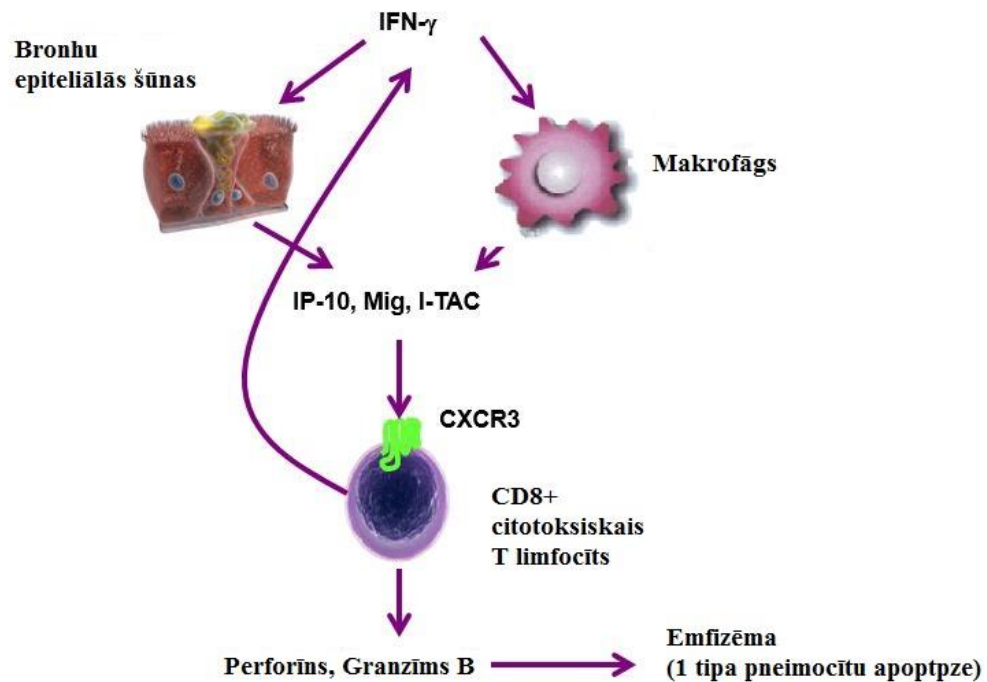
T limfocīti ar TCR – α/β ir 95% no visiem T limfocītiem, un šie limfocīti ir atbildīgi par imūnās sistēmas atbildes nodrošināšanu, sekretējot aktivējošos un regulējošos citokīnus, kamēr T limfocīti ar TCR – γ/δ ir galvenie homeostāzes nodrošinātāji un tiešās atbildes reakcijas pildītāji dažādu audu bojājumu gadījumā uz epitēlija virsmas (Jameson, 2003).

2.2.2.2. Citotoksiskās CD8⁺ T šūnas

Citotoksiskie T limfocīti (T_c) ir aptuveni 30-40% no α/β T limfocītu populācijas un uz to virsmas tiek ekspresēta CD4 molekula, kas palīdz TCR šūnu aktivizācijas procesā. Primārā CD8⁺ T limfocītu funkcija ir iznīcināt inficētās šūnas, tās atpazīstot pateicoties stimulējošo ligandu ekspresijai uz šo šūnu virsmas. CD8⁺ limfocīti ir spējīgi iznīcināt inficētās šūnas, audzēju šūnas un šūnas, kuras citu iemeslu dēļ ir bojātas vai tām ir novērojama kāda disfunkcija.

CD8⁺ spēj diferencēties 2 efektorajos fenotipos – T_c1 un T_c2 , kuri atkarībā no fenotipa izdala savādākus citokīnus. Abas šīs fenotipiskās grupas ir citotoksiskas un ar perforīnu un Fas/FasL darbības mehānismu palīdzību spēj likvidēt B limfocītus. T_c1 ekspresē IFN – γ , T_c2 sekretē IL – 4 un IL – 5 (Mosmann, 1997).

CD8⁺ T limfocīti ir dominējošās šūnas lielajos elpceļos pacientiem ar hronisku bronhītu (O'Shaughnessy, 1997), sīkajos elpceļos smēķētājiem ar HOPS (Saetta, 1998) un plaušu parenhīmā pacientiem ar HOPS (Calabrese, 2005; Saetta, 1999). CD8⁺ T limfocītus skaits plaušās korelē ar elpceļu obstrukcijas līmeni un emfizēmu, norādot, ka šīs šūnas var ierosināt audu bojājumus, kas noved pie HOPS (skat. 9. attēlu) (Shresta, 1998). Jebkura šūna, kura prezentē MHC I klases molekulu uz savas virsmas var būt par CD8⁺ T limfocīta mērķis. Pēc citolītiskā uzbrukuma šādai mērķšūnai, tā mirst no apoptozes vai nekrozes, ko izraisījuši perforīni, granulozīns vai granzīms A vai B, ko izdala CD8⁺ T limfocīts HOPS pacienta plaušās (Lieberman, 2003) (skat. 9. attēlu).



9. attēls. CD8⁺ citotoksisko T limfocītu aktivācija un to nozīme emfizēmas veidošanā. Interferons – γ (IFN – γ) aktivē bronhu epiteliālās šūnas un makrofāgus, kuri izdala interferona γ indukcijas proteīnu – 10 (IP – 10), interferonu γ inducēto monokīnu (Mig) un interferonu γ inducēto T limfocītu hemotakses faktoru (i – TAC), kas ar CXC – hemokīna receptora 3 (CXCR3) starpniecību saistās ar CD8⁺ citotoksiskajiem T limfocītiem, veicinot perforīna un granzīma B izdalīšanos, kas pastiprina emfizēmas veidošanos pacientiem ar HOPS (Majo, 2001).

HOPS pacientu plaušās, kuri smēķē un kuriem ir emfizēma, ir konstatēta izteiktāka epiteliālo un endoteliālo šūnu apoptoze (Imai, 2005), kā arī šis pieaugošais apoptisko šūnu skaits koralē ar CD8⁺ T limfocītu daudzumu plaušās (Majo,2001).

2.2.2.3. *Helperu CD4⁺ T šūnas*

Pārējo daļu no α/β T limfocītu populācijas sastāda Th T limfocīti, kuru darbības pamatā ir citu imūno šūnu aktivizēšana un vadīšana. Th šūnas nodrošina imūnās sistēmas atbildes reakcijas, atpazīstot patogēnus un aktivizējot šūnu ierosinātās imūnās sistēmas efektorās šūnas, veicinot patogēnu iznīcināšanu. Uz Th virsmas tiek ekspresēts CD4, kurš ir TCR co-receptors, šūnu aktivācijas palīgs, tām saistoties ar antigēnu prezentējošajām šūnām.

Th šūnas tiek iedalītas divās galvenajās apakšgrupās – T_{h1} un T_{h2} – atkarībā no to funkcijas. T_{h1} subpopulācijas T limfocīti sekretē IL – 2 un IFN – γ . IL – 2 stimulē T šūnu veidošanos un $CD8^+$ T limfocītu citotoksicitāti. IFN – γ aktivē makrofāģus, kas veicina patogēnu likvidēšanu. T_{h1} subpopulācijas šūnas ir galvenokārt atbildīgas par novēlotu hipersensitivitātes reakciju un citotoksisko T limfocītu aktivāciju. T_{h2} subpopulācija sekretē IL – 4, IL – 5 un IL – 10, kas nodrošina antivielu veidošanos. Šīs subpopulācijas šūnas ir ļoti nozīmīgas, kā palīgšūnas B limfocītu aktivācijā un antivielu veidošanā, it sevišķi ar alerģiskām reakcijām (Goldsby, 2001).

$CD4^+$ T limfocīti ir konstatēti palielinātā daudzuma HOPS pacientu elpceļos un plaušu parenhīmā (Hogg, 2004; Retamales, 2001). $CD4^+$ limfocītu skaits, kas ekspresē IFN – γ koralē ar elpceļu obstrukcijas pakāpi, kas norāda uz to, ka līdz ar $CD8^+$ T limfocītiem šīs šūnas ir iesaistītas HOPS patoģenēzē (Di Stefano, 2004).

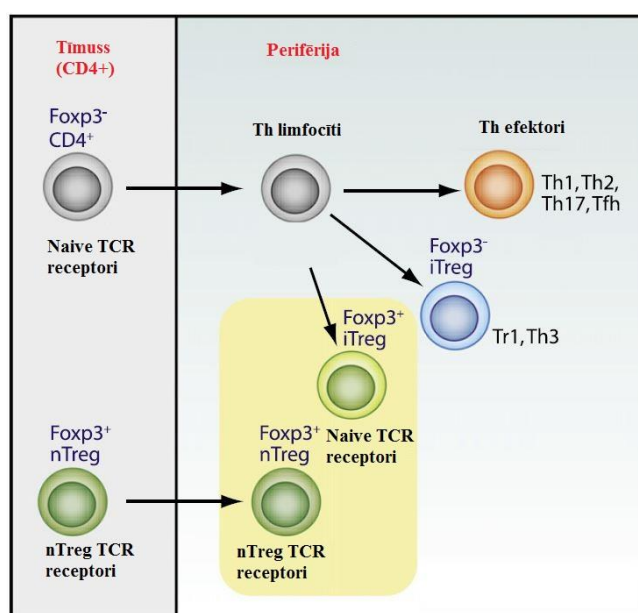
2.2.2.4. T regulatorās šūnas

Regulatorie T limfocīti ir specializēta T limfocītu subpopulācija, kas kavē imūnās sistēmas aktivitāti un līdz ar to saglabā imūnas sistēmas hemostāzi un toleranci pret paša organisma antigēniem. Regulatorie T limfocīti ir $CD4^+CD25^+$ T limfocītu apakšgrupa, kas kavē aktivēto limfocītu darbību, izdalot supresējošās molekulas, tādas kā – IL – 10 vai TGF – β (Cederbom, 2000; Liu, 2003). Tās arī ir spējīgas ierosināt imūnas sistēmas kaskādes, pateicoties citotoksisko $CD8^+$ T limfocītu asociēto antigēnu 4 (CTLA4) iedarbībai uz antigēnu prezentējošajām šūnām (Liu, 2003). Ir dažādu tipu regulatoro T limfocītu veidu, bet šūnas, kuras ekspresē CD25 (IL – 2R α) ir centrālās. $CD4^+CD25^+$ T regulatorie limfocīti ir 1 – 3% no kopējā $CD4^+$ T limfocītu skaita (Dejaco, 2006).

Ir divas dažādas T regulatoro limfocītu populācijas – naturālie un adaptīvie T regulatorie limfocīti. $CD4^+CD25^+$ naturālie T regulatorie limfocīti tiek sintezēti tīmusā un tiek izdalīti asinsritē un perifērajos limfajos. Naturālie T regulatorie limfocīti uz savas virsmas ekspresē IL – 2 receptorus (CD25), un to darbība ir atkarīga no IL – 2 darbības. Citi naturālo T limfocītu veidi var attīstīties papildus tīmusā no *naiviem* $CD4^+$ T limfocītiem TGF – β iedarbības rezultātā (Mills, 2004). Adaptīvie $CD4^+CD25^+$ T regulatorie limfocīti veidojas perifērijā no *naiviem* T limfocītiem, pēc

antigēnu prezentējošo šūnu (APC) iedarbības. Ir trīs tipu adaptīvie T regulatorie limfocīti: 1.tipa regulatorie T limfocīti (T_{r1}), T helperi 3 (T_{h3}) un $CD4^+$, $CD25^-$. Trešo veidu sauc arī par inducētajiem T regulatorajiem limfocītiem (iTreg). Tiem ir līdzīgas īpašības kā no aizkrūts dziedzerā izdalītajiem nTreg. Abi šie limfocītu veidi var inhibēt $CD4^+CD25^-$ T regulatoro limfocītu proliferāciju. Neskatoties uz to $CD4^+$ $CD25^-$ regulatorās T šūnas veicina anti – CD3 antivielu veidošanos, kā arī tie joprojām var saglabāt savu supresīvo darbību. Abu T regulatoro limfocītu veidu veidošanās ir atkarīga no gēna – transkripcijas faktora fork head box P3, FoxP3 (Sakaguchi, 2005; Tang, 2008).

Pēc transkripcijas faktora FoxP3 veidošanās, T regulatorie limfocīti sāk savu supresīvo darbību. Tajā skaitā citokinīnu izdalīšanos, ieskaitot IL – 10 un TGF – β sekrēciju, kuri var inducēt šūnu cikla apstāšanos vai efektoro T šūnu apoptozi, bloķēt DC nobriešanu. T regulatorajiem limfocītiem ir liela loma autoimūno slimību un transplantātu atgrūšanas reakciju attīstībā, kā arī astmas un alerģisko reakciju regulēšanā (Akbari, 2003).



10. attēls. T regulatoro limfocītu veidošanās tīmusā un perifērajos audos. Naturālie T regulatorie limfocīti (nTreg) diferencējas tīmusā un migrē uz perifērajiem audiem. Adaptīvie FoxP3⁺ T regulatorie limfocīti (iTreg) diferencējas sekundāri limfoīdajos orgānos un audos. TCR – T šūnu receptors.

Ir pierādīts, ka T limfocīti, kuri veicina TGF – β izdalīšanos, varētu efektīvi samazināt elpceļu iekaisumu un hiperaktivitāti. Vēl joprojām nav īsti skaidrs, kuri no T regulatorajiem limfocītiem regulē astmas un alerģisko slimību attīstību. Iespējams, ka T_h3 limfocīti, galvenokārt, iesaistītas gastrointestinālo slimību, bet T_r1 šūnas aktīvāk iesaistās elpceļu slimību regulācijā, jo dendrītiskās šūnas (DC) no elpošanas ceļiem producē IL-10, kas ir nepieciešams T_r1 šūnu attīstībai, bet DC no gastrointestinālā trakta producē, gan IL-10, gan TGF – β izdalīšanos, kas nepieciešams T_h3 šūnu attīstībai. Ir pierādīts, ka CD 25⁺ kavē elpceļu eozinofīlijas attīstību.

Pāris gadus atpakaļ CD25^{bright} bija vienīgais marķieris, lai noteiktu T regulatoros limfocītus. Nesen tika atklāts unikāls intra-nukleāru marķieris T regulatoru limfocītu noteikšanai – FoxP3⁺ (Fontenot, 2004). Ir zināmi arī vairāki citi marķieri, lai noteiktu T regulatoros limfocītus – CTLA4 un HLA – DR.

FoxP3⁺ ekspresija ir galvenokārt uz CD4⁺ T limfocītiem, taču arī CD8⁺ T limfocīti spēj ekspresēt FoxP3⁺. Joprojām nav izprotama FoxP3⁺ nozīme un loma, bet tie varētu darboties kā transkripcijas receptori, ar iespēju regulēt CD4⁺ T limfocītu atbildes reakcijas stiprumu (Schubert, 2001).

2.2.2.5. B šūnas

B limfocītiem ir imūnglobulīnu receptori antigēnu saistīšanai. Starp B un T limfocītiem ir šūnas, kuras saglabā informāciju par antigēnu, tāpēc, organismam atkārtoti sastopoties ar noteiktu antigēnu, imunoloģiskā atbildes reakcija norisinās ļoti ātri.

Ir konstatēts palielināts B šūnu daudzums lielajos elpceļos pacientiem ar HOPS, kā arī B šūnu sakopojumi konstatēti limfoīdajos folikulos ap sīkajiem elpceļiem (Hogg, 2004) un plaušu parenhīmu (van der Strate, 2006) it sevišķi HOPS smagākajā pakāpē. B šūnu aktivējošais tumora nekrozes faktors (BAFF) tiek pastiprināti ekspresēts HOPS pacientu plaušu limfoīdajos folikulos, salīdzinot ar kontroles grupu, kas liek secināt, ka BAFF un to receptoru saistība stimulē šo limfoīdo folikulu pastiprinātu sintēzi (Polverino, 2010). Kā arī BAFF ekspresijas daudzums koralē ar elpceļu limitācijas smagumu un hipoksijas smaguma pakāpi, kas ir divi nozīmīgi HOPS simptomi.

2.2.3. Iekaisuma mediatori

Daudz citokīnu ir atbildīgi par elpceļu iekaisuma veidošanos HOPS gadījumā. To galvenā darbība ir orientēta uz iekaisuma šūnu piesaistīšanu, aktivāciju un spēju izdzīvot. Citokīni, kurus izdala T limfocīti regulē iekaisuma veidu, kamēr pro-iekaisuma citokīni palielina uz uztur iekaisuma atbildes reakcijas. Tādi iekaisumu veicinošie citokīni, kā TNF – α , IL – 1 β un IL – 6 ir konstatēti palielinātā daudzumā pacientiem ar HOPS (Barnes, 2009). Ieelpotie cigarešu dūmi un citi ieelpotie kairinātāji aktivē epiteliālās šūnas un makrofāgus, kas pastiprināti izdala hemotakses faktoros, kas rezultējas ar iekaisuma šūnu rekrutēšanos plaušās.

TNF – α tiek sekretēts no daudzām šūnām, tai skaitā epiteliālajām šūnām, makrofāgiem, T limfocītiem un elpceļu gludajām muskuļa šūnām. TNF – α piemīt citotoksisks efekts, ierosina citu citokīnu izdalīšanos un tas ir atbildīgs par svara zudumu smaga hroniska iekaisuma gadījumā. TNF – α ir iekaisuma citokīns, kas iekaisuma gadījumā piesaista monocītus un neitrofilos leukocītus (Feldmann, 2001).

IL – 1 β – aktivē makrofāgus, kas veicina dažādu iekaisuma citokīnu, hemokīnu MMP9 izdalīšanos HOPS gadījumā (Culpitt, 2003).

IL – 2 galvenā darbības funkcija ir T limfocītu koloniāla proliferācija. IL – 2 sekretē Th1 limfocīti. IL – 2 ir 3 subvienības, α , β un γ . α ķēdes IL – 2 tiek izdalīts no aktivētiem T limfocītiem un to sauc arī par CD25. IL – 2 pastiprina arī T limfocītu un naturālo galētājšūnu proliferāciju un diferenciāciju.

IL – 4 izdalās no aktivētām Th2 šūnām, tuklajām šūnām un naturālajām galētājšūnām. Mērķšūnas galvenokārt šim citokīnam ir B limfocīti, kas nodrošina antivielu ražošanos, bet šis citokīns ietekmē arī T limfocītus un makrofāgus. Bez antivielu ražošanas veicināšanas, IL – 4 arī ierosina T limfocītu proliferāciju, un palielinātu MHC II klases ekspresiju uz B limfocītiem un makrofāgiem.

IL – 6 ir tas citokīns, kurš sadarbojoties ar citiem citokīniem nodrošina iedzimtās un iegūtās imūnas sistēmas sadarbību. IL – 6 izdala C – reaktīvo proteīnu (CRP) no

aknām, kas var ietekmēt dažādus sistēmiskos bojājumus HOPS gadījumā, tādus kā muskuļu vājums un endotēlija disfunkcija.

IL – 8 CXC hemokīns IL – 8 (CXCL8) ir neitrofilo leukocītu hematoaktraktants. IL – 8 daudzuma palielināšanās ir raksturīga HOPS pacientiem, kā arī tas korelē ar palielinātu neitrofilo leukocītu daudzumu (Keatings et. al., 1996). IL – 8 izdalās no elpceļu epitēliālajām šūnām dažādu kairinātāju ietekmē.

IL – 10 ir iespējamais pretiekaisuma citokīns, kas izdalās no monocītiem un alveolārajiem makrofāgiem, kā atbildes reakcija uz iekaisuma stimuliem. Galvenā IL – 10 funkcija ir imūnās atbildes mazināšana, bet citokīnam piemīt arī stimulējoša iedarbība. IL – 10 ierosinātā T regulatoro limfocītu aktivācija, attīsta perifērālo toleranci (Feldmann, 2001).

TGF – β ir nozīmīgs HOPS attīstībā. Tas ir multifunkcionāls augšanas faktors, kurš spēj ierosināt fibroblastu un elpceļu gludo muskuļu šūnu proliferāciju, ekstracelulāro matricu (EMC) nogulsnešanos un epitēliālo šūnu salabošanos. Tas ģenerējas no oksidatīvā stresa radītiem prekursoriem un dažādām proteāzēm. TGF – β piemīt arī imūno reakciju regulējoša iedarbība, kas tiek izpausta ar T regulatoro limfocītu darbību, samazinot T_h1 un T_h2 limfocītu aktivāciju (Wan, 2007).

IFN – γ tiek sekretēts no T limfocītiem, galvenokārt no T_h1 limfocītiem un naturālajām galētājšūnām. To mērķšūnas ir makrofāgi un B limfocīti, ar mērķi aktivizēt un diferencēt šīs šūnas, kā arī inhibēt T_h2 limfocītu proliferāciju.

2.2.4. Oksidatīvais stress

Cigarešu dūmi aktivē plaušu alveolu epitēlijšūnu caurlaidību, samazina virsmas aktīvo vielu sintēzi un palielina dažādu iekaisuma citokīnu un augšanas faktoru veidošanos, kuri fizioloģiski nav nepieciešami (skat. 11. attēlu.). Cigarešu dūmi spēj izraisīt alveolu epitēlijšūnu apoptozi vai nekrozi. Šūnu nāve iestājas oksidatīvā stresa rezultātā (Aoshiba, 2003).

Alveolu epitēliju veido 2 dažādi šūnu tipi: I un II tipa šūnas. I tipa šūnas ir lielas, plakanas un aizņem 90% no alveolu virsmas. II tipa šūnas aizņem 10% no alveolu virsmas. To galvenās funkcijas ir sintezēt un sekretēt virsmas aktīvās vielas (surfaktantu), ksenobiotiku metabolisms, izmantojot enzīmu P 450, citokīnu un augšanas faktoru ekspresiju, tādu kā interleikīns – 6 (IL – 6), interlekīns – 8 (IL – 8), tumora nekrozes faktors α (TNF – α), transformējošais augšanas faktors α (TGF – α), transformējošais augšanas faktors β (TGF – β), granulocītu - makrofāgu koloniju stimulējošais faktors (GM – CSF). Minētie citokīni piedalās epitēlijšūnu „salabošanas” procesos (Aoshiba, 2003).

Cigarešu dūmi satur dažādus reaktīvā skābekļa (ROS) un slāpekļa veidus, tādus kā superoksīda radikāļus, H_2O_2 , OH^\cdot , un peroksinitrītu. Dažas no cigarešu dūmu sastāvdaļām var atbrīvot dzelzi no ferritīna, pastiprinot oksidatīvo stresu plaušu šūnās, aktivējot fagocītus izdalīt ROS (Aoshiba, 2003). Nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāta (NADPH) oksidāzes, enzīmu komplekss, kas atrodas dažādās fagocitējošās šūnās un epitēlijšūnās, ksantīna/ksantīna oksidāzes sistēma, mieloperoksidāze un hēma peroksidāze ir galvenie ROS veidotāji. Slāpekļa oksīda sintāze ražo RNS, kā dažādas NO formas. NO kombinācijā ar superoksīdu (O_2^-), var veidot daudz kaitīgāku savienojumu – peroksinitrīta anjonu ($ONOO^-$), kā rezultātā veidojas nitrotirozīns. Oksidētāji, kuri veidojas no NADPH oksidāzes, galvenokārt, piedalās šūnas signalizācijas procesos, taču to pārmērīga ražošana mitohondrijos var radīt šūnu bojājumus vai nāvi.

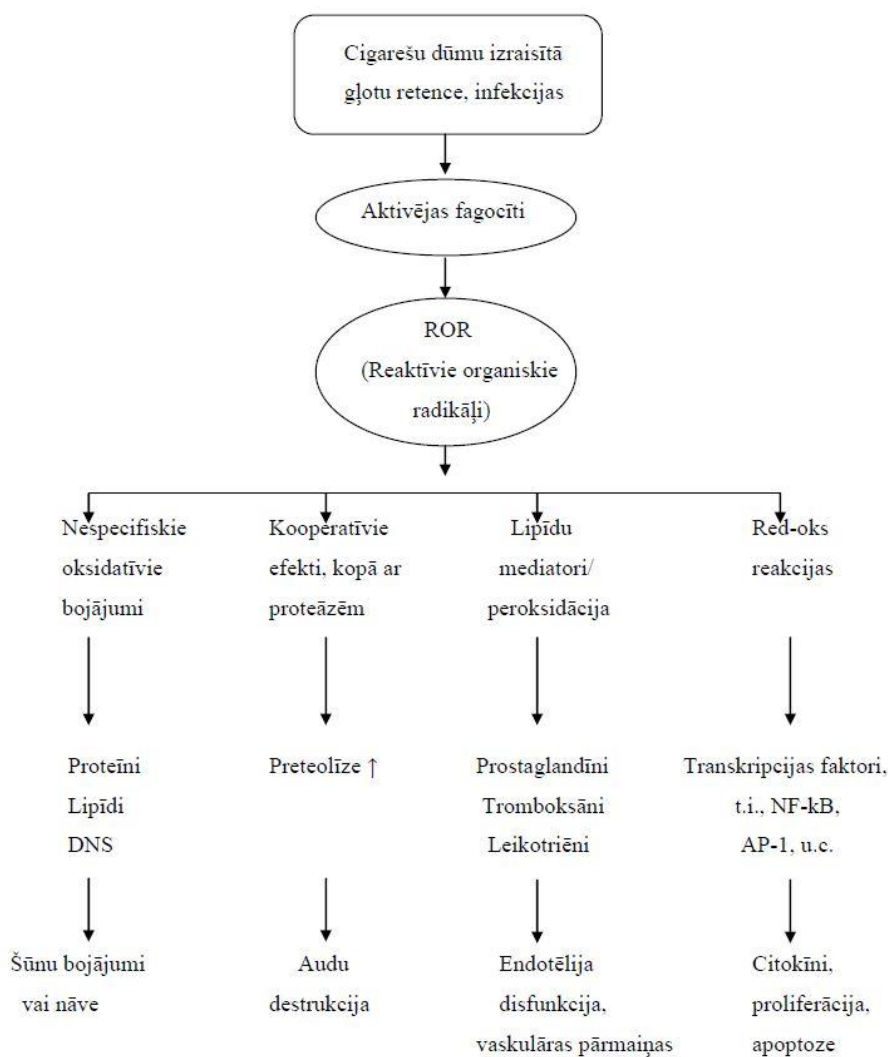
Darvas fāzē cigarešu dūmi satur organiskos radikāļus ar ilglaicīgu dzīvotspēju, piemēram, hinonu radikāļi, kas var strauji reaģēt ar molekulāro skābekli un ražot dažādas ROS variācijas, tādas kā superoksīdu, H_2O_2 , un OH^\cdot (Aoshiba, 2003).

Smēķētājiem sakarā ar kausšūnu hiperplāziju, palielinātu gļotu sekrēciju un samazinātu attīrīšanās funkciju elpceļos, var veidoties gļotu retence, kas ir ļoti laba vide dažādām baktēriju kolonijām un dažāda veida infekcijām, kas izraisa iekaisumu. Tabakas dūmu sastāvdaļas rada nespecifiskus kairinošus un/vai toksiskus efektus, kuri pateicoties to fizikāli-ķīmiskajām rakstura īpašībām izraisa daudz specifiskākus bojājumus, rodas ROS. ROS vai nu atrodas tabakas dūmos vai veidojas no tabakas dūmu esošajām sastāvdaļām plaušās, darvas sastāvdaļu šķīšanas rezultātā. Pēc ilgstoši veiktiem

pētījumiem, tiek uzskatīts, ka cigarešu dūmos esošie oksidanti, veicina neitrofilo leukocītu un monocītu skaita pieaugumu plaušās (Repine, 1997). Plaušās pastāv īpaša mijiedarbība starp oksidantiem un proteāzēm/antiproteāzēm. Oksidanti spēj inaktivēt svarīgas antiproteāzes, piemēram, α_1 – proteīnāzes inhibitorus, un sekretoros leukoproteīnāzes inhibitorus (Rahman, 1996). Tai pat laikā oksidanti spēj aktivēt proteāzes.

Kopumā oksidantu efekti izpaužas kā proteāžu/antiproteāžu līdzsvara zudums – disbalanss, kas izraisa audu bojājumus un iekaisumu. Šī mijiedarbība, starp oksidantiem un proteāžu/antiproteāžu sistēmu, ir nosaukta par „kooperatīvo efektu”. Citi ne mazāk svarīgi oksidantu bojājumu veidi, ko izraisa cigarešu dūmi, ir bojājumi plaušu antioksidantu aizsargsistēmā. Fizioloģiski, oksidanti ir līdzsvarā ar antioksidantiem, kuri atrodas plaušās. Īpaši svarīgi aktīvie antioksidanti plaušās (enzīmi un enzīmu sistēmas), novērš oksidantu izraisītus bojājumus un aizsargā šūnas. Glutathions (GSH) ir kvantitatīvi pats nozīmīgākais plaušu antioksidants, kas atrodas gan intracelulāri, gan arī ekstracelulāri. Oksidantu spēja radīt dažāda veida bojājumus plaušu šūnās, kā arī ekstracelulāri ir atainota 11. attēlā.

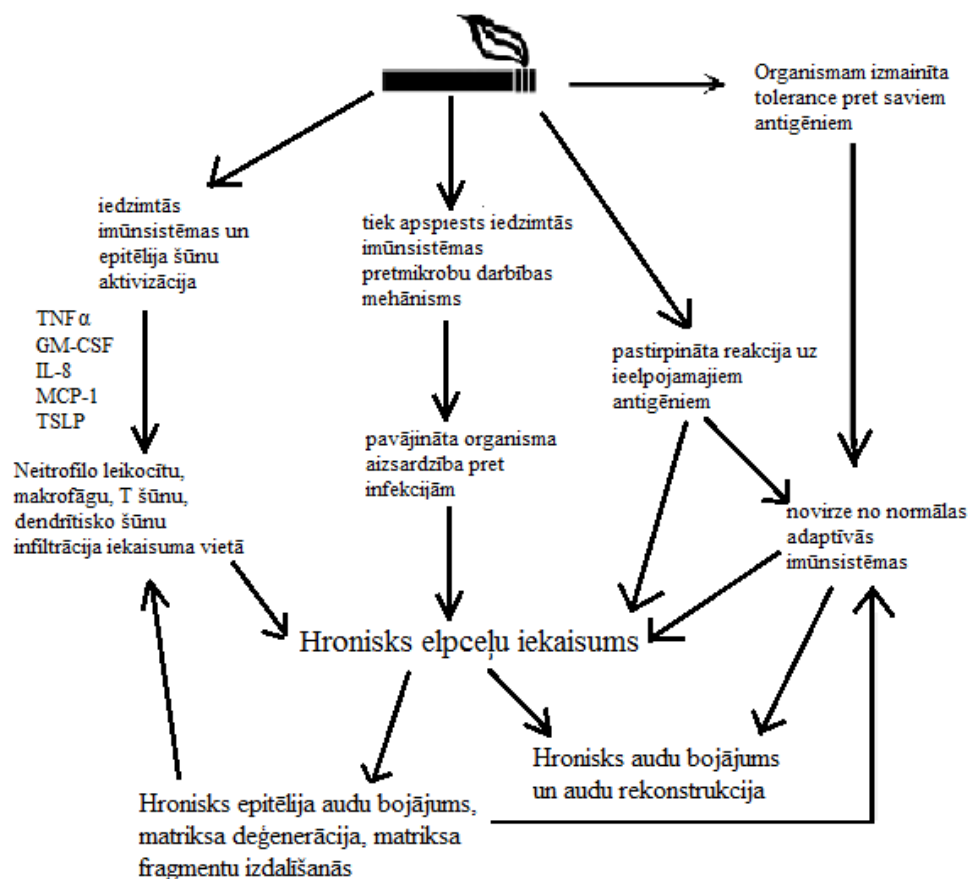
Cigarešu dūmi samazina ekstracelulāro un intracelulāro antioksidantu kapacitāti. Tie samazina antioksidantu līmeni asinīs, piemēram, askorbīna, α tokoferola, β karotīna. Īslaicīga cigarešu smēķēšana paaugstina glutathiona līmeni (GSH), samazinot glutathiona peroksidāzes un glikozes – 6 fosfāta dehidrogenāzes aktivitāti alveolu 2 tipa šūnās, eritrocītos, plaušu epitēlijā. Ilgstoša cigarešu smēķēšana paaugstina GSH līmeni un tā aktivitāti, taču tas nepasargā no iekaisuma veidošanās. Šīs GSH izmaiņas var izraisīt izmainītu glutamīlcisteīna sintāzes (GCS) gēnu ekspresiju plaušās. GSH ir nepieciešams, lai uzturētu oksidantu inducētu plaušu epitēlija šūnu funkciju un kontrolētu iekaisuma veidošanās procesu. Alveolu un plaušu GSH metabolisma izmaiņas var veicināt dažādu plaušu slimību attīstību, tajā skaitā arī HOPS. ROS veicina bronhu epitēlija apoptozi, kā arī mitohondriju disfunkciju alveolāro epitēliju šūnās. Šie bojājumi var ierosināt plaušu emfizēmu (Aoshiba, 2003).



11. attēls. Oksidatīvā stresa loma HOPS patoģenēzē. Reaktīvo organisko radikāļu izraisīto šūnu bojājumu veidi un audu destrukcijas mehānismi. NF – κ B – nukleārais faktors kapa β , AP – 1 aktivācijas proteīns – 1 (Rahman, 2011).

Cigarešu smēķēšana veicina kancerogenitātes indukciju. Rezultātā mainās gēnu funkcijas, piemēram, audzēja supresijas gēnam vai gēniem šūnas ciklā, DNS salabošanas procesā. Cigarettes degšanas procesā radušies ROS veicina brīvo radikāļu veidošanos. Tie bojā epitēlija šūnas elpceļos, inducējot lipīdu peroksidāciju, kā arī izraisa DNS bojājumus. Galvenokārt ROS aktivizē epitēlija šūnu intracelulāro signālu kaskādes, kuru rezultātā notiek iekaisuma citokīnu aktivizācija, galvenokārt IL – 8, TNF – α . Izdalās T_h limfocīti (T helperi) – T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} un notiek citokīnu sekrēcija. T_{h1} producē interferonu γ (IFN – γ), bet T_{h2} interleikīnu – 4 (IL – 4). Cigarešu dūmi veicina pastiprinātu gļotu izdalīšanos. Aktivētie iekaisuma faktori, veicina tādu imūno šūnu piesaisti kā neitrofilie leikocīti, makrofāgi, T limfocīti un dendrītiskās šūnas. Tajā pat laikā cigarešu dūmi pavājina iedzimtās imunitātes

aizsargreakciju mehānismus un maina adaptīvās imūnās atbildes reakcijas pret ielpojamojiem antigēniem. Rezultātā rodas hroniski elpceļu bojājumi un iekaisums (skat. 12. attēlu) (Lee, 2011).



12. attēls. Cigarešu dūmu izraisītais hronisks elpceļu iekaisums. Cigarešu dūmi aktivizē vairākus šūnu signālu ceļus, ieskaitot, mitogēnu – aktivizēto proteīnu kināzi (MAPK), nukleāro faktoru kappa B (NK – κB), aktivējošo proteīnu 1 (AP – 1). Tie visi piedalās iekaisuma regulācijā, šūnas ciklā. Aktivācijas proteīns – 1 (AP-1) veicina monocītu, makrofāgu un interleikīna – 8 (IL – 8) izdalīšanos (Lee, 2011).

2.2.5. Proteāzes un antiproteāzes

Tiek uzskatīts, ka nikotīnam piemīt arī tiešs aktivējošs un hemotakses efekts uz iekaisumam raksturīgām šūnām. Ir izpētīts, ka smēķēšana tieši stimulē granulocītu veidošanos un atbrīvošanu no kaulu smadzenēm, iespējams šo procesu nosaka GM – CSF, ko izdala plaušu makrofāgi (Terashima, 1997). Vēl ir noskaidrots, ka smēķēšana paldzina neitrofilo leikocītu saglabāšanos plaušās (MacNee, 1989). Par iekaisuma

šūnu piesaistīšanu ir atbildīgi arī brīvie radikāļi (ROS), kurus satur cigaretes (Rahman, 2006) (Rahman, 2005). Gan nikotīns, gan brīvie radikāļi spēj aktivēt transkripcijas faktoru NF- κ B (Barnes, 1997; Yang, 2006), kas aktivē gēnus TNF un hemokīnu produkcijai (Keatings, 1996). Hemokīnus izdala alveolārie makrofāgi (Russell, 2002), T-šūnas, epitēlijšūnas, kā arī paši neitrofilie leukocīti (Bazzoni, 1991). No hemokīniem būtiskie ir CXC hemokīni, piemēram, IL-8 (CXCL8), kas spēj piesaistīt un aktivēt neitrofilos leukocītus, kuri tālāk degranulē, atbrīvojot virkni proteāžu, piemēram, elastāze, katepsīnu G, proteināzi 3 un metalloproteāzes (MMP) (Barnes, 2006). Proteāzes tālāk izraisa audu bojājumus un gļotu hipersekreciju. Ir izpētīts, ka smēķēšana arī nomāc antiproteāžu efektu, izraisot, piemēram, 1 antitripsīna funkcionālu deficītu.

2.3. Ģenētisko faktoru loma HOPS patoģenēzē

Pēdējos gados tika veikti vairāki genoma mēroga asociācijas pētījumi (GWAS), kuros ir atklāts milzīgs dažādu polimorfismu skaits, kas potenciāli var izraisīt un/vai ietekmēt dažādas slimības. Līdz šim ir aprakstīta šādu polimorfismu saistība ar vairāk nekā 80 slimībām un to iezīmēm. Izlases lielums ir ievērojami palielinājies meklējot gēnu polimorfismus, kuri labāk izskaidrotu slimību un to iezīmju iedzimtību. Straujais GWAS pētījumu skaits sniedz nebijušu iespēju izvērtēt iespējamo ģenētisko variantu ietekmi sarežģītu slimību attīstībā. Notiek sistemātiska katalogizēšana, apkopojot galvenās slimību izpausmes un iezīmes, kuru attīstība saistīta ar gēnu SNP (Hindorff, 2009).

Tikai nelielai daļai smēķētāju attīstās HOPS, kas liecina, ka arī ģenētiskie faktori veicina HOPS attīstību (Lee, 2012). Svarīga HOPS iezīme ir tā, ka galvenais tās izraisītājs ir cigarešu smēķēšana, kas kvantitatīvi var ietekmēt slimības attīstību. Tāpēc šī pazīme ir iekļauta kā līdzmainīgais ģenētiskās – asociācijas pētījumos (DeMeo, 2009).

Neatkarīgi no iedzimtām gēnu izmaiņām, arī tās, kas iegūtas somatisko mutāciju rezultātā ir svarīgs komponents HOPS patoģenēzē. Oksidatīvais stress HOPS pacientiem rodas cigarešu smēķēšanas rezultātā. Tas izraisa DNS bojājumus, līdz ar to

„salabošanas” sistēmām ir grūtāk veikt savu darbu. Uzkrājoties iegūtiem DNS bojājumiem mikrosatelītu sekvencēs, telomērās, promoteros un metilēšanas vietās, var rasties faktori, kas var izraisīt HOPS un ietekmēt tās gaitu (Tzortzaki, 2013).

Vairāku pētījumu rezultātā ir identificēti 192 gēni, kuri saistīti ar HOPS un plaušu funkcionālajām pārmaiņām. Līdz šim ir veiktas meta - analīzes gēnos, kuri ir iesaistīti šādos HOPS attīstības molekulārajos ceļos: iekaisums (*IL4*, *IL6*, *IL13*, *IL1B*, *IL1RN*, *TNF* un *TGFB1*), proteāzes/ antiproteāzes (*MMP9*, metalopeptidāzes inhibitors 2 – *TIMP2*), oksidācijas stress (Glutathiona S transferāze M1 – *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *EPHX1*, *mEPHX1*, superoksīda dismutāze 2 - *SOD2* un *SOD3*) un citos (*AGPHD1* un *CHIT1*) (Bossé, 2012).

Apkopojot vairāku pētījumu rezultātus, atklājumus ir iespējams sagrupēt apakšgrupās, ņemot vērā tautību, smēķēšanas vēsturi u.c. (Bossé, 2012).

SNP saistībā ar gēnu ekspresiju, nodrošina informāciju, kas ļauj saprast molekulāro izmaiņu izraisīto uzņēmību (jūtīgumu) dažādu DNS variantu gadījumā. Identificētie polimorfismi ir saistīti gan ar slimību iezīmēm, gan viena vai vairāku gēnu kvantitatīvo transkripcijas līmeni attiecīgajos audos, izceļot cēloņus gēna ietvaros, uzņēmības lokusu (gēna atrašanās vieta hromosomā) un funkcionālo polimorfismu, kas ir galvenie HOPS patoģenēzē (Bossé, 2012).

Mēs izvēlējamies 4 vispopulārākos gēnu polimorfismus, kuri atklāti GWAS pētījumos un šobrīd, pēc literatūras datiem, tiek uzskatīti par potenciāliem kandidātģēnu polimorfismiem HOPS attīstībā.

2.3.1. CHRNA3/5

Nikotīnskābes acetilholīna receptora alfa subvienības 3/5 gēni, atrodas 15. hromosomas 25 lokusā (reģionā) (15q25) (Lee, 2012). Šie gēni kodē nikotīnskābes acetilholīna receptorus (nAChRs) $\alpha 3$ un $\alpha 5$ subvienības (Saccone, 2009), kuri ir gan neironos, gan arī citos audos. Tiem ir nozīmīga loma plaušās, jo tie kodē nikotīnskābes acetilholīna receptorus bronhu un alveolārajās epitēlija šūnās, gan arī iekaisuma šūnās,

piemēram, tuklajās šūnās, neitrofilajos leukocītos, monocītos un limfocītos (Lambrechts, 2010).

Atkarībā no nukleotīdu polimorfismiem ir dažāds risks, nikotīna atkarības attīstībai, kas pieaug līdz ar izsmēķēto cigarešu daudzumu (Saccone, 2009).

Šī gēna viena nukleotīda polimorfisms (SNPs) rs1051730 ir identificēts kā plaušu vēža un HOPS jutības lokuss baltās rases indivīdiem, tie ir ļoti reti aziātu rases pārstāvjiem (Lee, 2012).

SNPs rs1051730 nozīmē G nukleotīda apmaiņu ar A nukleotīdu *CHRNA3* gēnā. Šīs ģenētiskās izmaiņas korelē ar mRNS ekspresiju nikotīnskābes acetilholīna receptora apakšvienībās. Tajā pašā laikā, SNP rs1051730 ir cieši saistīts ar rs16969968, kas maina aminoskābi (D398N) $\alpha 5$ nikotīna receptora apakšvienībā un līdz ar to mainās šī receptora funkcijas. Šie divi ģenētiskie varianti, *CHRNA3/5* gēnu klasteri, varētu iedarboties kopā, mainīt nikotīna receptora funkcijas plaušu audos un vēl vairāk palielināt HOPS attīstības risku. *Zhang et al.* pētījuma rezultāti parādīja, ka SNPs rs1051730 bija saistīts ar samazinātu FEV₁. Tas varētu būt izskaidrojams ar elpceļu obstrukciju un gļotu sekrēcijas pastiprināšanos, kas pieaug novērojot riska alēlēs A esamību minētā polimorfisma gadījumā (Zhang, 2011).

Lambrechts, Buyschaert, Zanen, et al. pētījumā konstatēja, ja indivīdam rs1051730 ir A alēle, tad palielinās risks bronhu obstrukcijai un plaušu emfizēmai, neatkarīgi no smēķēšanas paraduma. Šajā pētījumā, lielākā daļa dalībnieku, kuriem bija emfizēma bija arī bronhu obstrukcija, bet bija arī pētījuma dalībnieki ar emfizēmu kam nebija bronhu obstrukcijas. Tas liecina, ka neskatoties uz to, ka abi klīniskie fenotipi ir līdzīgi, tos tomēr izraisa neatkarīgi ģenētiskie faktori. Tādēļ ir jānošķir gadījumi, kad bronhu obstrukciju un emfizēmu izraisa atšķirīgi fenotipi. Kopā ar iedzimtu $\alpha - 1$ – antitripsīna deficītu, rs1051730 ir viens no nedaudziem zināmajiem ģenētiskā riska faktoriem, kas veicina emfizēmas veidošanos. Pētījumā nepierādīja sakarību starp rs1051730 un atkarību no nikotīna, kas pieaug līdz ar izsmēķētajiem pakgadiem (nosmēķēto gadu skaits attiecībā pret izsmēķēto cigarešu daudzumu dienas laikā). Līdz ar to rs1051730 attiecīgajā hromosomā ir saistīts ar plaušu emfizēmas veidošanos un smaguma pakāpi, tieši ietekmējot alveolu destrukciju plaušās (Lambrechts, 2010).

2.3.2. IREB2

Dzelzs reaģējošā elementa saistošais proteīns 2 arī atrodas 15. hromosomas 25 lokusā (15q25). SNPs rs2656069 riska alēle ir T (DeMeo, 2009).

Izmantojot daudzpakāpju integratīvo genomikas metodi, ir pierādīts, ka *IREB2* ir viens no galvenajiem gēniem 15q25 reģionā, kas ietekmē HOPS attīstību (Zhang, 2011).

Dzelzs uzņemšanas un asinsrites regulācija cilvēka ķermenī ir saskaņā ar stingru homeostatisko kontroli, ko veic dzelzs regulējošais proteīns (IRPs). *IREB2* proteīna produkts (pazīstams arī kā IRP2) ir RNS saistošs proteīns, kas kopā ar *IREB1*, uztur normālu dzelzs ciklu cilvēka šūnās. Tika konstatēts, ka *IREB2* olbaltumvielas un mRNS daudzums ir palielināts HOPS slimnieku plaušu audu paraugos, salīdzinot ar kontroli (Zhang, 2011).

Hipoksēmija ir raksturīga HOPS pacientiem. *IREB2* svarīga iezīme ir tā, ka tas tiek aktivizēts samazinoties skābekļa daudzumam. Ir atrastas reģionālās atšķirības starp dzelzs un dzelzs saistošo proteīnu daudzumu smēķētāju plaušās. *Nelson et al.* izpētīja, ka BAL paraugos bija augstāka dzelzs, ferritīna un transferīna koncentrācija plaušu augšējās daivās salīdzinājumā ar apakšējām. Tas liecina, ka dzelzs un dzelzs saistošo proteīnu sadalījums atšķiras dažādās plaušu daļās un var novest pie dažādas pakāpes oksidatīvā kaitējuma. Emfizēma un plaušu vēzis visbiežāk attīstās tieši plaušu augšējās daivās, kas norāda uz potenciālo dzelzs un tā saistošo proteīnu lomu slimības patoģenēzē. Šajā pašā pētījumā tika konstatēts arī alveolārs dzelzs un IL – 1 β atšķirīgais daudzums dažādos plaušu reģionos (DeMeo, 2009).

Gēnu asociācija ir veikusi pētījumus ar cilvēka novecošanos saistītām slimībām, piemēram, Alzheimer slimību, kurās iesaistīti *IREB2* gēna polimorfismi, tajā skaitā rs2656069. Arī HOPS pieder pie šādām slimībām. Dzelzs nogulsnešanās un uzkrāšanās ir saistīta ar šūnu novecošanos, kā arī cilvēkiem gados ir palielināts dzelzs daudzums plaušās. Tā palielināšanos pastiprina cigarešu smēķēšana. *Ghio et al* pētījumā ir noskaidrots, ka veselīgiem smēķētājiem un smēķētājiem ar HOPS ir augstāka dzelzs koncentrācija plaušās, kas liecina par dzelzs homeostāzes traucējumiem, kas var būt viens no faktoriem HOPS attīstībai arī ilgu laiku pēc smēķēšanas atmešanas. Tādējādi rs2656069 polimorfa veidošanās dzelzs homeostāzes regulējošajā *IREB2*

gēnā, būtiski var ietekmēt HOPS attīstību, un dzelzs akumulāciju veicina ilgstoša cigarešu smēķēšana (DeMeo, 2009).

2.3.3. AGPHD1

Šī gēna otrs apzīmējums ir HYKK (hidroksilizīna kināze). Atrodas 15q25.1 (15.hromosomas 25 lokusā). Tas ir *AGPHD1* (aminoglikozīda fosfotransferāzes domēnu saturošā proteīna 1) kodējošais gēns. Šis proteīns katalizē GTP atkarīgu 5-hidroksi – L – lizīna fosforilēšanos magnija klātbūtnē. Tas pieder pie aminoglikozīdu fosfotransferāzes ģimenes un atrodas šūnas citoplazmā. *AGPHD1* katabolizē ar uzturu uzņemtā 5 – hidroksilizīna un 5 – hidroksilizīnu, kurš atvasināts no kologēna. *5Hyl* – kināzes darbība galvenokārt izpaužas aknās un nierēs. Tāpēc mutācija šajā gēnā visbiežāk var izraisīt hidroksilsinuriju un hidroksilisinēmiju. Ir konstatēts, ka *5PHyl* atrodas pieauguša cilvēka smadzenēs, tas liecina, ka šis savienojums var uzkrāties šajos audos un izraisīt kaitīgu iedarbību uz nervu sistēmu (Veiga da Cunha, 2012).

15. hromosomā esošā *CHRNA3/5* gēna polimorfismi uzrādīja nozīmīgu saistību ar HOPS, taču vēl spēcīgāka saistība novērotā par SNP rs8034191, kurš rodas aminoglikozīdu fosfotransferāzes domēna (*AGPHD1*) gēnā, kas atrodas netālu no *CHRNA5* (Galvan, 2010).

Sreekumar G. Pillai et. al. pētījumā konstatēja genotipa un vides mijiedarbību starp rs8034191 un smēķēšanu kā HOPS attīstības risku. Ievērojami lielāks HOPS risks ir smēķētājiem, kura genomā ir rs8034191 C alēlē, kas veicina arī atkarību no nikotīna. Smēķētājiem, kuriem ir grūtāk atmet smēķēšanu, pastāv lielāks HOPS attīstības risks. Kā arī ir konstatēts, ka šis SNP ietekmē FEV₁ un kopā ar *CHRNA3/5* gēna polimorfismu veicina holīnērgisko receptoru aktivitāti elpceļos, kas izpaužas kā gludo muskuļu spazmas un gļotu pastiprinātu sekrēcija elpceļos (Pillai, 2009).

Tāpat kā *CHRNA3/5* gēnu polimorfisms rs1051730, arī *AGPHD1* gēna rs8034191 – C alēle varētu būt riska faktors plaušu vēža attīstībai baltās rases pārstāvjiem, bet ne austrumu – aziātiem (Gu, 2012).

2.3.4. CHIT1

Hitināzes ir fermenti, kuras hidrolītiski sašķeļ polisaharīdu hitīnu. Cilvēkiem genomā ir kodētas divas hitināzes: hitotriozidāzes (CHIT1) un skābi saturošā zīdītāju hitināze (AMCase) (Seibold, 2008).

CHIT1 gēns ir lokalizēts 1mās hromosomas 31-32 lokusā (1q31-Q32), tas sastāv no 12 eksoniem (Aminuddin, 2012). *CHIT1* ekspresējas makrofāgos, bet, ja tas notiek pārmērīgi, tad var attīstīties slimības, kuras saistītas ar makrofāgu aktivāciju – talasēmija, sarkoidoze, iekšējo orgānu leišmanioze (Seibold, 2008).

Ir pierādīts, ka hitīns darbojas kā imunoloģiskais adjuvants, stimulējot dažādu citokīnu un hemokīnu ražošanu. Tas liecina, ka hitināzei – CHIT1 ir nozīme, modulējot lokālo vai cirkulācijā esošo hitīna koncentrāciju ķermenī un regulējot imūno reakciju pret šo polisaharīdu. Kad eksogēnais hitīns no, piemēram, sēnītes vai putekļu ērcītes tiek ieelpotas plaušās, CHIT1 nodrošina hitīna sašķelšanos. Tas varētu novērst hitīna ierosinātu imūnās atbildes reakciju. Bez aktīva CHIT1, hitīns var uzkrāties plaušās un iniciēt pārspīlētu iekaisuma reakcijas atbildi. Tas savukārt varētu veicināt iekaisuma veidošanos plaušās, kā arī HOPS attīstību un progresēšanu (Seibold, 2008).

Tomēr, līdz galam nav skaidrs kā smēķēšana ietekmē hitināzes (CHIT1) aktivitāti. Tiek uzskatīts, ka ar tabakas dūmiem ieelpo hitīna daļiņas, kuras atrodas uz tabakas lapām sēnīšu infekcijas rezultātā. Apmēram, 270 sēnīšu sporas var būt vienā cigaretē. Hitīns veicina iekaisumu, ja vēl papildus klāt ir cigarešu dūmi, tad tas var aktivizēt iekaisuma šūnas, piemēram, makrofāgus un elpceļu epitēlija šūnas. Rezultātā pastāvīgajiem smēķētājiem ir paaugstināta hitināzes aktivitāte un *CHIT1* gēnu ekspresija plaušās (Seibold, 2008).

Ir pierādīts, ka ģenētiskie varianti šajā gēnā ietekmē hitināzes aktivitāti un uzņēmību pret astmu. SNPs ir saistīts ar 24pb duplikāciju, kas ir saistīts ar samazinātu hitināzes aktivitāti smēķētāju plaušās. Rezultātā smēķējošo HOPS pacientu plaušās tika konstatēta samazināta CHIT1 aktivitāte (Aminuddin, 2012).

CHIT1 ir atbildīga par hitinolītisko aktivitāti plaušās. *Aminuddin et al.* konstatēja, ka smēķētājiem bez funkcionālās CHIT1 izoformas var straujāk pazemināties plaušu funkcionālie rādītāji. Tādējādi pētījums liecina CHIT1 aktīvā forma var būt kā aizsargājošs faktors pret strauju slimības attīstību smēķētājiem, kuriem veidojas HOPS (Aminuddin, 2012).

3. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

Par darba hipotēzi izvirzījām, ka jauniem indivīdiem ar salīdzinoši mazu smēķēšanas stāžu un normāliem plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem jau ir konstatējamā pārmaiņas inducēto krēpu imūno šūnu spektrā, kas liecina par agrīnu iekaisuma reakciju un minētās pārmaiņas varētu būt saistītas ar HOPS kandidātgēnu polimorfismiem.

Pētījuma mērķis ir – noskaidrot smēķēšanas izraisītās iekaisīgās un funkcionālās pārmaiņas plaušās jauniem smēķētājiem un to saistību ar HOPS kandidātgēniem.

Darba uzdevumi:

1. Izvērtēt smēķēšanas izraisītās pārmaiņas plaušu ventilācijas funkcijā gados jauniem smēķētājiem.
2. Novērtēt šūnu spektra pārmaiņas jaunu smēķētāju inducētajās krēpās, salīdzinājumā ar jauniem nesmēķētājiem.
3. Novērtēt iespējamo HOPS kandidātgēnu (*CHRNA3/5*, *CHIT1*, *AGPHD1*, *IREB2*) polimorfismus pētījuma dalībniekiem un to saistību ar plaušu funkcionālajiem rādītājiem un šūnu spektru inducētajās krēpās.

4. PACIENTU RAKSTUROJUMS UN IZMANTOTĀS METODEDES

4.1. Pētījuma norise un pacientu izvēle

Doktora disertācijas izstrāde ilga no 2010. – 2014. gadam. Pētījums norisinājās Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedrā, Latvijas Universitātes Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūtā. 07.01.2011. tika saņemta Latvijas Universitātes Eksperimentālas un klīniskās medicīnas institūta zinātniskās izpētes ētikas komisijas atļauja pētījuma veikšanai. 30.09.2013. tika saņemta Centrālās medicīnas ētikas komisijas atļauju Latvijas Zinātņu padomes Sadarbības projekta “Slimību etioloģijas, patogēneses un cilvēku novecošanas procesu ģenētiskā izpēte Latvijas populācijā” asociētajam projektam “HOPS kandidātģēnu noteikšana jauniem smēķētājiem un nesmēķētājiem”.

Pētījumā tika iekļauti 120 jaunieši, no tiem 54 vīrieši un 66 sievietes. Rezultātus, ko ieguvām no 12 pētījumā iekļauto jauniešu krēpu materiāla, nevarējām izmantot rezultātu ieguvei sakarā ar palielināto siekalu piejaukumu krēpās, kas pārsniedza 30%. Līdz ar to pētījuma rezultāti, tika iegūti apstrādājot 108 jauniešu krēpu materiālu. Jaunieši atbilstošu darba mērķim tika sadalīti divās grupās – jauni asimptomātiski smēķētāji (n=59) un jauni veseli nesmēķētāji (n=49). Visiem pētījumā iesaistītajiem jauniešiem pēdējā mēneša laikā nebija konstatēti respiratoro slimību simptomi.

Visiem pētījumā iekļautajiem jauniešiem bija paredzēta viena vizīte pie pētniecības personāla. Šīs vizītes laikā pacientam bija jāaizpilda aptaujas anketa norādot savus personiskos un antropometriskos datus, informācija par iespējamām slimībām un alergijām, kā arī jāaizpilda speciāli sagatavota BMC izstrādāta aptaujas anketa, kas ļāva iegūt precīzāku informāciju par cilvēka tuvinieku slimībām un anamnēzi. Visi pētījumā iesaistītie jaunieši parakstīja veidlapu par piekrišanu piedalīties pētījumā.

Visiem pētījumā iekļautajiem dalībniekiem tika veikta spirogrāfija, inducēto krēpu ieguve un apmācīts medicīnas personāla darbinieks ņēma asins paraugus, kuri tika nogādāti BMC tālākai apstrādei, DNS materiāla iegūšanai un analīzei.

Lai analizētu asociāciju starp mūsu izvēlētajiem 4 pētāmajiem SNP un HOPS, pētījumā iekļāvām arī pacientus ar jau apstiprinātu HOPS diagnozi. 58 pacientu ar

HOPS un 106 kontroles grupas (smēķējošu un nesmēķējošu jauniešu) asins paraugos tika analizēti *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu polimorfismi. Pacientiem ar HOPS diagnoze jau iepriekš bija apstiprināta klīnikā, kā arī veicot spirogrāfiju viņiem konstatējām slimībai raksturīgu ainu ($FEV_1, \% = 40,96 \pm 4,34$, $FVC, \% = 54,38 \pm 4,4,8$, $FEV_1/FVC, \% = 56,18\%$, nosmēķētie pakgadi – $29,50 \pm 3,92$). Kontroles grupā bija mūsu pētījumā iesaistītie jaunie nesmēķētāji un smēķētāji.

DNS iegūšana tika veikta Genomu centra DNS laboratorijā, pielietojot fenola/hloroforma izdalīšanas metodi. Saskaņā ar Cilvēka genoma izpētes likuma I nodaļas 8.pantu visi pētījumā izmantotie DNS paraugi tika iekļauti genoma datu bāzē tikai tad, ja gēnu donors deva rakstveida piekrišanu.

Visiem pētījumā iesaistītajiem jauniešiem bija iespējams uzdot sev interesējošos jautājumus par pētījuma norisi, kā arī jebkurā brīdī atteikt savu dalību pētījumā.

4.2. Plaušu ventilācijas funkciju novērtēšana

Plaušu ventilācijas funkcija tika novērtēta izmantojot spirogrāfijas metodi. Spirogrāfijas mērījumi tika uzskatīti par derīgiem, ja tika veikti trīs vienlīdz labi forsētās izelpas manevri. Pirms izmeklējuma pētījumā iesaistītie jaunieši nebija lietojuši bronholītiskos medikamentus, kā arī smēķējošie jaunieši tika lūgti nesmēķēt vismaz 3 stundas pirms mērījumu veikšanas.

Spirogrāfijai tika izmantots:

1. MicroGP MS07 spirogrāfs. Spirogrāfs atbilst Amerikas torakālās biedrības (ATS) un Eiropas Respiratorās biedrības (ERS) spirogrāfijas standartizācijas rekomendācijām.
2. Vienreizējās lietošanas iemutes.

Spirogrāfijas veikšanas metodika

Ir zināms, ka spirogrāfijas izmeklējumā iegūtie rezultāti ir atkarīgi no izmeklējamās personas spējas veikt pareizu forsētās izelpas manevru, kas tiek reģistrēts spirogrammas veidā. Ja izmeklējamā persona nespēja veikt pieņemamu forsētās izelpas manevru, tad plānotais izmeklējums tika atlikts vai pilnībā atteikts.

Pirms izmeklējuma pētījuma dalībniekam tika izskaidrota procedūras gaita, īpaši uzsverot, ka izelpotais gaiss spirogrāfijas laikā nedrīkst iet garām iemutum. Pirms forsētās vitālās kapacitātes mērījuma veikšanas izmeklējamā persona tika informēta, ka veiksmīgs izmeklējums ir atkarīgs no precīzi veikta forsētās izelpas manevra.

Uzsākot izmeklējumu spirogrāfā tika ievadīti izmeklējamās personas individuālie dati – augums, vecums, dzimums un svars, pēc kuriem tiek rēķināta individuālā norma.

Spirogrāfija tika veikta sēdus. Abas izmeklējamās personas pēdas bija noliktas uz grīdas un nedrīkstēja vienu kāju likt pāri otrai. Mugura bija taisna. Galva taisni izslieta, jo kakla saliekšana sašaurina augšējos elpceļus. Šo nosacījumu neievērošana var radīt nepareizu priekšstatu par elpceļu caurejamību.

Izmeklējamai personai tika izskaidrots, kā pareizi paņemt mutē vienreizējās lietošanas iemuti. Iemute bija jāpaņem zobos un cieši jāaņņem ar lūpām, lai pa mutes kaktiņiem neplūstu ārā gaiss un nerastos kļūda mērījumā.

Būtiskākie ventilācijas funkcijas rādītāji, kas tika novērtēti ar spirogrāfijas metodi bija:

- **Forsētā vitālā kapacitāte (FVC)** – gāzes tilpums litros, ko var izpūst maksimāli spēcīgas un pilnas izelpas laikā, kas sāka pēc maksimāli dziļas ieelpas.
- **Forsētas izelpas tilpums pirmajā sekundē (FEV₁)** – no plaušām izplūstošais gāzes tilpums litros maksimāli spēcīgas izelpas pirmajā sekundē, kas sāka pēc pilnas ieelpas. FEV₁ ir rādītājs, kas dod vismazāko kļūdu atkārtotos mērījumos, tāpēc tieši šo rādītāju izmanto bronhu dilatācijas testa efektivitātes un obstruktīvu pārmaiņu novērtēšanai elpceļos.
- **FEV₁ attiecība pret FVC izteikta procentos (FEV₁/FVC, %) – Tifno indekss.** Tifno indekss ir matemātiski aprēķināts lielums, ko izmanto obstruktīvu plaušu slimību atšķiršanai no restriktīvām.

4.3. Krēpu indukcija

Zinātniskajos pētījumos un klīniskajā diagnostikā, lai izvērtētu iekaisuma procesu plaušās, ir nepieciešams iegūt citoloģisko, histoloģisko, kā arī bioķīmisko materiālu no plaušām. Citoloģisko materiālu no plaušām visvienkāršāk ir iespējams iegūt no spontāni izdalītajām krēpām, kā arī tās izsaukt mākslīgi, ierosinot to izdalīšanos. Krēpu indukcijai ir pat priekšrocības, atšķirībā no spontāni izdalītajām krēpām. Inducētās krēpas ir iespējams iegūt laikā, kad tas ir nepieciešams, īsi pirms krēpu tālākas citoloģiskās un bioķīmiskās analīzes (Bhowmik, 1998). Spontānās krēpas visvieglāk iegūt pārsvarā no rīta un līdz to tālākai apstrādei var paiet laika posms, kurā šis paraugs var kļūt nederīgs tālākai analīzei. Inducēto krēpu priekšrocība ir arī tā, ka tās var iegūt no indivīdiem, kuriem nav spontānas krēpu izdalīšanās, kā mūsu gadījumā strādājot ar jauniešiem. Veseliem cilvēkiem, bez plaušu iekaisuma, nav raksturīga spontāna krēpu veidošanās un vienīgā metode to ieguvei ir krēpu izdalīšanās indukcija.

Sākotnēji krēpu indukcijas metode, tika lietota, lai diagnosticētu *Pneumocystis carinii* pulmonāru infekciju HIV slimniekiem. I. Pina pirmā piemēroja šo metodi absolūtā un relatīvā krēpu šūnu skaita iegūšanai astmas slimniekiem (Pin, 1992). Vēlāk šī metode tika pielietota, lai iegūtu krēpu citoloģisko un bioķīmisko materiālu no pacientiem ar HOPS, cistisko fibrozi, bronhektāzēm u.c.

Atšķirībā no bronhu biopsijas, bronhu skalojuma un bronhoalveolārās lavāžas, ko iegūst bronhoskopijas laikā, krēpu indukcija ir vienkārša, neinvazīva, viegli paciešama, ne pārlietu dārga procedūra, bez nozīmīgām blaknēm.

Inducēto krēpu metode ir precīza elpceļu iekaisuma novērtēšanas metode ar augstu šūnu diferenciālās skaitīšanas rezultātu atkārtojamību to veicot dažādiem pētniekiem. Veicot atkārtotu krēpu indukciju ar vairāku dienu starplaiku, ir konstatēta laba skaitīšanas rezultātu atkārtojamība tādām šūnām kā eozinofīlie un neitrofilie leukocīti un makrofāgi. Ir arī augsta bioķīmisko analīžu rezultātu atkārtojamību krēpu supernatantā. Mūsu pētījumā krēpu indukcija tika veikta pēc ERS Eiropas Respiratorās biedrības izstrādātām vadlīnijām (Pin, 1992; Pizzichini, 2002).

Krēpu indukcija prasa pacienta aktīvu līdzdalību. Krēpu indukcija tika veikta kabīnē ar velkmi, lai novērstu infekcijas risku. Krēpu indukcijai tika izmantots ultraskaņas

inhalators (*Omron NE-U17 (NE-U17-E). OMRON MATSUSAKA Co*, Japāna) ar lielu aerosola izsmidzināšanas ražību un augstu dispersijas pakāpi. Pētījumā izmantotā ultraskaņas inhalatora ražība bija 1 mL/min.

Krēpu indukcijai izmantojām nemainīgas koncentrācijas NaCl šķīdumu (4%) (Pizzichini, 2002). Īpaši jutīgiem pacientiem ar bronhospazmas risku ir ieteicams lietot alternatīvo krēpu indukcijas metodi, kad sāk ar izotonisku (0,9%) NaCl šķīdumu, turpina ar 3% NaCl šķīdumu un beidz ar 4,5% NaCl šķīdumu, taču šādi pacienti pētījumā netika iekļauti.

Lai iegūtu krēpas analīzēm, pacientiem tika veikta krēpu indukcija. No smēķētājiem bija vieglāk iegūt krēpas nekā no nesmēķētājiem un no vīriešiem vieglāk nekā no sievietēm. Visgrūtāk bija iegūt krēpas no indivīdiem, kas bija veseli un nesmēķēja.

Drošības nolūkos krēpu indukcija tika veikta spirometrijas kontrolē. Spirometriju veicām pirms un pēc bronholītiķa (salbutamola (*Ventolin, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A.*) inhalācijas, kā arī ik pēc 5 min krēpu indukcijas laikā (Pizzichini, 2002). Bronhospazmas risku 200 µg salbutamola pilnībā nevar novērst, tāpēc spirometrijas kontrolei bija būtiska loma. Krēpu indukcija tiktu pārtraukta, ja FEV₁, % pazeminātos vairāk par 20% no pēcbronholītiķa līmeņa.

2.tabula. Krēpu indukcijas standartmetode izmantojot sāls šķīdumu ar nemainīgu koncentrāciju. Modificēta E. Pizzichini u.c. shēma.

Nr. p.k.	Manipulācija	Inhalētās vielas koncentrācija	Ievērotie laika intervāli
1.	Informējam pētījuma dalībnieku par procedūru	-	-
2.	Pārbaudām aparatūru (iestādām ultraskaņas inhalatora izsmidzināšanas ātrumu 1 ml/min), ievadām pētījuma dalībnieka datus spirometrā	-	-
3.	Veicam spirometriju (novērtējam FVC, FEV ₁ % un FEV ₁ /FVC%)	-	-

4.	Pētījuma dalībnieks saņem salbutamola inhalāciju ar dozējamo inhalatoru (izmantojot krājtelpu)	(200µg)	-
5.	Gaidām	-	10 min
6.	Atkārtojam spirometriju. Ja FEV ₁ % < 60% no normas krēpu indukciju atceļam	-	
7.	Pētījuma dalībnieks saņem NaCl inhalāciju	4%	5 min
8.	Lūdzam pētījuma dalībnieku izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
9.	Lūdzam klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
10.	Atkārtojam spirometriju	-	-
11.	Pētījuma dalībnieks saņem NaCl inhalāciju	4%	5 min
12.	Lūdzam izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
13.	Lūdzam klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
14.	Veicam spirometriju	-	-
15.	Pētījuma dalībnieks saņem NaCl inhalāciju	4%	5 min
16.	Lūdzam izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
17.	Lūdzam klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
18.	Veicam spirometriju	-	-
19.	Pētījuma dalībnieks saņem NaCl inhalāciju	4%	5 min
20.	Lūdzam izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
21.	Lūdzam klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
22.	Veicam spirometriju	-	-
23.	Ja FEV ₁ % kritums > 10%, tad pētījuma dalībnieks saņem salbutamola inhalāciju ar dozējamo inhalatoru (izmantojot krājtelpu)	(200µg)	-
24.	Gaidām, kamēr FEV ₁ % kritums ir < 5%		2 min

4.4. Inducēto krēpu pirmapstrāde

3. tabula. Inducēto krēpu pirmapstrādes shēma (A. Efthimiadis u.c. shēmas modifikācija).

Nr. p.k.	Manipulācija	Parametri	Ievērotie laika intervāli
1.	Ja nepieciešams, glabā krēpu paraugu ledusskapī (krēpas ieteicams apstrādāt cik ātri iespējams)	4°C	2h, maks. 8h
2.	Nosver krēpas kopā ar iepriekš nosvērtu trauciņu	≈ 50 ml tilpuma	-
3.	Pievieno ekvivalentu svaru (tilpumu) DTT (ditiotreitola) (<i>Sigma-Aldrich</i> , ASV). DTT izšķīdināti HBSS (Henksa balansētā sāļu šķīdumā) (<i>Sigma-Aldrich</i> , ASV)	0.1%	-
4.	Samaisa paraugu ievēlot un izpūšot no pipetes un /vai sakratot ar vortex mikseri	3-4 reizes ar pipeti	5-10s ar mikseri
5.	Inkubē paraugu kratāmā vannā (<i>Grant GLS400</i> , <i>Grant Instruments</i> , Lielbritānija)	22°C vai 37°C	15 min
6.	Paraugu filtrē caur neilona sietu iepriekš nosvērtā traukā	Sieta acu izmērs 48 μm	-
7.	Nosver filtrātu	-	-
8.	Sajauc ekvivalentu tilpumu filtrātu un tripānzilo (<i>Sigma-Aldrich Company</i> , Lielbritānija)	20μL filtrāta 20μL tripānzilā	-
9.	Samaisa ievēlot un izpūšot no pipetes vai sakratot ar vortex mikseri (<i>Biosan</i> , ASV)	3-4 reizes ar pipeti	3s ar mikseri
10.	Izmantojot Neubauera hemocitometru (<i>Carl Zeiss Jena</i> , Vācija), veic totālo šūnu skaitīšanu. Skaita pilnu laukumu. Plakanā epitēlija šūnas skaita atsevišķi. Pārējām šūnām skaita dzīvās un beigtās šūnas atsevišķi.	Skaita 9 lielos kvadrātus – 9mm ² .	-

11.	Aprēķina kopējo šūnu skaitu mililitrā	-	-
12.	Centrifūgē filtrātu centrifūgā (<i>Hettich Zentrifugen, Universal 320R, Vācija</i>)	(300 – 1500g) 4°C temp	10min
13.	Ar pipeti nosūc supernatantu	-	-
14.	Supernatantu sadala pa kriotobriņiem	200 µL (vai vairāk) katrā	-
15.	Kriotobriņus ar supernatantu sasaldē un glabā ledusskapī vai šķidrā slāpekļī	-70 līdz -80°C vai -195°C	Atkarībā, ko vēlas noteikt
16.	Šūnu sedimentu resuspendē HBSS šķīdumā (Henksa balansētā šāļu šķīdumā) (<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>).	Līdz 1 ml	-
17.	Šūnu suspensiju atšķaida ar HBSS šķīdumu (Henksa balansētā šāļu šķīdumu) (<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>).	400000 – 600000 šūnas/ml	-
18.	Sagatavo darbam citocentrifūgu (<i>Cellspin II, Hettich Zentrifugen, Vācija</i>)	-	-
19.	Iepilda citocentrifūgas piltuvēs sagatavoto šūnu suspensiju (ar aprēķinu lai uz katru stikliņu nonāktu 40000-60000 šūnas)	100 µL katrā piltuvē	-
20.	Citocentrifugē	22g* (10-51g)	6 min
21.	Izņem stikliņus no citocentrifūgas un atstāj nožūt	-	-

4.5. Uztriepes preparātu krāsošana diferenciālā šūnu skaitīšanai

Stikliņus ar uztriepēm, kas tika izņemti no citocentrifūgas un nožāvēti, 10 min fiksējām metanolā. Nožuvušos preparātus 9 min krāsojām ar 0,25% Meja – Grīnvalda krāsu (*Reagena*, Somija). Krāsu nolējām un veicām starpskalošanu ar buferētu destilētu ūdeni, kur pH ir 6,9. Sekoja krāsošana ar 1/50 ūdenī atšķaidītu Gimza krāsu (*Sigma-Aldrich Company*, Lielbritānija), kuras pH 6,7. Gimza krāsā preparāti atradās 13 min. Pēc krāsošanas preparātus īslaicīgi skalojām ar buferētu destilētu ūdeni, pH 6,9, un žāvējām, līdz stikliņi bija pilnībā sausi (Pin, 1992).

4.tabula. Uztriepes preparātu krāsošanu ar Meja – Grīnvalda – Gimzas metodi.

Nr. p.k.	Manipulācija	Parametri	Ievērotie laika intervāli
1.	Pēc izņemšanas no citospina ļauj stikliņiem nožūt	≈20°C	vēlams 24h
2.	Fiksē metanolā	≈20°C	10 min
3.	Atstāj stikliņus nožūt (ja nepieciešams paraugus var uzglabāt vairākas dienas istabas temperatūrā līdz turpmākai krāsošanai)	≈20°C	20 min
4.	Krāso ar Meja – Grīnvalda krāsu	≈20°C	9 min
5.	Noskalo ar destilētu buferētu ūdeni	≈20°C	-
6.	Krāso ar Gimzas krāsu	≈20°C	13 min
7.	Noskalo ar destilētu buferētu ūdeni	≈20°C	-
8.	Atstāj stikliņus nožūt (ja nepieciešams paraugus var uzglabāt un skaitīt vēlāk)	≈20°C (istabas temp)	3h

Pēc pēdējās uztriepes preparātu žāvēšanas, tika veikta diferenciālā šūnu skaitīšana. Diferenciālā šūnu skaitīšana notika, skaitot šūnas no diviem uztriepes preparātiem – no katra stikliņa pa 400 identificētajām kodolainām pulmonāras izcelsmes šūnām (bronhu epitēlijšūnas un leukocīti) un atsevišķi plakanā epitēlija šūnas.

Ja vidējais plakanā epitēlija daudzums uztriepes preparātos un Neubauera kamerā pārsniedza 30%, tos uzskatījām par nederīgiem sakarā ar palielinātu siekalu piejaukumu (Pin, 1992).

4.6. Uztriepes preparātu imūncitoķīmiskā krāsošana

1. Uztriepes preparāti pēc izņemšanas no citocentrifūgas tika nožāvēti un sasaldēti.
2. Pirms imūncitoķīmiskās krāsošanas uztriepes preparāti tika salikti speciālās kamerās un 30 sekundes fiksēti acetona. Visas reakcijas notika *Shandon* mitrajā kamerā istabas temperatūrā.
3. Sekoja preparātu skalošana trīs reizes, katru reizi citā *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 14200* (DPBS) buferī (*Sigma Aldrich*, ASV). Ceturto reizi preparāti tika atstāti 10 min buferī, lai buferis noskalo iepriekšējo reaģentu.
4. Preparāti 10 min. Tika inkubēti peroksidāzes (*Dako*, Dānija) bloķētājreaģenta klātbūtnē, kas saturēja 3% ūdeņraža peroksīdu. Peroksidāze bloķē šūnu endogēno peroksidāzes aktivitāti, kas traucē sasaisti ar antivielām.
5. Preparātu inkubācijas laikā, tika sagatavotas primārās antivielas:
 - CD4⁺ (*Dako*, Dānija) (T limfocītiem)
 - CD8⁺ (*Dako*, Dānija) (citotoksiskajiem T limfocītiem)
 - FoxP3⁺ (*Abcam*, ASV) (T regulatorajiem limfocītiem)

Antivielas tika atšķaidītas ar *DAKO Cytomation Antibody Diluent* (*Dako*, Dānija) attiecībā 1:100 (piem., 1 μl antiViela : 1 ml atšķaidītājs).

6. Preparāti tika skaloti 3 reizes buferī. Tādā veidā tiek noskalots reaģents un tiek samazināta antivielu nespecifiskā saistīšanās.
7. Uz preparātiem tika pilināti 100 μl no katras antivielas. Antivielas iedarbības laiks bija 1h.
8. Sekoja preparātu skalošana trīs reizes, katru reizi citā *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 14200* (DPBS) buferī.
9. 30 minūtes ilga inkubācija ar *DAKO EnVision rabbit/ mouse* 100 μl katrā paraugā.
10. Sekoja preparātu skalošana trīs reizes, katru reizi citā *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 14200* (DPBS) buferī.

11. Preparāti tika inkubēti 5 – 10 min. Hromogēna – 3,3 diaminobenzidīnu (DAB) klātbūtnē (*Dako*, Dānija).
12. Noslēgumā preparāti tika trīs reizes skaloti krāna ūdenī.
13. Pēc skalošanas priekšmetstikliņi tika nosusināti, uzpilināta līme un uzlikti segstikliņi, līdz ar to pabeidzot krāsošanas procesu.
14. Imūncitoķīmiskā krāsošana ļauj vizualizēt, atšķirt un saskaitīt CD8⁺ T limfocītus un CD4⁺ T limfocītus, kā arī FoxP3⁺ T regulatoros limfocītus.

4.7. Ģenētiskā materiāla iegūšana un apstrāde

Ģenētiskā materiāla izpēte tika veikta BMC. Pētījuma dalībnieku asins paraugi tika savākti speciālos stobriņos (*Becton Dickenson vakutaineros*), uz kuru malām izsmidzināts EDTA, kas saista kalciju un neļauj asinīm sarecēt un ļauj veiksmīgi izdalīt genomisko DNS.

Sertificētais medicīnas personāls no pētījumā piesaistītiem cilvēkiem ņēma asins paraugus, pildot tos šajos stobriņos. Stobriņus ar asins paraugiem 72h laikā nogādāja BMC Genoma centrā, kur tālāk notika šo asins paraugu apstrāde, analīze un datu statistiskā apstrāde.

5.tabula. Ģenētiskā materiāla apstrādei izmantotā aparatūra.

Aparatūra	Modelis	Ražotājs
Automatizētas pipetēšanas iekārtas	<ul style="list-style-type: none"> • Evo • Corbett Robotics 	Tecan Group Ltd, Šveice Corbett Life Science, Austrālija
Centrifūgas	<ul style="list-style-type: none"> • 5424 • Universal 32 	Eppendorf, Vācija Hettich, Vācija
Elektroniskie svāri	Kern 440-33	Kern&Sohn, Vācija
Ledusskapis	FR240-1501A+	Snaige, Lietuva

Maisītāji	<ul style="list-style-type: none"> • Minigen type 4TEC • Microspin FV-2400 	Biosan, Latvija
Mazu tilpumu spektrofotometrs	Nanodrop	ThermoScientific, ASV
Programmējams termostats	GeneAmpPCR system 9700	Applied Biosystems, ASV
Reālā laika PCR sistēma	ViiA 7	Life Technologies, ASV
Saldētava	F100-1201A	Snaige, Lietuva
Termobloks	TDB-120	Biosan, Latvija
Termostats	TC-80M-2	медлабортехника оао, Krievija
Ūdens attīrīšanas iekārta	Milli-Q Synthesis A10	Millipore, ASV
Velkmes skapis	MSZ 6619	Ezermester ISZ, Ungārija
Vertikālais autoklāvs	Olymatic	International pbi S.p.a., Itālija
Vortekss centrifūga	Microspin FV-2400	Biosan, Latvija

6.tabula. Ģenētiskā materiāla apstrādei izmantotie reaģenti un izejvielas

Ražotājs	Reaktīvs
AMRESCO, Lietuva	Tris (2-amino-2-hidroksimetil-propān-1,3-diols)
Applied Biosystems, ASV	TaqMan zondes, TaqMan PCR Master Mix
Fermentas, Lietuva	Proteināze K
Jaunpagasts Plus, SIA, Latvija	Etanols
Merck, ASV	Saharoze
Rīgas ķīmija, SIA, Latvija	Hloroforms, HCl
Sigma-Aldrich, ASV	EDTA, Mg ₂ Cl ₂ , SDS, borskābe
Stanlab, Polija	Fenols, izopropilspirts

Šķīdumi un buferi

- RBC Lysis A1 šķīdums

Saharoze	109,5 g
1M Tris-HCl pH 7,6	10 ml
1M Mg ₂ Cl ₂	5 ml
dH ₂ O	līdz 1 l

- Šūnu suspensijas šķīdums (Cell Suspension Solution)

0,5M EDTA	50 ml
5M NaCl	40 ml
dH ₂ O	līdz 1 l

- 10% SDS šķīdums

SDS	50 g
dH ₂ O	450 ml

- TE buferis (DNA Hydration solution)

1M Tris-HCl pH 7,6	5 ml
0,5M EDTA	1 ml
dH ₂ O	500 ml

7. tabula. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijā izmantotās TaqMan zondes.

Hromosoma	Gēns	Rs numurs	Sekvence
15	<i>CHRNA3/5</i>	rs1051730	GGGCCATCATCAAAGCCCCAGGCTA[C/T] AAACACGACATCAAGTACAACTGCT
15	<i>IREB2</i>	rs2656069	CTTAGCCCTAATCAATATTATTCT[A/G]T CCTTAAACACGAATGAAGCAGGTC
15	<i>AGPHD1</i>	rs8034191	CCCAATGTGGTATAAGTTTTCTGTT[C/T]A GAAAGGCCCTGACAGATAGTAACT
1	<i>CHIT1</i>	rs2494303	AATGGAGGGAGCAGGTTTATTGAGC[A/C] TGGATCCTCTGGAGATCCCTGGGGG

Genomiskā DNS izdalīšana no cilvēka asinīm

Balto asins šūnu attīrīšana

1. Uz steriliem 50ml flakoniem uzlīmē atbilstošā parauga identifikāciju un uzpilda ~10ml ar RBC Lysis A1 šķīduma (no dispensera).
2. Uzmanīgi, ar grieztu, sterilu pipeti nosūc visu balto šūnu slāni (pēc iespējas cenšoties paņemt pārējos asins ķermeņiņus) un pārnes iepriekš sagatavotā 50ml flakonā. Pipeti noskalo vairākas reizes iesūcot un izspiežot RBC Lysis A1 šķīdumu.
3. 50ml flakoniem (ar šūnu) uzlej vēl 10ml RBC Lysis A1 šķīduma (no dispensera), uzliek korķi un samaisa, 3x apgriežot riņķī, nedrīkst stipri kratīt vai vorteksēt.
4. Inkubē 15min $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ledusskapī.
5. Atlikušās asinis neizmanto, uzliek korķīti un izmet bioloģisko atkritumu paredzētajā maisā.
6. Pēc inkubācijas 50ml flakonus centrifugē $+4^{\circ}\text{C}$, 4000apg./15min.
7. Tūlīt pēc centrifūgas apstāšanās uzmanīgi nolej supernatantu (speciāli marķētā „Bīstamie bioloģiskie atkritumi” tvertnē), atstājot radušās nogulsnes.
8. Pēc supernatanta noliešanas, nogulsnes (leikocītās šūnas) kopā ar atlikušo buferi uzmanīgi tiek suspendētas ar pipetes palīdzību tā, lai leikocītās šūnas netiktu pārrautas. Suspendējot jāizvairās no straujas šķīduma iesūkšanas un izspiešanas.

Leikocītu šūnu lizēšana

9. No 50ml flakoniem, leikocītās šūnas, pārnes uz 15ml flakoniem tos attiecīgi marķējot. Suspendētajām nogulsnēm (leikocītām šūnām) pievieno 5ml Cell Suspension Solution.
10. Samaisa, ievietojot grozītājā uz 3 – 5 min, līdz šūnas ir suspendētas šķīdumā.
11. Pievieno 0,4ml 10% SDS šķīduma, samaisa 3x apgriežot riņķī.
12. Pievieno 5,0μl Proteināzes K, samaisa 3x apgriežot riņķī.
13. Inkubē termostatā pie $+50^{\circ}\text{C}$ visu nakti un DNS izdalīšanu turpina nākamajā dienā.

DNS izdalīšana

14. Šūnu maisījumam pievieno 5ml Fenola, maisa grozītājā ne mazāk par 15min, centrifugē $+20^{\circ}\text{C}$, 4000apg./10min.
15. Virsējo fāzi pārnes jaunā 15ml flakonā, neaiztiekot fenolu un šūnu atlikumus.

16. Pievieno 5ml hloroforma, maisa grozītājā 5 min, centrifugē +20°C, 4000apg./10min.
17. Virsējo fāzi uzmanīgi pārnes jaunā 15ml flakonā, cenšoties nepaņemt hloroformu un šūnu atlikumus.
18. Lēnām, gar flakona malu, pievieno 5ml izopropilspirta, samaisa apgriežot flakonu vairākas reizes (nedrīkst kratīt), kamēr izveidojas DNS nogulsnes.
19. Centrifugē +20°C, 4000apg./10min.
20. Tūlīt pēc centrifūgas apstāšanās visu šķīdumu uzmanīgi nolej un tajā pašā flakonā pievieno 5ml 70% etanola, samaisa ieliekot grozītājā uz 1min un inkubē 2min.
21. Centrifugē +20°C, 4000apg./10min.
22. Tūlīt pēc centrifūgas apstāšanās rūpīgi nolej spirtu tā, lai nogulsnes paliek pie flakona sieniņas. Turot apgāztus flakonus uz filtrpapīra, nogulsnes žāvē 10min istabas temperatūrā.

DNS šķīdināšana

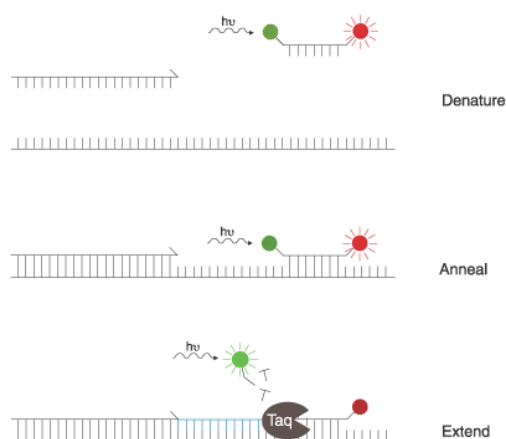
23. Pievieno 1ml DNA Hydration Solution (TE buferis), lēni maisot grozītājā atstāj pa nakti istabas temperatūrā. Nākamajā rītā ieliek ledusskapī +4±2°C un turpina šķīdināt vismaz 7 dienas.
24. 15ml flakonus ar DNS uzvorteksē 10sek un nocentrifugē īsu mirkli (līdz 1min), lai to novirzītu no flakona sieniņām uz lejas daļu.
25. DNS koncentrāciju mēra uz maza tilpuma spektrofotometra.

Sagatavo “mātes” plates PCR reakciju un sekvenēšanu veikšanai, kurā DNS koncentrācija ir 7ng/μl. Plates (*Applied Biosystems*®, ASV) veido, izmantojot automatizētu pipetēšanas iekārtu Tecan Freedom Evo. Plates ievieto –20°C saldētavā. PCR un reālā laika PCR reakciju veikšanai plates sagatavo sekojoši: katrā bedrītē iepilina 4μl DNS no atbilstošajām mātes plates bedrītēm un plates žāvē istabas temperatūrā vismaz 8h.

4.8. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (Real-Time PCR)

Real – time PCR jeb kvantitatīvā PCR ir metode, kuras laikā notiek vēlamu kopiju skaita noteikšana pēc katra amplifikācijas cikla reālā laikā. Izmantota metode ar specifiskām DNS Taqman zondēm, kuras sastāv no oligonukleotīdiem, un divu tipu fluoroforiem, kuri tiek iezīmēti ar dažādām fluorescentajām krāsvielām. Kamēr zonde ir vai nav piesaistījusies DNS komplementārajai sekvenai (atkarībā no SNP alēlēs viena zonde pie DNS saistās labāk nekā otra) un pirms polimerāze sāk darboties, dzēsēja Q (quencher) fluorofors (parasti ar garāku viļņa garuma krāsvielu, piemēram, sarkanu) reducē reportera R (reporter) fluorofora (parasti ar īsāku viļņa garuma krāsvielu, piemēram, zaļu) izraisīto fluorescenci. Šis process norisinās ar *Förster* (fluorescences) rezonanses enerģijas pārnesei (FRET) starpniecību.

Polimerāze sāk sintēzi no praimera 3' gala. Kad nonāk pie zondes tā tiek noārdīta, reportieris un dzēsējs tiek atbrīvoti, tie reakcijas maisījumā attālinās viens no otra un FRET efekts pazūd. Parādās fluorescence, kuras intensitāte ir tieši proporcionāla sašķelto zonu daudzumam, kas reakcijā norāda interesējošā fragmenta skaitu (skat. 13. attēlu).



13. attēls. Trīs soļu TaqMan® zondes darbības aina. Pirms zonde saskaras ar Taq polimerāzi, īso viļņu fluorofors (zaļš) nodod enerģiju garo viļņu fluoroforam (sarkans). Polimerāzei pievienojot nukleotīdus, tā atbrīvo īso viļņu fluoroforu, padarot to detektējamu, bet garo viļņu fluoroforu nedetektējamu

(*Real time PCR: the TaqMan Method.*

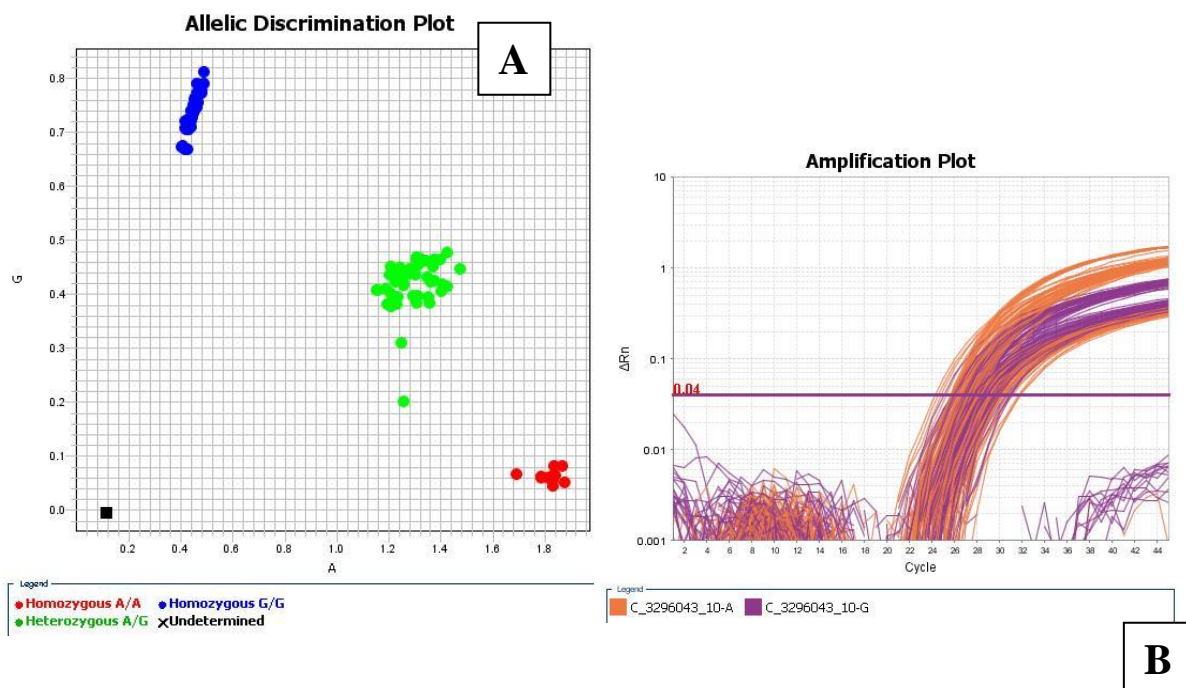
(<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/pierce/realtimemcr.htm> skat. 13.03.2014)).

Protokols

1. Sagatavo plates vai stobriņus, kuros jau iepriekš alikvotēta un izžāvēta DNS (28 ng).
2. Sagatavo genotipēšanas reakcijas maisījumu, to uznes uz 96 reakciju PCR plates PCR boksā ar Corbet Robotics CAS-1200.
3. Genotipēšanas reakciju veic ar Applied Biosystems ViiA 7 Real Time PCR System (Life Technologies). Izmanto ViiA lietošanas instrukciju.
4. Rezultātus analizē ar ViiA 7 Software atbilstoši ražotāja instrukcijām.

8.tabula. Reakcijas maisījums vienai reakcijai.

dH ₂ O	5µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	4,75µl
TaqMan zonde	0,25µl
Master Mix = 1reakcija*100+10%	



14.attēls. Paraugu genotipēšanas ar reālā laika PCR rezultāti vienai platei. A. Alēļu izšķiršanas grafiks, B. Amplifikācijas grafiks.

4.9. Datu statistiskā apstrāde

4.9.1. Inducēto krēpu iegūtā materiāla apstrāde

4.9.1.1. *Pielietotie analīžu modeļi*

Datu statistiskai analīzei tika izmantotas datorprogrammas “Statistica 7” apakšnodaļas: “Vispārējais lineārais modelis” (General Linear Models – GLM) un “Vispārējais linearizējamais modelis” (General Linearized Models – GLZ).

Ja neatkarīgie faktori bija diskrēti (Categorical Predictor): piemēram ir vai nav kāda gēna alēle, vai tā ir homozigota vai heterozigota, bet atkarīgais faktors bija nepārtraukts kvantitatīvs (Continuous Predictor) faktors: “smēķēšana pakgados”, ”šūnu skaits” u.c. izmantojām vienfaktora vai daudzfaktoru dispersijas analīzi (ANOVA Analysis of Variance). Ja faktoru vai to mijiedarbību ietekme izrādījās būtiska, tad ar Fišera LSD testu pārbaudījām starp kurām kategorisko faktoru apakšklasēm ir ticamas atšķirības un aprēķinājām vidējos aritmētiskos un vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervālus. Atšķirību starp grupām uzskatījām par būtisku, ja $p < 0,05$ – savukārt, ja $0,05 \leq p < 0,1$ tad uzskatījām, ka ir atšķirības tendence. Nebūtiskie faktori vai to mijiedarbības tika izslēgti no modeļa un izveidots jauns modelis.

Ja neatkarīgais faktors bija nepārtraukts kvantitatīvs (Continuous Predictor) faktors un atkarīgais faktors nepārtraukts kvantitatīvs (Continuous Predictor) faktors izmantojām vienfaktora regresijas analīzi. Ieguvām regresijas vienādojumu, determinācijas koeficientu r^2 un regresijas būtiskumu – p vērtību. Regresiju uzskatījām par būtisku, ja $p < 0,05$ – savukārt, ja $0,05 \leq p < 0,1$ tad uzskatīja, ka neatkarīgajam faktoram ir ietekmes tendence uz atkarīgo faktoru. Regresiju attēlojām grafiski kā līkni un tās 95% reprezentācijas zonu.

Pēc analīzes veikšanas veicām atkarīgā faktora atlikuma (residual) pārbaudi atbilstībai normālajam sadalījumam. Ja tas neatbilda normālajam sadalījumam, bet atbilda lognormālajam sadalījumam veicām izejas datu logaritmisko transformāciju un atkārtojām analīzi. Lai rezultātus (vidējo aritmētisko, vidējā aritmētiskā 95% reprezentācijas intervāls vai regresijas gadījumā – regresijas vienādojums) kā arī to

grafikus varētu attēlot izejas datu mērvienībās nevis to logaritmiskajās vienībās, veicām šo rezultātu pretēju transformāciju.

Ja abi faktori (gan atkarīgais, gan neatkarīgais) bija diskrēti, piemēram dzimums un smēķēšana, tad izmantojām loģiskās regresijas analīzi ar logit funkciju un binomiālo sadalījumu. Noteicām grupu proporciju atšķirību būtiskumu, vidējo proporciju un vidējās proporcijas 95% reprezentācijas intervālu.

4.9.1.2. Datu transformācija

Lai veiktu visas iepriekšminētās statistiskās analīzes, kas pieder pie parametrisko statistikas metožu grupas ir prasības, lai atkarīgā faktora dati dispersijas analīzes gadījumā, kā arī regresijas analīzes gadījumā (Y) atbilstu normālajam sadalījumam, būtu ar līdzīgu dispersiju (homoscedastic) un neatkarīgo faktoru (X) ietekme uz atkarīgo (Y) būtu pieskaitoša (additive) (Liepa, 1974; Zar, 1999). Regresijas gadījumā arī neatkarīgā faktora datiem (X) vēlams atbilst šiem nosacījumiem. Ja kāds vai visi šie nosacījumi neizpildās ir nepieciešama datu transformācija. Pārsvārā gadījumu izpildot vienu no šiem nosacījumiem izpildās arī pārējie nosacījumi un arī līkne kļūst lineāra – iztaisnojas (Zar, 1999). Turpretī, ja atkarīgā faktora (Y) dati jau atbilst iepriekš minētajiem nosacījumiem un nav jātransformē, vai arī pēc transformācijas un iepriekšminēto prasību izpildes dati labāk atbilst nelineārai sakarībai (līkne), tad var veikt arī neatkarīgo faktoru datu transformāciju, kas linearizē vienādojumu, bet neizmaina normalitāti un abus pārējos nosacījumus (Zar, 1999).

Lai pārbaudītu atkarīgā faktora (Y) datu normalitāti, homoscedastitāti un aditivitāti tika novērtēta Y atlikuma (atlikums – residuals, $atlikums = Y_i - \hat{Y}_i$ kur \hat{Y}_i - aprēķinātais pēc modeļa vienādojuma, Y_i – reālais izmērītais) dati un to histogramma, un Y atlikuma atkarība no X.

Atkarīgā faktora (Y) atlikuma datu atbilstība normālajam sadalījumam tika novērtēta izmantojot χ^2 , kā arī Kolmogorova – Smirnova testu. Bez tam Y atlikuma datu normalitāte tika novērtēta arī vizuāli pēc histogrammas.

Atkarīgā faktora (Y) atlikuma datu dispersiju līdzīgumu (homoscedasticity) novērtēja vizuāli pēc grafika, kur atkarīgā faktora (Y) atlikums mainās atkarībā no neatkarīgā faktora (X). Heteroscedastitātes gadījumā palielinoties X vērtībai palielinās arī Y izkliede pēc Draper and Smith 19813 (Zar, 1999).

Datu normalizācijai var izmantot logaritmisko, kvadrātsaknes u.c. transformācijas. Stipru sadalījuma asimetriju gadījumā lieto logaritmisko transformāciju, mazāku asimetriju gadījumā kvadrātsaknes u.c. transformācijas. Mūsu gadījumā pietika tikai ar logaritmisko transformāciju.

Logaritmiskā transformācija

Logaritmiskās transformācijas vienādojumu – skatīt 1. formulu. Atkarīgā faktora (Y) logaritmiskā transformācija tika pielietota atlikuma datu dispersiju atšķirīgumu gadījumā (heteroscedasticity), ja šī faktora atlikuma datu standartnovirze palielinājās proporcionāli neatkarīgā faktora (X) vērtībām (Zar, 1999), vai dispersijas analīzes gadījumā – katras klases vidējā aritmētiskā standartnovirze proporcionāla šīs klases vidējam aritmētiskajam (variācijas koeficienti - s% klasēm ir līdzīgi) (Zar, 1999). Ja neatkarīgā faktora ietekme uz atkarīgo faktoru ir multiplikatīva nevis aditīva (Zar, 1999). Ja Atkarīgā faktora (Y) atlikuma dati neatbilda normālajam sadalījumam, bet bija stipri pozitīvi asimetriski (positively skewed distribution) (Zar, 1999; Liepa, 1974).

$$(1. formula) Y' = \log_{10} Y$$

Ja Y vērtības ir mazi skaitļi un īpaši ja dažas vērtības ir vienādas ar nulli, tad tika lietota Bartlett 1947. gadā ieteiktā sakarību (skat. 2. formula) (Zar, 1999; Liepa, 1974).

$$(2. formula) Y' = \log_{10}(Y + 1)$$

Pēc statistiskās analīzes veikšanas regresijas vienādojumiem, to 95% reprezentācijas zonām un dispersijas analīžu klašu vidējiem aritmētiskajiem un to 95% reprezentācijas intervāliem veica pretēju transformāciju (skat. 3.un 4. formulu attiecīgi) (Zar, 1999; Liepa, 1974).

$$(3. formula) Y = 10^{Y'}$$

$$(4. formula) Y = 10^{Y'} - 1$$

Rezultātā, ja logaritmiski transformēts ticis tikai atkarīgais faktors (Y) par Y' tad regresijas analīzes rezultātā iegūtos taisnes vienādojumus (skat. 7. formula) attransformējot atpakaļ iegūst **eksponentregresijas vienādojumus** (skat. 5. formula) (Liepa, 1974).

$$(5. formula) \text{ eksponentregresija } Y = b_0 b_1^X$$

Šo vienādojumu logaritmējot (6. Formula) iegūst lineāru sakarību (skat. 7. Formula)

$$(6. formula) \log_{10} Y = \log_{10} b_0 + X \log_{10} b_1$$

Ja apzīmē $Y' = \log_{10} Y$, $b'_0 = \log_{10} b_0$, $b'_1 = \log_{10} b_1$ tad iegūst taisnes vienādojumu (skat. 7. formula)

$$(7. formula) Y' = b'_0 + b'_1 X,$$

kura koeficientus iegūst iepriekš minēto analīžu rezultātā. Veicot atgriezenisku transformāciju b'_0 koeficientam $b_0 = 10^{b'_0}$ un b'_1 koeficientam $b_1 = 10^{b'_1}$ un ievietojot abus šos koeficientus 5. formulā iegūst eksponentregresijas vienādojumu (Liepa, 1974).

Ja logaritmiski transformēti tika gan atkarīgais faktors (Y) gan neatkarīgais faktors (X) par attiecīgi (Y') un (X') tad regresijas analīzes rezultātā iegūtos taisnes vienādojumus attransformējot atpakaļ iegūst **pakāpes regresijas vienādojumus** (skat. 8. formula) (Liepa, 1974)

$$(8. formula) \text{ pakāpes regresijas vienādojums } Y = b_0 X^{b_1}$$

Šo vienādojumu logaritmējot iegūst lineāru sakarību (skat. 9. formula).

$$(9. formula) \log_{10} Y = \log_{10} b_0 + b_1 \log_{10} X$$

Ja apzīmē $Y' = \log_{10} Y$, $b'_0 = \log_{10} b_0$, $X' = \log_{10} X$ tad iegūst taisnes vienādojumu (skat. 10. formula).

$$(10. formula) Y' = b'_0 + b_1 X'$$

kura koeficientus iegūst iepriekš minēto analīžu rezultātā. Veicot atgriezenisku transformāciju b'_0 koeficientam $b_0 = 10^{b'_0}$ un ievietojot b_0 un b_1 koeficientus 8. Formulā iegūst pakāpes regresijas vienādojumu (Liepa, 1974).

Ja logaritmiski transformēts ticis tikai neatkarīgais faktors (X) par X' tad regresijas analīzes rezultātā iegūtos taisnes vienādojumus (skat. 12. formula) attransformējot atpakaļ iegūst **logaritmiskās regresijas vienādojumus** (skat. 11. formula) (Liepa, 1974)

$$(11. formula) Y = b_0 + b_1 \log_{10} X$$

Ja apzīmē $X' = \log_{10} X$ tad iegūst taisnes vienādojumu (skat. 14. formula).

$$(12. formula) Y = b_0 + b_1 X'$$

kura koeficientus iegūst iepriekš minēto analīžu rezultātā un ievietojot b_0 un b_1 koeficientus 11. formulā iegūst logaritmiskās regresijas vienādojumu.

4.9.2. Ģenētiskā materiāla apstrāde

Visiem iegūtajiem gēnu polimorfismiem asociācijas analīze tika veikta programmā PLINK. Tā ir bezmaksas, brīvpieejas asociācijas analīžu programma, kura paredzēta pamata vai liela mēroga analīžu veikšanai datorizētā veidā. Asociācijas tika pārbaudītas ar Hī-kvadrāta (χ^2) testu. χ^2 tests ir biežāk izmantotais no neparametriskās statistikas rādītājiem. Ar tā palīdzību ir iespējams noteikt, vai rezultāti kādā mērījumā ir atbilstoši kādam teorētiskam sadalījumam vai tomēr nav.

5. REZULTĀTI

5.1. Pētījumā iesaistīto dalībnieku raksturojums

Pētījumā iesaistīto pacientu klīniskie un plaušu funkcionālie rādītāji ir atspoguļoti 9. tabulā. Starp abām pacientu grupām netika konstatētas būtiskas atšķirības antropometriskajos rādītājos, t.i., vecumā, svarā un augumā, kā arī plaušu funkcionālajos rādītājos (skat. 9. tabulu).

Smēķētāju grupā bija lielāks vīriešu skaits ($n = 32$), salīdzinot ar nesmēķētājiem ($n = 15$). Pētījuma laikā radās grūtības piesaistīt tieši nesmēķējošus jaunus vīriešus (skat. 9. tabulu).

Ģenētiskās analīzes veikšanai pētījumā iesaistījām 58 pacientus ar HOPS (skat. 9. tabulu).

9. tabula. Pētījumā iesaistīto dalībnieku raksturojums.

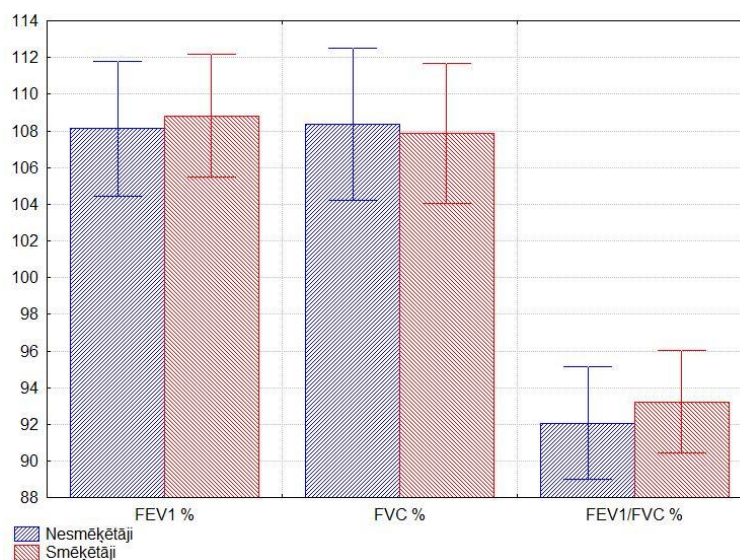
	Nesmēķētāji (n=49)	Smēķētāji (n=59)	HOPS pacienti (n=58)
Dzimums (V/S)	15/34	32*/27	46/12
Vecums	21,92 ± 0,49	21,83 ± 0,45	67,47 ± 3,00
Svars (kg)	66,73 ± 4,32	70,88 ± 3,93	80,43 ± 6,87
Augums (cm)	173,82 ± 2,92	176,46 ± 2,66	168,32 ± 4,13
Smēķēšana (pakgadi) vidējais	–	1,97 (1,55 – 2,47)	42,36 (37,68 – 47,04)
min – max		0,15 – 9,0	8,5 – 68
FEV₁ (%)	108,12 ± 3,67	108,81 ± 3,34	40,96 ± 4,34
FVC (%)	108,37 ± 4,17	107,87 ± 3,79	54,38 ± 4,47
FEV₁/FVC (%)	92,06 ± 3,07	93,23 ± 2,80	59,32 ± 4,76

Dati norādīti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls vai vidējais (95% ticamības intervāls). * $p < 0,05$. FEV₁ – forsētais izelpas tilpums 1. sekundē pēc pilnas ieelpas. FVC – forsētā vitālā kapacitāte.

5.2. Plaušu ventilācijas funkcijas raksturojums pētījuma dalībniekiem

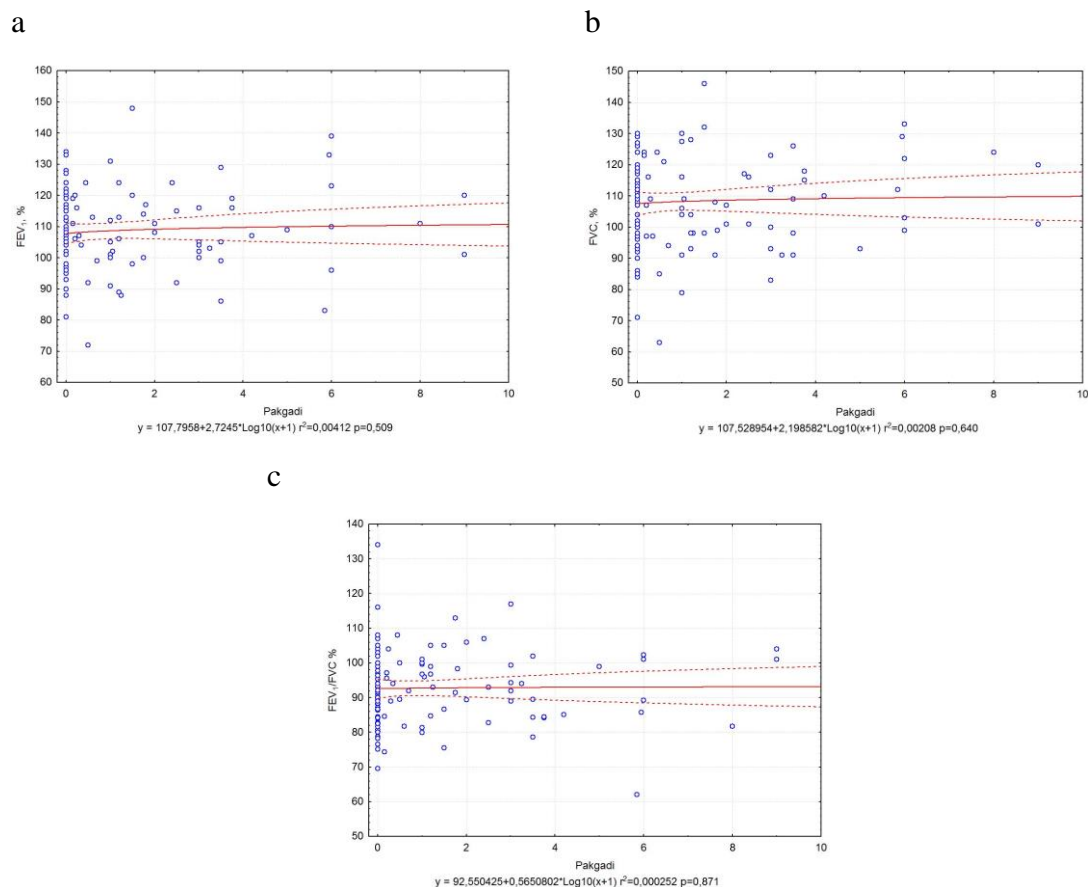
Būtiska nozīme HOPS diagnozes uzstādīšanai smēķētājiem ir tieši plaušu ventilācijas funkcijas mērījumu rādītājiem. Veicot spirogrāfiju ir iespējams novērtēt elpceļu sašaurināšanos, pat ja pacients vēl nejūt nekādas pārmaiņas un nav HOPS raksturīgie simptomi. Galvenokārt, šādi pacienti ir vecāki par 40 gadiem un smēķē jau vairāk kā 20 gadus. Retos izņēmumos HOPS iespējams diagnosticēt 20 – 25 gadu vecumā. Šādos gadījumos visticamāk būs iedzimts $\alpha - 1$ antitripsīna deficīts organismā, kā rezultātā ir attīstījies HOPS. Mūsu pētījumā netika konstatēti šādi gadījumi.

Plaušu ventilācijas funkcijas mērījuma rādītāji jauniem nealerģiskiem nesmēķētājiem un asimptomātiskiem smēķētājiem, kā jau pieļāvām, būtiski neatšķiras. Mūsu pētījumā jauno nesmēķētāju FEV_1 ($108,12 \pm 3,67$), FVC ($108,37 \pm 4,17$), FEV_1/FVC ($92,06 \pm 3,07$) funkcionālie rādītāji (%) un jauno smēķētāju FEV_1 ($108,81 \pm 3,34$), FVC ($107,87 \pm 3,79$), FEV_1/FVC ($93,23 \pm 2,80$) funkcionālie rādītāji (%) neatšķiras (skat. 15. attēlu).



15. attēls. Plaušu ventilācijas funkciju rādītāju salīdzinājums jauniem smēķētājiem un nesmēķētājiem. FEV_1 – forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē %, FVC – forsētā vitālā kapacitāte % un FEV_1/FVC % asimptomātiskiem smēķētājiem un nesmēķētājiem. Dati attēloti kā vidējais $\pm 95\%$ ticamības intervāls.

Izvērtējot smēķēšanas ietekmi uz katru no pētītajiem elpošanas funkciju rādītājiem atkarībā no smēķēšanas stāža (pakgados) arī nekonstatējām būtiskas pārmaiņas (skat. 16. attēlu).

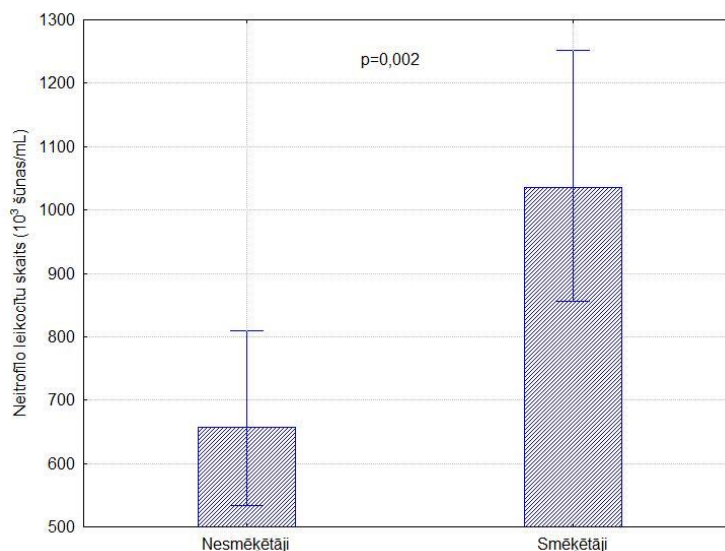


16. attēls. Smēķēšanas ietekme uz **(a)** forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē (FEV₁, %) , **(b)** forsēto vitālo kapacitāti (FVC, %) un **(c)** forsētās izelpas tilpuma pirmajā sekundē/ forsētās vitālās kapacitātes (FEV₁/FVC, %) atkarībā no smēķēšanas stāža (pakgados) jauniem nesmēķētājiem un smēķētājiem.

5.3. Imūno šūnu spektra raksturojums inducētajās krēpās

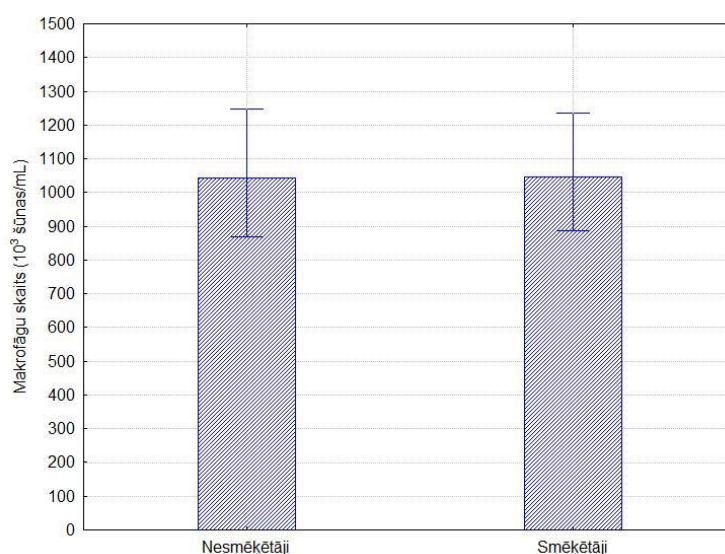
5.3.1. Smēķēšanas izraisītās šūnu skaita pārmaiņas inducētajās krēpās

Smēķētājiem inducētajās krēpās ir statistiski ticami ($p=0,002$) palielināts neitrofilo leikocītu absolūtais skaits [1035,17 (856,05 – 1251,78), šūnas $10^3/\text{mL}$] salīdzinājumā ar nesmēķētājiem [657,09 (533,44 – 809,41) šūnas $10^3/\text{mL}$] (skat. 17. attēlu).



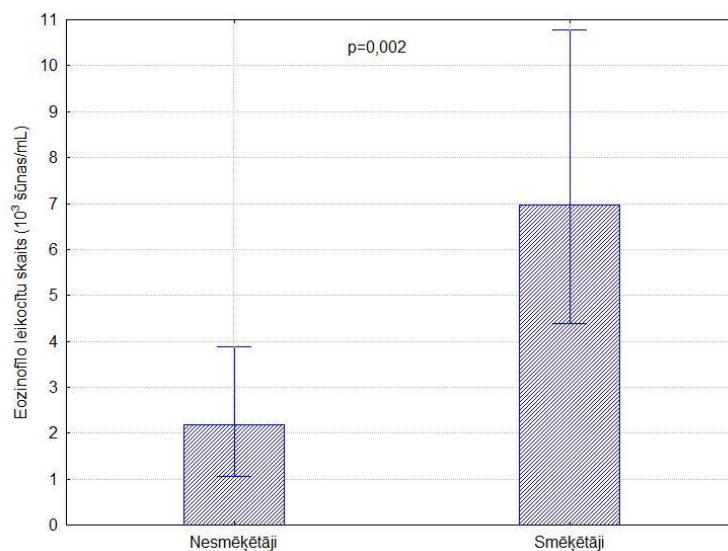
17. attēls. Smēķēšanas ietekme uz neitrofilo leikocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais \pm 95% ticamības intervāls.

Jauniem asimptomātiskiem smēķētājiem inducētajās krēpās makrofāgu absolūtais skaits nebija būtiski atšķirīgs no nesmēķētājiem (skat. 18. attēlu).



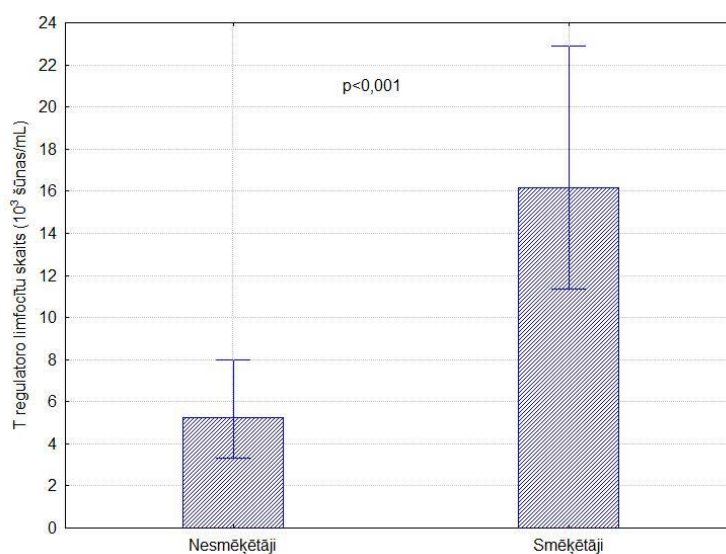
18. attēls. Smēķēšanas ietekme uz makrofāgu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais \pm 95% ticamības intervāls.

Smēķētājiem inducētajās krēpās ir statistiski ticami ($p=0,002$) palielināts eozinofilo leukocītu absolūtais skaits [6,96 (4,38 – 10,78), šūnas $10^3/\text{mL}$] salīdzinājumā ar nesmēķētājiem [2,18 (1,07 – 3,89) šūnas $10^3/\text{mL}$] (skat. 19. attēlu).



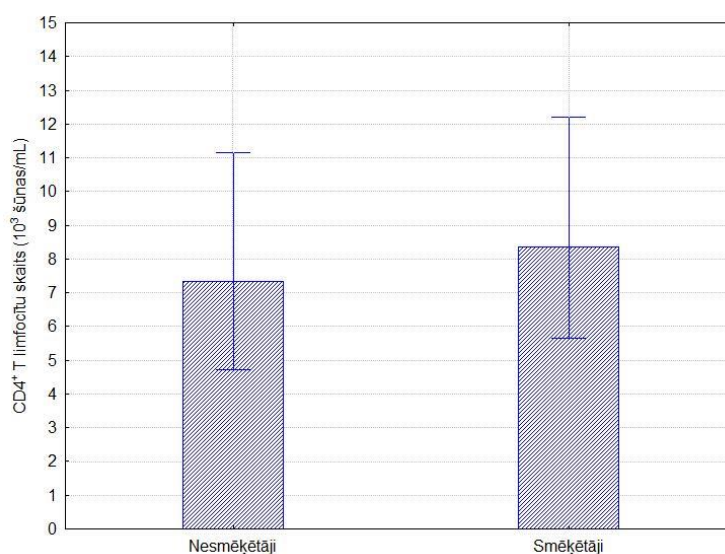
19. attēls. Smēķēšanas ietekme uz eozinofilo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais \pm 95% ticamības intervāls.

Smēķētājiem inducētajās krēpās ir statistiski ticami ($p<0,001$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits [16,16 (11,33 – 22,88), šūnas $10^3/\text{mL}$] salīdzinājumā ar nesmēķētājiem [5,24 (3,34 – 7,96) šūnas $10^3/\text{mL}$] (skat. 20. attēlu).



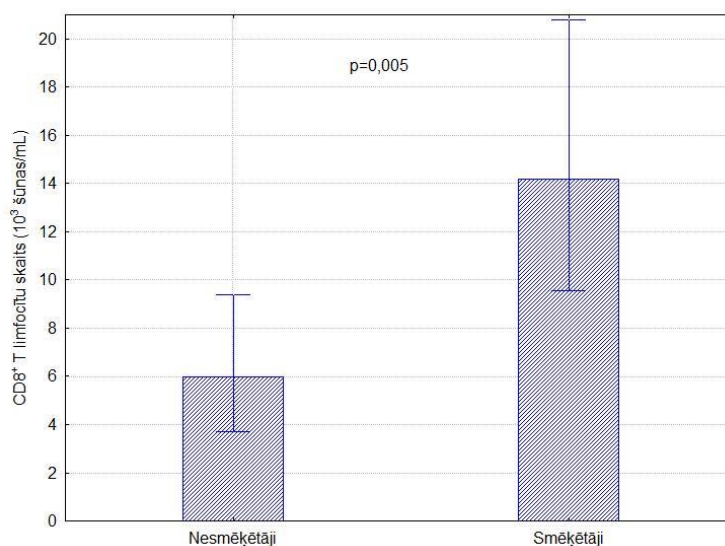
20. attēls. Smēķēšanas ietekme uz T regulatoro limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais \pm 95% ticamības intervāls.

Jauniem asimptomātiskiem smēķētājiem inducētajās krēpās CD4⁺ T limfocītu absolūtais skaits neatšķiras no nesmēķētājiem (skat. 21. attēlu).



21. attēls. Smēķēšanas ietekme uz CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

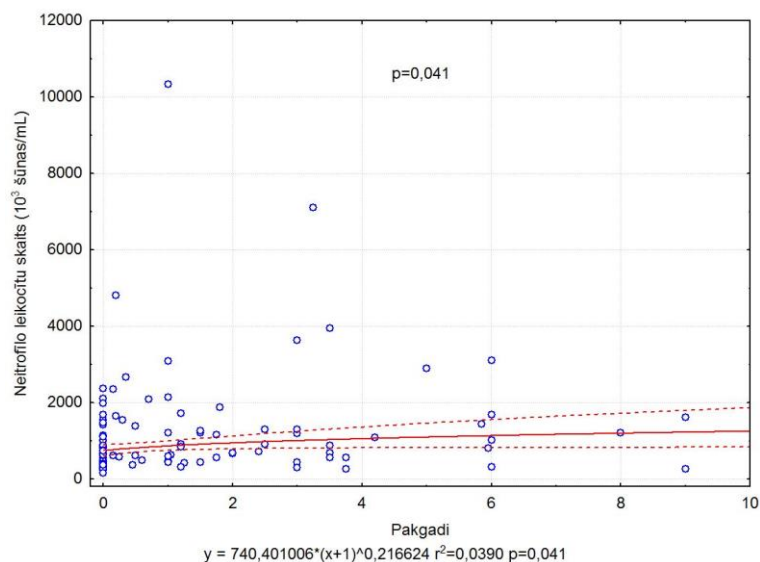
Smēķētājiem inducētajās krēpās ir statistiski ticami ($p=0,005$) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits [14,17 (9,55 – 20,80), šūnas 10³/mL] salīdzinājumā ar nesmēķētājiem [5,98 (3,69 – 9,40) šūnas 10³/mL] (skat. 22. attēlu).



22. attēls. Smēķēšanas ietekme uz CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās. Dati norādīti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

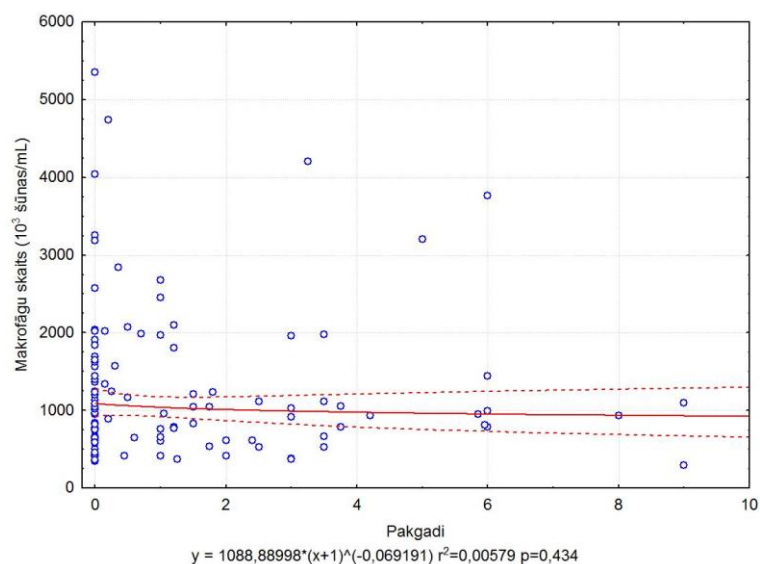
5.3.2. Smēķēšanas stāža ietekme uz imūnās sistēmas šūnām inducētajās krēpās

Pieaugot smēķēšanas stāžam būtiski ($p=0,041$, $r^2=0,039$) pieaug neitrofilo leukocītu absolūtais skaits inducētajās krēpās (skat. 23. attēlu).



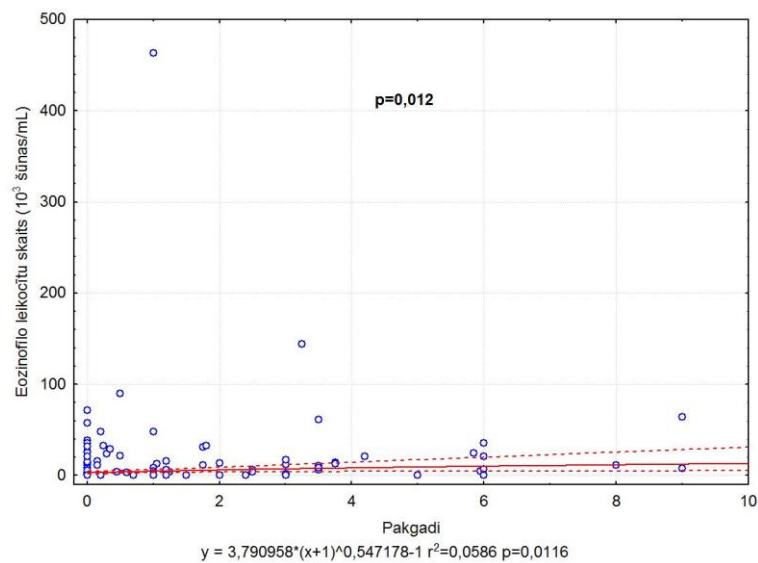
23. attēls. Izsmēķēto pakgadu ietekme uz neitrofilo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Nekonstatējām būtiskas izmaiņas makrofāgu absolūtajā skaitā inducētajās krēpās pieaugot smēķēšanas stāžam (skat. 24. attēlu).



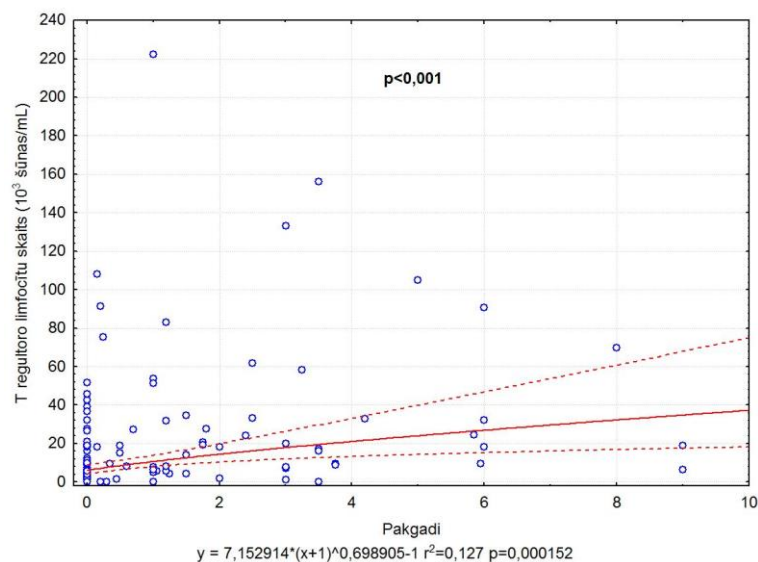
24. attēls. Izsmēķēto pakgadu ietekme uz makrofāgu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Pieaugot smēķēšanas stāžam būtiski ($p=0,012$, $r^2=0,059$) pieaug eozinofilo leukocītu absolūtais skaits inducētajās krēpās (skat. 25. attēlu).



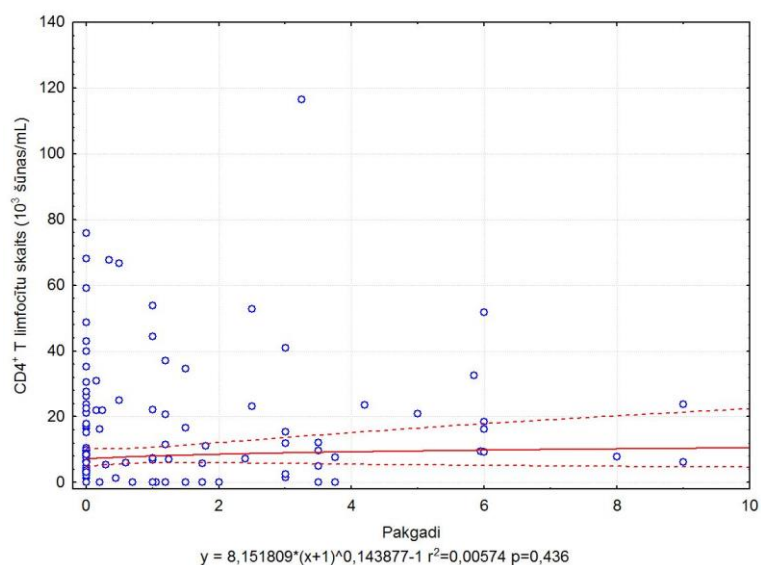
25. attēls. Izmēķēto pakgadu ietekme uz eozinofilo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Pieaugot smēķēšanas stāžam būtiski ($p<0,001$, $r^2=0,127$) pieaug T regulatoro limfocītu absolūtais skaits inducētajās krēpās (skat. 26. attēlu).



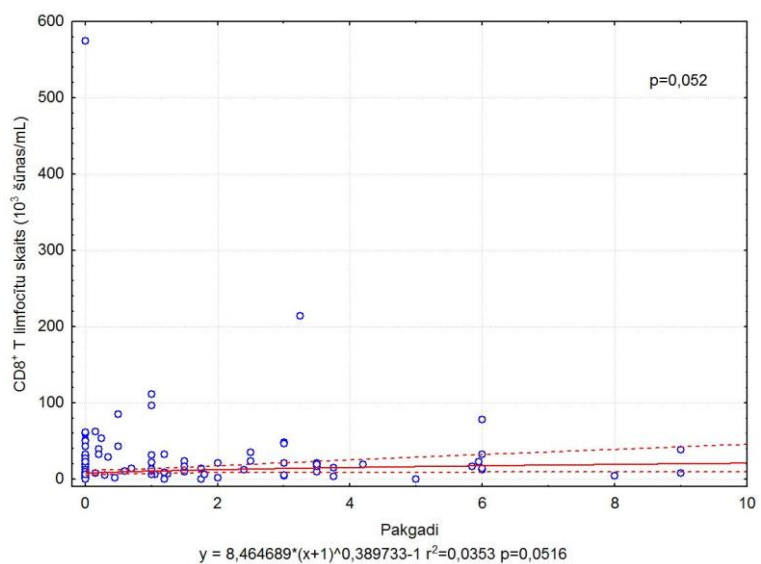
26. attēls. Izmēķēto pakgadu ietekme uz T regulatoro limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Nekonstatējām būtiskas izmaiņas CD4⁺ T limfocītu absolūtajā skaitā inducētajās krēpās pieaugot smēķēšanas stāžam (skat. 27. attēlu).



27. attēls. Izmēķēto pakgadu ietekme uz CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

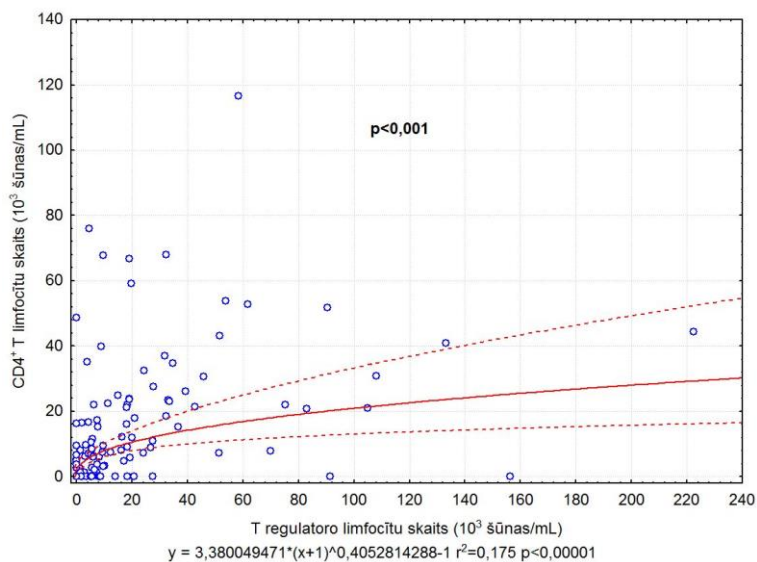
Novērojām tendenci, ka pieaugot smēķēšanas stāžam ($p=0,052$, $r^2=0,035$) pieaug CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits inducētajās krēpās (skat. 28. attēlu).



28. attēls. Izmēķēto pakgadu ietekme uz CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

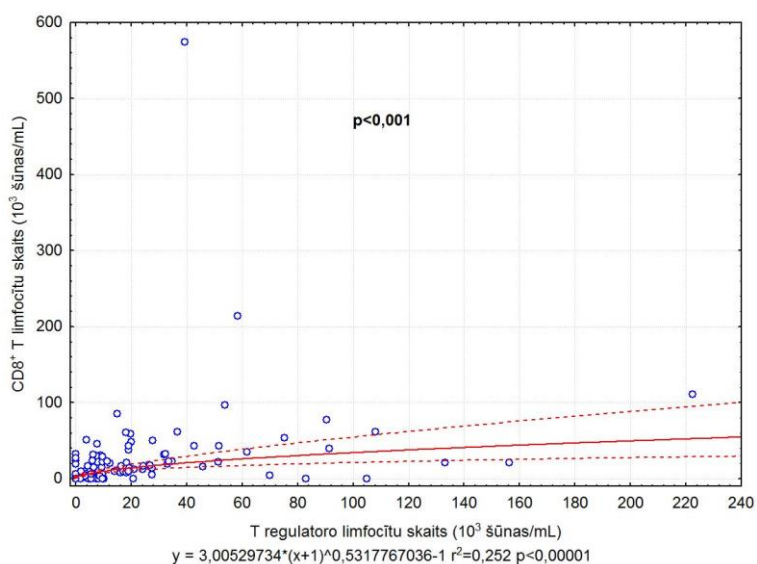
5.3.3. Dažādu limfocītu skaita savstarpējās funkcionālās sakarības inducētajās krēpās

Statistiski būtiski ($p < 0,001$, $r^2 = 0,175$) pieaug $CD4^+$ T limfocītu skaits, palielinoties T regulatoro limfocītu skaitam inducētajās krēpās (skat. 29. attēlu).



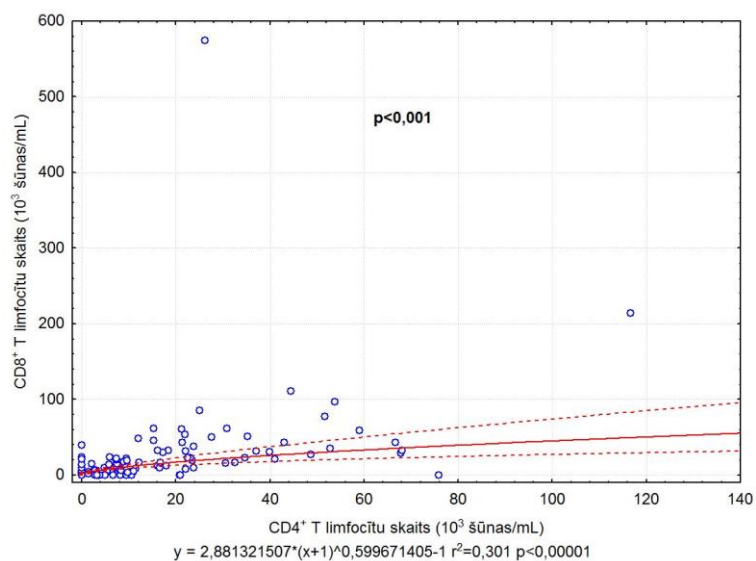
29. attēls. Funkcionālā sakarība starp T regulatoro limfocītu un $CD4^+$ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Statistiski būtiski ($p < 0,001$, $r^2 = 0,252$) pieaug $CD8^+$ T limfocītu skaits, palielinoties T regulatoro limfocītu skaitam inducētajās krēpās (skat. 30. attēlu).



30. attēls. Funkcionālā sakarība starp T regulatoro limfocītu un $CD8^+$ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

Statistiski būtiski ($p < 0,001$, $r^2 = 0,301$) pieaug $CD8^+$ T limfocītu skaits, palielinoties $CD4^+$ T limfocītu skaitam inducētajās krēpās (skat. 31. attēlu).



31. attēls. Funkcionālā sakarība starp $CD4^+$ T limfocītu un $CD8^+$ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās.

5.4. Gēnu polimorfismu raksturojums

Lai varētu novērtēt *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu saistību ar HOPS Latvijas populācijā, analizēšanai tika izvēlēti tādi viena nukleotīda polimorfismi, kuri iepriekš veiktos pētījumos citās populācijās ir uzrādījuši statistiski nozīmīgas asociācijas ar HOPS patoģenēzi – rs2494303 (*CHIT1*), rs2656069 (*IREB2*), rs8034191 (*AGPHD1*), rs1051730 (*CHRNA3/5*).

Izvēlētajiem gēnu polimorfismiem tika veikta analīze, izmantojot TaqMan SNP reaģentu komplektus un reālā laika PCR metodi. SNPus genotipēja ar reālā laika PCR sistēmu ViiA7. Tika iegūti dati par gēnu viena nukleotīda polimorfismu asociāciju starp HOPS pacientu un kontroles grupām (10., 11., 12. tabula). Kā arī alēļu sadalījumu starp HOPS pacientiem un kontroles grupu kopumā (13. tabula). Visiem iegūtajiem polimorfismiem tika veikta asociācijas analīze programmā PLINK.

Analizējot iegūtos genotipēšanas rezultātus, tika noteikts, ka to genotipu frekvences atbilst Hārdija – Veinberga vienādojumam.

10. tabula. Apvienotās kontroles grupas *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu viena nukleotīda polimorfismu – rs2494303, rs2656069, rs8034191, rs1051730 asociācijas dati ar HOPS.

Gēna nosaukums	Hromosoma	SNP	Retāk izplatītā alēle	Alēles frekvence HOPS pacientiem	Alēles frekvence kontroles grupai	Biežāk izplatītā alēle	P-vērtība	OR	L95	U95
CHIT1	1	rs2494303	A	0,17	0,14	C	0,48	1,25	0,67	2,32
IREB2	15	rs2656069	C	0,21	0,30	T	0,09	0,63	0,37	1,08
AGPHD1	15	rs8034191	C	0,41	0,32	T	0,09	1,50	0,94	2,39
CHRNA3/5	15	rs1051730	A	0,39	0,28	G	0,04	1,67	1,03	2,72

Salīdzinot šo četru gēnu SNP starp HOPS un kontroles grupu kopumā (smēķētājiem un nesmēķētājiem), *CHRNA3/5* gēnā esošais polimorfisms rs1051730 tika statistiski būtiski asociēts ar HOPS, $p=0,04$. Ņemot vērā to, ka $OR>1$, retāk izplatītā alēle A veicina HOPS attīstību. Šīs alēles frekvence ir lielāka HOPS pacientu grupā nekā kontroles. Pārējo gēnu – *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1* polimorfismi neuzrādīja būtisku asociāciju ar HOPS.

11. tabula. Nesmēķētāju kontroles grupas *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu viena nukleotīda polimorfismu – rs2494303, rs2656069, rs8034191, rs1051730 asociācijas dati ar HOPS.

Gēna nosaukums	Hromosoma	SNP	Retāk izplatītā alēle	Alēles frekvence HOPS pacientiem	Alēles frekvence kontroles grupai	Biežāk izplatītā alēle	P-vērtība	OR	L95	U95
CHIT1	1	rs2494303	A	0,17	0,15	C	0,60	1,22	0,58	2,57
IREB2	15	rs2656069	C	0,21	0,26	T	0,44	0,78	0,41	1,47
AGPHD1	15	rs8034191	C	0,41	0,37	T	0,47	1,23	0,71	2,15
CHRNA3/5	15	rs1051730	A	0,39	0,34	G	0,44	1,25	0,71	2,22

Salīdzinot HOPS pacientu paraugus tikai ar nesmēķētāju kontroles grupu, neviens no pētāmo gēnu polimorfismiem neuzrādīja statistiski būtisku asociāciju, jo visos gadījumos $p > 0,05$. No tā var secināt, ka šajā grupā netika konstatēta būtiska asociācija ar HOPS.

12. tabula. Smēķētāju kontroles grupas *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu viena nukleotīda polimorfismu – rs2494303, rs2656069, rs8034191, rs1051730 asociācijas dati ar HOPS.

Gēna nosaukums	Hromosoma	SNP	Retāk izplatītā alēle	Alēles frekvence HOPS pacientiem	Alēles frekvence kontroles grupai	Biežāk izplatītā alēle	P-vērtība	OR	L95	U95
CHIT1	1	rs2494303	A	0,17	0,14	C	0,50	1,28	0,62	2,61
IREB2	15	rs2656069	C	0,21	0,34	T	0,04	0,54	0,30	0,98
AGPHD1	15	rs8034191	C	0,41	0,29	T	0,04	1,76	1,03	3,07
CHRNA3/5	15	rs1051730	A	0,39	0,23	G	0,007	2,19	1,23	3,91

Aplūkojot šo polimorfismu asociāciju ar HOPS pacientu grupu, kā kontroles grupu izvēloties smēķētājus, konstatējām, ka 15. hromosomā esošo trīs gēnu *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* polimorfismi rs2656069, rs8034191, rs1051730 uzrāda būtisku asociāciju ar HOPS, jo visos trīs gadījumos $p < 0,05$.

Apskatot gēnu SNP alēļu sadalījumu starp HOPS un kontroles grupu netika konstatētas būtiskas atšķirības genotipu sadalījumā, izņemot rs1051730, kur izplatītākais genotips pacientu grupā ir heterozigoti A/G, bet kontroles grupā homozigoti G/G (skat. 13. tabulu).

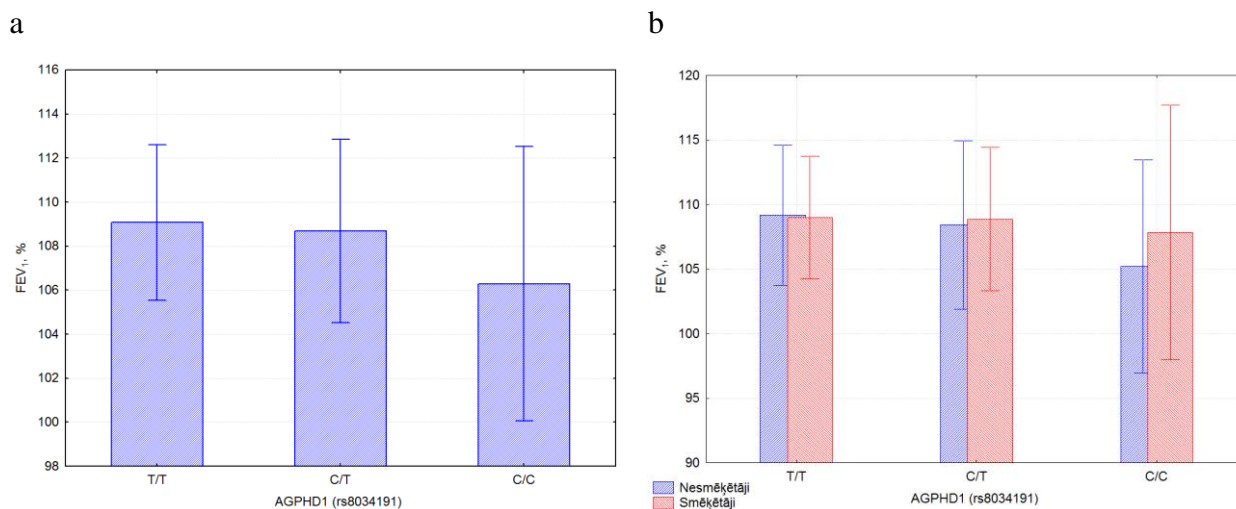
13. tabula. Dati par *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* gēnu viena nukleotīda polimorfismu – rs2494303, rs2656069, rs8034191, rs1051730 genotipu sadalījumu HOPS pacientiem un kontroles grupai.

Polimorfisms	Retāk izplatītā alēle	Biežāk izplatītā alēle	Paraugu skaits kopā		Homozigots pēc retākās alēles n (%)		Heterozigots n (%)		Homozigots pēc biežākās alēles n (%)	
			pacienti	kontrole	pacienti	kontrole	pacienti	kontrole	pacienti	kontrole
rs2494303	A	C	58	105	2(3)	4(4)	16(28)	22(21)	40(69)	79(75)
rs2656069	C	T	56	106	4(7)	9(9)	16(29)	46(43)	36(64)	51(48)
rs8034191	C	T	58	106	10(17)	15(14)	28(48)	38(36)	20(35)	53(50)
rs1051730	A	G	56	104	9(16)	9(9)	26(46)	40(38)	21(38)	55(53)

5.4.1. HOPS kandidātģēnu polimorfismu mijiedarbība ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem

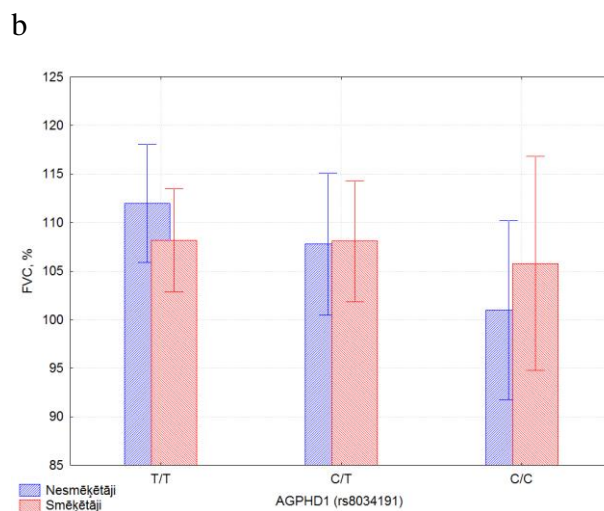
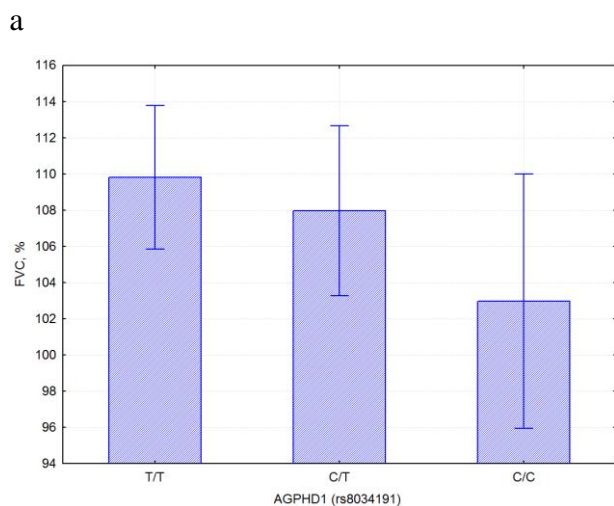
5.4.1.1. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem

Salīdzinot FEV₁, % starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 32. attēlu).



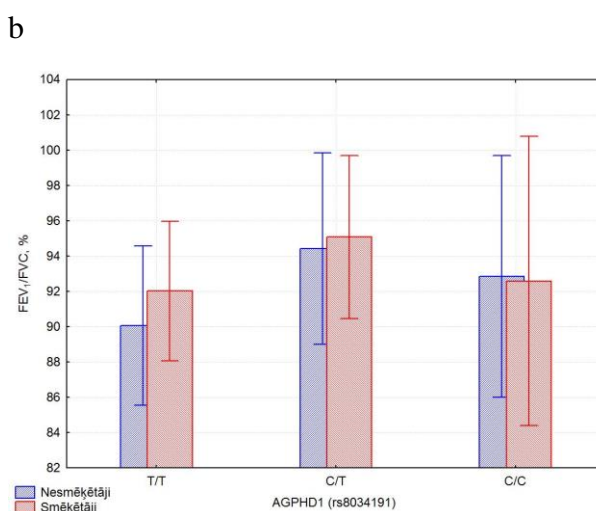
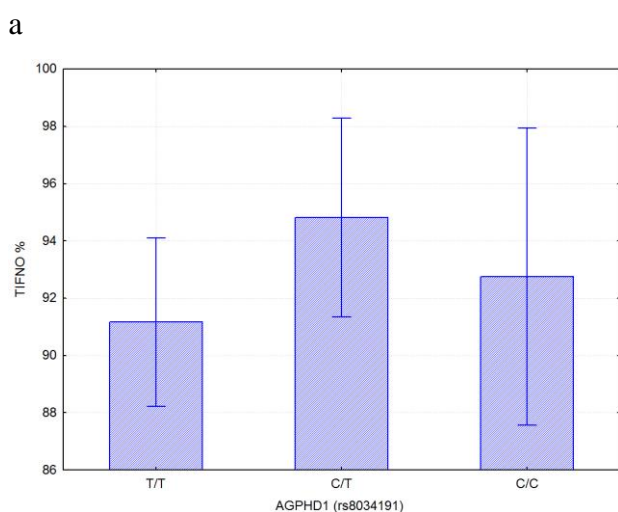
32. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē (FEV₁) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FVC, % starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 33. attēlu).



33. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar forsēto vitālo kapacitāti (FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

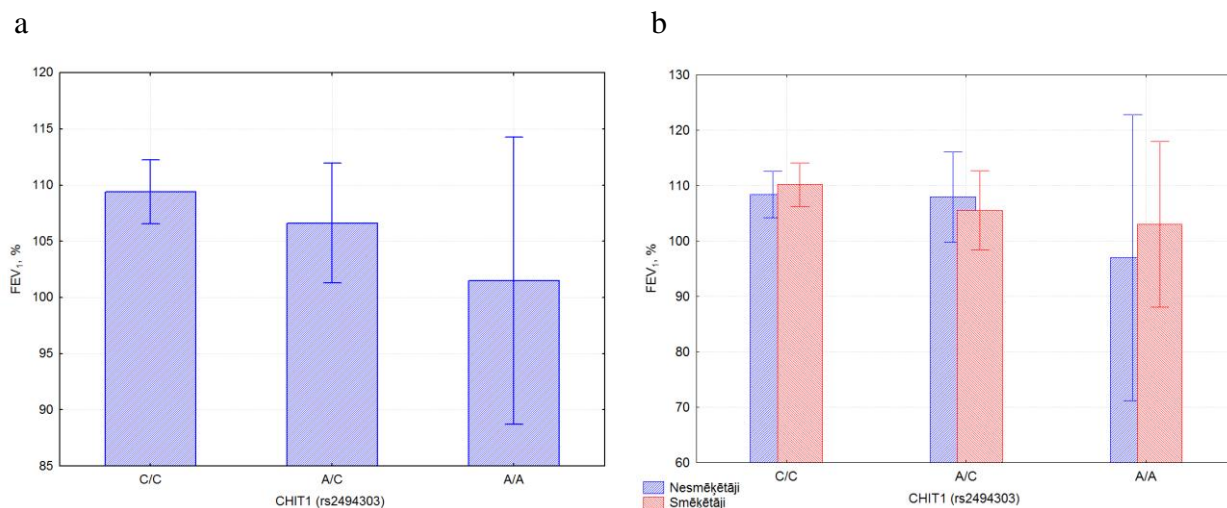
Salīdzinot FEV_1/FVC , % starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 34. attēlu).



34. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē/ forsēto vitālo kapacitāti (FEV_1/FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

5.4.1.2. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem

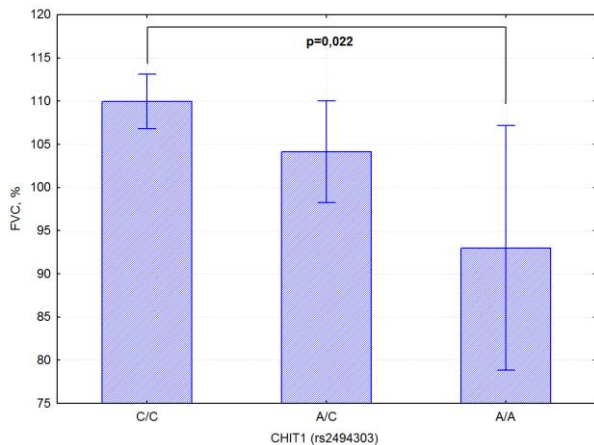
Salīdzinot FEV₁, % starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 35. attēlu).



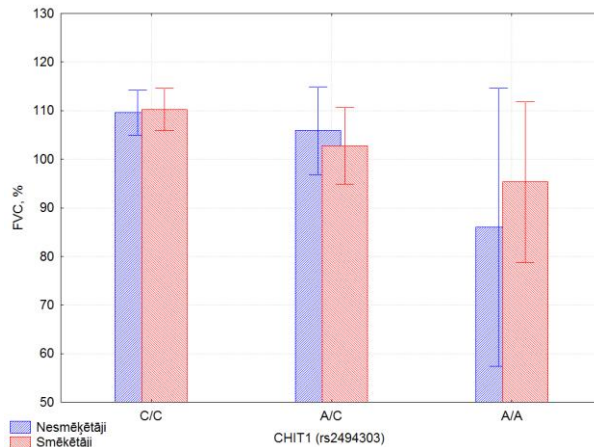
35. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē (FEV₁) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FVC, % starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem indivīdiem, kuri ir abu riska alēļu nēsātāji ir ticami zemāki ($p=0,022$) FVC, % rādītāji, salīdzinot ar indivīdiem bez riska alēlēm (a) (skat. 36. attēlu).

a



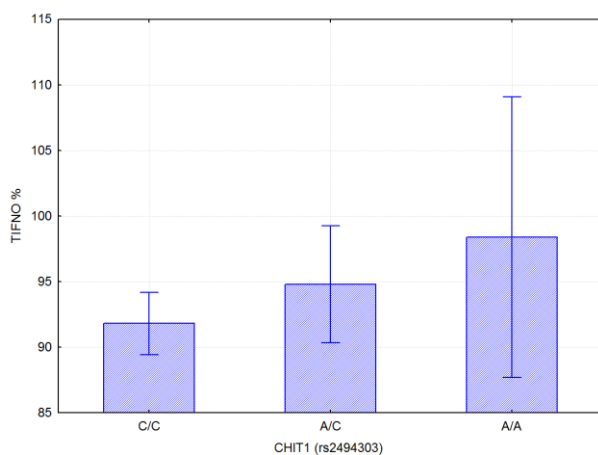
b



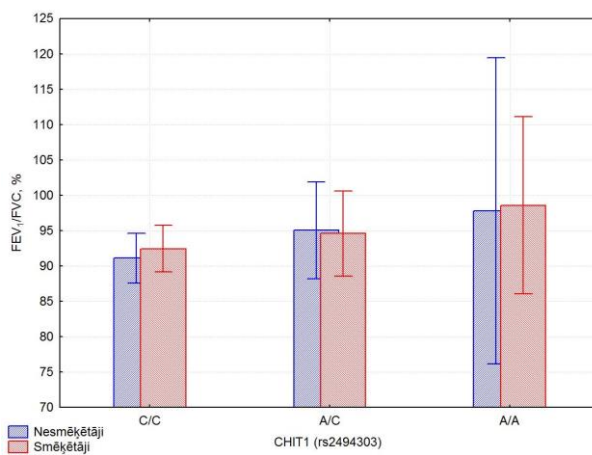
36. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar forsēto vitālo kapacitāti (FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FEV_1/FVC , % starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 37. attēlu).

a



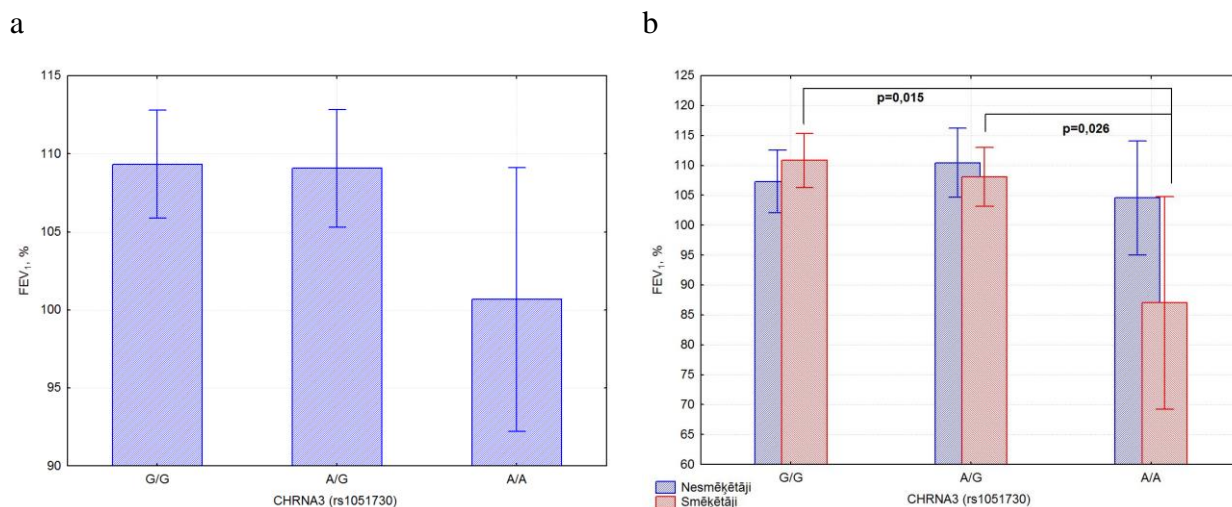
b



37. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē/ forsēto vitālo kapacitāti (FEV_1/FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

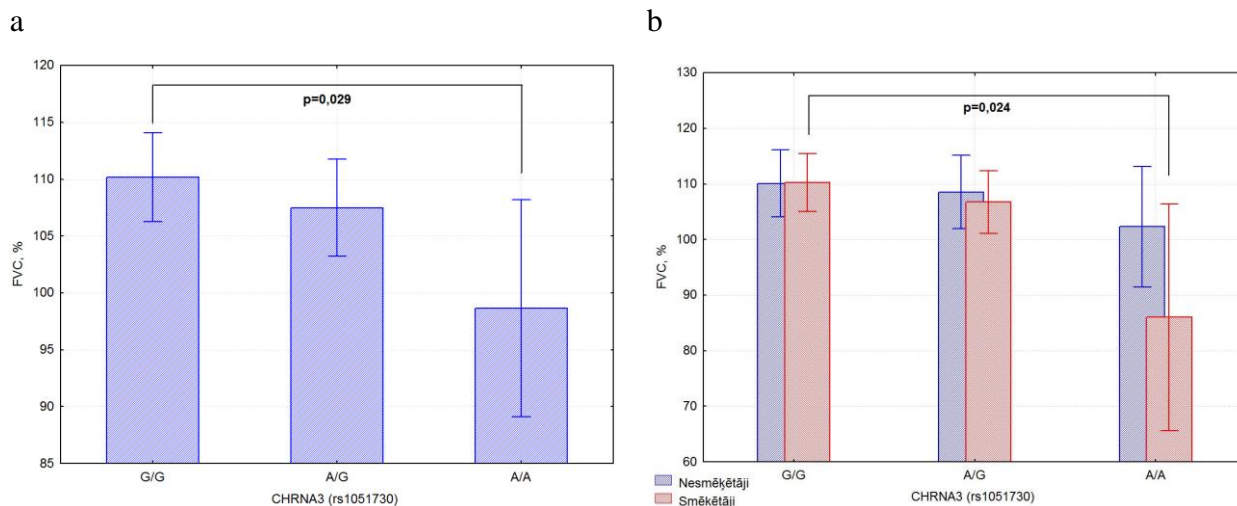
5.4.1.3. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem

Salīdzinot FEV₁, % starp homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka homozigotiem (A/A) smēķētājiem ar abām riska alēlēm ir statistiski būtiski (p=0,015) zemāks FEV₁, % salīdzinājumā ar homozigotiem (G/G) smēķētājiem bez riska alēlēm un heterozigotiem (A/G) smēķētājiem (p=0,026) (skat. 38. attēlu).



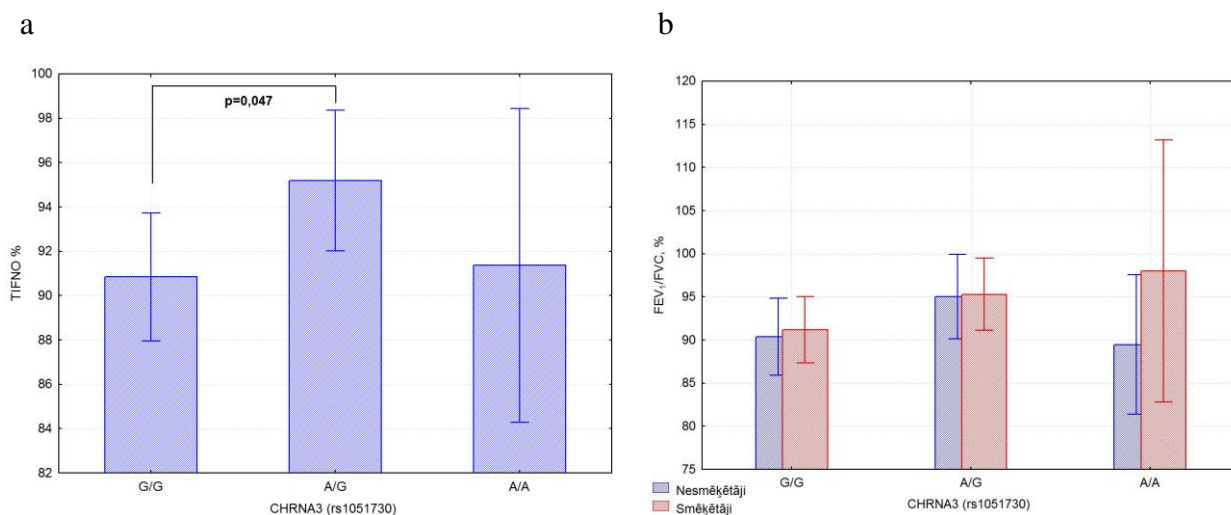
38. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē (FEV₁) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FVC, % starp homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka homozigotiem (A/A) indivīdiem ir būtiski (p=0,029) zemāks FVC, %, salīdzinot ar homozigotiem (G/G) indivīdiem bez riska alēlēm (a). Homozigotiem (A/A) smēķētājiem ar abām riska alēlēm konstatējām statistiski būtiski (p=0,024) zemāku FVC, % salīdzinot ar homozigotiem (G/G) smēķētājiem bez riska alēlēm (b) (skat. 39. attēlu).



39. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar forsēto vitālo kapacitāti (FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FEV_1/FVC , % starp homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēlēs, būtiskas pārmaiņas konstatējām tikai apvienotajā grupā. Heterozigotiem (A/G) indivīdiem ir būtiski ($p=0,047$) zemāks FEV_1/FVC , % salīdzinot ar homozigotiem (G/G) indivīdiem bez riska alēlēm (a) (skat. 40. attēlu).

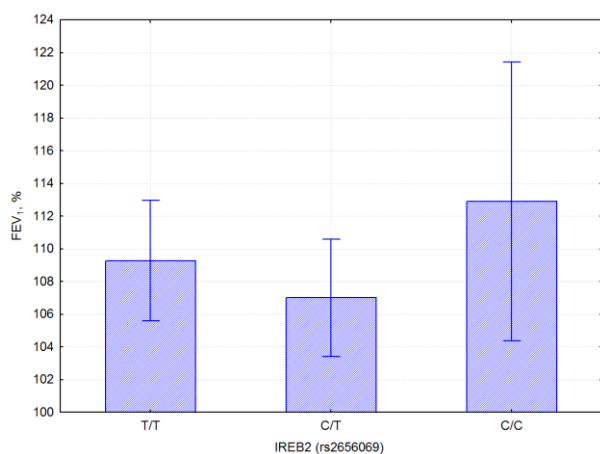


40. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē/ forsēto vitālo kapacitāti (FEV_1/FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

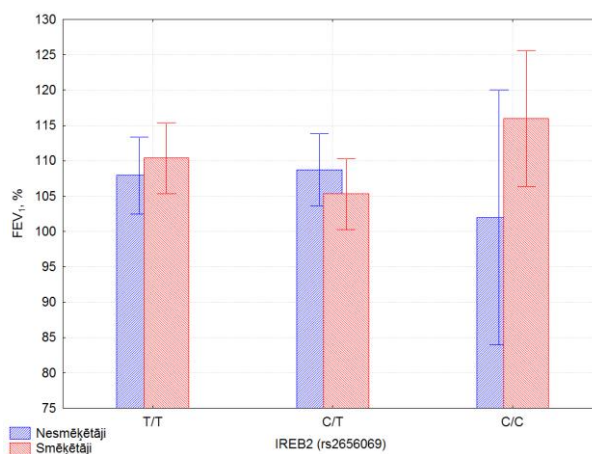
5.4.1.4. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem

Salīdzinot FEV₁, % starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuri nav riska alēļu nēsātāji, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 41. attēlu).

a



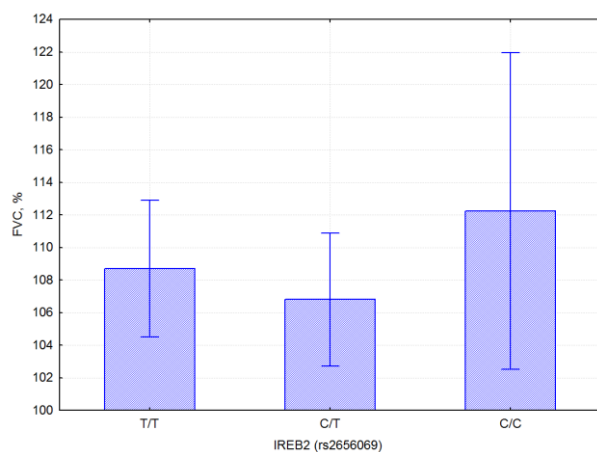
b



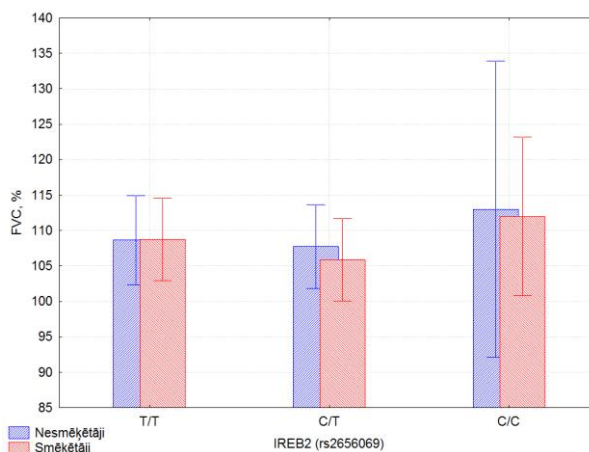
41. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē (FEV₁) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FVC, % starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuri ir riska alēļu nēsātāji, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 42. attēlu).

a



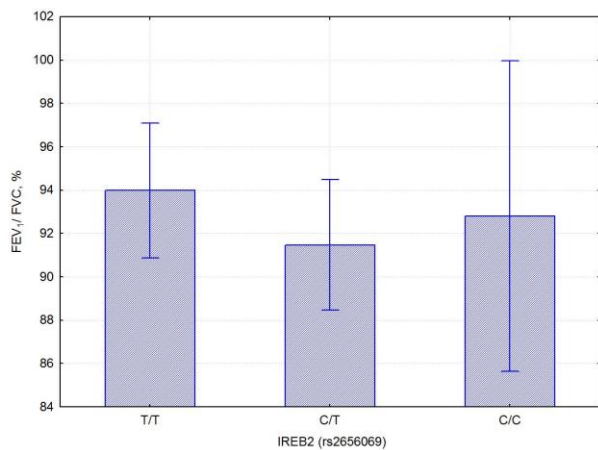
b



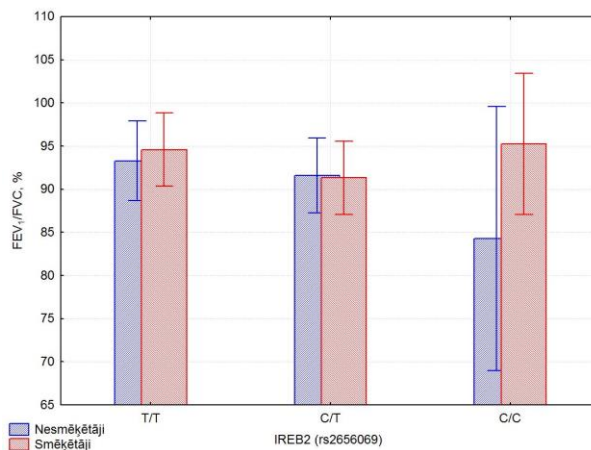
42. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar forsēto vitālo kapacitāti (FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot FEV₁/FVC, % starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C), kuri ir riska alēļu nēsātāji, būtiskas pārmaiņas nekonstatējām (skat. 43. attēlu).

a



b



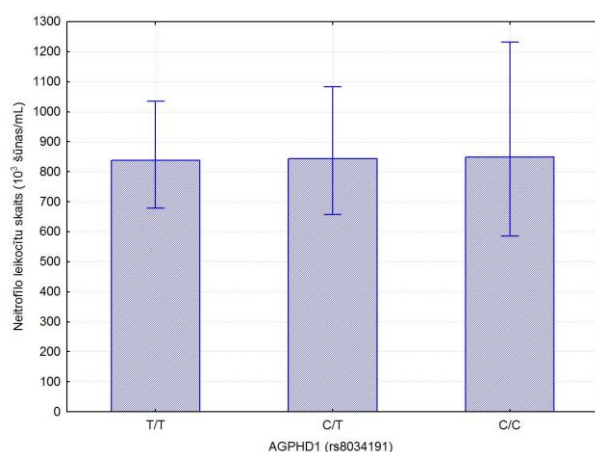
43. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar forsētās izelpas tilpumu pirmajā sekundē/ forsēto vitālo kapacitāti (FEV₁/FVC) % apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

5.4.2. HOPS kandidātģēnu polimorfismu mijiedarbība ar plaušu morfoloģiskajiem rādītājiem

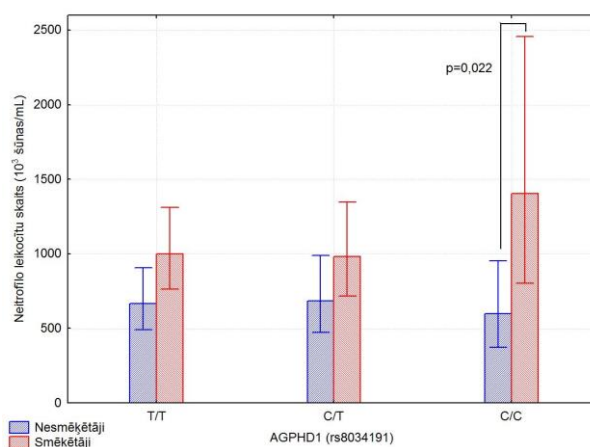
5.4.2.1. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 mijiedarbība ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās

Salīdzinot neitrofilo leikocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (C/C) smēķētājiem, ar abām riska alēlēm, ir būtiski ($p=0,022$) palielināts neitrofilo leikocītu absolūtais skaits inducētajās krēpās, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) nesmēķētājiem, kuri ir abu riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 44. attēlu).

a

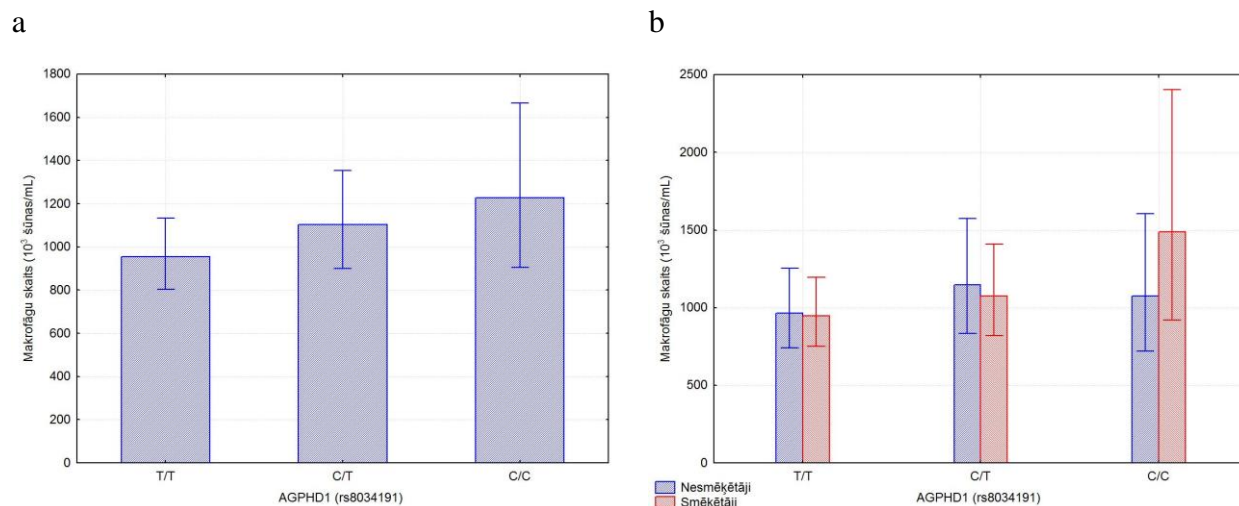


b



44. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar neitrofilo leikocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

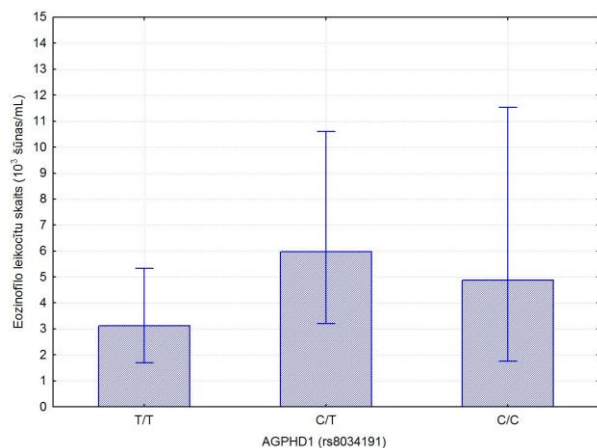
Salīdzinot makrofāgu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles būtiskas pārmaiņas nav konstatējamas (skat. 45. attēlu).



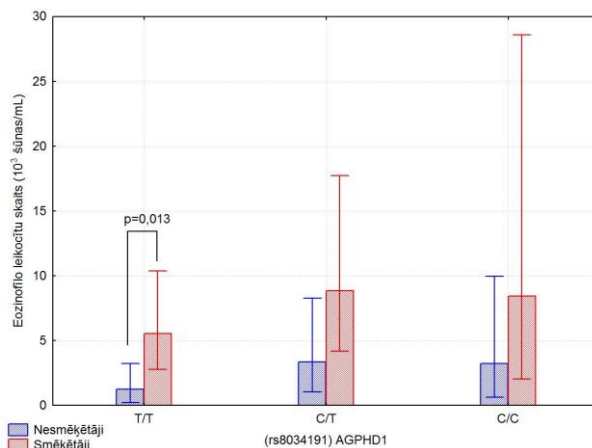
45. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar makrofāgu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot eozinofīlo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka smēķētājiem (T/T), bez riska alēlēm, ir būtiski ($p=0,013$) palielināts eozinofīlo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (T/T) nesmēķētājiem, kuri arī nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 46. attēlu).

a



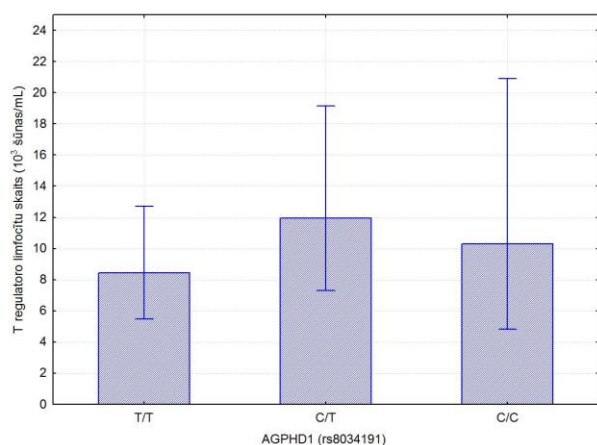
b



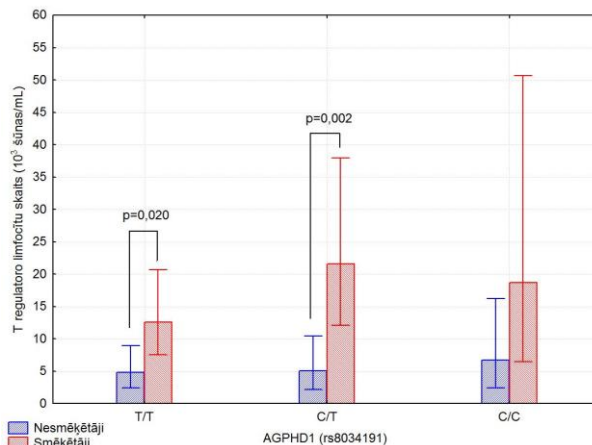
46. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot T regulatoro limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (T/T) un heterozigotiem (C/T) smēķētājiem ir būtiski ($p=0,020$ un $p=0,002$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, atbilstoši salīdzinot ar homozigotiem (T/T) un heterozigotiem (C/T) nesmēķētājiem (skat. 47 attēlu).

a

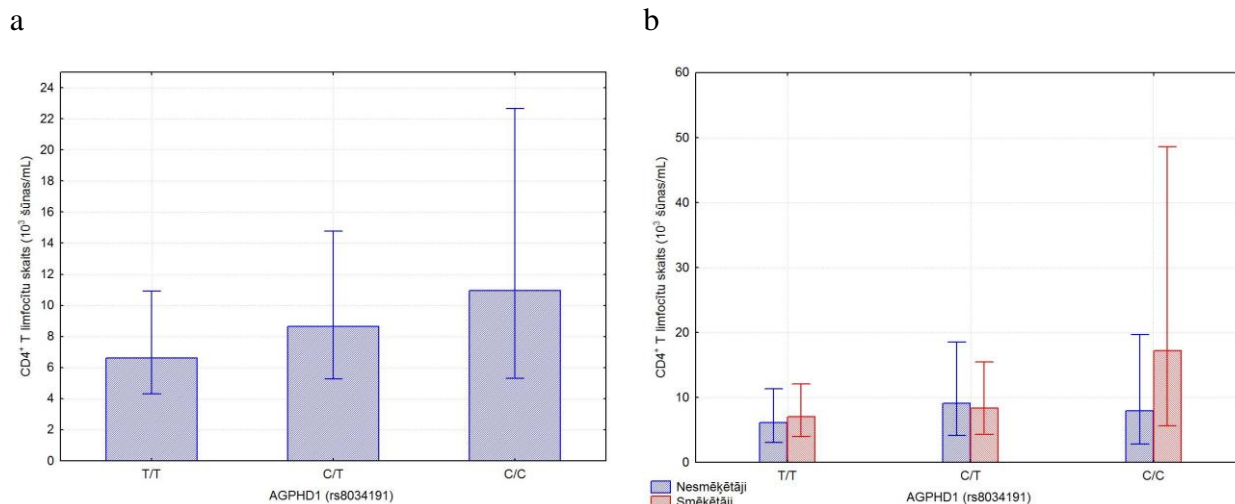


b



47. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar T regulatoro limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

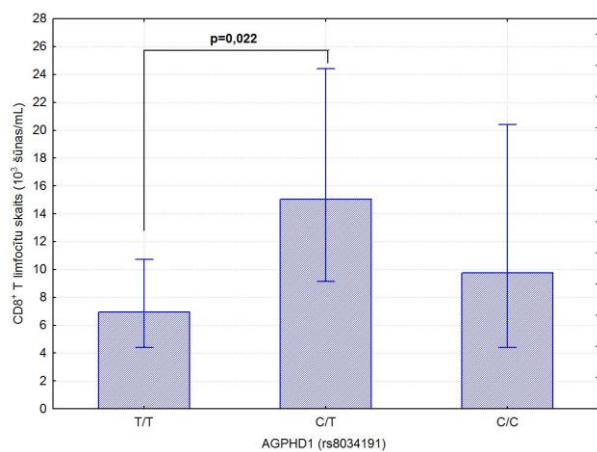
Salīdzinot CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, būtiskas pārmaiņas nav konstatējamas (skat. 48. attēlu).



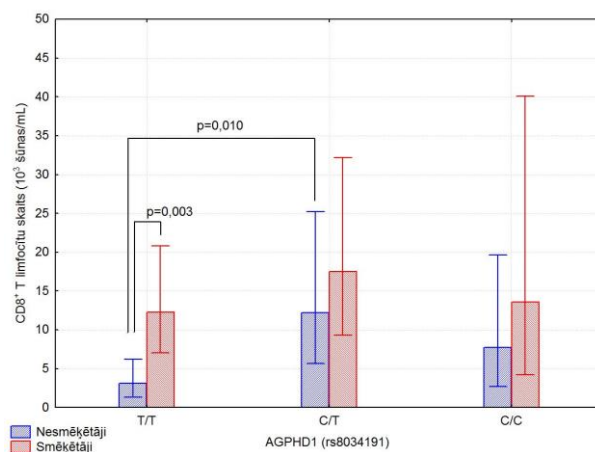
48. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD8⁺ T limfocītu leikocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka heterozigotiem (C/T), indivīdiem ir būtiski palielināts ($p=0,022$) CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (T/T) indivīdiem (a). Smēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) un nav riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,003$) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (T/T) un nav riska alēļu nēsātāji. Nesmēķētājiem, kuri ir heterozigoti (C/T) vienas riska alēles nēsātāji, ir būtiski ($p=0,010$) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) un nav riska alēles nēsātāji (b) (skat. 49. attēlu).

a



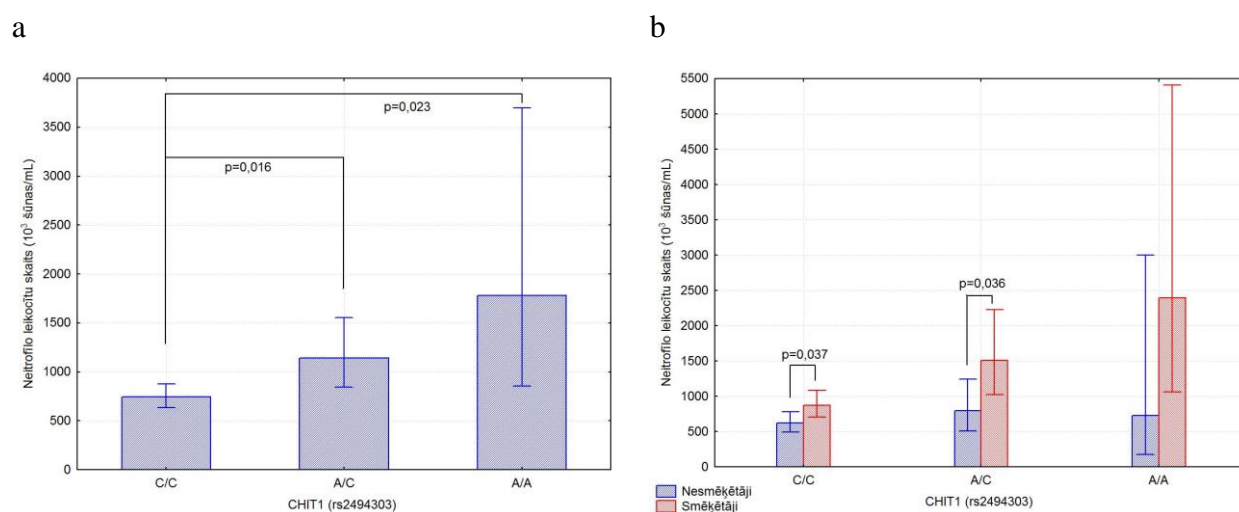
b



49. attēls. *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191 asociācijas dati ar CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

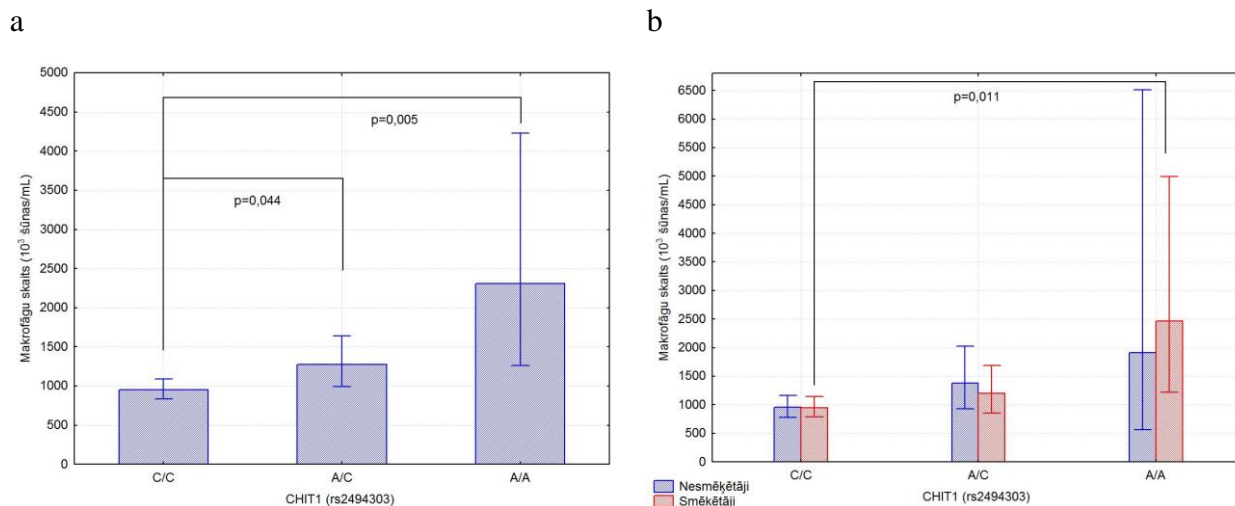
5.4.2.2. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 mijiedarbība ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās

Salīdzinot neitrofilo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (A/A) indivīdiem, kur ir abu riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,023$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) indivīdiem, nav riska alēļu nēsātāji. Arī indivīdiem, kuri ir heterozigoti (A/C) ar vienu riska alēli ir būtiski ($p=0,016$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C), kuri nav riska alēļu nēsātāji (a). Homozigotiem (C/C) smēķētājiem, kuri ir nav riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,037$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) nesmēķētājiem, kuri arī nav riska alēļu nēsātāji. Heterozigotiem (A/C) smēķētājiem, kuri ir vienas riska alēles nēsātāji, ir būtiski ($p=0,036$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar heterozigotiem (A/C) nesmēķētājiem, kuri ir vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 50. attēlu).



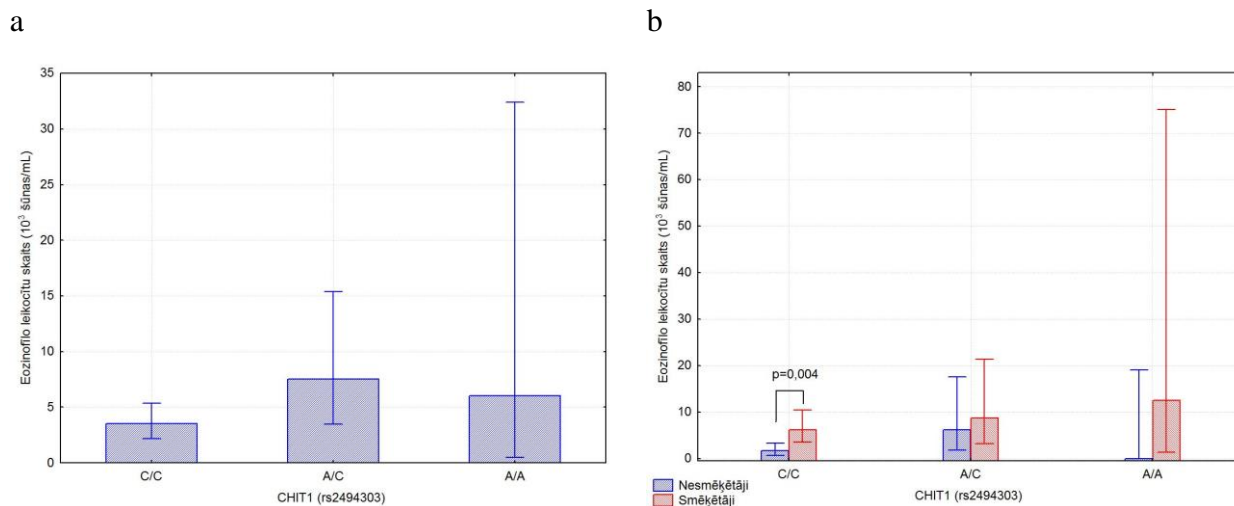
50. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar neitrofilo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot makrofāgu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuri ir abu riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,005$) palielināts makrofāgu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji. Līdzīgi indivīdiem, kuri ir heterozigoti (A/C) vienas riska alēles nēsātāji, ir būtiski ($p=0,044$) palielināts makrofāgu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C), kuri nav riska alēļu nēsātāji (a). Smēķētājiem, kuri ir homozigoti (A/A) abu riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,011$) palielināts makrofāgu absolūtais skaits, salīdzinot ar smēķētājiem, kuri ir homozigoti (C/C) un nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 51. attēlu).



51. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar makrofāgu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

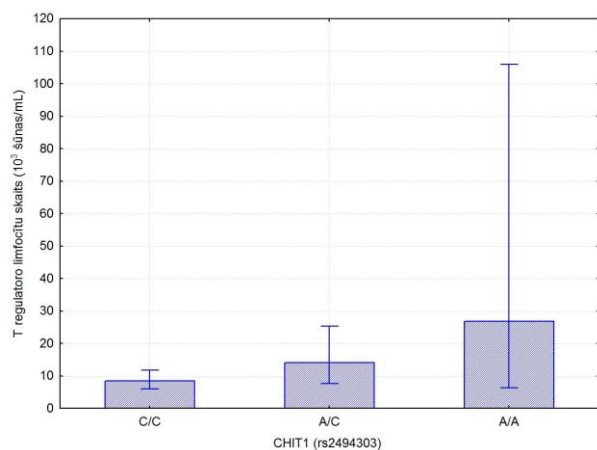
Salīdzinot eoziofīlo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (C/C) smēķētājiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,004$) palielināts eozinofīlo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) nesmēķētājiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 52. attēlu).



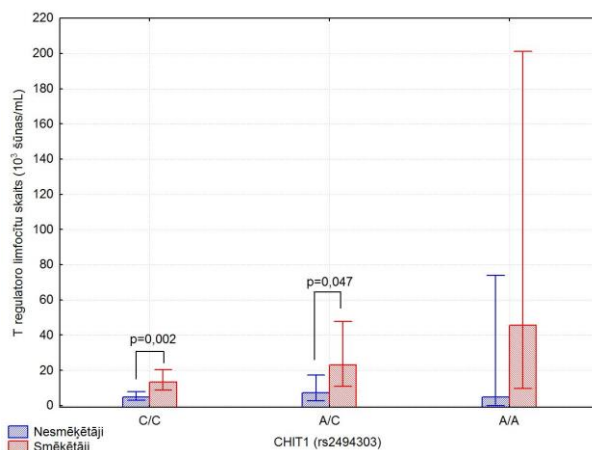
52. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar eozinofīlo leukocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot T regulatoro limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (C/C) smēķētājiem inducētajās krēpās ir būtiski ($p=0,002$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (C/C) un nav riska alēļu nēsātāji. Smēķētājiem, kuri ir heterozigoti (A/C) ir būtiski ($p=0,047$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir heterozigoti (A/C) vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 53. attēlu).

a



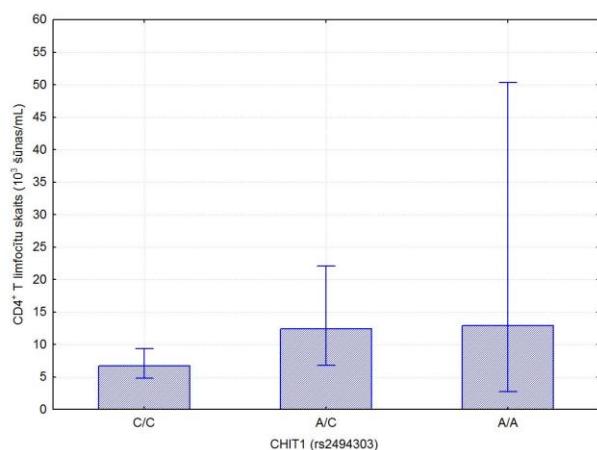
b



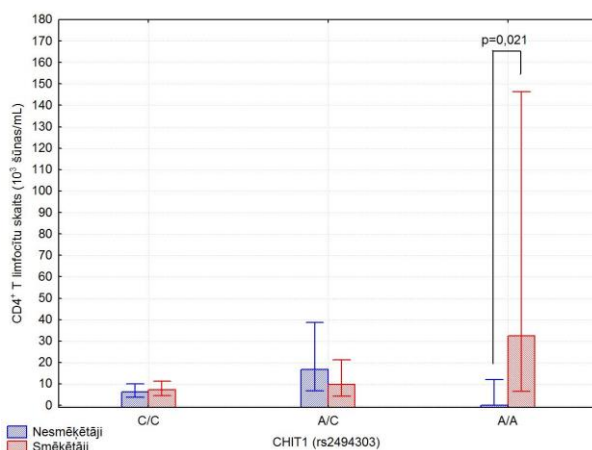
53. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar T regulatoro limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka smēķētājiem, kuri ir homozigoti (A/A) abu riska alēļu nēsātāji, ir būtiski ($p=0,021$) palielināts CD4⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (A/A) abu riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 54. attēlu).

a

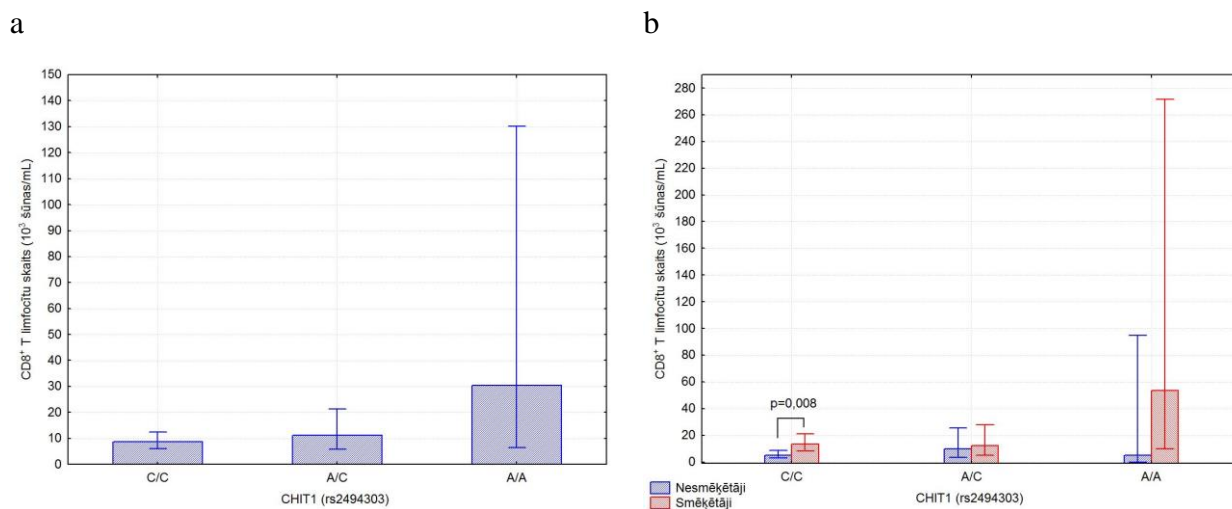


b



54. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/C), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles, konstatējām, ka smēķētājiem, kuri ir homozigoti (A/A) ir būtiski (p=0,008) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (A/A) un nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 55. attēlu).

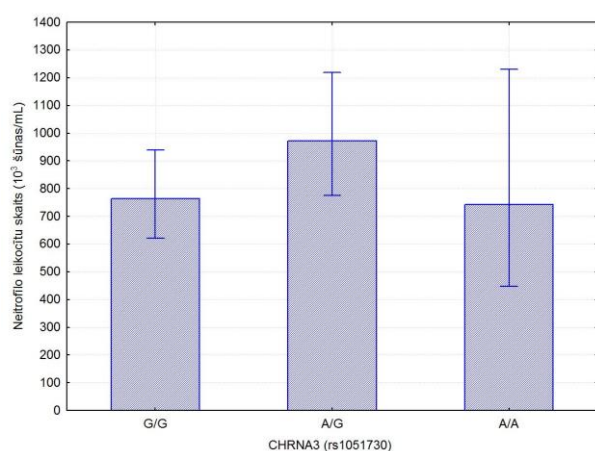


55. attēls. *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2494303 asociācijas dati ar CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu inducētajās krēpās visiem pētījuma dalībniekiem (a) un atsevišķi smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

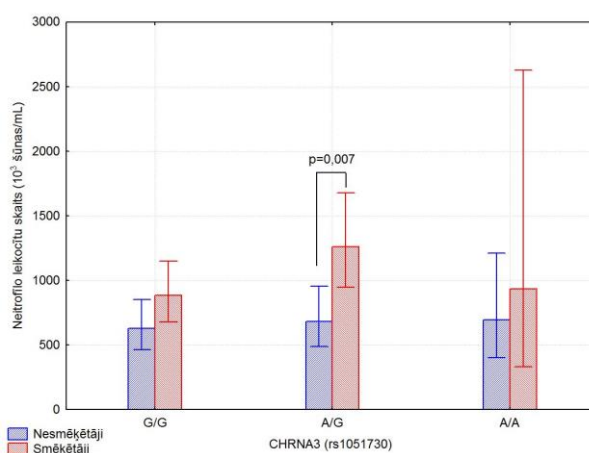
5.4.2.3. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 mijiedarbība ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās

Salīdzinot neitrofilo leukocītu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka smēķētājiem, kuri ir heterozigoti (A/G), ir būtiski ($p=0,007$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir heterozigoti (A/G) vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 56. attēlu).

a



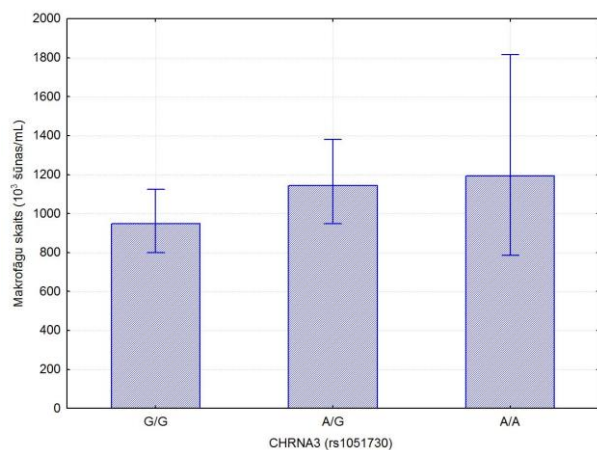
b



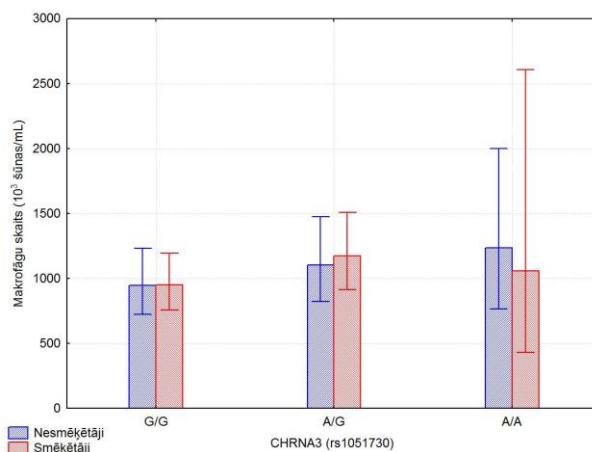
56. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar neitrofilo leukocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot makrofāgu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem ir abas ir riska alēles konstatējām, ka nav būtisku pārmaiņu (skat. 57. attēlu).

a



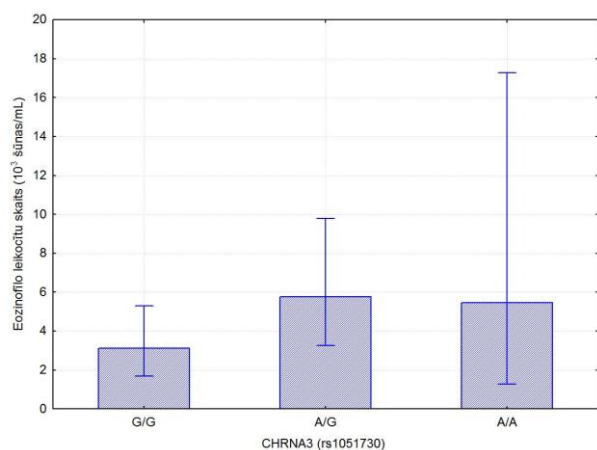
b



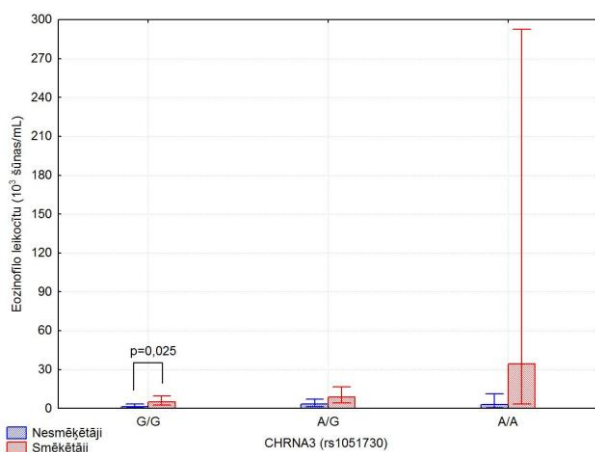
57. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar makrofāgu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot eozinofilo leukocītu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka homozigotiem (G/G) smēķētājiem ir būtiski ($p=0,025$) palielināts eozinofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (G/G) un nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 58. attēlu).

a

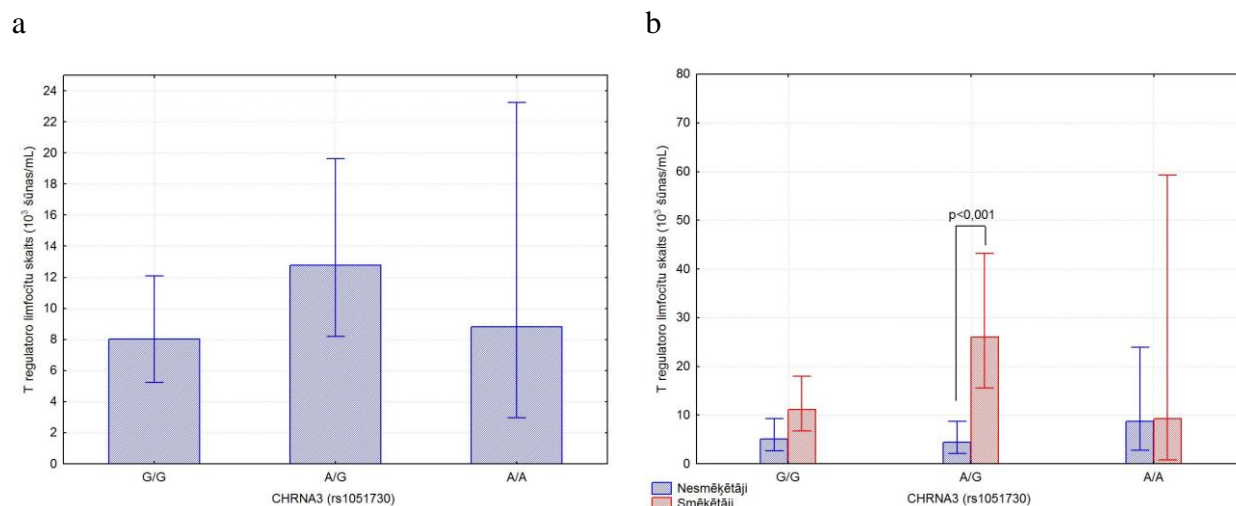


b



58. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

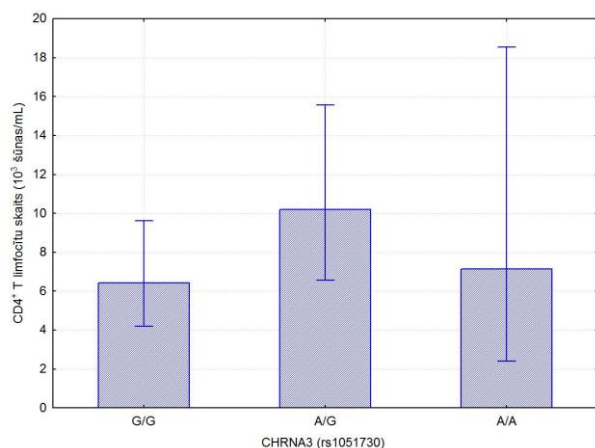
Salīdzinot T regulatoro limfocītu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A) indivīdiem, kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka heterozigotiem (A/G) smēķētājiem ir būtiski ($p < 0,001$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir heterozigoti (A/G) vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 59. attēlu).



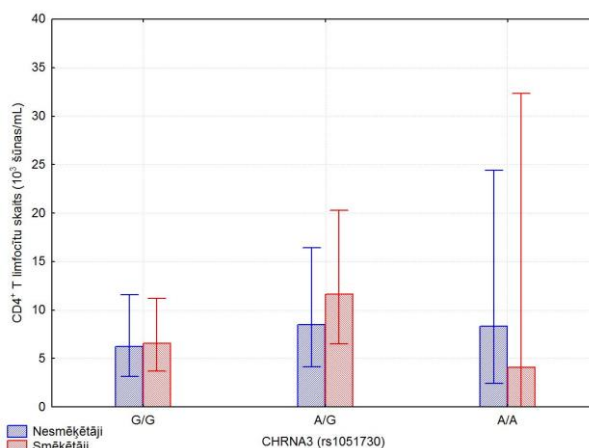
59. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar T regulatoro limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot $CD4^+$ T limfocītu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles nekonstatējām būtiskas pārmaiņas (skat. 60. attēlu).

a



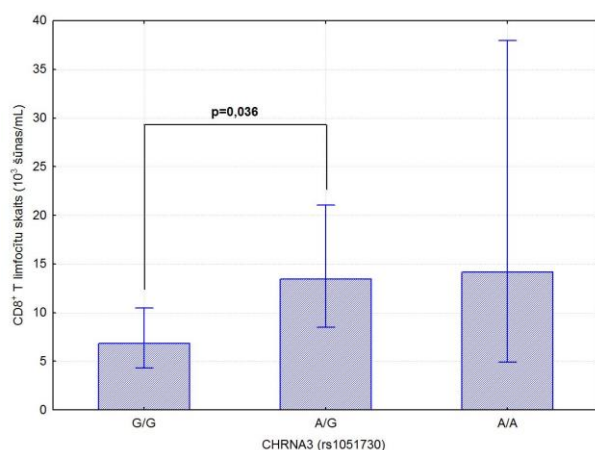
b



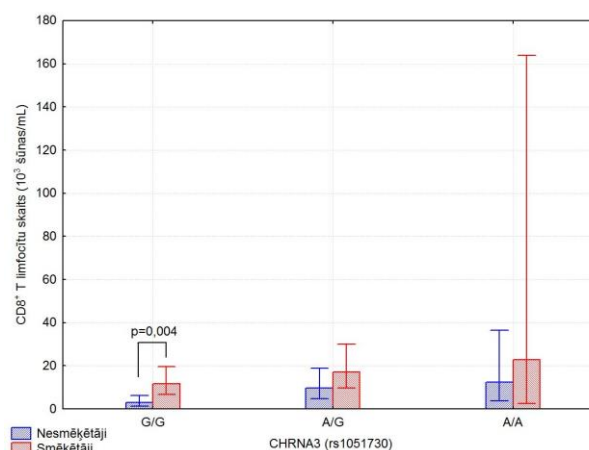
60. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (A/G), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (A/A), kuriem abas ir riska alēles konstatējām, ka heterozigotiem (A/G) indivīdiem ir būtiski ($p=0,036$) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar indivīdiem, kuri ir homozigoti (G/G) un nav riska alēļu nēsātāji (a). Homozigotiem (G/G) smēķētājiem ir būtiski ($p=0,041$) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri arī ir homozigoti (G/G) un nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 61. attēlu).

a



b

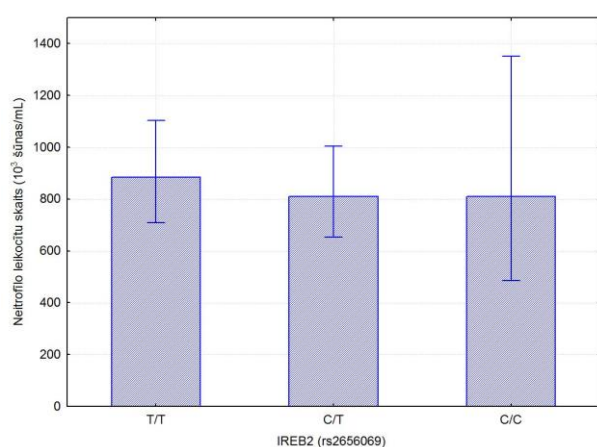


61. attēls. *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 asociācijas dati ar CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

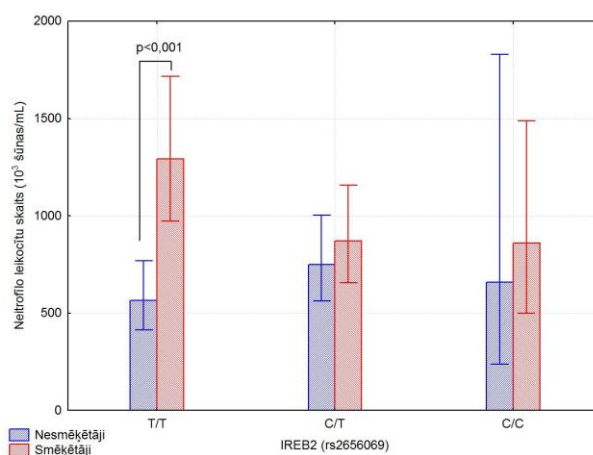
5.4.2.4. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 mijiedarbība ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās

Salīdzinot neitrofilo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kuri ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji, konstatējām, ka homozigotiem (T/T) smēķētājiem ir būtiski ($p < 0,001$) palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) un ir riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 62. attēlu).

a

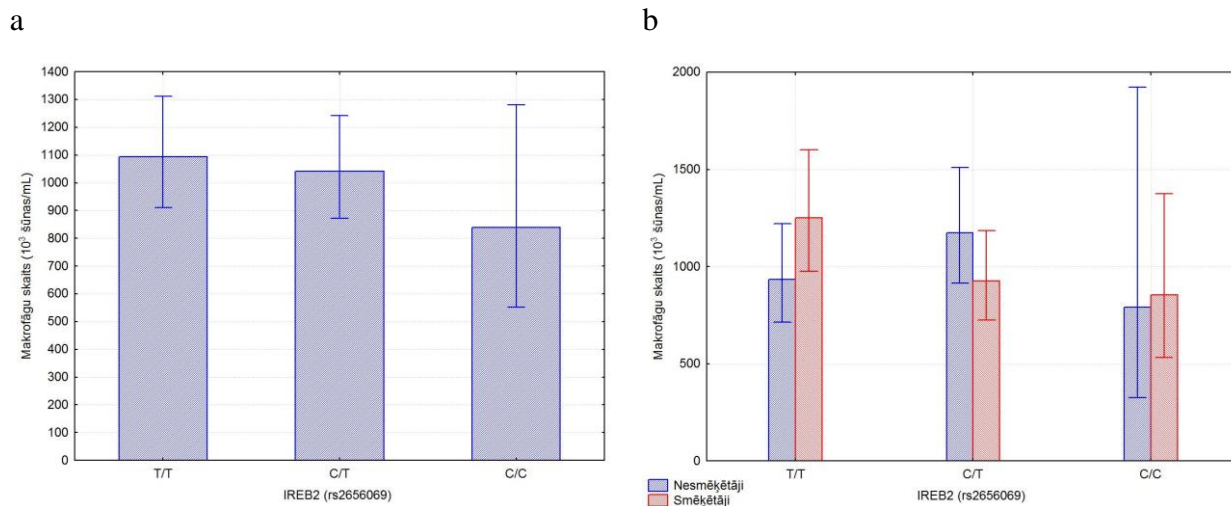


b



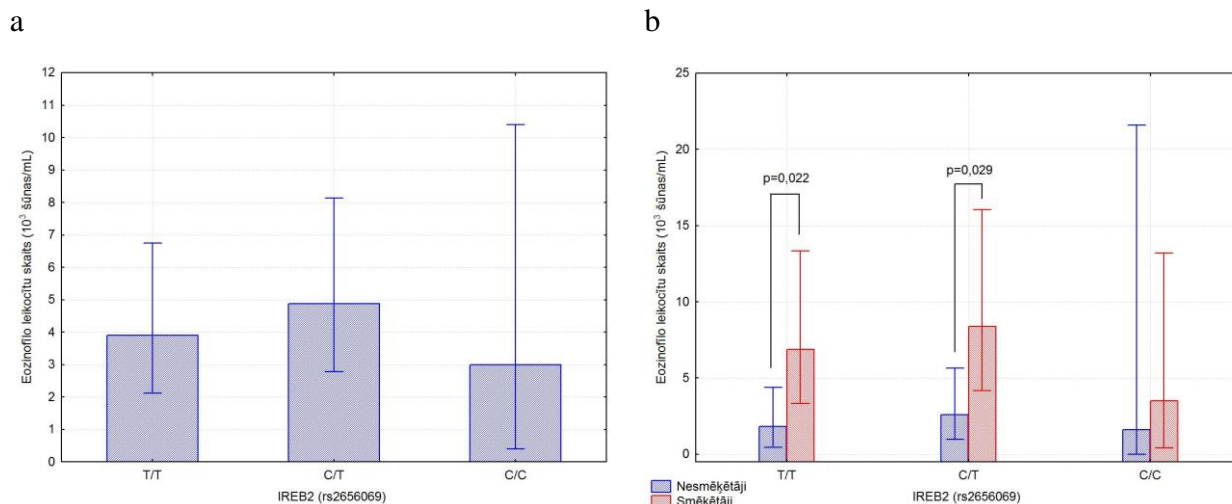
62. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar neitrofilo leukocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot neitrofilo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem nav riska alēles, konstatējām, ka nav vērā ņemamu pārmaiņu (skat. 63. attēlu).



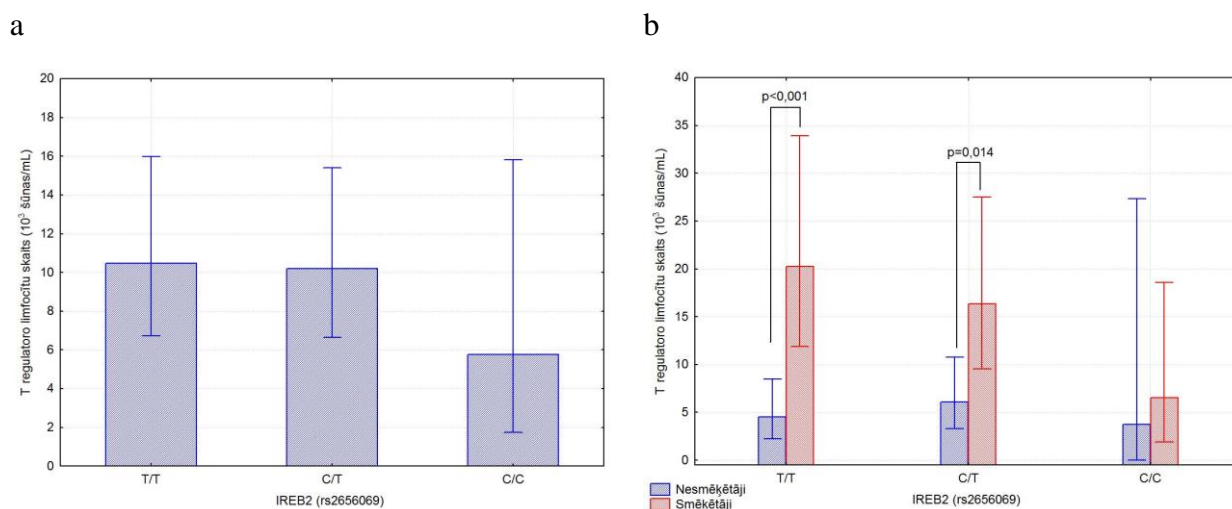
63. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar makrofāgu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot eozinofilo leukocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji, konstatējām, ka homozigotiem (T/T) smēķētājiem ir būtiski ($p=0,022$) palielināts eozinofilo leukocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) abu riska alēļu nēsātāji, kā arī heterozigotiem (C/T) smēķētājiem, ir būtiski ($p=0,029$) palielināti eozinofīlā leukocīta absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir heterozigoti (C/T) vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 64. attēlu).



64. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

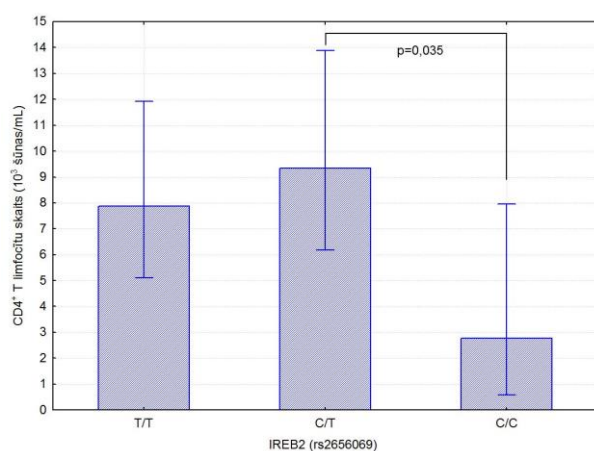
Salīdzinot T regulatoro limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem nav riska alēles, konstatējām, ka homozigotiem (T/T) smēķētājiem ir būtiski ($p<0,001$) palielināts T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) abu riska alēļu nēsātāji, kā arī heterozigotiem (C/T) smēķētājiem ir būtiski ($p=0,014$) palielināti T regulatorā limfocīta absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir heterozigoti (C/T) vienas riska alēles nēsātāji (b) (skat. 65. attēlu).



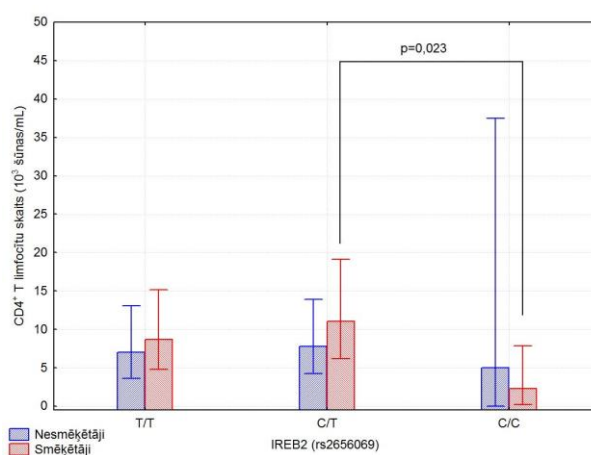
65. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar T regulatoro limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kuri ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuriem nav riska alēles, konstatējām, ka heterozigotiem (C/T) indivīdiem, vienas riska alēles nēsātājiem, ir būtiski (p=0,035) palielināts CD4⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar indivīdiem, kuri ir homozigoti (C/C) (a). Heterozigotiem (C/T) smēķētājiem, kuri ir vienas riska alēles nēsātāji ir būtiski (p=0,023) palielināts CD4⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar homozigotiem (C/C) smēķētājiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 66. attēlu).

a

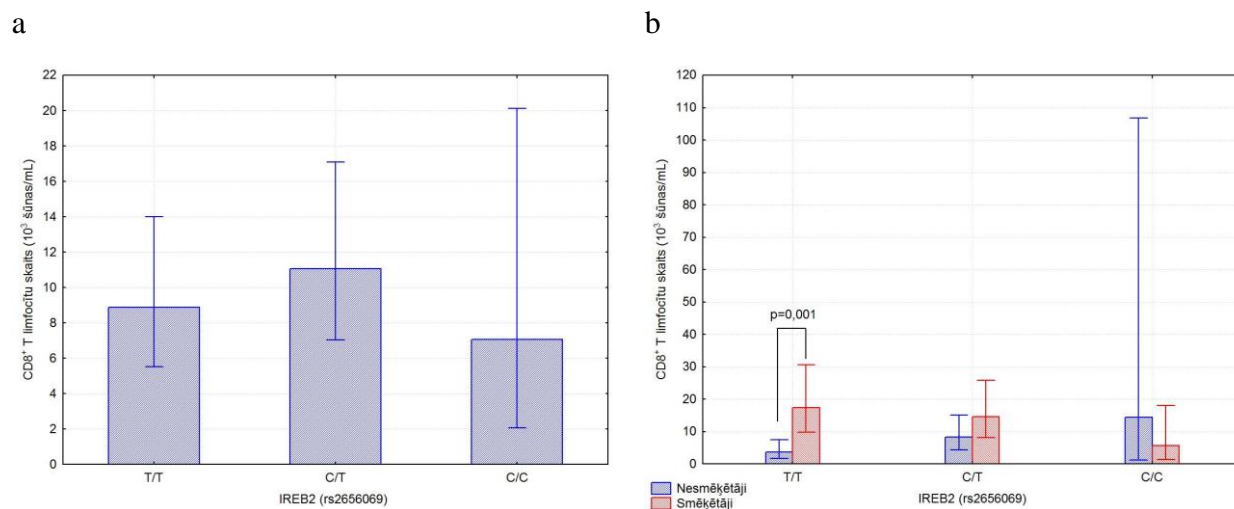


b



66. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar CD4⁺ T limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

Salīdzinot CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu starp homozigotiem (T/T), kas ir riska alēļu nēsātāji, heterozigotiem (C/T), kuriem ir viena no riska alēlēm un homozigotiem (C/C) indivīdiem, kuri nav riska alēļu nēsātāji, konstatējām, ka homozigotiem (T/T) smēķētājiem, kuri ir abu riska alēļu nēsātāji, ir būtiski (p=0,001) palielināts CD8⁺ T limfocītu absolūtais skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kuri ir homozigoti (T/T) abu riska alēļu nēsātāji (b) (skat. 67. attēlu).



67. attēls. *IREB2* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs2656069 asociācijas dati ar CD8⁺ T limfocītu absolūto skaitu apvienotā pētījuma dalībnieku grupā (a) un atsevišķi jaunajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (b).

6. DISKUSIJA

6.1. Plaušu ventilācija funkcijas rādītāji gados jauniem smēķētājiem

Kā jau iepriekš mūsu veiktajos pētījumos (Maģistra darbs, Kislina, 2011), arī šoreiz secinājām, ka neliels smēķēšanas stāžs (0,15 – 9 pakgadi) neietekmē plaušu ventilācijas funkcijas rādītājus (FEV_1 , %, FVC, %, FEV_1/FVC , %) gados jauniem smēķētājiem. Arī GOLD vadlīnijās ir norādīts, ka HOPS ir hroniska iekaisuma slimība, ko izraisa ilgstoša smēķēšana – virs 20 pakgadiem un pirmie simptomi parādās pēc 40 gadu vecuma.

6.2. Smēķēšanas izraisītas šūnu skaita pārmaiņas inducētajās krēpās

Pirmo reizi tika pētītas imūnās sistēmas šūnu kvantitatīvas pārmaiņas inducētajās krēpās gados jauniem smēķētājiem ar nelielu smēķēšanas stāžu, vidēji 3 pakgadi, kuriem nav simptomu, kas liecinātu par HOPS attīstību.

Iegūtie rezultāti parādīja, ka neskatoties uz normāliem plaušu funkcionāliem rādītājiem un simptomu trūkumu, jauniem smēķētājiem inducētajās krēpās ir palielināts absolūtais neitrofilo un eozinofilo leukocītu skaits kā arī $FoxP3^+$ T regulatoro un $CD8^+$ T limfocītu daudzums. Atklājām sakarību, ka pieaugot smēķēšanas stāžam (izsmēķēto cigarešu daudzumam) pieaug neitrofilo leukocītu, eozinofilo leukocītu, $FoxP3^+$ T regulatoro limfocītu absolūtais skaits, kā arī ir tendence pieaugt $CD8^+$ T limfocītu daudzumam. Daudzos pētījumos ir konstatēts palielināts neitrofilo leukocītu un makrofāgu daudzums inducētajās krēpās smēķētājiem ar HOPS (Stanescu, 1996) (O'Donnell, 2006; Tetley, 2002). Palielinātais minēto šūnu skaits tiek skaidrots ar smēķēšanas izraisītu hroniskam iekaisumam raksturīgu pārmaiņu secību. Ir noskaidrots, ka nikotīnam piemīt tiešs aktivējošs un hemotakses efekts uz iekaisuma šūnām. Smēķēšana tieši stimulē granulocītu veidošanos un atbrīvošanos no kaulu smadzenēm, iespējams šo procesu nosaka GM-CSF, ko izdala alveolārie makrofāgi (Terashima, 1997). Ir izpētīts, ka smēķēšana paldzina neitrofilo leukocītu saglabāšanos plaušās (MacNee, 1989). Par iekaisuma šūnu piesaistīšanu ir atbildīgi arī brīvie radikāļi (ROS), kurus satur cigaretes (Rahman, 2006; Rahman, 2005). Gan nikotīns, gan brīvie radikāļi aktivē transkripcijas faktoru NF- κ B (Barnes, 1997; Yang, 2006), kas aktivē gēnus TNF un hemokīnu produkcijai (Keatings, 1996). Hemokīnus izdala arī alveolārie makrofāgi (Russell, 2002), T limfocīti, epitēlijšūnas, kā arī paši

neitrofilie leukocīti (Bazzoni, 1991). Būtiskie ir CXC hemokīni, piemēram, IL-8 (CXCL8), kas spēj piesaistīt un aktivēt neitrofilos leukocītus, kuri tālāk degranulējas, atbrīvojot virkni proteāžu, piemēram, elastāzi, katepsīnu G, proteināzi 3 un metalloproteāzes (MMP) (Barnes, 2006). Proteāzes tālāk bojā audus un izraisa gļotu hipersekrēciju. Ir izpētīts, ka smēķēšana nomāc antiproteāžu efektu, izraisot, piemēram, α – 1 antitripsīna funkcionālu deficītu. Neitrofilo leukocītu skaits bronhu biopsiju materiālos un inducētajā krēpās korelē ar HOPS smaguma pakāpi un plaušu funkcionālo rādītāju samazināšanos (Di Stefano, 1998). Literatūrā ir minēts, ka palielināts neitrofilo leukocītu daudzums inducētajās krēpās ir konstatēts pacientiem ar HOPS, kā arī veseliem smēķētājiem ar salīdzinoši lielu, aptuveni 25.5 pakgadu, smēķēšanas stāžu (Borrill, 2008). Mūsu pētījums atklāja, ka palielināts neitrofilo leukocītu daudzums ir konstatējamas jau pēc dažiem nosmēķētajiem pakgadiem, un ir pozitīva sakarība starp nosmēķēto pakgadu skaitu un neitrofilo leukocītu daudzumu gados jaunu smēķētāju inducētajās krēpās, kad vēl plaušu funkcionālie rādītāji atbilst normām. Neskatoties un literatūras norādēm, mūsu pētījumā nekonstatējām pārmaiņas makrofāgu daudzumā gados jaunu smēķētāju inducētajās krēpās. To varētu skaidrot ar to, ka makrofāgi ir raksturīgas hroniska iekaisuma šūnas, arī HOPS gadījumā, bet tā kā pētījumā iekļāvām jauniešus, tad iekaisuma process vēl nav hronizējies.

Statistiski ticami tika pierādīts, ka smēķētājiem ierosinātajās krēpās ir palielināts eozinofīlo leukocītu absolūtais skaits salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un, ka to skaits pieaug līdz ar smēķēšanas stāžu. *Belda et. al.* rakstā par šūnu sadalījumu veselu indivīdu inducētajās krēpās ir informācija, ka eozinofīlo leukocītu absolūtais skaits nepārsniedz $0,0 - 0,4$ šūnas/ 10^4 mL, kas atbilst arī mūsu pētījuma rezultātiem nesmēķētāju grupā (Belda, 2000). Salīdzinoši, mūsu pētījumā konstatējām, smēķētāju grupā eozinofīlo leukocītu daudzums ir būtiski palielināts un vidēji atbilst $6,96$ šūnas/ 10^3 mL. Arī *Dippolito* un citu (Dippolito, 2001) rakstā ir informācija, ka asimptomātiskiem smēķētājiem (21 ± 20 pakgadi) eozinofīlo leukocītu absolūtais skaits vidēji ir $2/10^4$ mL, bet nesmēķētājiem $0,2/10^4$ mL.

Eozinofīlo leukocītu pieaugums ir nepārprotama norāde uz iekaisuma attīstību. Eozinofīlo leukocītu mediatori, kas iesaistās elpceļu iekaisuma patoģenēzē, tiek uzglabāti šūnu granulās un tiek izdalīti šūnām aktivējoties. Būtiskākie mediatori ir galvenais proteīns (MBP) (Gleich, 2000), kas korelē ar bronhu epitēlija bojājumu, eozinofīlo leukocītu katjoniskais proteīns (ECP), kas pieaug hroniskas astmas gadījumā

un korelē ar elpceļu obstrukciju (Venge, 1999), eozinofilo leukocītu izdalītais neirotoksīns (ECN), kas stimulē fibroblastu proliferāciju (Rochester, 1996) un eozinofilo leukocītu peroksidāze (EPO), kas veicina toksisko slāpekļa savienojumu veidošanos veicinot astmai raksturīgo iekaisumu (Alving, 1993). Bez tam, aktivēti eozinofīlie leukocīti izdala ciklooksigenāzes (COX), lipoksigenāzes un fosfolipāzi A2, kas piedalās iekaisuma reakcijā, veidojot eikosanoīdus (Bandeira-Melo, 2002).

Aktivēti eozinofīlie leukocīti sintezē un izdala virkni iekaisumu veicinošus citokīnus, tādus kā interleikīnus IL – 1 α , IL – 6, IL – 8; tumora nekrozes faktoru – α (TNF – α); transformējošo augšanas faktoru (TGF) – α un β un eotaksīnus (Churg, 2002) (Kuschner, 1996). Visi minētie savienojumi, kas izdalās no aktivētiem eozinofīlajiem leukocītiem, var ierosināt iekaisuma kaskādi.

Intrapulmonāra iekaisuma klātbūtne pacientiem ar HOPS ir pētīta jau ilgu laiku, aktivētu makrofāgu un neitrofilo leukocītu (iedzimtās imūnās sistēmas sastāvdaļas) akumulācija, jau sen tiek uzskatīta par smēķēšanas izraisītas hroniskas obstruktīvas plaušu slimības attīstības svarīgu komponenti. Pēdējos gados ar vien vairāk tiek veikti pētījumi, lai noskaidrotu adaptīvās imūnās sistēmas lomu HOPS patofizioloģijā (Tetley, 2005). Ir veikti pētījumi, kas apliecina T limfocītu būtisko nozīmi iekaisuma attīstībā un uzturēšanā, gan izdalot mediatorus, gan tieši mijiedarbojoties un aktivējot citas iekaisumā iesaistītās šūnas (Monaco, 2004). Senākos pētījumos *Finkelstein et. al.*, konstatē, ka ir palielināts limfocītu skaits pacientu ar HOPS elpceļu sienīņās (Finkelstein, 1995). Ir pētījumi, kuros atklāts ka CD8⁺ T limfocīti ir dominējošās imūnās sistēmas šūnas HOPS pacientu galveno elpceļu sienīņās (O'Shaughnessy, 1997), mazo elpceļu sienīņās (Saetta, 1998) un plaušu parenhīmā (Calabrese, 2005; Saetta, 1999). Turpmākos pētījumos citi autori norāda, ka kopējais CD8⁺ limfocītu daudzums inducētajās krēpās pacientiem ar HOPS ir statistiski ticami palielināts salīdzinot ar tiem smēķētājiem kam HOPS nav attīstījies un nesmēķētājiem (Rufino, 2007; Tzanakis, 2004). Rufino atklāj, ka CD8⁺ limfocītu daudzums ir palielināt gan inducētajās krēpās, gan arī perifērajās asinīs, kas apstiprina teoriju par HOPS sistēmiska iekaisuma raksturu. *Tzanakis et. al.* pētījumā tika konstatēts, ka CD8⁺ limfocītu daudzums inducētajās krēpās nesmēķējošiem un smēķējošajiem indivīdiem bez HOPS būtiski neatšķiras, savukārt CD4⁺ limfocītu absolūtais skaits bija ticami samazināts HOPS pacientiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un smēķētājiem bez

HOPS (starp divām pēdējām grupām nebija atšķirības). *Arnson et.al.*, savos pētījumos ir ieguvis savādākus rezultātus. Smēķētājiem, kuru smēķēšanas stāžs ir lielāks par 50 pakgadiem un nav izveidojies HOPS, viņš konstatēja samazinātu CD4⁺ limfocītu skaitu, bet palielinātu CD8⁺ limfocītu skaitu (Arnson, 2010). Ir izpētīts, ka CD8⁺ limfocītiem ir dažādas funkcijas pacientu elpceļos ar HOPS. Piemēram, CD8⁺ limfocīti kalpo kā aizsargšūna vīrusu infekciju gadījumā, bet nav skaidrs kāpēc šo šūnu skaits nesamazinās infekcijai beidzoties (Barnes, 2003). Aktivēti CD8⁺ limfocīti elpceļos sekretē virkni citokīnu, kas savukārt aktivē citas iekaisuma šūnas, piemēram, makrofāģus, vai tieši izsauc šūnu nāvi izdalot citotoksiskus mediatorus, tādus kā grenzīmus un perforīnus. Aktivēti CD8⁺ T limfocīti var izraisīt CD4⁺ T limfocītu apoptozi (Liu, 1996). Līdztekus padziļinātiem pētījumiem par CD8⁺ limfocītu nozīmi HOPS patoģenēzē, tiek pētīta arī CD4⁺ T limfocītu loma HOPS attīstībā. Ir zināms, ka CD4⁺ limfocīti veicina citokīnu izdalīšanos, kas regulē imūnās sistēmas atbildes reakcijas iekaisuma gadījumā, kā arī piesaista citas imūnsistēmas šūnas (Gadgil, 2008). Apkopojot literatūras datus, konstatējām, ka pārsvarā pētījumos ir iegūti rezultāti, kas liecina par CD4⁺ T limfocītu daudzuma samazināšanos pacientiem ar HOPS (Costabel, 1986). Mūsu pētījumā konstatējām, ka smēķējošiem jauniešiem ir palielināts CD8⁺ T limfocītu daudzums inducētajās krēpās, kas sakrīt ar HOPS patoģenēzes pētījumiem. Kā arī konstatējām, ka CD8⁺ T limfocītiem ir tendence pieaugt atkarībā no izsmēķēto pakgadu daudzuma. Tai pat laikā nekonstatējām pārmaiņas CD4⁺ T limfocītu daudzumā, kas varētu liecināt par pārmaiņu agrīno raksturu. Pieļaujam, ka palielināts CD8⁺ T limfocītu, kā arī neitrofilo un eozinofilo leukocītu daudzums inducētajās krēpās varētu palīdzēt identificēt gados jaunus smēķētājus, kam ir tendence uz HOPS attīstību.

Pētījumos ir iegūti rezultāti, kas uzrāda, ka HOPS pacientiem ir ticami samazināta CD4⁺/CD8⁺ T limfocītu attiecība, bet smēķētājiem bez HOPS un nesmēķētājiem šī attiecība bija nemainīga (Rufino, 2007). Tas sakrīt ar mūsu rezultātiem, mēs konstatējām, ka proporcionāli pieaugot CD8⁺ T limfocītiem pieaug arī CD4⁺ T limfocīti, bet proporcija paliek nemainīga. *Tzanakis et. al.* pētījumā galvenā atšķirība starp HOPS pacientiem un smēķētājiem bez HOPS un nesmēķētājiem bija CD8⁺ T limfocītu daudzumā un CD4⁺/CD8⁺ T limfocītu attiecībā (Tzanakis, 2004). Autori skaidro, ka disbalanss starp CD4⁺ T limfocītiem un CD8⁺ T limfocītiem ir viens no iemesliem HOPS raksturīgā iekaisuma attīstībā.

Mūsu pētījumā konstatējām, ka smēķētājiem salīdzinot ar nesmēķētājiem ir statistiski ticami palielināts FoxP3⁺ T limfocītu skaits, kā arī pieaugot smēķēšanas stāžam statistiski ticami pieaug FoxP3⁺ T limfocītu skaits. CD4⁺CD25⁺ T limfocīti, kas ekspresē transkripcijas faktoru FoxP3⁺ tiek saukti par T regulatorajiem limfocītiem. Šīm šūnām ir liela nozīme tolerances uzturēšanā un imūnsistēmas homeostāzes nodrošināšanā (Sakaguchi, 2008). FoxP3⁺ T regulatoro šūnu attīstību kontrolē FoxP3⁺ transkripcijas faktors (Sakaguchi, 2008). FoxP3⁺ ekspresējošās T regulatorās šūnas nomāc citu imūno šūnu, piemēram, CD4⁺ T limfocītu un CD8⁺ T limfocītu, galētajšūnu, B limfocītu, dendrītisko šūnu un makrofāgu aktivitāti, citokīnu produkciju un proliferāciju. Minētais apstiprināts pētījumos gan *in vivo* gan *in vitro* (Miyara, 2001; Langier, 2010). Mūsu pētniecības grupas veiktajos senākos pētījumos tika konstatēts, ka lielajos elpceļos ir palielināts FoxP3⁺ T regulatoro limfocītu daudzums gan smēķētājiem ar HOPS, gan smēķētājiem bez HOPS salīdzinot ar nesmēķētājiem, kā arī tika novērota pozitīva korelācija starp FoxP3⁺ T regulatoro limfocītu daudzumu lielajos elpceļos un smēķēšanas stāžu. Savukārt HOPS pacientiem mazajos elpceļos tika konstatēts samazināts FoxP3⁺ T regulatoro limfocītu daudzums salīdzinājumā ar smēķētājiem ar normāliem plaušu funkcionālajiem rādītājiem un nesmēķētājiem, kā arī netika atklāta korelācija starp FoxP3⁺ T regulatoro limfocītu skaitu un nosmēķēto pakģadu daudzumu (Isajevs, 2009). Arī citu autoru pētījumi parāda, ka smēķējošo indivīdu BAL, ar normāliem plaušu ventilācijas funkciju rādītājiem, ir lielāks T regulatoro limfocītu skaits, salīdzinot ar nesmēķētājiem, bet pacientu plaušās ar HOPS un emfīzēmu ir samazināts FoxP3⁺ T regulatoru limfocītu skaits (Barcel, 2008). Smyth J.C. veiktais pētījums atspoguļo, ka hroniska cigarešu smēķēšana, bez elpceļu obstrukcijas, palielina CD4⁺ T regulatoro limfocītu daudzumu (Smyth, 2007). Šie rezultāti sakrīt ar mūsu iegūtajiem datiem. Iespējams, ka T regulatorie limfocīti regulē smēķēšanas izraisītās pārmaiņas elpceļos arī smēķētājiem ar nelielu smēķēšanas stāžu, mazinot imūnās sistēmas aktivitāti un ar to saistītos audu bojājumus.

Paliek atklāts jautājums kuram no smēķētājiem iepriekš aprakstītās pārmaiņas izraisīs HOPS, jo tikai daļai no smēķētāju attīstās minētā slimība. Acīmredzot HOPS attīstību nosaka vides faktori mijiedarbībā ar ģenētisku predispozīciju. Ir noskaidroti HOPS attīstības iespējamie kandidatģeni, piemēram, ģēni, kas ir atbildīgi par iekaisuma mediatoru izdalīšanos, kas nosaka proteāžu – antiproteāžu produkciju, u.c. Tā kā HOPS ir kompleksa slimība, tad atsevišķu patoģenētisku pārmaiņu noskaidrošana vēl

nedod pilnvērtīgu ieskatu slimības izcelsmē. Tādēļ pilnveidojām pētījumu, veicot četru zināmo HOPS kandidātģēnu viena nukleotīda polimorfismu novērtēšanu smēķējošiem un nesmēķējošiem jauniešiem, kā arī sasaistot iegūtos rādītājus ar plaušu ventilācijas funkciju rādītājiem un imūnās sistēmas šūnām inducētajās krēpās.

6.3. HOPS kandidātģēnu polimorfismi, to asociācija ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem un pārmaiņām inducētajās krēpās

Salīdzinot mūsu izvēlēto četru iespējamo kandidātģēnu viena nukleotīda polimorfismus starp HOPS un kontroles grupu kopumā (smēķētājiem un nesmēķētājiem), *CHRNA3/5* ģēnā esošais polimorfisms rs1051730 tika statistiski būtiski asociēts ar HOPS, $p=0,04$. Ņemot vērā to, ka $OR>1$, retāk izplatītā alēle A veicina HOPS attīstību. Kā arī šīs alēles frekvence ir lielāka HOPS pacientu grupā nekā kontroles grupā. Pārējo ģēnu – *CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1* polimorfismi neuzrādīja būtisku asociāciju ar HOPS. SNP *CHRNA3/5* ģēnā var palielināt elpceļu obstrukcijas risku arī tiem, kuri nekad nav smēķējuši (Wilk, 2012). Polimorfisms šajā ģēnā kodē divas apakšvienības nikotīnskābes acetilholīna receptorā, kas var veicināt nikotīna atkarības veidošanos, ja cilvēks sāk smēķēt (Jaworowska, 2011).

Mūsu pētījumā novērtējām sakarību starp četru pētāmo ģēnu viena nukleotīda polimorfismiem un plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem (FEV_1 , % FVC, % un FEV_1/FVC , %). Mūsu pētījumā konstatējām, ka nav asociācija starp *AGPHD1*, *CHIT1* un *IREB2* ģēna viena nukleotīda polimorfismiem ar plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem. Asociāciju konstatējām *CHRNA3/5* ģēna polimorfisma gadījumā. Homozigotiem smēķētājiem ar abām riska alēlēm (A/A) bija būtiski zemāks FEV_1 , % un FVC, % nekā heterozigotiem (A/G) un homozigotiem (G/G), kas nav riska alēļu nēsātāji. Minētais sakrīt ar literatūras datiem. Zhang *et. al.* apvienoja vairāku pētījumu datus, kopumā ietverot 3460 HOPS pacientus un 11437 kontroles grupas individuus. Tika konstatēts, ka *CHRNA3/5* ģēna polimorfisma rs1051730 A alēle ir saistīta ar paaugstinātu HOPS attīstības risku, neatkarīgi no smēķēšanas paraduma, $p<10^{-5}$ un $OR=1.26$. Turklāt AA genotips, salīdzinot ar GG genotipu, uzrādīja statistiski nozīmīgu asociāciju ar samazinātu FEV_1 , %, $p = 0,009$ un biežāku emfizēmas risku $p=0.001$ (Zhang, 2011). Asociāciju konstatējām arī *CHIT1* ģēna polimorfisma

gadījumā. Homozigotiem (A/A) pētījuma dalībniekiem ar abām riska alēlēm bija būtiski zemāks FVC, % nekā homozigotiem (C/C), kas nav riska alēļu nēsātāji. *Aminuddin et. al.* pētījumā ticami tika pierādīta sakarība starp *CHIT1* gēna polimorfismu un strauju FEV₁ funkciju samazināšanos Eiropēidās rases pārstāvjiem (p=0.008), īpaši AC alēļu genotipā, salīdzinot ar CC un AA genotipā salīdzinot ar CC. Līdzīgi arī mūsu iegūtie rezultāti apstiprina plaušu ventilācijas funkcijas samazināšanos. (Aminuddin, 2012).

Novērtējot sakarību starp četru pētāmo gēnu polimorfismiem un imūnās sistēmas šūnām inducētajās krēpās konstatējām, ka gados jauniem smēķētājiem ar *AGPHDI* viena nukleotīda polimorfismu, kas ir abu vai vienas riska alēļu nēsātāji (C/C; C/T) inducētajās krēpās ir palielināts neitofilo leukocītu, T regulatoro un CD8⁺ T limfocītu skaits. Minētās šūnas liecina par iekaisuma attīstību. Norvēģijā veikta pētījuma dati liecina par *AGPHDI* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs8034191, attiecīgi, C alēles (p<0.0001), būtisku asociāciju ar HOPS. Polimorfisma izredžu attiecība (OR) ir lielāka par vienu, kas liecina par tā asociāciju ar HOPS. Tas tiek skaidrots ar nikotīna atkarības veidošanos un to, ka smēķētājiem, kuriem ir grūtāk atmet smēķēšanu, var vēl vairāk palielināties HOPS attīstības risks (Pillai, 2009). Arī *Kim. et al.* veiktajā pētījumā *AGPHDI* gēna viena nukleotīda polimorfisms uzrādīja būtiskas asociācijas ar HOPS smēķētāju grupā, kuriem bija konstatēta nikotīna atkarība (rs8034191). Kā arī tika konstatētas *AGPHDI* gēnu SNP būtiska asociācija ar emfizēmu HOPS un bijušo smēķētāju grupā (p<0.05) (Kim, 2011).

Konstatējām, ka pētījuma dalībniekiem ar *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfismu, kas ir abu vai vienas riska alēļu nēsātāji (A/A; A/C) krēpās ir palielināts neitrofilo leukocītu un makrofāgu skaits. *Aminuddin et. al.* pētījumā konstatēja, ka *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisms ir raksturīgs pacientiem ar HOPS (Aminuddin, 2012). Četri mūsu pētījumā iekļautie jaunieši bija homozigoti retākās alēlēs nēsātāji, bet 22 heterozigoti, pieļaujam, ka šie pētījuma dalībnieki smēķēšanas gadījumā varētu būt pakļauti lielākam HOPS attīstības riskam, par ko liecina arī palielinātais iekaisuma šūnu daudzums inducētajās krēpās.

Novērtējot *CHRNA3/5* viena nukleotīda polimorfisma asociāciju ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās, vērā ņemamu šūnu pieaugumu nekonstatējām. Atšķirībā no mūsu

rezultātiem, Norvēģijā veiktā pētījuma dati liecina par *CHRNA3/5* gēna viena nukleotīda polimorfisma rs1051730 būtisku asociāciju ar HOPS, kas tiek skaidrots ar nikotīna atkarības veidošanos (Pillai, 2009). Arī *Kim. et al.* veiktajā pētījumā tika konstatētas *CHRNA3/5* gēna SNP būtiska asociācijas ar plaušu emfizēmu HOPS pacientiem (Kim, 2011). Vēl vienā pētījumā, kas tika veikts Ķīnā, polimorfisms rs1051730 (G>A), neuzrādīja genotipa asociāciju ar HOPS, $p>0.05$ (Yang, 2012).

Novērtējot *IREB2* viena nukleotīda polimorfisma asociāciju ar imūnajām šūnām inducētajās krēpās, vērā ņemamu šūnu pieaugumu nekonstatējām. Mūsu iegūtie rezultāti gan uzrāda pārmaiņas starp atsevišķām grupām, kas varētu norādīt uz eozinofīlo leukocītu un T regulatoro limfocītu pieaugumu, bet dati nav īsti saprotami un grūti pamatojami. Pētītais gēns kodē dzelzi saistošo proteīnu, kas piedalās dzelzs homeostāzes nodrošināšanā. Pārmaiņas dzelzs homeostāzē var būt nozīmīgs oksidatīvā stresa veidošanās mehānisms. *IREB2* proteīna ekspresija, ko veicina cigarešu smēķēšana, pastiprina dzelzs uzkrāšanos plaušās (Chappell, 2011).

7. SECINĀJUMI

1. Neliels smēķēšanas stāžs (0,15 – 9 pakgadi) neietekmē plaušu ventilācijas funkcijas rādītājus (FEV_1 , %, FVC, %, FEV_1/FVC , %).
2. Jauniem smēķētājiem, pieaugot smēķēšanas stāžam, inducētajās krēpās pieaug neitrofilo leukocītu, eozinofilo leukocītu, T regulatoro limfocītu un $CD8^+$ T limfocītu daudzums, kas norāda uz pastiprinātu imūno reakciju.
3. Paralēli imūnajām reakcijām pieaug T regulatoro limfocītu skaits inducētajās krēpās, kas iespējams ierobežo $CD8^+$ T limfocītu citotoksisko iedarbību.
4. No četriem HOPS kandidātģēniem (*CHIT1*, *IREB2*, *AGPHD1*, *CHRNA3/5* viena nukleotīda polimorfismiem – rs2494303, rs2656069, rs8034191, rs1051730) ar HOPS būtiski asociējas *CHRNA3/5* gēna polimorfisms rs1051730.
5. Individīdiem *CHRNA3/5* un *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfisma gadījumā ir zemāki plaušu ventilācijas funkcijas rādītāji.
6. Gados jauniem smēķētājiem ar *AGPHD1* gēna viena nukleotīda polimorfismu, kas ir abu vai vienas riska alēļu nēsātāji (C/C; C/T) ir raksturīgs iekaisums elpceļos ar neitrofilo leukocītu dominanci.
7. Individīdiem ar *CHIT1* gēna viena nukleotīda polimorfismu, kas ir abu vai vienas riska alēlēs nēsātāji (A/A; A/C) elpceļos ir raksturīgs iekaisums ar neitrofilo leukocītu un makrofāgu dominanci.
8. Jauniem indivīdiem ar mazu smēķēšanas stāžu un normāliem plaušu ventilācijas funkcijas rādītājiem ir konstatējamā pārmaiņas inducēto krēpu imūno šūnu spektrā, kas liecina par agrīnu iekaisuma reakciju un minētās pārmaiņas ir saistītas ar HOPS kandidātģēnu polimorfismiem.

8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Akbari O, Stock P, DeKruyff HR. et. al. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Opinion in Immunology* 2003; 15:627-633.

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. et. al. Increased amounts of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6:1268-1370.

Aminuddin F, Akhabir L, Stefanowicz D, et. al. Genetic association between human chitinases and lung function in COPD. *Hum Genet* 2012; 131(7):1105-1114.

Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Lofdahl CG, Erjefalt JS. Alterations in lung mast cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:206-217.

Aoshiha K., Nagai A. Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. *Tob Induc Dis* 2003; 15:(3):219-226.

Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2010; 34:258-65.

Balmes J, Becklake M, Blanc P et. al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:787-797.

Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allerg Clin Immunol* 2002; 109(3):393-400.

Barcel. B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agusti AG. Phenotypic characterization of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J.* 2008; 31:555-62.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-1071.

Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 2000; 343:269-280.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22:672-688.

Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:6-14.

- Barnes PJ.** New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1055–1062.
- Barnes PJ.** Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:183-192.
- Barnes PJ.** The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41:631-638.
- Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M.** Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 173:771-774.
- Belda J, Leigh R, Parameswarn K, O'Byrne PM, Sears MR, Hhargreave FE.** Induced Sputum Cell Counts in Healthy Adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 16(2):475-478.
- Bhowmik A, et. al.** Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 1998; 53(11):953-956.
- Borrill ZL, Roy K, Vessey RS, Woodcock AA, Singh D.** Non-invasive biomarkers and pulmonary function in smokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008; 3(1): 171–83.
- Bossé Y.** Updates on the COPD gene list. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2012; 7:607-631.
- Boyd CM, Darer J, Boult C, et. al.** Clinical practice guidelines and quality of care for older patients with multiple comorbid diseases: implications for pay for performance. *JAMA* 2005; 294:716-724.
- Brinkman GL.** The mast cell in normal human bronchus and lung. *J Ultrastruct Res* 1968; 23:115-123.
- Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, et al.** Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* 2005; 6:14.
- Cederbom L, Hall H, Ivars F.** CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:1538-1543.
- Chapell LS, Daly L, Lotya J, et. al.** The role of IREB2 and transforming growth factor beta-1 genetic variants in COPD: a replication case-control study. *BMC Med Gen* 2011; 12:24.

- Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al.** Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76.
- Cerveri I, Corsico AG, Accordini S, et al.** Underestimation of airflow obstruction among young adults using FEV1/FVC>70% as a fixed cut-off a longitudinal evaluation of clinical and functional outcomes. *Thorax* 2008; 63:1040-1045.
- Chu F, Utokaparch S, Butazu L, et. al.** The nature of airway obstruction in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:A874.
- Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL.** Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Crit Care Med* 2002; 166(6):849-854.
- Cosio MG, Sietta M, Agusti A,** Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445–2454.
- Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Ruhle KH, Matthys H.** Alteration in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90:39-44.
- Culpitt SV, et. al.** Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:24-31.
- Dālmāne A.** *Histoloģija*, LU Akadēmiskais apgāds 2004, 70.-87.lpp.
- Decramer M, Rennard S, Troosters T, et. al.** COPD as a lung disease with systemic consequences-clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention. *COPD* 2008; 5:235-256.
- Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, et. al.** Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006; 117:289-300.
- Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, et. al.** Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:998–1005.
- DeMeo LD, Mariani T, Bhattacharya S, et. al.** Integration of Genomic and Genetic Approaches Implicates IREB2 as a COPD Susceptibility Gene. *Am J Hum Genet* 2009; 85:493-502.
- Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, Mapp CE, Ciaccia A, Covacev L, Fabbri LM, et. al.** Upregulation of adhesion molecules in the

bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:803-810.

Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1277-1285.

Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, et al. Increased expression of NF-kB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:556-563.

Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24:78-85.

Dippolito R, Foresi A, Chetta A, Castagnaro A, Malorgio R, Marangio E, Olivieri D. Eosinophils in induced sputum from asymptomatic smokers with normal lung function. *Respir Med* 2001; 95(12):969-974.

Edwards R. The problem of tobacco smoking. *BMJ* 2004; 328:21-219.

Eriksen M, Mackay J, Ross H. The Tobacco Atlas 4th Edition. American Cancer Society and Worls Lung Foundation. 2012

Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet* 2007; 370:797-799.

Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, et. al. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:204-212.

Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1666-1672.

Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:240-247.

Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1:1645-1648.

Fontenot JD, Rudensky AY. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin Immunol* 2004; 16:73-80.

- Gadgil A, Duncan SR.** Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J of COPD*. 2008; 3(4):531-41.
- Galvan A, Dragani AT.** Nicotine dependence may link the 15q25 locus to lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 2010; 31(3):331-333.
- Germain RN.** T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:309-322.
- Ghio AJ, Hilborn ED, Stonehuerner JG, Dailey LA, Carter JD, Richards JH, Crissman KM, Foronjy RF, Uyeminami DL, Pinkerton KE.** Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1130–1138.
- Gleich GJ.** Mechanisms of eosinophil - associated inflammation. *J Allerg Clin Immunol* 2000; 105:651-663.
- Gopptu B, Ekeowa UI, Lomas DA.** Mechanisms of emphysema in α 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J* 2009; 34: 475-488.
- Gu M, Dong X, Zhang X, et. al.** Strong Association between Two Polymorphisms on 15q25.1 and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2012; 7(6):e37970.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et. al.** Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-667.
- Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, et. al.** Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet* 2010; 42:45-52.
- Hardie JA, Buist AS, Vollmer WM, Ellingsen I, Bakke PS, Morkve O.** Risk of over-diagnosis of COPD in asymptomatic elderly never-smokers. *Eur Respir J* 2002; 20:1117-1122.
- Hindorff AL, Sethupathy P, Junkins AH.** Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human disease and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(23):9362-9367.
- Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN.** Increased airway granzyme – b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD* 2006; 3:179-187.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et. al.** The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645-2653.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061.

Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25:250-258.

Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, Kratovska A. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J.* 2009; 33:61-67.

Jameson J, Witherden D, Havran WL. T – cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:349-353.

Jaworowska E, Trubicka J, Lener RM. et. al. Smoking Related Cancers and Loci at Chromosomes 15q25, 5p15, 6p22.1 and 6p21.33 in the Polish Population. *PLoS ONE*, 2011, 6(9):e25057.

Jordan TS, Spencer EM, Davies P. Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction. *Respirology* 2010; 15:623-628.

Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; 9:1215-1223.

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, et al. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530-534.

Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:449-453.

Kim KD, Hersh PC, Washko RG, et.al. Epidemiology, radiology and genetics of nicotine dependence in COPD. *Respir Res* 2011; 12:9.

Kohansal R, Martinez-Camlor P, Agusti A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J respir Crit Care Med* 2009; 180:3-10.

Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 2006; 315:13-34.

- Kuby J, Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA.** Immunology 4th ed. 2000. W.H Freeman and Company, 670.
- Kumara V, Sharma A.** Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol* 2010; 48:14-25.
- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD.** Dose – dependent cigarette smoking – related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Resp J* 1996; 9:1989-1994.
- Lambrechts D, Buyschaert I, ZanenP, et. al.** The 15q24/25 Susceptibility Variant for Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:486-493.
- Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, et. al.** COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest* 2011; 139:752-763.
- Larosa DF, Orange JS.** 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:S364-369.
- Larsson K.** Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *J Intern Med* 2007; 262(3):311-340.
- Lazaar AL, Plotnick MI, Kucich U, Crichton I, Lotfi S, Das SK, et. al.** Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol* 2002; 169(2):1014-1020.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R.** Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. *J Dent Res* 2011; 91(2):142-149.
- Lee YJ, Yoo SS, Kang GH, et. al.** A Functional Polymorphism in the CHRNA3 Gene and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Korean Population. *J Korean Med Sci*, 2012, 27:1536-1540.
- Lieberman J.** The ABCs of granule mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:361-370.
- Liepa I.** Biometrija. 1974, Rīga, Zvaigzne, 339.
- Liu CC, Young LH, Young JD.** Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *Nengl J Med*. 1996; 335(22):1651-9
- Liu H, Hu B, Xu D, et al.** CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 2003; 171:5012-5017.

- MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC.** The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321(14):924-928.
- Majo J, Ghezzi H, Cosio MG.** Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17:946-953.
- Martin TR, Frevert CW.** Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:403-411.
- Matheson MC, Benke G, Raven J, et. al.** Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60:645-651.
- Medzhitov R, Janeway Jr C.** Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-344.
- Mills KH.** Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004; 4:841-855.
- Milojevic D, Nguyen K, Wara D. et.al.** Regulatory T cells and their role in rheumatic diseases: a potential target for novel therapeutic development. *Pediatric Rheumatology*, 2008, 6:20.
- Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Zmoura Z.** Human FoxP3+ regulatory T cells in systematic autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2011; 10:744-55.
- Molfino NA.** Genetics of COPD. *Chest* 2004; 125:1929-1940.
- Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, et al.** T-cell mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004; 3:35-42.
- Mortaz E.** ATP and the pathogenesis of COPD. *European Journal of Pharmacology* 2010; 63:81-84.
- Mortaz E, Folkerts G, Redegeld F.** Mast cells and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24:367-372.
- Mosmann TR, Li L, Sad S.** Functions of CD8 T – cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 1997; 9:87-92.
- Nelson ME, O'Brien-Ladner AR, Wesselius LJ.** Regional variation in iron and iron-binding proteins within the lungs of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1353-1358.
- Normunds Jurka.** Smēķēšanas ietekme uz hroniska iekaisuma būtiskām pazīmēm ierosinātajās krēpās un asinīs slimniekiem ar obstruktīvām plaušu patoloģijām. Disertācija. 2006.

O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006; 61:448–54.

Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:1294-1309.

O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-857.

Pillai GS, Ge D, Zhu G, et. al. A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci. *PLoS Genet* 2009; 5(3):e1000421.

Pin I, et. al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47(1):25-29.

Pizzichini E, et. al. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20(37):9-18.

Polverino F, Baraldo S, Bazzan E, et al. A novel insight into adaptive immunity in chronic obstructive pulmonary disease: B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1011-1019.

Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 1999; 13:1109-1114.

Punturieri A, Filippov S, Allen E, et. al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K – deficient human macrophages. *J Exp Med* 2000; 192:789-800.

Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systematic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1055-1060.

Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43(1):167-188.

Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28:219-242.

Rahman I. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1822(5):714-728.

- Repine JE, Bast A, Lankhorst I.** Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-357.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, et. al.** Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:469-473.
- Reuter S, Taube C.** Mast cells and the development of allergic airway disease. *J Occup Med Toxicol* 2008; 1(3):S2.
- Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA.** Eosinophil fibroblast interactions granule major basic protein interacts with interleukin – 1 and transforming growth factor – b in the stimulation of lung fibroblast interleukin 6 – type cytokine production. *J Immunol* 1996; 156:4449-4456.
- RufinoR, Costa CH, Souza HS, Madi K, Silva JR.** Induced sputum and peripheral blood cell profile in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.*2007; 33(5):510-8.
- Russell EK, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et. al.** Macrophage mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Lung Physiol* 2002; 283(4): L867-L873.
- Saccone LN, Saccone FS, Hinrichs LA, et. al.** Multiple Distinct Risk Loci for Nicotine Dependence Identified by Dense Coverage of the Complete Family of Nicotinic Receptor Subunit (CHRN) Genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Gene*, 2009; 150B(4):453-466.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al.** CD8+ T lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:822-826.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al.** CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711-717.
- Sakaguchi S.** Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-352.
- Salvi SS, Barnes PJ.** Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet.* 2009; 374:733-743.

- Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, et. al.** Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276:37672-37679.
- Seibold AM, Donnelly S, Solon M, et. al.** Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(5):944-950.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ.** How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998; 10:581-587.
- Smyth LJC, Starkey C, Vestbo J, Singh D.** CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest.* 2007; 132(1):156-63.
- Sorheim IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL.** Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax* 2010; 65:480-485.
- Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al.** Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax.* 1996; 51:267-71.
- Tang Q, Bluestone JA.** The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9:239-244
- Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF.** Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4):1441-7.
- Tetley TD.** Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4:607-18.
- Torres-Duque C, Maldonado D, Perez-Padilla R, Ezzati M, Viegi G.** Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:577-590.
- Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE.** Elevated levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* 2002; 57:590-595.
- Trupin L, Earnest G, San Pedro M, et. al.** The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:462-469.

Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, Kyriakou D, Tsiligianni J, Bouros D, et. al. Induced sputum CD8⁺ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2004; 98:57-65.

Tzortzaki EG, Tsoumakidou M, Makris D, Siafakas NM. Laboratory markers for COPD in “susceptible” smokers. *Clin Chim Acta* 2006; 364(1-2):124-138.

Tzortzaki GE, Papi A, Neofytou E, et. al. Immune and Genetic Mechanisms in COPD: Possible Targets for Therapeutic Interventions. *Curr Drug Targets,* 2013; 14:141-148.

Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, et al. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 2002; 168:782-792.

van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, et. al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758.

Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* 2006; 129:1673-1682.

Veiga da Cunha M, Hadi F, Balligand T, et. al. Molecular Identification of Hydroxylysine Kinase and of Ammoniophospholyases Acting on 5-Phosphohydroxy-L-lysine and Phosphoethanolamine. *J Biol Chem* 2012; 287:7246-7255.

Venge P, Bystrom J, Carlson M. et. al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allerg* 1999; 29:1172-1186.

Wan YY, Flavell RA. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:271-276.

Weissler A, Mekori YA, Mor A. The role of mast cells in non-allergic inflammation. *Isr Med Assoc J* 2008; 10:843-845.

Wen Y, Reid DW, Zhang D, Ward C, Wood-Baker R, Walters EH. Assessment of airway inflammation using sputum, BAL, and endobronchial biopsies in current and ex-smokers with established COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010; 5:327-334.

Wilk BJ, Shrine GRN, Loehr RL, et. al. Genome-Wide Association Studies Identify CHRNA5/3 and HTR4 in the Development of Airflow Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:622–632.

Wraith CD, Nicolson SK, Whitley TN. Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16:695-701.

Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, et. al. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131:1557-1566.

Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, et. al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291:L46-57.

Zar JH. Biostatistical analysis . 4th ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data, ed. S.L. Snavely. 1999, New Jersey 07458 USA: Prentice-Hall, Inc. Somon&Schuster, A Viacon Company, 663.

Zhang J, Summah H, Zhu GY, et. al. Nicotinic acetylcholine receptor variants associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Respir Res* 2011; 12:158.

http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf; skat.
27.02.2014

<http://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/> skat.
25.08.2014

9. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTUS ATSPUGUĻOJOŠO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Agnese Kislina, Gunta Strazda, Līga Balode, Normunds Jurka, Uldis Kopeika, Sergejs Isajevs, Valentīna Gordjušina, Immanuel Taivans. Smēķēšanas izraisītu morfofunkcionālo pārmaiņu novērtējums elpceļos gados jauniem smēķētājiem. *LU Zinātniskie raksti, 773. sējums, Medicīna” 2011; 123-139.*

Agnese Kislina, Gunta Strazda, Līga Balode, Normunds Jurka, Zane Sinkevica, Sergejs Isajevs, Darja Isajeva, Valentina Gordjusina, Immanuel Taivans. Increased innate and adaptive immune response in induced sputum of young smokers. Apstiprināts publicēšanai 2014. gada 8. oktobrī. *Medicina (Kaunas).*

Gunta Strazda, Māris Bukovskis, Normunds Jurka, Agnese Kislina, Zanda Balode, Līga Balode, Sergejs Isajevs, Valentīna Gordjušina, Immanuel Taivans. Salbutamola, formoterola un ipratropija bromīda ietekme uz izelpotā slāpekļa oksīda daudzumu pacientiem ar bronhiālo astmu un veseliem indivīdiem. *LU Zinātniskie raksti, 773. sējums, Medicīna 2011; 139-151.*

Līga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Uldis Kopeika, Agnese Kislina, Māris Bukovskis, Marina Beinare, Valentīna Gordjušina, Immanuel Taivans. Lipoxygenase derived arachidonic acid metabolites in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas) 2012; 48(6):292-2.*

Līga Balode, Darja Isajeva, Gunta Strazda, Sergejs Isajevs, Agnese Kislina, Normunds Jurka, Maris Bukovskis, Uldis Kopeika, Valentina Gordjusina, Immanuel Taivans. Leikotriēna B4, lipoksīna A4 un FPRL-1 receptora ekspresija hroniskas obstruktīvas plaušu slimības paasinājuma fāzē. *LU Zinātniskie raksti, 788. sējums, Medicīna 2012; 76-86.*

10. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTU PREZENTĀCIJAS KONFERENCĒS

European Respiratory Society Annual congress 2012 in Vienne, Austria, September 1–5, 2012 – **Agnese Kislina, Gunta Strazda, Liga Balode, Zane Sinkevica, Normunds Jurka, Sergejs Isajevs, Darja Isajeva, Valentina Gordjusina, Immanuels Taivans.** Evaluation of cell spectrum in induced sputum of young cigarette smokers.

Latvijas Universitātes 70. Zinātniskā konference, 2. februāris, 2012 – **Agnese Kislina, Gunta Strazda, Līga Balode, Zane Sinkeviča, Normunds Jurka, Uldis Kopeika, Immanuels Taivans.** Limfocītu šūnu spektra novērtējums smēķējošu un nesmēķējošu jauniešu ierosinātajās krēpās.

11th European Respiratory Society Lung Science Conference. Estoril, Portugal, March 13 – 16, 2013 – **Līga Balode, Agnese Kislina, Gunta Strazda, Maris Bukovskis, Normunds Jurka, Liene Logina, Uldis Kopeika, Immanuels Taivans.** Volatile compounds of exhaled breath in lung cancer and lung inflammatory disease.

European Respiratory Society Annual congress 2011 in Amsterdam, Netherlands, September 24 – 28, 2011 – **Agnese Kislina, Gunta Strazda, Liga Balode, Marina Beinare, Normunds Jurka, Immanuels Taivans.** Evaluation of morpho-functional changes in airways of young cigarette smokers.

9th European Respiratory Society Lung Science Conference. Estoril, Portugal, April 1–3, 2011 – **Agnese Kislina, Gunta Strazda, Liga Balode, Marina Beinare, Normunds Jurka, Immanuels Taivans.** Evaluation of morpho-functional changes in airways of young cigarette smokers.

Latvijas Universitātes 69. Zinātniskā konference, 3. februāris, 2011 – **Agnese Kislina, Marina Beinare, Līga Balode, Normunds Jurka, Gunta Strazda, Immanuels Taivans.** Smēķēšanas izraisītu morfofunkcionālu pārmaiņu novērtējums elpceļos jauniešiem.

European Respiratory Society Annual congress 2012 in Vienne, Austria, September 1 – 5, 2012 – **Liga Balode, Agnese Kislina, Darja Isajeva, Sergejs Isajevs, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Uldis Kopeika, Maris Bukovskis, Immanuel Taivans.** Chronic obstructive pulmonary disease is characterized with suppressed lipoxin A₄ and increased receptor expression in lungs.

European Respiratory Society Annual congress 2013 in Barcelona, Spain, September 7 – 11, 2013 – **Gunta Strazda, Maris Bukovskis, Agnese Kislina, Liga Balode, Normunds Jurka, Ansis Pirtnieks, Jevgenija Aprinceva, Viesturs Silins, Immanuel Taivans.** Analysis of exhaled breath with electronic nose and discrimination of lung cancer and COPD by logistic regression analysis.

European Respiratory Society Annual congress 2013 in Barcelona, Spain, September 7 – 11, 2013 – **Immanuel Taivans, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Maris Bukovskis, Agnese Kislina, Liga Balode, Ansis Pirtnieks, Jevgenija Aprinceva, Liene Logina.** Volatile organic compounds of exhaled breath in lung cancer and lung inflammatory disease.

11. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājai Dr. biol., asoc. prof. Guntai Strazdai par neizsīkstošo atbalstu un palīdzību, vērtīgiem norādījumiem, iedrošinājumu un ticību darba realizēšanai.

Paldies Dr. biol. Normundam Jurkam par neatsveramo palīdzību analīžu veikšanā un datu statistiskā apstrādē.

Paldies Dr. habil. med., prof. Immanuelam Taivanam par vērtīgiem un konstruktīviem padomiem darba tapšanas gaitā.

Mīļš paldies Dr. med. Līgai Balodei par atbalstu, palīdzību un klātbūtni darba tapšanas gaitā.

Liels paldies Dr. med. Mārim Bukovskim un Dr. med. Uldim Kopeikam par uzmundrinājumu darba gaitā.

Paldies P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Pulmonoloģijas un alergoloģijas centra personālam – ārstiem un māsiņām – par palīdzību pacientu rekrutēšanā un vienmēr pozitīvo attieksmi.

Paldies Biomedicīnas pētījuma centra speciālistiem – Lienei Ņikitinai – Zaķei un Annai Sarbantovičai, bez kuru palīdzības promocijas darba ģenētiskie pētījumi nebūtu iespējami.

Pateicos Darjai Isajevai un Dr. med., doc. Sergejam Isajevam par palīdzību imūncitoloģisko analīžu veikšanā un vērtīgajiem padomiem darba tapšanā.

Paldies Dr. habil. med., asoc. prof. Valentīnai Gordjušinai par citoloģisko un histoloģisko preparātu bildēm un padomiem.