

LATVIJAS UNIVERSITĀTES
RAKSTI

712. SĒJUMS

Medicīna

SCIENTIFIC PAPERS
UNIVERSITY OF LATVIA

VOLUME 712

Medicine

SCIENTIFIC PAPERS
UNIVERSITY OF LATVIA
VOLUME 712

Medicine

LATVIJAS UNIVERSITĀTES
RAKSTI
712. SĒJUMS

Medicīna

UDK 61(082)

Me 082

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

Redkolēģija

Dr. habil. med. asoc. prof. **Igors Aksiks** (LU Medicīnas fakultāte)

Ph. D. prof. **Pēteris Alberts** (Zviedrija)

Dr. habil. med. **Juris Bērziņš** (Rīgas Austrumu slimnīca, Onkoloģijas centrs)

Ph. D. prof. **Irje Kollans** (Somija, Turku Universitāte)

Dr. habil. biol. prof. **Ruta Muceniece** (LU Medicīnas fakultāte)

Ph. D. prof. **Zaiga Priede-Kalniņš** (ASV)

Dr. habil. biol. prof. **Nikolajs Sjakste** (LU Medicīnas fakultāte)

Dr. habil. med. prof. **Immanuels Taivans** (LU Medicīnas fakultāte)

Dr. habil. med. prof. **Uldis Vikmanis** (LU Medicīnas fakultāte)

Dr. habil. med. prof. **Aija Žileviča** (LU Medicīnas fakultāte)

Literārie redaktori: **Ruta Puriņa, Gita Bērziņa, Māra Anteniške**

Maketu veidojis **Jānis Misiņš**

Visi krājumā ievietotie raksti ir recenzēti.

Pārpublicēšanas gadījumā nepieciešama Latvijas Universitātes atļauja.

Citējot atsauksme uz izdevumu obligāta.

ISSN 1407-2157

ISBN 978-9984-802-44-2

© Latvijas Universitāte, 2007

Saturs

Contents

Svetlana Kozireva, Modra Murovska, Sandra Lejniece, Irina Kholodnyuk Chemokine Receptor's Genes Expression in T-Cell Lines Derived from Patients with Hematological Malignancies <i>Hemokīnu receptoru gēnu ekspresija T-šūnu līnijās, kas iegūtas no slimniekiem ar hematoloģiskām malignitātēm</i>	7
K. Bernarde, I. Folkmane, S. Čapenko, M. Murovska, R. Rozentals The Impact of Early Cytomegalovirus (CMV) Infection and CMV Disease on Long-Term Kidney Allograft Function and Late Complications after Kidney Transplantation: a Clinical Study <i>Agrīnas citomegalovīrusa (CMV) infekcijas un CMV slimības ietekme uz nieres transplantāta funkciju un vēlīnām komplikācijām pēc nieres transplantācijas: klīniskais pētījums</i>	13
A. Sultanova, S. Čapenko, Z. Nora, S. Doniņa, M. Murovska Imūnsupresija kā β -herpesvīrusu aktivācijas faktors pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs <i>Immunosuppression as Activation Factor of β-Herpesviruses in Patients with Digestive Cancer</i>	20
A. Krūmiņa, S. Čapenko, M. Murovska, L. Viksna HIV-1 izraisītā imūnsupresija kā latentu (persistentu) β -herpesvīrusu infekcijas aktivators <i>HIV-1 Associated Immunosuppression as Activator of Latent/Persistent β-Herpesviruses Infection</i>	25
Uldis Kalniņš, Milāna Zabunova, Sanda Jēgere Vai kardiovaskulāro komplikāciju risks ietekmē ārstēšanas stratēģijas izvēli pacientiem ar diagnozi „nestabilā stenokardija” vai ne-Q miokarda infarktu <i>Does the Risk of Cardiovascular Events Influence the Management Strategy in Patients with Unstable Angina or Non-Q-Wave Myocardial Infarction?</i>	31
Sergejs Isajevs, Jurijs Markovs, Gundega Knipše, Aija Žileviča Onkoproteīna BCL-2, citokeratīna 19 un S-100 ekspresija mandeļu šūnās hroniska tonsilīta pacientiem <i>Oncoprotein BCL-2, S-100 and Cytokeratin 19 Expression in Palatine Tonsils' Cells in Chronic Tonsillitis</i>	40
Arnolds Jezupovs, Tālis Kauliņš, Māris Mihelsons Pacientu individuāla agrīna sistēmiska iekaisuma reakcija uz polipropilēna protēzēm pēc cirkšņa trūču operācijām, tās izvērtējums <i>Individual Early Inflammation Reaction of Patients to Polypropylene Mesh after Groin Hernioplasties</i>	47
Maija Dzintare, Dainuvīte Meirena, Nikolajs Sjakste Slāpekļa oksīda nozīme cilvēka patoloģijā <i>The Role of Nitric Oxide in Human Pathology</i>	54
Sergejs Isajevs, Immanuels Taivans, Uldis Kopeika, Gunta Strazda Iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos HOPS pacientiem <i>Inflammatory Changes in Central and Peripheral Airways in COPD</i>	64
Reinis Balmaks, Jānis Freivalds, Pauls Pumpēns, Andris Kazāks Tumorasociēto antigēnu inkorporācija virusveidīgās daļiņās <i>Incorporation of Tumor-Associated Antigens in Virus-Like Particles</i>	76

Valentīna Gordjušina, Mārīte Ārija Baķe, Dagmāra Sprūdža Kadmija koncentrāciju noteikšana Latvijas iedzīvotājiem, kam ir dažādas patoloģijas <i>Detection of Cadmium Concentration of Inhabitants with Different Pathologies in Latvia</i>	80
Valentīna Gordjušina, Dagmāra Sprūdža, Māra Marauska, Mārtiņš Beķers Jaunais perspektīvais produkts – saldinātājs fruktāna sīrups <i>A New Prospective Product – Sweetener Fructan Syrup</i>	85
Aiga Stāka, Aldis Puķītis, Juris Pokrotņiņš Agrīna aizkuņģa dziedzera vēža diagnostika. Vai reāla? <i>Early Pancreatic Cancer Diagnostics. Is it Realistic?</i>	91
Jeļizaveta Sokolovska, Maija Dzintare, Tatjana Sjakste, Gustavs Latkovskis, Nikolajs Sjakste BBOX1 un eNOS gēna polimorfisma asociācija ar arteriālo hipertensiju Latvijas populācijā <i>Possible Association of the BBOX1 and eNOS Gene Polymorphism in the Latvian Population</i>	97
Jurijs Markovs, Maija Freda, Sergejs Isajevs, Baiba Rozentāle, Nadežda Bērziņa, Gundega Knipše The Role of TRPV1 in Iron Homeostasis – Implications to Hemosiderosis	116
J. Eglītis, U. Vikmani, A. Stengrēvics, O. Siņicka, L. Tihomirova Krūts un olnīcu vēža ģenētiskie riska faktori <i>Genetic Risk Factors of Breast and Ovary Cancer</i>	124
Dzintars Ozoliņš, Ilona Hartmane, Aija Žileviča Sifilisa seroloģisko diagnostikas metožu salīdzinājums <i>Comparison of Syphilis Diagnostics Methods</i>	133
Māra Kalniņa, Olga Koroļova, Aina Dālmāne Noslēpumainie mitohondriji <i>Mysterious Mitochondria</i>	142
Dainuvīte Meirena, Larisa Baumanē, Jeļena Šaripova, Lāsma Ļauberte, Maija Dzintare, Nikolajs Sjakste, Ivars Kalviņš Dažu flavonoīdu ietekme uz NO saturu žurku audos <i>The Influence of Baicalein, Luteolin and Myricetin on Nitric Oxide Level in Rat Tissues</i>	148
Maija Dzintare, Tatjana Sjakste, Nikolajs Sjakste Zināmie un iespējamie genoma aktivitātes regulācijas mehānismi <i>Established and Eventual Mechanisms of Epigenetic Transcription Regulation</i>	156
Maija Dzintare, Nikolajs Sjakste, Tatjana Sjakste DNS pārrāvumu noteikšanas metodes un to nozīme audzēju ķīmijterapijā <i>Methods of Detection of DNA Breaks and these Applications in Chemotherapy of Cancer</i>	173
E. C. Ratnayake, K. Geldnere, V. Pirāgs Prevalence of Different Diagnostic Criteria in Hospitalized Diabetic and Non-Diabetic Patients with Metabolic Syndrome and their Relationship to Waist Circumference and BMI Dažādu metabolā sindroma kritēriju izplatība hospitalizētiem pacientiem ar cukura diabētu bez tā kritēriju saistība ar vidukļa apkārtmēru un ķermeņa masas indeksu	188
Alinta Hegmane, Uldis Vikmanis HER-2/ <i>neu</i> – molekulārs marķieris ar prognostisku un prediktīvu vērtību krūts vēža gadījumā <i>HER-2/neu – Molecular Marker with a Prognostic and Predictive Value in the Case of Breast Cancer</i>	198

Chemokine Receptor's Genes Expression in T-Cell Lines Derived from Patients with Hematological Malignancies

Hemokīnu receptoru gēnu ekspresija T-šūnu līnijās, kas iegūtas no slimniekiem ar hematoloģiskām malignitātēm

Svetlana Kozireva¹, Modra Murovska¹, Sandra Lejniece², Irina Kholodnyuk¹

¹LU August Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Ratsupites Str. 1, LV-1067, Riga, Latvia, phone: 7-427920, fax: 7428036,

²National Center of Haematology, Medical Center „Linezers”

Corresponding author: Dr. Svetlana Kozireva,

e-mail: skozireva@lycos.com, skozireva@latnet.lv

The infiltration of leukemic cells into various organs such as the liver, spleen and lymph nodes is commonly observed in acute lymphocytic leukemia and is an important step in the development and prognosis of the disease. Chemokine and chemokine receptors are involved in the regulation of lymphocyte trafficking to intra- and interlymphoid tissues as well as to the site of inflammation. It has been observed that besides their physiological functions chemokine receptors might play an important role in the migration of leukemic cells. We investigated the expression of CC and CX chemokine receptors – CCR6, CCR9, CXCR4 and CXCR6/TIMSTR in T-ALL derived cell lines at mRNA level using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. All T-ALL cell lines expressed CXCR4, but their expression level was similar to those in normal T-cells. None of T-ALL cell lines were positive for CXCR6/TIMSTR. Expression of CCR6 was restricted to double-positive CD4⁺CD8⁺ T-ALL cell lines. Expression of CCR9 was up-regulated in almost all T-ALL cell lines. Therefore, CCR9 may be important in the manifestation and development of T-ALL, making it a potential target for the therapeutic modulation of this lymphoproliferative disorder.

Key words: T-cell acute lymphocytic leukemia, T-cell lines, chemokine receptors, gene expression, messenger RNA.

Introduction

Chemokines and their receptors play a critical and crucial role in immune responses (i.e. inflammation, haematopoiesis and angiogenesis). In addition to their role in inflammation, chemokines and chemokine receptors have recently been shown to play an important role in the homing of circulating lymphocytes to secondary lymphoid organs, e. g. lymph nodes and Peyer's patches, under physiological conditions. It is now established that a unique pattern of chemokine receptors expression may help define lymphocyte populations that differ in differentiation, activation stages and biological properties. There is accumulating evidence that apart from their physiological functions, chemokine receptors may also be involved in migration and dissemination of malignant haemopoietic cells. The acute lymphocytic leukemia (ALL) represents the malignant counterparts of normal lymphocytes arrested at specific stages of maturation. A common manifestation of ALL is infiltration of various organs, including the lymph nodes, spleen, lung, liver, intestinal

tract and even the brain by leukemic cells (1). Malignant lymphocyte migration into and from organs is an important aspect, since leukemic cells infiltration often causes serious clinical problems for patients, affecting the progression and prognosis of the disease (2).

CXCR6/BONZO/TIMSTR is an orphan chemokine receptor and HIV co-receptor that is expressed on activated T lymphocytes. In vitro polarized T cell subsets including Th1 and Th2 cells express functional TIMSTR, suggesting involvement of this receptor in chronic inflammation (3, 4). The chemokine receptor CCR6 expression has been found in B and T lymphocytes, but monocytes, eosinophils, and natural killer cells are negative. In T-cell population, CCR6 is restricted mainly to memory CD4⁺ subsets expressing $\alpha\beta 7$ integrin, the intestinal lymphocyte homing receptor (5). However, the physiological role of CCR6 is currently unknown. The chemokine receptor CXCR4 is expressed at all T-cell differentiation stages and may play a role in the migration of mature T-cells. This chemokine receptor is also involved in homing and mobilization of CD34 progenitors (6). The chemokine receptor CCR9 is expressed on most small intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes as well as on a small subset of peripheral blood lymphocytes. This chemokine receptor together with its ligand TECK efficaciously induces chemotaxis of immature CD4⁺CD8⁺ double positive and mature CD4⁺ and CD8⁺ single positive thymocytes, suggesting that TECK/CCR9 interaction play a pivotal role in T-cell migration in thymus (7, 8).

The present study was undertaken to investigate the involvement of chemokine receptors CXCR4, CCR6, CCR9 and TIMSTR in hematological malignancies, particularly in T-cell lineage ALL (T-ALL).

Materials and Methods

Cells and cell lines

In this study eight human T-cell lines, including six acute lymphoblastic derived cell lines and two HTLV-I-transformed cell lines, were used. All the cell lines were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum.

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from venous blood of healthy donors by the standard method using Ficoll-Paque (Amersham/Pharmacia Biotech, Sweden). The CD3⁺ T-cells were purified by incubation with magnetic beads coated with monoclonal antibodies against CD3 (Dynal, A. S.)

Tonsil mononuclear cells were isolated as described by Ryon *et al* (9) and T-cells were purified using neuraminidase-treated sheep RBCs.

Reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis (RT-PCR)

Total RNA was prepared from T-cells and T-cell lines using Trizol reagent (Invitrogen, UK). Total RNA was reverse transcribed using random hexamer primer (Invitrogen) and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, UK). Resulting first-strand DNAs were amplified in the final volume of 30 μ l containing 10 pmol of each primer and 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen, UK). The primers used were:

+5'-GGTACCAAATGACGCCGAG-3' and -5'-GCAGCCTGTACTT GTCCGTCAT-3' for CXCR4; +5'-AGTCACCTCTACTTCTCTG CTACCG-3' and -5'- ATCAAGGAGTAGGCAATCGGTACA-3' for CCR6; +5'-CAGCTCTTCCCCAGACACTGA-3' and -5'-GATGA ACACGAGCCAGTACAAGG-3' for CCR9 as well as +5'-TTGC TTCATGAGCAAGCTCATCT-3' and -5'-TGCAACTTATGGTA GAAGATGGATATGAC-3' for TIMSTR.

Primers for all chemokine receptors were chosen from different exons. Amplification conditions for CXCR4, CCR6, CCR9 and TIMSTR were 35 cycles and for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) – 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec (5 min for the first cycle), annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min (5 min for the last cycle). The duplex RT-PCRs were performed for semiquantitative analysis of chemokine receptors gene expression.

Results

Using eight human T-cell lines we examined the presence of chemokine receptors CXCR4, CCR6, CCR9 and TIMSTR in these cells at the messenger RNA (mRNA) level by RT-PCR. The results are shown in the Table 1 and Figure 1. Based on the expression of CD4 and CD8, all T-ALL cell lines were further divided into 3 groups: double-positive, double-negative and CD4⁺. HTLV-I-transformed T-cell lines were consistently CD4⁺.

Table 1

Expression of chemokine receptors genes in T-ALL cell lines

Cell type	Cell line	CXCR4	TIMSTR	CCR6	CCR9
Double-negative	CCRF-HSB2	P	N	N	P
Double-positive	HPB-ALL	P	N	P	P
	MOLT-3	P	N	P	P
	MOLT-4	P	N	P	P
CD4 ⁺	CCRF-CEM	P	N	N	N
	Jurkat	P	N	N	P
HTLV-I ⁺	C91/PL	P	N	N	N
	MT-2	P	N	P	P

P indicate positive; *N* indicate negative; *HTLV-I⁺* - HTLV-I transformed T-cell lines.

All T-ALL cell lines were found to express CXCR4 at a high level. HTLV-I transformed T-cell lines were also positive for CXCR4. Expression of CXCR4 was also observed in CD3⁺ T-cells from the peripheral blood of a healthy donor as well as in tonsil T-cells.

Expression of TIMSTR was observed only in tonsil T-cells. None of T-ALL cell lines was positive for TIMSTR. HTLV-I transformed T-cell lines also did not express this chemokine receptor.

Concerning CCR6, all double-positive T-ALL cell lines were positive, whereas double-negative and all CD4⁺ cell lines were negative. Expression of this chemokine receptor gene was also found in one HTLV-I-transformed T-cell line as well as in CD3⁺ T-cells and tonsil T-cells.

The presence of CCR9 mRNA was detected in almost all T-ALL cell lines. However, in double-positive CD4⁺CD8⁺ CCR9 expression was higher compared with double-negative T-ALL cell lines (Figure 1). T-ALL mature CD4⁺ cell lines expressed CCR9 moderately, whereas normal CD3⁺ cells expressed CCR9 rarely, and the level of expression was low. Therefore, CCR9 expression in all T-ALL cell line was up regulated but the highest CCR 9 expression level was in double-positive CD4⁺CD8⁺ cell lines. A high expression of CCR9 was observed also in one of HTLV-I-transformed cell lines (Figure 1)

Discussion

A coordinated multistep process is involved during lymphocyte homing into lymphoid organs under normal conditions. ALL is a malignancy with the potential to infiltrate

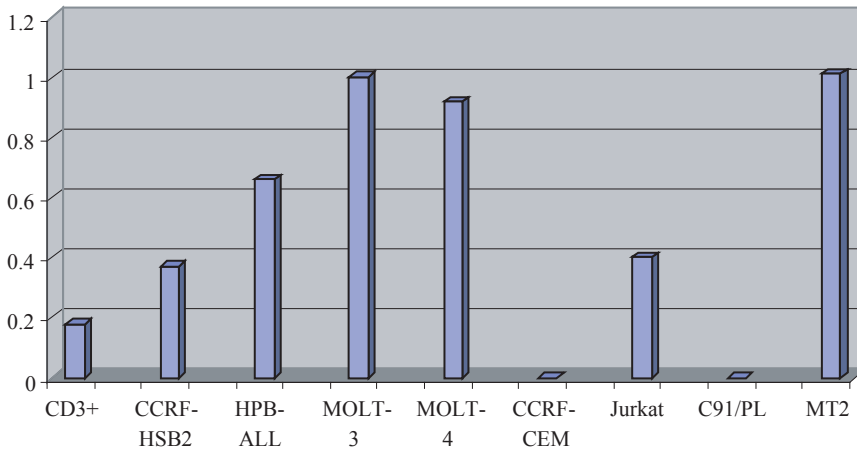


Figure 1. Semiquantitative analysis of CCR9 mRNA level in T-cell lines. The bars represent the signal intensity ratio between CCR9 and G3PDH. Representative results of two independent experiments.

the lung, lymph node, spleen and even the brain (10, 11). Observations on the increased migration of malignant lymphoblasts indicate the involvement of chemokine receptors and chemokines. Our data for the first time demonstrated that TIMSTR is not expressed in T-ALL and in HTLV-I-transformed cell lines. CXCR4 was highly expressed in all T-ALL cell lines, including double-positive $CD4^+CD8^+$, double-negative $CD4^+CD8^-$ and single positive $CD4^+$. The level of CXCR4 mRNA in double-positive cell lines was comparable to that of double-negative and single positive $CD4^+$ cell lines as well as to that of normal $CD3^+$ T-cells, suggesting that high expression of CXCR4 may be a common phenomena in normal and malignant T cells. However, it has been shown that CXCR4 together with its ligand SDF1 play an important role in influencing the localization of precursor B acute lymphoblastic leukemia cells within a bone marrow microenvironment (12). Therefore, we could not exclude the possible involvement of CXCR4 in the migration of T-ALL cells. Further studies are required to reach a final conclusion on this aspect.

We have also observed a high level of CCR9 mRNA in almost all examined T-ALL cell lines. This result is in agreement with those of Qiuping *et al* (13) who described the up regulation of CCR9 in $CD4^+$ and $CD4^+CD8^+$ T-cells from patients with T-ALL and allow suggesting that CCR9 is important for stimulation of T-ALL cell migration. It has been shown that CXCR4 binding to its ligand SDF1 regulates precursor B-cell lineage ALL survival and proliferation (12). CCR9 activation provides a cell survival signal (14). We documented that CCR9 is overexpressed on T-ALL cell lines and a logical implication may be that CCR9 and its ligands promote the survival or proliferation of T-ALL cells.

CCR6 expression is restricted to immature double-positive $CD4^+CD8^+$ T-ALL cells. It is possible to suggest that the restricted pattern of CCR6 expression could be a part of the process of T-cell maturation and differentiation. From another side, CCR6 could be involved in the migration and dissemination of double-positive $CD4^+CD8^+$ T-ALL cells.

In conclusion, we have demonstrated that T-ALL cell lines express abnormally high CCR9, high CXCR4 but do not express TIMSTR. CCR6 expression is restricted to double positive $CD4^+CD8^+$ T-ALL cells. This selectivity in expression of chemokine receptors in acute lymphoproliferative disorder implies the diversity of chemokine receptors in the

physiology and pathophysiology of the process of development of T-ALL. Taking into account the possible involvement of CCR9 and its ligands in supporting malignant cell proliferation, we conclude that our observations may have implications in considering the effect of cytokine therapy on the disease process.

References

1. Till K. J., Lin K., Zuzel M., Cawley J. C. The Chemokine Receptor CCR7 and $\alpha 4$ Integrin are Important for Migration of Chronic Lymphatic Leukemia Cells Into Lymph Nodes. *Blood*, 2002, 99: 2977–2984.
2. Hasegawa H., Nomura T., Kohno M., Tateishi N., Suzuki Y., Maed N., Fujisawa R., Yoshie O., Fujita S. Increased Chemokine Receptor CCR7/EB11 Expression Enhances the Infiltration of Lymphoid Organs by Adult T-Cell Leukemia Cells. *Blood*, 2000, 95: 30–38.
3. Wilbanks A., Zondlo S. C., Murphy K., Mak S., Soler D., Langdon P., Andrew D. P., Briskin M. Expression Cloning of the STRL33/BONZO/TIMSTR Ligand Reveals Elements of CC, CXC, and CX3C Chemokines. *J. Immunol.*, 2001, 166: 5145–5154.
4. Kim C. H., Kunkel E. L., Boisvert J., Johnston B., Campbell J. J., Genovese I., Greenberg H. B., Butcher E. C. Bonzo/CXCR6 Expression Defines Type 1-Polarized T-Cell Subpopulations with Extralymphoid Tissue Homing Potential. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107: 595–601.
5. Liao F., Rabin R. L., Smith C. S., Sharma G., Nutman T. B., Farber J. M. CC-Chemokine Receptor 6 is Expressed on Diverse Memory Subsets of T Cell and Determines Responsiveness to Macrophage Inflammatory Protein 3α . *J. Immunol.*, 1999, 162: 186–194.
6. Sallusto F., Mackay C. R., Lanzavecchia A. The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000, 18: 593–620.
7. Youn B. S., Kim C. H., Smith F., Broxmeyer H. E. TECK, an Efficacious Chemoattractant for Human Thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a Specific Receptor. *Blood*, 1999, 94: 2533–2536.
8. Papadakis K. A., Landers C., Prehn J., Kouroumalis E. A., Moreno S. T., Gutierrez-Ramos J. C., Hong M. R., Targan S. C. CC Chemokine Receptor 8 Expression Defines a Subset of Peripheral Blood Lymphocytes with Mucosal T-Cell Phenotype Th1 or T-Regulatory 1 Cytokine Profile. *J. Immunol.*, 2003, 171: 159–165.
9. Ryon J. Isolation of Mononuclear Cells from Tonsil Tissue. *Current Protocols in Immunology*, Unit 78, Colligan A., Kruisbuk D., Margulies M. ed. Wiley, New York, 1997.
10. Springer T. A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm. *Cell.*, 1994, 76: 301–314.
11. Crazzolara R., Kreezy A., Mann G., Heitger A., Eibl G., Fink F. M., Mohle R., Meister B. High Expression of the Chemokine Receptor CXCR4 Predicts Extramedullary Organ Infiltration in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Br. J. Haematol.*, 2001, 115: 545–553.
12. Qiuping Z., Qun L., Chunsong H., Xiaolian Z., Baojun H., Mingzhen Y., Chengming L., Jinshen H., Qingping G., Kejian Z., Zhimin S., Xuejun Z., Junyan L., Jinqun T. Selectively Increased Expression and Functions of Chemokine Receptor CCR9 on CD4⁺ T Cells from Patients with T-Cell Lineage Acute Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.*, 2003, 63: 6469–6477.
13. Brandstock K. F., Makrynikol V., Bianchi A., Shen W., Hewson J., Gottlieb D. J. Effect of the Chemokine Stromal Cell Derived Factor-1 on the Migration and Localization of Precursor B-Acute Lymphoblastic Leukemia Cells within Bone Marrow Stromal Layers. *Leukemia*, 2000, 14: 882–888.
14. Youn B. S., Kim Y. I., Mantel C., Yu K. Y., Broxmeyer H. E. Blocking of c-FLIP(L)-Independent Cycloheximide-Induced Apoptosis or Fas-Mediated Apoptosis by the CC Chemokine Receptor 9/TECK Interaction. *Blood*, 2001, 98: 925–933.

Kopsavilkums

Akūtu limfocitāro leikēmiju (ALL) kopīga izpausme ir dažādu orgānu infiltrācija. Leikēmisko šūnu migrācija uz un no orgāniem ir svarīgākais aspekts šīs asins sistēmas ļaundabīgās slimības patoģenēzē, jo leikēmisku šūnu infiltrācija bieži izraisa nopietnas klīniskas problēmas pacientiem, ietekmējot slimības gaitu un prognozi. Hemokīniem un hemokīnu receptoriem ir nozīmīga loma angiogēnēzē,

limfopoēzē, asinsradē un iekaisuma procesā. Turklāt ir parādījušies dati, ka hemokīnu receptori var piedalīties leukēmisko šūnu migrēšanā un izplatībā. Mēs pētījām CC- un CX- hemokīnu receptoru CXCR4, CXCR6/TIMSTR, CCR6 un CCR9 ekspresiju mRNS līmeni T-ALL šūnu līnijās, lietojot apgrieztais traskriptāzes polimerāzes ķēdes reakciju. Rezultāti parādīja, ka hemokīna receptors TIMSTR neekspresējas nevienā no T-ALL šūnu līnijām. Savukārt, CXCR4 ekspresija bija konstatēta visās T-ALL šūnu līnijās, bet CXCR4 ekspresijas līmenis šajās šūnu līnijās neatšķīrās no ekspresijas līmeņa normālās CD3⁺ T-šūnās. CCR6 ekspresija bija novērota tikai dubultpozitīvās CD4⁺CD8⁺ T-ALL šūnu līnijās. CCR9 ekspresiju atrada visās T-ALL šūnu līnijās un ekspresijas līmenis šajās šūnās bija augstāks nekā normālās CD3⁺ šūnās. Visaugstākais CCR9 ekspresijas līmenis bija konstatēts dubultpozitīvās T-ALL šūnu līnijās. Tādējādi, var secināt, ka CCR9 ir svarīgākā loma šajā T-šūnu asins sistēmas ļaundabīgajā slimībā un tas var tikt lietots kā mērķis modulēšanas terapijā.

The Impact of Early Cytomegalovirus (CMV) Infection and CMV Disease on Long-Term Kidney Allograft Function and Late Complications after Kidney Transplantation: a Clinical Study

Agrīnas citomegalovīrusa (CMV) infekcijas un CMV slimības ietekme uz nieres transplantāta funkciju un vēlīnām komplikācijām pēc nieres transplantācijas: klīniskais pētījums

K. Bernarde, I. Folkmane, S. Chapenko¹, M. Murovska¹, R. Rozentals

Latvian Center of Renal Transplantation, Riga Stradins University

¹August Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, University of Latvia

Cytomegalovirus (CMV) and acute rejection (AR) are suggested as risk factors for the development of chronic allograft nephropathy (CAN) in patients undergoing renal transplantation (RT). The aim of this study was to evaluate the incidence of latent/persistent CMV infection, CMV disease and AR rate during the first three months after RT in the patients with CAN beyond three months after RT. The demographic data of recipients and donors, immunosuppressive treatment after RT, AR rate, donor/recipients CMV serological status using MEIA, CMV activation using nPCR and CMV disease in 19 recipients with CAN and 20 recipients with normal kidney allograft function were analysed.

There were no significant differences between the primary diagnosis, modality and duration of dialysis, causes of donor death and mean cold ischemia time in recipients. The mean age of CAN patients was lower, but they had received organs from more aged donors. CMV IgG positive were 81.5% of donors and 84.5% of recipients. Primary CMV infection was detected in 3/19 of CAN patients. Delayed graft function and AR were more frequent in CAN patients (5/19 and 7/19) than in control patients (1/20 and 2/20). The frequency of CMV reactivation (7/19 and 1/20) and CMV disease (10/19 and 1/20) was significantly higher in CAN patients. The combination of AR and CMV disease was observed in CAN patients only. Renal allograft loss was diagnosed only in CAN patients (5/19, 23.6%) and from them one had CMV reactivation, 3 – combination of AR and CMV disease, and in one patient CMV infection remained latent. In conclusion: CMV activation and CMV disease in the early period after RT are independent risk factors for CAN and kidney allograft loss in the late posttransplant period. CMV disease is an additional factor in the pathogenesis of CAN in the presence of acute rejection.

Key words: renal transplantation, Cytomegalovirus (CMV), acute rejection, CMV disease, chronic renal allograft nephropathy, kidney allograft loss.

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection remains a major cause of mortality in transplant patients. Primary CMV infection results in lifelong virus persistence in the host, and reactivation frequently occurs in immunocompromised patients, as solid organ transplant

recipients. Risk factors for activation of CMV and CMV disease development are donor and recipient serological status (D+/R-), intensity of immunosuppression and host factors (age, comorbidities). More frequently CMV disease occurs during the first 3 months after kidney transplantation. Although the immediate effects of CMV are well described, the impact of early CMV activation and CMV disease on long-term outcome after transplantation remain controversial. Some clinical studies indicate an association of CMV disease with increased risk of kidney allograft loss (1). However, others fail to show such an association (2, 3). Pretransplant CMV seropositivity is associated with postransplant systemic inflammation and decreased renal allograft function and patient survival after transplantation (4). There are some indications that CMV disease is associated with an increased risk for acute rejection (AR). At present AR is a rare direct cause of graft loss in kidney transplant recipients, but it remains the main risk factor for chronic allograft failure and a major cause of late graft loss. When both AR and CMV disease occur in kidney transplant recipients, AR usually precedes CMV disease, suggesting that an AR episode can trigger CMV activation, possibly due to increased immunosuppressive therapy (5). Other authors suggest that CMV disease seems to play some role in the pathogenesis of chronic allograft nephropathy only in the presence of AR. Reasons for it may include the inability to adequately treat AR due to the presence of CMV disease or increased virulence of latent CMV infection in recipients being treated for AR (6). Neither CMV disease nor AR alone was associated with increased vascular or other histopathologic changes in 6-month protocol biopsy specimens of kidney allografts, but a previous history of both – acute rejection and the presence of CMV in the graft – was associated with increased vascular changes (7). In experimental studies CMV increases the expression of collagens both types I and III, the accumulation of myofibroblasts and enhances total collagen synthesis in the development of interstitial fibrosis in chronic renal allograft rejection (8).

The aim of our study was to evaluate the incidence of latent/persistent CMV infection, CMV disease and acute rejection rate during the first three months after transplantation in patients with chronic renal allograft nephropathy (CAN) beyond three months after transplantation.

Materials and methods

Patients. 81 patients had undergone kidney transplantation at the Latvian Centre of Renal transplantation between 1st of January, 2002 and 1st of November 2003. All patients received cadaveric renal transplants. 19 of 81 (23.5%) patients beyond 3 months after transplantation developed chronic allograft nephropathy (CAN) – with an increase of serum creatinine concentration, reduced glomerular filtration rate, progressive proteinuria and hypertension. The mean follow-up period was 25.4 months. The control group included 20 patients with normal kidney allograft function during the follow-up period. We analysed demographic data of recipients (age, initial graft function, primary diagnosis of kidney disease, modality and duration of dialysis before transplantation) and donors (age, mean cold ischemia time, reason for death), immunosuppressive treatment after transplantation, acute rejection rate, donor/recipient CMV serological status, CMV activation and CMV disease after transplantation in both groups.

Immunosuppression. From 19 of CAN patients, 11 (57.9%) received induction therapy with monoclonal anti-IL-2 antibodies – Simulect, 3 (15.8%) – antithymocyte globulin (ATG) and 5 (26.3%) were without induction therapy. In the control group, 17 of 20 (85.0%) patients received induction therapy with Simulect, one (5.0%) – ATG; 2 (10.0%) were without induction therapy. All patients received maintenance immunosuppression with cyclosporine (CsA) in microemulsion, micofenolate mofetil (MMF) and prednisolo-

ne. Treatment with oral CsA in microemulsion was started before surgery (10 mg/kg/d) to obtain therapeutic blood CsA level and then was adjusted, based on a target through level 150–350 ng/ml during the first 4 weeks and at 150–250 ng/ml thereafter. CsA through level was measured using the Ax Sym (Abbott) cyclosporine assay with a fluorescence polarization immunoassay. The maintenance dose of orally administered MMF was 1–1.5 g/d. Methylprednisolone 5 mg/kg/d was administered on 3 consecutive days from the day of operation. Oral prednisolone was started on the first day after operation at 0.5 mg/kg/d and reduced gradually till 5–10 mg/d.

Acute rejection. AR episodes were suspected in recipients with a rise in the serum creatinine level and confirmed by percutaneous biopsy. The histological features were graded according to Banff 97 classification. AR was treated with intravenous methylprednisolone at 500 mg/d for three days. Steroid resistant cases were treated with ATG.

CMV serology. The serum samples from donors and patients before and after renal transplantation were tested for CMV IgM (Imx, Abbott) and CMV IgG (Abbott) antibodies by microparticle enzyme immunoassay (MEIA).

CMV disease. CMV disease was defined by detection of CMV in blood serum samples using nested polymerase chain reaction (nPCR) accompanied either by CMV syndrome with fever, muscle pain, leucopenia (leukocyte count less than $4 \times 10^9/L$) and/or thrombocytopenia (cell count less than $100 \times 10^9/L$), or by organ involvement such as hepatitis, gastrointestinal ulceration, pneumonitis or retinitis. CMV disease was treated with intravenous ganciclovir. The dose of ganciclovir was adjusted according to renal function. No patients received anti-CMV prophylaxis or preemptive therapy.

Renal allograft loss (RAL). Loss of allograft function was characterised with a return to dialysis and followed dialysis treatment more than one month.

DNA extraction and Polymerase chain reaction (PCR). Total DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (PBL) to determine latent/persistent CMV infection and blood serum samples to determine active CMV infection. The cells were lysed, digested by proteinase K, and DNA was extracted by phenol-chloroform treatment. The QIA amp Blood Kit was used for the extraction of DNA from serum. A globin PCR was performed to assure the quality of the extracted DNAs. nPCR was used for the detection of viral sequences in PBL and serum DNA from donors and patients before and after renal transplantation. The detection of CMV DNA was carried out according to Studahl et al. (9).

Statistics. Statistical differences between tested groups were evaluated by Fisher's Exact test (2 Tail, P value).

Results

Demographic data of patients with CAN and patients of control group are shown in Table 1.

There were no significant differences between primary diagnosis, modality and duration of dialysis, causes of donor death and mean cold ischemia time in patients with CAN and the control group.

Table 1

Recipients and donors demographic data

	Patients with CAN n = 19	Control group n = 20
Mean recipient age (years)	43	52
Primary kidney transplantation	15/19 (78.9%)	17/20 (85.0%)
Delayed graft function	5/19 (26.3%)	1/20 (5.0%)
Primary diagnosis:	11/19 (57.9%)	12/20 (60.0%)
Chronic glomerulonephritis	3/19 (15.8%)	1/20 (5.0%)
Diabetic nephropathy	5/19 (26.3%)	7/20 (35.0%)
Other causes of ESRD		17/20 (85.0%)
Hemodialysis before transplantation	18/19 (94.7%)	11.9 (1-34)
Mean hemodialysis duration (months)	14.5 (1-48)	33
Mean donor age (years)	41	4/20 (20.0%)
Cause of donors death:	6/19 (31.5%)	14/20 (70.0%)
Cerebral infarct	9/19 (47.4%)	2/20 (10.0%)
Cerebral trauma	4/19 (21.1%)	16.5 (6-24)
Politrauma	17.5 (12-24)	
Mean cold ischemia time (hours)		

The mean age of patients with CAN (43 [range 19-62]) was lower than that of patients in control group (52 [range 35-68]), however CAN patients had received organs from older donors than control patients (41 [range 16–64] and 33 [range 16–53] years, respectively). The patients with CAN (5 of 19, 26.3%) were 5 times more frequently presented with delayed graft function than the patients in control group (one of 20, 5.0%) however without statistically significant difference ($P = 0.09$).

CMV serology. CMV serological status of the donors and the patients before kidney transplantation is shown in Table 2.

Table 2

CMV serology of the donors (D) and the recipients (R) before kidney transplantation

CMV serology	Patients with CAN (%) n = 19	Control group(%) n = 20
D+/R-	3/19 (15.8)	0/20
D+/R+	12/19 (63.2)	16/20 (80.0)
D-/R+	4/19 (21.1)	3/20 (15.0)
D-/R-	0/19	1/20 (5.0)

According to serological study CMV IgG positive were 15 of 19 (79.0%) kidney allograft donors for CAN patients and 16 of 20 (84.0%) – for patients in the control group. Antiviral specific IgG antibody was detected in 14 of 19 (74.0%) recipients with CAN and in 19 of 20 (95.0%) in control group. Primary CMV infection (D+/R-) was found in 3 of 19 (15.8%) cases and all were patients with CAN. Neither in the donors nor in the patients before renal transplantation virus-specific IgM antibodies were detected. These data supported by the results of nPCR showed a high level of latent/persistent CMV infection as in the donors as well as in the recipients.

Acute rejection and symptomatic CMV infection. Although the frequency of acute rejection was 3.7 times more often in CAN patients (7/19, 36.8%) in comparison to the patients with stable allograft function (2/20, 10.0%), the difference was not significant ($P = 0.064$) (Table 3).

Table 3

Frequency of acute rejection and CMV disease in transplant recipients during the first three months after transplantation

	Patients with CAN (%) n = 19	Control group (%) n = 20
Acute rejection	7/19 (36.8)	2/20 (10.0)
Primary infection	3/19 (15.8)	0/20
CMV reactivation	7/19 (36.8)	1/20 (5.0)
CMV disease:	10/19 (52.0)	1/20 (5.0)
Viral syndrome	9/19 (47.4)	1/20 (5.0)
Tissue invasive infection	1/19 (5.3)	0/20
Acute rejection and CMV disease	6/19 (31.6)	0/20

At the same time, the frequency of CMV reactivation and CMV disease was significantly higher in CAN patients ($P = 0.019$ and $P = 0.012$, respectively). The combination of AR and CMV disease was observed in CAN patients only, and the significance of this index was relatively high (6/19, 31.6%).

Renal allograft loss. RAL was diagnosed in 5 of 19 (23.6%) patients with CAN. From these 5 patients, one patient had CMV reactivation, three – the combination of AR and CMV disease and in one case CMV infection remained latent. From the 3 patients with the combination of AR and CMV disease in one case primary CMV infection and in two – CMV reactivation was detected.

Discussion

The causes of graft loss have changed significantly in the past two decades. New effective immunosuppressive drugs, available today, effectively prevent acute rejection and maximize short-term graft survival in kidney transplant recipients, but long-term graft survival has not been improved. Acute rejection is now a rare cause of graft loss in kidney transplant recipients. CAN and death with functioning allograft become the most common causes of graft loss. Not enough attempts have been made to decrease CAN, partly because its pathogenesis remains unclear. Both immunologic and non-immunologic mechanisms have been proposed to explain the development of CAN. Many studies show an association between acute rejection and subsequent CAN, indicating that immune responses and their consequences may lead to ongoing deterioration of graft function (5, 6). Several non-immunologic factors have also been shown to influence long-term graft survival independent from acute rejection, including older donor age, delayed graft function, cold ischemia time. One factor that has long been suggested to play a role in the pathogenesis of CAN is CMV disease (5). The present study was designed to follow kidney transplant recipients and evaluate the influence of donor and recipient age, primary diagnosis of kidney disease, initial graft function, dialysis modality and duration, causes of donor death, mean cold ischemia time, the incidence of CMV infection and CMV disease, acute rejection rate during the first three months after transplantation in patients with chronic allograft nephropathy in the late posttransplantation period (beyond 3 months after transplantation).

In our study we did not find statistically significant influence of primary diagnosis, modality and duration of dialysis, causes of donor death and mean cold ischemia time on the development of CAN. In the group of patients with CAN the mean recipient age was lower than in the control group, but these patients received organs from elderly donors.

In comparison to the control group CAD patients had suffered five times more frequently from delayed graft function. Although this difference was not significant it may indicate that the age of a donor had certain significance.

Our study shows that CMV reactivation and CMV disease are significantly more frequent in patients with CAN. We can suggest that CMV reactivation and CMV disease are the independent risk factors for CAN. These data are in accordance with previous reports of a detrimental effect of CMV infection and CMV disease on long-term renal allograft function and patient survival reported by Sagedal et al. (1) and Humar et al. (6). Sagedal et al. reported that CMV seems to be associated with increased risk for death rather than isolated effects on the graft. Humar et al. showed that CMV disease is a significant risk factor of chronic rejection only in the presence of acute rejection.

We found AR more frequently in CAN patients, but these data were not statistically significant. Most of the patients with a combination of AR and CMV disease lost their allograft function during the follow-up period. How CMV disease has an additional effect on the injury caused by acute rejection is not clear.

Additive effect of CMV disease may be due to the inability to adequately treat acute rejection in recipients who secondary developed the infectious process. It is also possible that the virulence of latent CMV virus increases in recipients being treated for acute rejection due to the increase of the viral load.

Conclusion

CMV activation and CMV disease in the early period after renal transplantation are independent risk factors for chronic allograft nephropathy and kidney allograft loss in the late posttransplant period. CMV disease is an additional factor in the pathogenesis of chronic allograft nephropathy in the presence of acute rejection. Because the pathogenesis of CAN is not agreed upon and the role of CMV activation and CMV disease in the development of CAN is difficult to prove, further investigations in this field are necessary. Whether CMV prophylaxis or preemptive therapy, given routinely after kidney transplantation, would improve patient and allograft survival in the long term, remains to be shown.

References

1. Sagedal S., Hartmann A., Nordal K. P., Osnes K., Leivestad T., Foss A., Degre M., Fauchald P., Rollag H. Impact of Early Cytomegalovirus Infection and Disease on Long Term Recipient and Kidney Graft Survival. *Kidney International*, 2004, 66: 329–337.
2. Dickemann M. J., Cathomas G., Steiger J. et al. Cytomegalovirus Infection and Graft Rejection in Renal Transplantation. *Transplantation*, 2002, 7: 764–767.
3. Erikson B. M., Wirgart B. Z., Claesson K. et al. A Prospective Study of Rapid Methods of Detecting Cytomegalovirus in the Blood of Renal Transplant Recipients in Relation to Patient and Graft Survival. *Clin. Transplant.*, 1996, 10: 494–502.
4. Fitzgerald J. T., Gallay B., Taranto S. E., McVicar J. P., Troppmann C., Chen X., McIntosh M. J., Perez R. V. Pretransplant Recipient Cytomegalovirus Seropositivity and Hemodialysis are Associated with Decreased Renal Allograft and Patient Survival. *Transplantation*, 2004, 77: 1405–1411.
5. Nett Ph. C., Heisey D. M., Fernandez L. A., Sollinger H. W., Pirsch J. D. Association of Cytomegalovirus Disease and Acute Rejection with Graft Loss in Kidney Transplantation. *Transplantation*, 2004, 78: 1036–1041.
6. Humar A., Gillingham K. J., Payne W. D., Dunn D. L., Sutherland D. E. R., Matas A. J. Association between Cytomegalovirus Disease and Chronic Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*, 1999, 68: 1879–1883.
7. Helanterä I., Koskinen P., Tornroth T., Loginov R., Gronhagen- Riska C., Lautenschlager I. The Impact of Cytomegalovirus Infections and Acute Rejection Episodes on the Development of Vascular Changes in 6 Month Protocol Biopsy Specimens of Cadaveric Kidney Allograft Recipients. *Transplantation*, 2003, 75: 1858–1863.
8. Inkinen K., Soots A., Krogerus L., Bruggeman C., Ahonen J., Lautenschlager I. Cytomegalovirus Increases Collagen Synthesis in Chronic Rejection in the Rat. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, 17: 772–779.

9. Studahl M., Bergstrom T., Ekeland-Sjoberg K., Riksten A. Detection of Cytomegalovirus DNA in Cerebrospinal Fluid in Immunocompetent Patients as a Sign of Active Infection. J. Med. Virol., 1995, 46: 274.

Kopsavilkums

Ievads. Hroniska transplantāta nefropātija (HTN) ir viens no galvenajiem transplantāta funkcijas zuduma iemesliem pacientiem vēlīnajā periodā pēc nieres transplantācijas. Viens no neimunoloģiskiem faktoriem, kas veicina HTN attīstību, ir CMV infekcija agrīnā pēctransplantācijas periodā.

Darba mērķis. Novērtēt latentu/persistējošas un simptomātiskas CMV infekcijas un akūtas tremes biežumu pacientiem ar HTN vēlīnajā pēctransplantācijas periodā (>3 mēnešus pēc transplantācijas).

Metodes. Izmeklēti 19 pacienti ar HTN un 20 pacienti ar stabilu nieres transplantāta funkciju (kontroles grupā). Vidējais pacientu novērošanas ilgums bija 25,4 mēneši. Akūtas tremes diagnoze pamatojās un klīniskām pazīmēm un histoloģisko atradi nieru transplantātu biopsijas materiālā. CMV infekcija bija diagnosticēta, pamatojoties uz raksturīgo klīnisko ainu – vīrusu sindromu vai orgānu bojājumu audu invazīvās formas gadījumā. Latenti/persistējošas CMV infekcijas un CMV aktivācijas noteikšanai tika izmantota seroloģiskā metode (MEIA) un polimerāzes ķēdes reakcija (PCR).

Rezultāti. Pacientiem ar HTN 5 reizes biežāk novēroja atliktu transplantāta funkciju (5/19, 26,3%) nekā kontroles grupā (1/20, 5,0%). Latenti/persistējošu CMV infekciju konstatēja 31/39 (79,5%) donoriem un 33/39 (84,6%) recipientiem. Primāro infekciju (D+/R-) konstatēja 3 pacientiem tikai HTN grupā. Akūtas tremes novēroja 3,7 reizes biežāk pacientiem ar HTN nekā kontroles grupā. CMV slimību statistiski ticami biežāk novēroja pacientiem ar HTN (10/19, 52,6%, $P = 0,012$) nekā kontroles grupā (1/20, 5,0%). Pacientiem ar HTN (6/19, 23,6%) biežāk novēroja akūtas tremes un CMV infekcijas kombināciju. Primāro CMV infekciju un audu invazīvo formu diagnosticēja tikai pacientiem ar HTN. Novērošanas laikā 5 pacienti, kuriem bija HTN, zaudēja nieres transplantāta funkciju un atgriezās hemodialīzes programmā. No šiem 5 pacientiem vienam bija CMV reaktivācija, 3 – kombinēta akūta treme un CMV slimība, vienam – latentā CMV infekcija.

Secinājums. Agrīnā nieres pēctransplantācijas periodā CMV aktivācija un simptomātiska CMV infekcija ir neatkarīgs HTN attīstības un transplantāta funkcijas zuduma riska faktors. CMV slimības un akūtas tremes kombinācija ir transplantāta funkcijas zuduma riska faktors.

Imūnsupresija kā β -herpesvīrusu aktivācijas faktors pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs

Immunosuppression as Activation Factor of β -Herpesviruses in Patients with Digestive Cancer

A. Sultanova, S. Čapenko, Z. Nora, S. Doniņa¹, M. Murovska
LU Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts
Rītupītes iela 1, Rīga, LV-1067
E-pasts: sultanova@e-apollo.lv
¹Latvijas Onkoloģijas centrs
Hipokrāta iela 4, Rīga, LV-1079
E-pasts: donsimon@inbox.lv

Šajā darbā ir pētīta β -herpesvīrusu (CMV, HHV-6, HHV-7) aktivācija kuņģa un zarnu trakta audzēju I–II stadijā (1. grupa) un III–VI stadijā (2. grupa), kā arī imunoloģisko rādītāju izmaiņas atkarībā no vīrusu aktivitātes un audzēja stadijas.

Izmantojot nPCR, CMV, HHV-6 un HHV-7 gēnu sekvences, noteiktas PBL DNS [(perifērie asins leukocīti) latentas infekcijas marķieris] un asins plazmas DNS (aktīvas infekcijas marķieris) 1. ($n = 12$) un 2. ($n = 13$) grupas pacientiem. Rezultāti salīdzināti ar imunoloģiskiem rādītājiem un slimības klīnisko progresu (audzēju stadijām).

Latentu CMV infekciju biežāk konstatēja 2. grupas pacientiem (20,7%) nekā 1. grupas pacientiem (16,64%). Arī HHV-6 biežāk atrada 2. grupas pacientiem (38,4%) nekā 1. grupas pacientiem (25,0%). HHV-7 infekcija biežāk tika diagnosticēta 2. grupas (85,6%) nekā 1. grupas (75,0%) pacientiem. CMV un HHV-6 reaktivācija nebija atrasta nevienā izmeklētājā grupā. Aktīvu HHV-7 infekciju atrada abās pacientu grupās: 1. grupā – 44,5% un 2. grupā – 45,4%.

Salīdzinot imunoloģisko šūnu rādītājus izmeklētājās grupās, var secināt, ka, progresējot slimībai, kopējais limfocītu skaits, tāpat kā CD3+, CD4+ un CD8+ šūnu skaits, būtiski samazinājies, bet CD95+ pieaudzis.

Mūsu pētījumu rezultāti parādīja, ka imūnsupresiju padziļina ne tikai audzēja stadija, bet arī vīrusu aktivācija. Aktīvas vīrusu infekcijas un vēlīnākas (III–VI) audzēja stadijas gadījumā kopējais limfocītu, kā arī CD3+, CD4+ šūnu skaits statistiski ticami samazinājās ($p < 0,05$), savukārt CD95+ šūnu skaits statistiski ticami pieauga ($p < 0,05$), salīdzinot šos rādītājus ar 1. grupas pacientu imunoloģiskiem rādītājiem.

Atslēgvārdi: latentī persistenta un aktīva β -herpesvīrusu (CMV, HHV-6, HHV-7) infekcija, kuņģa un zarnu trakta audzēji, imunoloģisko šūnu rādītāji, imūnsupresija.

Ievads

Ļaundabīgi veidojumi, to skaitā arī kuņģa un zarnu trakta audzēji, izraisa imūnsupresiju. Audzējam progresējot, tā padziļinās, un uz šīs imūnsupresijas fona bieži atīstās komplikācijas, kas nav saistītas ar pamatslimību, bet kas sarežģī tās klīnisko gaitu un bieži beidzas ar letālu iznākumu. Izraisīto komplikāciju pamatā var būt dažādu latentu (persistentu) infekciju aktivācija, tajā skaitā vīrusinfekciju aktivācija.

CMV, HHV-6 un HHV-7 ir plaši izplatīti limfotropi β -herpesvīrusi, ar kuriem inficējas jau agrā bērnībā, bet latentā (persistentā) formā cilvēka organismā tie var saglabāties visu mūžu. β -herpesvīrusiem ir raksturīgs plašs šūnu tropisms, ieskaitot imūnkompetentās šūnas (CD34+, CD4+, CD8+, monocītus un makrofāģus, CD16+) (1, 2), epiteliālās, endoteliālās šūnas un fibroblastus. Tie var aktivēties imūnsupresijas dēļ, ko rada pamatslimība, un arī paši var būt aģenti, kas pacientiem padziļina imūnsupresiju. β -Herpesvīrusiem piemīt imūnmodulējošas īpašības, tie var mainīt vairāku citokīnu ekspresiju un inducēt apoptozi (3).

Līdz šim veiktie pētījumi nesniedz nepārprotamu atbildi par limfotropo herpesvīrusu nozīmi kuņģa un zarnu trakta ļaundabīgo audzēju slimības norisē. Darba mērķis ir pētīt β -herpesvīrusu aktivāciju pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs, tās atkarību no pamatslimības izraisītās imūnsupresijas dziļuma, no vienas puses, un vīrusu aktivācijas nozīmi imūnsupresijas padziļināšanā, no otras puses.

Materiāli un metodes

Pacienti. Pētījumā iekļauti 25 pacienti (17 vīrieši un 8 sievietes, vidējais vecums – 55 gadi (no 46 līdz 83 gadiem)), kam ir kuņģa un zarnu trakta ļaundabīgs audzējs, neviens no viņiem pirms tam nebija saņēmis specifisku citostatisko terapiju. Bija izveidotas divas pacientu grupas: 1. grupa – slimnieki ar I vai II stadijas ļaundabīgu audzēju ($n = 12$) un 2. grupa – slimnieki ar III vai IV stadijas ļaundabīgu audzēju ($n = 13$). Pētījuma veikšanai saņemta AML/RSU Ētikas komisijas atļauja, un visi pētījuma dalībnieki deva piekrišanu izmeklējumiem.

Metodes. Lai noteiktu vīrusinfekciju, totālās DNS izdalīšanai no PBL izmantoja fenola-hloroforma ekstrakcijas metodi un DNS izdalīšanai no asins seruma – *QIAamp Kit*. Vīrusu genomu secību konstatēšanai PBL DNS un asins seruma DNS izmantoja polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimēšanu (nPCR *nested polymerase chain reaction*). CMV genoma secību noteikšanai izmantoja praimeru pārus un protokolu, ko aprakstījis *Studahl et al.*, 1993 (4), HHV-6 noteikšanai – *Bandobashi et al.*, 1997 (5), HHV-7 noteikšanai – *Berneman et al.*, 1992 (6). Pacientu imūnā stāvokļa novērtēšanai noteica dažādas T limfocītu subpopulācijas, lietojot lāzera plūsmas citofluorimetru (*FACS Calibur Becton Dickinson*, ASV).

Imunoloģisko rādītāju statistisko ticamību starp izmeklētajām grupām noteica ar *Student's* testu un rezultātu uzskatīja par ticamu, ja $p \leq 0,05$.

Rezultāti

Latenta (persistenta) CMV infekcija atrasta 16,6% 1. grupas pacientu un 30,7% 2. grupas pacientu. HHV-6 latentu (persistentu) infekciju konstatēja 25,0% 1. grupas un 38,4% 2. grupas pacientu, savukārt HHV-7 latentu (persistentu) infekciju atrada 75,0% 1. grupas un 84,6% 2. grupas pacientu. Aktīvu CMV infekciju, tāpat kā aktīvu HHV-6 infekciju nekonstatēja nevienam izmeklētajam pacientam, savukārt HHV-7 aktivāciju atrada 44,4% 1. grupas un 45,5% 2. grupas pacientu (sk. 1. tab.).

1. tabula

Latentas (persistentas) un aktīvas β–herpesvīrusu infekcijas sastopamība pacientiem, kam ir ļaundabīgs kuņģa un zarnu trakta audzējs
Incidence of latent/persistent and active β–herpesviruses infection in patients with digestive tract cancer

Grupās	Latenta infekcija			Aktīva infekcija		
	CMV	HHV-6	HHV-7	CMV	HHV-6	HHV-7
1. grupa (I–II stadija)	2/12 (16,6%)	3/12 (25,0%)	9/12 (75,0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	4/9 (44,4%)
2. grupa (III–IV stadija)	4/13 (30,7%)	5/13 (38,4%)	11/13 (84,6%)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	5/11 (45,4%)

Salīdzinot 1. grupas pacientu imunoloģiskos rādītājus, var secināt, ka latentas vīrusinfekcijas gadījumā šie rādītāji ir augstāki nekā aktīvas vīrusinfekcijas gadījumā, savukārt CD95+ šūnu skaits ir augstāks aktīvas vīrusinfekcijas gadījumā (sk. 2. tab.).

Imūnregulatorais indekss (CD4+/CD8+) 1. grupas pacientiem, kam ir aktīva vīrusinfekcija, bija $1,0 \pm 0,05$, kas ir zemāks nekā šīs grupas pacientiem, kam ir latentā vīrusinfekcija ($1,4 \pm 0,09$) (sk. 2. tab.).

2. tabula

Imūnkompetento šūnu skaits 1. un 2. grupas pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs un latentā un aktīva vīrusinfekcija
The number of immunocompetent cells of the 1st and 2nd group digestive tract cancer patients with latent and active viral infection

Šūnu indekss perifērajās asinīs	1. grupa (I–II stadija)		2. grupa (III–IV stadija)	
	latenta	aktīva	latenta	Aktīva
Limfocīti*	2571±973	1910±856	1960±695	1815±907
CD3	1787±670	1081±480	1564±520	1048±600
CD4	1122±459	626±360	830±276	588±263
CD8	781±320	596±345	720±240	568±284
CD95	715±293	794±458	768±290	826±338
CD4/CD8	1,4±0,09	1,0±0,05	1,1±0,07	1,0±0,04

* 1mm^3 perifēro asiņu

Salīdzinot 2. grupas pacientu imunoloģiskos rādītājus, var secināt, ka latentas vīrusinfekcijas gadījumā CD3+, CD4+ un CD8+ limfocītu skaits ir augstāks nekā aktīvas vīrusinfekcijas gadījumā (sk. 2. tab.). Tāpat kā 1. grupas pacientiem, arī 2. grupas pacientiem CD95+ šūnu skaits aktīvas vīrusinfekcijas gadījumā bija lielāks nekā latentas vīrusinfekcijas gadījumā. 2. grupas pacientiem, kam ir latentā infekcija, CD4+ un CD8+ šūnu attiecība bija $1,1 \pm 0,07$, bet aktīvas infekcijas gadījumā šī attiecība nedaudz samazinājās: $1,0 \pm 0,04$ (sk. 2. tab.).

CD3+ un CD4+ šūnu skaits gan 1., gan 2. pacientu grupā bija statistiski ticami samazinājies ($p < 0,05$), savukārt CD95+ šūnu skaits – statistiski ticami pieaudzis ($p < 0,05$).

Ņemot vērā aktīvu vīrusinfekciju un kuņģa un zarnu trakta audzēju stadijas, var secināt, ka 2. grupas pacientiem imunoloģiskie rādītāji ir vairāk izmainīti nekā 1. grupas pacientiem: ir pazemināts CD3+, CD4+ un CD8+ limfocītu skaits, bet paaugstināts CD95+

šūnu skaits. Turklāt CD95+ šūnu skaits 2. grupas pacientiem bija lielāks nekā 1. grupas pacientiem gan aktīvas, gan arī latentas vīrusu infekcijas gadījumā (sk. 2. tab.).

CD3+ un CD4+ šūnu skaits statistiski ticami bija augstāks 1. grupas pacientiem ($p < 0,01$ un $p < 0,05$), savukārt CD95+ šūnu skaits – 2. grupas pacientiem ($p < 0,05$).

Diskusija

Lielu interesi izraisa β -herpesvīrusu tiešais un netiešais aktivācijas efekts imūnsupresētiem slimniekiem, pie kuriem pieder arī pacienti, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs.

Pētījuma mērķis ir noskaidrot β -herpesvīrusu infekcijas aktivitātes pakāpi pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta ļaundabīgs audzējs dažādās stadijās, un aktivācijas atkarību no imūnsupresijas dziļuma, kā arī pašu vīrusu nozīmi imūnsupresijas padziļināšanā.

Izmeklējot 25 pacientu imūnstāvokli, iegūtie rezultāti liecina, ka pamatslimības netieši saistās ar imūnsupresiju, kas padziļinās, progresējot slimībai. Samazinās limfocītu skaits, CD3+, CD4+, CD8+ T šūnu skaits, un pieaug šūnu daudzums ar apoptozes receptoriem – CD95+. Šie rezultāti pilnībā sakrīt ar citu pētnieku iegūtajiem rezultātiem (6). Ņemot vērā β -herpesvīrusu spēju inficēt imūnsistēmas šūnas (īpaši T limfocītus (CD4+)), kurās tie replicējas, varēja paredzēt, ka vīrusu aktivācijas gadījumā pieaugs imūnsupresija. Izmeklējumu rezultāti parādīja, ka latentā (persistenta) β -herpesvīrusu infekcija ir izplatīta pacientiem, kam ir kuņģa un zarnu trakta audzējs. HHV-7 aktivācija tika konstatēta gan 1., gan 2. grupas pacientiem, taču aktivācijas līmenis izplatīta kuņģa un zarnu trakta audzēja pacientiem bija augstāks nekā pacientiem, kam ir lokalizēts audzējs. Jau agrākos pētījumos tika konstatēta HHV-7 aktivācija medikamentozās imūnsupresijas pacientiem, nieres transplantāta un kaulu smadzeņu transplantāta recipientiem, tāpat arī HIV inficētajiem un AIDS pacientiem (7, 8).

Literatūrā nav datu par to, vai pacientiem, kam ir ļaundabīgs kuņģa un zarnu trakta audzējs, notiek HHV-7 aktivācija un imūnstatusa izmaiņas.

Pacienti, kam ir latentā (persistenta) HHV-7 vīrusinfekcija (20/25) un aktīva HHV-7 infekcija (9/20) dažādās audzēju stadijās, tika izmeklēti, un imunoloģisko rādītāju salīdzinošā analīze parādīja, ka HHV-7 aktivācijas gadījumā padziļinājās imūnsupresija, jo samazinājās kopējais limfocītu, CD3+ un CD4+ skaits, savukārt CD95+ šūnu skaits statistiski ticami pieauga. Samazinājās attiecība starp CD4+ un CD8+ šūnām (imūnregulatorais indekss). Šie rezultāti rosina domāt, ka HHV-7 aktivācija padziļina imūnsupresiju pacientiem, kam ir ļaundabīgs kuņģa un zarnu trakta audzējs. Uz šāda fona ir iespējami pamatslimības gaitas sarežģītumi un oportūnisko infekciju (mikrobu, sēnīšu infekciju) parādīšanās. Kaut arī aktīva CMV un HHV-6 infekcija netika konstatēta, tomēr šo vīrusu nozīmi imūnsupresijas padziļināšanā nevar ignorēt, jo ir zināms, ka HHV-7 darbojas kā šo vīrusu aktivācijas iniciators. Lai pilnīgāk izpētītu vīrusu nozīmi imūnsupresijas procesos, pētījumi jāveic dinamiskā.

Secinājumi

- Abās izmeklētajās pacientu grupās konstatēja tikai HHV-7 aktivāciju, turklāt 2. grupā aktīva infekcija bija sastopama biežāk nekā 1. grupā.
- Abu grupu pacientiem tika konstatēta imūnsupresija, kas padziļinājās atbilstoši ļaundabīgā audzēja stadijai.
- Imunoloģisko rādītāju salīdzinošā analīze parādīja, ka 1. un 2. grupas pacientiem, kam ir aktīva HHV-7 infekcija, imūnsupresija bija vairāk izteikta nekā abu grupu pacientiem ar latentu infekciju.

- Imūnsupresiju raksturoja adaptīvās imunitātes pavājināšanās, ko statistiski ticami parādīja CD3+ un CD4+ šūnu skaita samazināšanās un CD95+ šūnu pieaugums.

Literatūra

1. Lusso P., Malnati M., Balotta et al. Productive Infection of CD4 and CD8 Mature Human T Cell Populations and Clones by Human Herpesvirus 6. Transcriptional Downregulation of CD3. *Journal of Immunology*, 1991, 147, 658–691.
2. Mirandola P., Sechiero P., Pierpaoli S. et al. Infection of CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells by Human Herpesvirus 7 (HHV-7). *Blood*, 2000, 96: 126–131.
3. Atedzoe B. N., Menezes J., Addario M. et al. Modulatory Effects of Human Herpes Virus-7 on Cytokine Synthesis and Cell Proliferation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture. *J. Leukocyte Biology*, 1999, 66: 822–828.
4. Studahl M., Bergstorm T., Ekeland-Sjoberg K. et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Cerebrospinal Fluid in Immunocompetent Patients as a Sign of Active Infection. *J Med Virol*, 1995, 46: 274–278.
5. Bandobashi K., Daibata M., Kamioka M. et al. Human Herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's Lymphoma: Establishment of a Novel Cell Line Infected with HHV-6. *Blood*, 1992, 89: 10552–10556.
6. Berneman Z. N., Ablashi D. V., Eger-Fletcher M. et al. Human Herpesvirus 7 is T-lymphotropic Virus and is Related to, but Significantly Different from, Human Herpesvirus 6 and Human Cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 10552.
7. Chapenko S., Kruma A., Murovska M. et al. Frequency and Clinical Significance of Beta-Herpesvirus Infections in HIV-1-positive Patients. *HIV AIDS Rev*, 2003, 2(3/4): 131–135.
8. Chapenko S., Folkmane I., Bernarde K. et al. Immunocompromised Patients and Latent/Persistent and Active Beta-Herpesviruses Infection. *Eurovirology*, 2004, 157–160.

Summary

This study examines the level between activity of β -herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7) and digestive tract cancer in I and II (1st group) stage and in III and IV stage (2nd group), as well as changes of immunological indicators depending on virus activity and stage of tumor.

Using nPCR, CMV, HHV-6 and HHV-7 gene sequences were determined in PBL [(peripheral blood leukocytes) marker of latent infection] and in blood plasma (marker of active infection) for the first (n=12) and for the second (n=13) group of the patients. The results were compared with immunological indicators and clinical progress of the disease (stages of tumors).

Latent CMV was found more frequently in the patients of the 2nd group (20.7%) than in ones in the 1st group (16.6%), as well HHV-6 was found more frequently in the patients of the 2nd group (38.4%) than in ones in the 1st group (25.0%). HHV-7 infection also was more frequently diagnosed in the patients of the 2nd group (85.6%) than in ones in the 1st group (75.0%). Reactivation of CMV and HHV-6 was not detected in any group of the patients. Active HHV-7 was found in both groups of the patients: 44.5% in the 1st group and 45.4% in the 2nd group.

Comparing immunological indicators of cells one could see that with disease progression the total number of lymphocytes as well as CD3+, CD4+ and CD8+ cells was significantly reduced but the number of CD95+ cells increased.

Our results showed that not only the stage of tumors but also activation of the viruses deepens immunosuppression. In the cases of active viral infection and later stage of tumors (III or IV), the quantity of lymphocytes and CD3+, CD4+ and CD8+ cells significantly reduced ($p < 0.05$), however, the quantity of CD95+ cells was significantly increased ($p < 0.05$) compared to immunological indicators of the 1st group.

Key words: latent/persistent and active β -herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7) infection; digestive cancer; immunological indicators of cells; immunosuppression.

HIV-1 izraisītā imūnsupresija kā latentu (persistentu) β -herpesvīrusu infekcijas aktivators

HIV-1 Associated Immunosuppression as Activator of Latent/Persistent β -Herpesviruses Infection

A. Krūmiņa¹, S. Čapenko¹, M. Murovska¹, L. Viksna¹

¹Rīgas Stradiņa universitāte, Tradicionālās infektoloģijas,

tuberkulozes un AIDS katedra

Dzirčiema iela 16, Rīga, LV-1007

E-pasts: angelika@fastnet.lv

²Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts

Rātsupītes iela 1a, Rīga, LV-1067

E-pasts: modra@latnet.lv

HIV-1 infekcijas rezultāts ir smaga imūndisfunkcija ar progresējošu CD4+ T limfocītu zudumu, kas noved pie AIDS attīstības.

HIV-1 radītā imūnsupresija darbojas kā limfotropo herpesvīrusu (CMV, HHV-6, HHV-7) aktivators, taču pētījumi šai jomā nav pietiekami plaši.

Šī darba mērķis ir izpētīt β -herpesvīrusu infekcijas klātbūtni pacientiem, kam ir atšķirīgas HIV-1 infekcijas un AIDS klīniskās izpausmes, un HIV-1 infekcijas izraisītās imūnsupresijas ietekmi uz β -herpesvīrusu aktivāciju.

Pētījumā iekļauti 52 pacienti. Saskaņā ar HIV/AIDS CDC klasifikāciju (1993) 19 pacientiem bija asimptomātiska HIV-1 infekcija (A1+A2), 9 – simptomātiska infekcija (B1+B2) un 24 pacientiem – AIDS (A3, B3, C1, C2, C3).

HIV-1 infekcija diagnosticēta, pamatojoties uz seroloģiskajiem testiem. HIV-1 antivielas serumā pierādītas ar ELISA metodi ar vairākiem komercfirmas reaģentiem – *Abbott*, ASV; *Bio-Rad*, Francija; *Dade Behring*, Vācija – un rezultāti apstiprināti ar *Western immunoblot* vai neitralizācijas testu (*BioRad*, Francija; *Inmunogeneticas* Beļģija; *Abbott*, ASV; *Inmunogenetics*, Vācija). CD4+ T šūnu skaits seropozitīviem indivīdiem analizēts ar plūsmas citometrijas metodi.

DNS tika izolēta no perifēro asiņu leukocītiem (PBL) un plazmas, kas atbrīvota no šūnām. DNS no šūnām izdalīja ar *fenol-hloroform* ekstrakcijas metodi, no plazmas – ar *QIAamp Blood Kit* palīdzību. Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu (nPCR) tika izmantota, lai konstatētu vīrusu genomu secību klātbūtni PBL un plazmas DNS.

β -Herpesvīrusu genomu secības PBL DNS atrastas 43 no 52 pacientiem, kam ir HIV-1 infekcija (82,7%). Vienlaicīga vairāku vīrusu infekcija konstatēta 32 no 52 pacientiem (61,5%).

AIDS pacientiem aktīva CMV infekcija atrasta 2,6 reizes biežāk (33,3%) nekā pacientiem, kam ir asimptomātiska HIV-1 infekcija (12,5%), un 1,2 reizes biežāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (28,6%) (sk. 2. tab.). Aktīva HHV-6 infekcija AIDS slimniekiem bija 3 reizes biežāk (77,7%) salīdzinājumā ar asimptomātisku HIV-1 infekciju (20,0%) un 1,2 reizes biežāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (66,7%).

Aktīva HHV-7 infekcija AIDS pacientiem konstatēta 3 reizes biežāk (64,3%) nekā pacientiem, kam ir asimptomātiska HIV-1 infekcija (21,4%), bet mazāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (77,8%).

β-Herpesvīrusu infekcija ir plaši izplatīta starp HIV-1 inficētiem pacientiem. HIV-1 infekcijas progresēšana un imūnsupresijas padziļināšanās var ietekmēt β-herpesvīrusu aktivāciju.

HIV-1 inficētu pacientu laboratoriskajā diagnostikā būtu ieteicams iekļaut ne tikai CMV, bet arī HHV-6 un HHV-7 infekcijas, kas ļautu prognozēt iespējamo komplikāciju un blakusslimību risku.

Atslēgvārdi: HIV-1, AIDS, imūnsupresija, β-herpesvīrusi, PCR.

Ievads

HIV-1 infekcijas rezultāts ir smaga imūndisfunkcija ar progresējošu CD4+ T limfocītu zudumu, kas noved pie AIDS attīstības. Iedarbojoties dažādiem kofaktoriem (herpesvīrusu superinfekcija, daudzu dzimumpartneru spermas sensibilizējošs efekts, toksiskas vielas – narkotikas, medikamenti vai ekoloģiski radīta imūnsupresija), notiek vīrusa replikācija, ko pavada imūnocītu bojāeja, imūndeficīta attīstība ar prevalējošu T limfocītu populācijas izsīkumu. Inficētās šūnas bojāejas mehānisms vēl nav noskaidrots. Domājams, ka šūnas membrāna tiek bojāta, jaunajiem virioniem izejot no šūnas, kā arī liela nozīme ir sensibilizēto citotoksisko šūnu imūnām reakcijām.

T limfocītu bojāeja un CD4+/CD8+ skaita inversija ierosina imūnšūnu kooperācijas dezintegrāciju, tās zaudē spēju adekvāti reaģēt uz alogēniem un autogēniem – zūd organisma spēja pretoties dažādām infekcijām un neoplāziju rašanās procesam.

Līdztekus T limfocītu bojāejai notiek B limfocītu poliklonāla aktivācija ar visu klašu imūnglobulīnu (Ig) sintēzi, sevišķi ar IgG un IgA. Pēc kāda laika seko šo Ig klašu izsīkums, tāpēc tiek nomāktas makrofāgu antigēna (Ag)-atpazīšanas un Ag-prezentācijas funkcijas. Makrofāgi palielina pretiekaisuma citokīnu (TNF- α , IL-1 u. c.) sintēzi, kas klīniski izpaužas kā drudzis, novājēšana. TNF- α un citi citokīni spēj aktivizēt HIV-1 regulatoros ģēnus, tātad paātrināt tā replikāciju.

Imūno procesu regulācijas traucējumi izpaužas arī kā α -interferona, β 1-timozīna, β 2-mikroglobulīna, IL-2 līmeņa samazināšanās.

Imūnsistēmas traucējumu dēļ, sevišķi T limfocītu skaitam pazeminoties < 400/mkl asiņu, rodas labvēlīgi apstākļi HIV-1 nekontrolējamai replikācijai un dažādu vīrusu, baktēriju, sēnīšu infekciju attīstībai; vienšūņu, helmintu invāzijai un ļaundabīgām norisēm, kā arī autoimūnu procesu attīstībai.

HIV-1 radītā imūnsupresija darbojas kā limfotropo herpesvīrusu (CMV, HHV-6, HHV-7) aktivators, taču pētījumi šai jomā nav pietiekami plaši. β-Herpesvīrusiem ir plašs saimniekšūnu tropisms, ieskaitot imūnkompetentās šūnas (CD34+ CD4+, CD8+, monocītus, NK šūnas), epitēlijšūnas un endotēlijšūnas (1, 2, 3). Aktivētie CD4+ T limfocīti ir izvēles mērķšūnas HHV-6 un HHV-7 replikācijai (4). β-Herpesvīrusiem ir imūnmodulējošas īpašības. Tie spēj inducēt imūnaktīvo molekulu ekspresiju, modulēt citokīnu ekspresiju, inducēt CD4+ šūnu apoptozi, kā arī provocēt imūnsupresijas attīstību (5, 6, 7). Pierādīts, ka HHV-7 var aktivēt latentu (persistentu) HHV-6 (8) un CMV infekciju (9) imūnsupresētiem pacientiem. Progresējot HIV-1 infekcijai, CMV tiek uzskatīts kā ļoti svarīgs komplikāciju riska faktors, jo tas ir biežākais oportūnistisko slimību cēlonis AIDS stadijās (10, 11, 12). Pašlaik vēl nav skaidrs, vai HIV-1 infekcija var ietekmēt HHV-6 infekcijas gaitu (13). Hipotēze par to, ka HHV-6 var būt kā kofaktors HIV-1 infekcijas progresēšanā, balstīta uz tādiem pierādījumiem kā bieža HHV-6 izolācija AIDS pacientiem, vīrusa tropisms CD4+T limfocītos, spēja mainīt HIV-1 regulācijas elementus, spēja paaugstināt HIV-1 replikāciju, kā arī pozitīvs sinerģisms ar HIV-1 citopātisko efektu inducēšanā (5). Tiek ziņots, ka sasaiste starp HHV-6 un HIV-1 var būt atšķirīga dažādās AIDS stadijās (14). Līdz šim nav ticamu datu par HHV-7 reaktivāciju un slimību. Korelācija starp HHV-7 reaktivāciju, imūnsupresijai padziļinoties HIV-1 infekcijas gadījumā, ir pierādīta orgānu līmenī (15, 16).

Šī darba mērķis ir izpētīt β -herpesvīrusu infekcijas klātbūtni pacientiem, kam ir atšķirīgas HIV-1 infekcijas un AIDS klīniskās izpausmes, un HIV-1 infekcijas izraisītās imūnsupresijas ietekmi uz β -herpesvīrusu aktivāciju.

Materiāli un metodes

Pacienti un izpētes materiāls

Pētījumā iekļauti 52 pacienti. Saskaņā ar HIV/AIDS CDC klasifikāciju (1993) 19 pacientiem bija asimptomātiska HIV-1 infekcija (A1+A2), 9 – simptomātiska infekcija (B1+B2) un 24 pacientiem – AIDS (A3, B3, C1, C2, C3). Vidējais pacientu vecums bija 33 gadi (no 17 līdz 53 gadiem). 10 pacienti bija sievietes, 42 – vīrieši. Pētījumam saņemta Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komisijas atļauja, un visi pacienti piekrita šim pētījumam.

Perifēro asiņu paraugi ņemti Latvijas Infektoloģijas centrā 2002.–2003. gadā. HIV-1 infekcija diagnosticēta, pamatojoties uz seroloģiskajiem testiem. HIV-1 antivielas serumā pierādītas ar ELISA metodi ar vairākiem komercfirmas reaģentiem – *Abbott*, ASV; *Bio-Rad*, Francija; *Dade Behring*, Vācija – un rezultāti apstiprināti ar *Western immunoblot* vai neitralizācijas testu (*Bio-Rad*, Francija; *Inmunogenetics* Beļģija; *Abbott*, ASV; *Inmunogenetics*, Vācija). CD4+T šūnu skaits seropozitīviem indivīdiem analizēts ar plūsmas citometrijas metodi.

Virusoloģiskās metodes

Totāla DNS bija izolēta no perifēro asiņu leikocītiem (PBL) un plazmas, kas atbrīvota no šūnām. DNS no šūnām izdalīja ar *fenol-hloroform* ekstrakcijas metodi, no plazmas – ar *QIAamp Blood Kit* palīdzību. Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu (nPCR) izmantota, lai konstatētu vīrusu genomu secību klātbūtni PBL un plazmas DNS. CMV DNS konstatēšana notika saskaņā ar *Studahl et al.* (17); HHV-6 DNS – ar *Bandobashi et al.* (18) un HHV-7 DNS – saskaņā ar *Berneman et al.* (19).

Statistiskā metode. Statistiskās atšķirības starp grupām tika iegūtas, izmantojot Fišera testu.

Rezultāti

Latentas (persistentas) β -herpesvīrusu infekcijas noteikšana HIV-1 inficētiem pacientiem. β -Herpesvīrusu genomu secības PBL DNS atrastas 43 no 52 pacientiem ar HIV-1 infekciju (82,7%). Vienlaicīga vairāku vīrusu infekcija konstatēta 32 no 52 pacientiem (61,5%). Nebija ievērojamas atšķirības latentas (persistentas) CMV infekcijas prevalencē starp pacientiem, kam ir asimptomātiska (84,2%), simptomātiska (77,8%) HIV-1 infekcija un AIDS (75,0%) (sk. 1. tab.). Paaugstinātā latentas (persistentas) HHV-6 infekcijas sastopamība novērota paralēli HIV-1 infekcijas progresēšanai (26,3%, 33,3%, 37,5%), taču šī atšķirība pēģito pacientu grupā nav statistiski ticama.

HHV-7 infekcijas sastopamība bija augsta visās grupās. Latenta (persistenta) HHV-7 infekcija tika statistiski ticami biežāk konstatēta pacientiem, kam ir HIV-1 simptomātiska infekcija ($p = 0,015$) salīdzinājumā ar AIDS pacientiem. Iegūtie dati parāda, ka latentā (persistenta) β -herpesvīrusu infekcija ir plaši izplatīta starp pacientiem ar dažādu HIV/AIDS klīniku.

1. tabula

β -Herpesvīrusu genomu secību konstatēšana PBL DNS pacientiem ar dažādām HIV-1 infekcijas stadijām un AIDS ($n = 52$), izmantojot nPCR
Detection of β -herpesvirus sequences in PBMC DNAAs of patients with different stages of HIV- 1 infection and AIDS ($n = 52$) by nPCR

Vīrusu infekcija	HIV-1 infekcija		AIDS stadija
	Asimptomātiska	Simptomātiska	
CMV	16/19	7/9	18/24
HHV-6	5/19	3/9	9/24
HHV-7	14/19	9/9	14/24
Vienlaicīgā infekcija	11/19	7/9	14/24

nPCR – polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu; PBL – perifēro asiņu mononukleāras šūnas; pozitīvo skaits/testēto skaits

nPCR- nested polymerase chain reaction; PBMC- peripheral blood mononuclear cells; number positive (number tested)

Aktīvas β -herpesvīrusu infekcijas noteikšana HIV-1 inficētiem pacientiem. AIDS pacientiem aktīva CMV infekcija atrasta 2,6 reizes biežāk (33,3%) nekā pacientiem, kam ir asimptomātiska infekcija (12,5%) un 1,2 reizes biežāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (28,6%) (sk. 2. tab.). Aktīva HHV-6 infekcija AIDS slimniekiem konstatēta 3 reizes biežāk (77,7%) salīdzinājumā ar asimptomātisku HIV-1 infekciju (20,0%) un 1,2 reizes biežāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (66,7%).

Aktīva HHV-7 infekcija AIDS pacientiem konstatēta 3 reizes biežāk (64,3%) nekā pacientiem, kam ir asimptomātiska HIV-1 infekcija (21,4%), bet retāk nekā pacientiem, kam ir simptomātiska HIV-1 infekcija (77,8%).

2. tabula

β -Herpesvīrusu genomu secību konstatēšana plazmas DNS pacientiem ar HIV-1 infekcijas dažādām stadijām un AIDS (nPCR)
Detection of β -herpesvirus sequences in plasma DNAAs of patients with different stages of HIV- 1 infection and AIDS by nPCR

Vīrusu infekcija	HIV infekcija		AIDS stadija
	Asimptomātiska	Simptomātiska	
CMV	2/16	2/7	6/18
HHV-6	1/5	2/3	7/9
HHV-7	3/14	7/9	9/14
Vienlaicīgā infekcija	1/11	1/7	8/14

nPCR – polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu; pozitīvo skaits (testēto skaits)

nPCR- nested polymerase chain reaction; number positive (number tested)

Salīdzinot ar HIV-1 infekcijas asimptomātiskiem nēsātājiem, AIDS pacientiem novērots aktīvas vienlaicīgas vairāku vīrusu infekcijas ievērojams pieaugums (attiecīgi 57,1% un 9,1%; $p = 0,03$).

Vienlaicīga CMV, HHV-6 un HHV-7 aktivācija atrasta diviem AIDS slimniekiem, HHV-7 un HHV-6 – vienam, CMV un HHV-7 – diviem AIDS slimniekiem.

Diskusija

52 pacienti, kam ir AIDS infekcijas dažādas klīniskas izpausmes (pamatojoties uz CD4+ šūnu skaitu), bija apzināti, lai izvērtētu β -herpesvīrusu izplatību un HIV-1 infekcijas imūnsupresijas pakāpes ietekmi uz šo vīrusu aktivāciju.

Šī darba rezultāti liecina, ka latentā (persistenta) β -herpesvīrusu infekcija ir ļoti izplatīta HIV-1 inficētiem pacientiem (sk. 1. tab.). Latentas (persistenta) CMV infekcija HIV-1 inficētiem pacientiem sastopama biežāk nekā asins donoriem (20). Šī fakta viens izskaidrojums varētu būt CMV seksuāla un (vai) asins transmisija, jo lielākā daļa pētāmo pacientu bija intravenozi narkomāni un (vai) homoseksuāļi (12). Aktīva CMV, HHV-6 un HHV-7 infekcija AIDS pacientiem bija 2,6–3,9 reizes biežāk nekā pacientiem, kam ir asimptomātiska HIV-1 infekcija. Ļoti bieži aktīva CMV infekcija tika novērota pacientiem AIDS stadijā, tas atbilst *Welch et al.* (21) un *Erice et al.* (11) iegūtajiem datiem. Aktīva vienlaicīga β -herpesvīrusu infekcija AIDS pacientiem bija statistiski ticami biežāk ($p = 0,03$) salīdzinājumā ar HIV-1 asimptomātiskiem nēsātājiem. Vienlaicīga β -herpesvīrusu aktivācija konstatēta tikai AIDS pacientiem.

Secinājumi

β -Herpesvīrusu infekcija ir plaši izplatīta starp HIV-1 inficētiem pacientiem. HIV-1 infekcijas progresēšana un imūnsupresijas padziļināšanās var ietekmēt β -herpesvīrusu aktivāciju.

HIV-1 inficētu pacientu laboratoriskajā diagnostikā būtu ieteicams iekļaut ne tikai CMV, bet arī HHV-6 un HHV-7 infekcijas, tas ļautu prognozēt iespējamo komplikāciju un blakusslimību risku.

Literatūra

1. Clark D. A. Human Herpesvirus 6: Prevalence of Infection in the Immunocompromised Host. *Review. British J. Haematol.*, 2003, 120: 384–395.
2. Docrell D. H. Human Herpesvirus 6: Molecular Biology and Clinical Features. *Review. J. Med. Virol.*, 2003, 52: 5–18.
3. Addo M. M., Rosenberg E. S. Cellular Immune Responses in Transplantation – Associated Chronic Viral Infection. *Transpl. Infect. Dis.*, 2002, 4: 31–40.
4. Boeckh M., Nichols W. G. Immunosuppressive Effects of Beta-Herpesviruses. *Herpes*, 2003, 10: 12–16.
5. Grivel J. C., Santoro F., Chen S. et al. Pathogenic Effects of Human Herpesvirus 6 in Human Lymphoid Tissue ex vivo. *J. Virol.*, 2003 77: 8280–8289.
6. Atedzoe B. N., Menezes J., Addario M. et al. Modulatory Effect of Human Herpesvirus-7 on Cytokine Synthesis and Cell Proliferation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture. *J. Leukocyte Biol.*, 1999, 66: 822–828.
7. Ljungman P. β -Herpesvirus Challenges in the Transplant Recipient. *J. Infect. Dis.*, 2002, 186 (suppl): 99–109.
8. Katsafanas G. S., Schirmer E. C., Wyatt L. S. et al. In vitro Activation of Human Herpesvirus 6 and 7 from Latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 9788–9792.
9. Chapenko S., Folkmane I., Tomson V. et al. Co-Infection of Two β -Herpesviruses (CMV and HHV-7) as an Increased Risk Factor for „CMV Disease” in Patients Undergoing Renal Transplantation. *Clin. Transpl.*, 2000, 14: 486–492.
10. Spector S. A., Wong R., Hsia K. et al. Plasma Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Preceded CMV Disease and Survival in AIDS Patients. *J. Clin. Investig.*, 1998, 101: 497–502.
11. Erice A., Tierney C., Hirsch M. et al. Cytomegalovirus (CMV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Burden, CMV End-Organ Disease, and Survival in Subjects with Advanced HIV Infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 37: 567–578.
12. Robain M., Boufassa F., Hubert J. B. et al. Is Cytomegalovirus Infection a Co-Factor in HIV-1 Disease Progression? *Epidemiol. Infect.*, 2000, 125: 415–420.
13. Dolcetti R., Di Luca D., Carbone A. et al. Human Herpesvirus 6 in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals: Association with Early Histologic Phases of Lymphadenopathy

- Syndrome but not Malignant Lymphoproliferative Disorders. *J. Med. Virol.*, 1996, 48: 344–353.
14. Bonura F., Perna A. M., Vitale F. et al. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus (HIV) by Variant B of Human Herpesvirus 6 (HHV-6). *New Microbiol.*, 1999, 22: 161–171.
 15. Emery V. C., Atkins M. C., Bowen E. F. et al. Interactions Between Beta-Herpesviruses and Human Immunodeficiency Virus in vivo: Evidence for Increased Human Immunodeficiency Viral Load in the Presence of Human Herpesvirus 6. *J. Med. Virol.*, 1999, 57: 278–282.
 16. Kempf W., Muller B., Maurer R. et al. Increase Expression of Human Herpesvirus 7 in Lymphoid Organs of AIDS Patients. *J. Clin. Virol.*, 2000, 16: 193–2001.
 17. Studahl M., Bergstrom T., Ekeland-Sjoberg K. et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Cerebrospinal Fluid in Immunocompetent Patients as a Sign of Active Infection. *J. Med. Virol.*, 1995, 46: 274–278.
 18. Bandobashi K., Diabata M., Kamioka M. et al. Human Herpesvirus 6 (HHV-6)-Positive Burkitt's lymphoma: Establishment of a Novel Cell Line Infected with HHV-6. *Blood*, 1997, 90: 1200–1207.
 19. Berneman Z. N., Ablashi D. V., Li et al. Human Herpesvirus 7 is a T-lymphotropic Virus and is Related to, but Significantly Different from, Human Herpesvirus 6 and Human Cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 10552–10556.
 20. Kozireva S., Nemceva G., Danilane I. et al. Prevalence of Blood-Borne Viral Infection (Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, Human Herpesvirus-7 Human Herpesvirus-8, Human T-cell Lymphotropic Virus-I/II, Human Retrovirus-5) among Blood Donors in Latvia. *Ann. Hematol.*, 2001, 80: 669–673.
 21. Welch K., Kissinger P., Bessinger R. et al. The Clinical Profile of End-Stage AIDS. *AIDS Pat Care STDS*, 1998, 12: 125–129.

Summary

Latent/persistent β -herpesviruses infection is widespread among HIV-1 infected patients. The frequency of the β -herpesviruses activation increased with the disease progression, suggesting the relationship between β -herpesviruses activation and the immunosuppression degree.

Factors affecting the course of HIV-1 infection have been studied insufficiently. The role of lymphotropic ubiquitous β -herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7) as co-factors in HIV-1 disease progression is estimated controversially. The aim of this study was to investigate the prevalence of β -herpesviruses infection among patients with different clinic of HIV/AIDS and to evaluate the effect of immunosuppression on the activation of latent/persistent β -herpesviruses infection.

Peripheral blood samples were obtained from 52 patients with HIV-1 infection (19 – asymptomatic; 9 – symptomatic; 24 – AIDS). ELISA and Western immunoblot or neutralization test were used for the diagnosis of HIV-1 infection. The number of CD4+ T cells was determined by laser flow cytometry. nPCR was used for the detection of β -herpesviruses sequences in PBL and cell-free plasma DNAs.

Latent/persistent β -herpesviruses infection was detected in 82.7% (43/52) of patients with HIV-1 infection, among them - concurrent β -herpesviruses infection in 61.5% (32/52). The prevalence of active CMV infection was 2.6 times higher in AIDS patients (6/18, 33.3%) in comparison to the patients with asymptomatic HIV-1 infection (2/16, 12.5%). HHV-6 activation was detected in 77.7% (7/9) of AIDS patients, in 20.0% (1/5) of asymptomatic HIV-1 infected and in 66.7% (2/3) in symptomatic HIV-1 infected patients. The frequency of HHV-7 activation (plasma viremia) was 3.0 times higher in AIDS patients (9/14, 64.3%) in comparison to the asymptomatic (3/14, 21.4%) HIV-1 carriers. The prevalence of active concurrent β -herpesviruses infection was significantly higher in AIDS patients. Simultaneous activation of several β -herpesviruses was detected in AIDS patients only.

Key words: HIV-1, AIDS, immunosuppression, β -herpesviruses, PCR.

Vai kardiovaskulāro komplikāciju risks ietekmē ārstēšanas stratēģijas izvēli pacientiem ar diagnozi „nestabilā stenokardija” vai ne-Q miokarda infarktu

Does the Risk of Cardiovascular Events Influence the Management Strategy in Patients with Unstable Angina or Non-Q-Wave Myocardial Infarction?

Uldis Kalniņš[†], Milāna Zabunova, Sanda Jēgere

Latvijas Kardioloģijas centrs, Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
Pilsõņu iela 13, Rīga, LV-1002
E-pasts: milanaz@one.lv

Pacientiem ar diagnozi „nestabilā stenokardija” vai „ne-Q miokarda infarkts” ir augsts kardiovaskulāro komplikāciju attīstības risks. Klīniskā stratēģija – atbilstoša medikamentozā terapija un (vai) agrīna revaskularizācija – atkarībā no riska novērtēšanas šiem pacientiem uzlabo gan klīniskos iznākumus, gan nākotnes prognozi.

Pētījuma mērķi: 1) novērtēt, kā kardiovaskulāro komplikāciju risks ietekmē ārstēšanas stratēģiju, ko izmanto pacientiem, kuri iekļauti pētījumā un kuriem ir nestabilā stenokardija vai ne-Q miokarda infarkts; 2) iegūtos datus salīdzināt ar Eiropas Kardiologu biedrības, Amerikas Kardioloģijas koledžas, Amerikas Sirds asociācijas un Latvijas Kardiologu biedrības izstrādātajām akūta koronāra sindroma vadlīnijām; 3) analizēt klīniskos iznākumus – kardiovaskulāro komplikāciju (notikumu) biežumu – hospitalizācijas laikā un trīsdesmit dienas pēc akūta koronāra sindroma.

Prospektīvajā klīniskajā pētījumā iekļauti 162 pacienti, kuri no 2004. gada 9. janvāra līdz 2004. gada 10. martam stacionēti Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā Latvijas Kardioloģijas centra intensīvās terapijas palātā. Pēc izveidotās riska klasifikācijas shēmas pacienti tika sadalīti augsta, vidēja un zema riska grupā. Lai novērtētu klīniskos iznākumus, trīsdesmit dienas pēc akūta koronāra sindroma tika veikta pacientu telefoniskā aptauja.

Augsta riska grupā pirmajās 48 stundās pēc stacionēšanas trombocītu glikoproteīnu IIb/IIIa receptoru inhibitori un perkutānā koronārā intervence tika lietota lielākam pacientu īpatsvaram nekā zema un vidēja riska grupā. Aspirīna, klopidogrela, mazas molekulas heparīnu, nitrātu, beta adrenoblokatoru, statīnu, angiotenzīnu konvertējoša enzīma inhibitoru farmakoterapijā nenovēroja statistiski ticamas atšķirības starp riska grupām.

Secinājumi: 1) klīniskajā praksē pacientu sadalījums akūtā koronārā sindroma (bez ST segmenta elevācijas) riska grupās ietekmē ārstēšanas stratēģijas izvēli pacientiem, kam ir nestabila stenokardija vai ne-Q miokarda infarkts; 2) ārstēšanas stratēģijas izvēle atbilst profesionālo kardiologu asociāciju akūta koronāra sindroma rekomendāciju ārstēšanas taktikai atbilstoši riska grupu sadalījumam; 3) zema riska grupā novērots mazāks kardiovaskulāro notikumu skaits nekā vidēja un augsta riska grupā gan hospitalizācijas periodā, gan trīsdesmit dienu laikā pēc akūta koronāra notikuma.

Atslēgvārdi: akūts koronārs sindroms, kardiovaskulārie notikumi, riska novērtēšana.

Ievads

Akūts koronārs sindroms (AKS) ir nopietna sabiedrības veselības problēma, kas saistīta ar biežu hospitalizāciju un augstu mirstību. Eiropā pacientu mirstība ar akūtu koronāru sindromu bez ST segmenta elevācijas pirmā pusgada laikā sasniedz 12% (1).

Pacientiem, kam noteikta diagnoze „Nestabilās stenokardijas (NS) vai ne-Q miokarda infarkts (ne-Q-MI)”, ir augsts kardiovaskulāro komplikāciju jeb notikumu risks, tāpēc riska novērtēšana ir būtiska šo akūtu koronāru sindromu ārstēšanas stratēģijas izvēlē (2, 3). Atkarībā no tā agrīni uzsākta medikamentozā terapija un (vai) neatliekama revaskularizācija šiem pacientiem uzlabo gan klīniskos iznākumus, gan nākotnes prognozi (1). Klīniskie dati sākotnējā novērtēšanā var palīdzēt klasificēt AKS pacientus un izvēlēties optimālu ārstēšanas stratēģiju katrā riska grupā (4).

Pētījuma mērķi ir novērtēt kardiovaskulāro komplikāciju risku pacientiem, kam ir nestabilā stenokardija vai ne-Q-MI, pamatojoties uz demogrāfiskiem, klīniskiem un bioķīmiskiem rādītājiem pacientu iestāšanās brīdī; novērtēt ārstēšanas stratēģijas izvēli reālajā klīniskajā praksē atkarībā no riska pakāpes un analizēt klīniskos iznākumus – kardiovaskulāro komplikāciju (notikumu) biežumu – hospitalizācijas laikā un trīsdesmit dienas pēc akūta koronāra sindroma.

Pacienti un metodes

Norises vieta

Prospektīvajā klīniskajā pētījumā secīgā kārtībā iekļauti 162 pacienti, kuri no 2004. gada 9. janvāra līdz 2004. gada 10. martam akūtā kārtā stacionēti Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā Latvijas Kardioloģijas centra intensīvās terapijas palātā.

Pacientu izvēle

Iekļaušanas kritēriji

Vecums \geq 18 gadi

Iestāšanās diagnoze:

- 1) AKS bez ST segmenta elevācijas;
- 2) AKS ar tranzitorām ST segmenta elevācijām;
- 3) ne-Q miokarda infarkts;
- 4) nestabilā stenokardija.

Izslēgšanas kritēriji

Iestāšanās diagnoze:

- 1) AKS ar ST segmenta elevāciju;
- 2) Q miokarda infarkts;
- 3) cita diagnoze.

Anketa

Informācija par pacientu, kam ir NS/ne-Q-MI gala klīniskā diagnoze, fiksēta speciāli šim pētījumam sastādītajā anketā. Pamatojoties uz literatūrā atspoguļotiem starptautisko randomizēto pētījumu rezultātiem, anketā tika iekļauti pamatjautājumi, lai novērtētu kardiovaskulāro komplikāciju riskus, kuriem ir pierādīta nozīme turpmāko koronāro

notikumu attīstībā (pēkšņa nāve, MI/atkārtots MI, atkārtota išēmiskā lēkme) pacientiem, kam ir NS vai ne-Q-MI (2, 5–8).

Riska klasifikācijas jeb stratifikācijas shēmas izstrādāšanai ņemti vērā šādi riska faktori: vecums ≥ 65 gadi, iepriekšējo slimību un invazīvo manipulāciju anamnēze (stenokardija, pārciests miokarda infarkts (MI), pārciests insults, cukura diabēts, arteriālā hipertensija, hroniskā sirds mazspēja, hiperholesterinēmija, perifēro artēriju slimība, koronārā angiogrāfija, perkutānā koronārā intervence (PCI), koronāro artēriju šuntēšana (KAŠ), klīniskā manifestācija, pārmaiņas elektrokardiogrammā (EKG) un miokarda bojājuma marķieru (troponīns I vai kreatīnkināzes MB frakcija (CK-MB masa)) paaugstinātie

1. tabula

Katram kardiovaskulāro komplikāciju riska faktoram piešķirtais punktu skaits

Riska faktors	Punkti	Riska faktors	Punkti
Vecums ≥ 65 gadi	1	PCI	1
	Anamnēzē:	KAŠ	1
		Sāpes krūtīs pirms hospitalizācijas	1
Stenokardija	1	Sāpes krūtīs hospitalizācijas brīdī	1
Pārciests MI	1	Recidivējošas sāpes krūtīs	1
Pārciests insults	1	Hemodinamikas nestabilitāte	1
Cukura diabēts	1	EKG izmaiņas (ST segmenta tranzitorā elevācija vai ST segmenta depresija, vai negatīvi T zobī)	1
Arteriālā hipertensija	1	Paaugstināti troponīna I vai CK-MB masas rādītāji	1
HSM	1		
Hiperholesterinēmija	1		
Perifēro artēriju slimība	1		
Koronārā angiogrāfija	1		

MI – miokarda infarkts; HSM – hroniskā sirds mazspēja; PCI – perkutānā koronārā intervence; KAŠ – koronāro artēriju šuntēšana; EKG – elektrokardiogramma

rādītāji. Katrs minētais riska faktors novērtēts ar vienu punktu, bet ar nulli, ja šis faktors nav bijis konstatēts (sk. 1. tab.).

Atbilstoši riska punktu skaitam pacienti tika sadalīti trīs grupās – zema riska (0–4 punkti), vidēja riska (5–9 punkti) un augsta riska (10–18 punkti) grupā.

Pacienta aptaujas lapā tika iekļauts arī ārstēšanas protokols, kas ietver datus par konservatīvu ārstēšanu (aspirīns, klopidogrels, nefrakcionēts heparīns (NH) vai mazas molekulas heparīni (MMH), angiotenzīnkonvertējošā enzīma inhibitori (AKEI), nitrāti, beta adrenoblokatori, trombocītu glikoproteīnu IIb/IIIa receptoru inhibitori (GP IIb/IIIa RI), statīni) un datus par invazīvo ārstēšanas stratēģiju (neatliekama PCI vai KAŠ).

Pētījuma anketā tika fiksēta informācija par kardiovaskulārām komplikācijām hospitalizācijas laikā un iznākumiem.

Trīsdesmit dienu rezultāti

Trīsdesmit dienas pēc akūta koronāra notikuma tika veikta pacientu telefoniskā aptauja, iepriekš informējot pacientus par aptaujas mērķiem.

Funkcionālā klase novērtēta atbilstoši Kanādas Kardiologu asociācijas stabilas slodzes stenokardijas klasifikācijai. Atkārtota išēmiskā lēkme definēta kā tipiskas kardiālas, stenokardijai raksturīgas sāpes krūtīs līdz divdesmit minūtēm un ilgāk fiziskās slodzes laikā vai miera stāvoklī; MI (atkārtots MI) – ja pacients trīsdesmit dienu laikā ir bijis stacionēts ar šo diagnozi.

Katrā gadījumā pa tālruni tika runāts ar pašu pacientu, izņemot vienu gadījumu, kad informācija saņemta no radniekiem (pacients bija miris).

Datu apstrāde

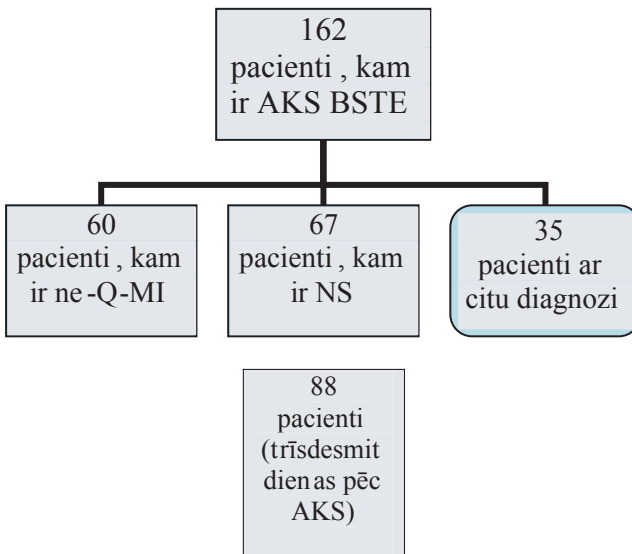
Datu apstrāde veikta, izmantojot *Microsoft Excel* un *SPSS* datorprogrammu. Primāri ievāktiem datiem norādīta vidējā vērtība \pm standartnovirze. Statistikas analizē p vērtība noteikta ar Hī kvadrāta (*Chi-Square*) testa metodi. Par statistiski ticamām uzskatītas atšķirības p vērtībām, mazākām par 0,05.

Rezultāti

Pētījumā tika iekļauti 162 pacienti ar AKS bez ST segmenta elevācijas atbilstoši iekļaušanas kritērijiem. Gala klīniskā diagnoze ne-Q-MI bija 60 pacientiem (37%), nestabilā stenokardija – 67 pacientiem (41%) un cita diagnoze – 35 pacientiem (22%). Telefoniskā aptaujā iegūta informācija par 88 pacientiem (69%) no kopējā pacientu skaita ar NS/ne-Q-MI diagnozi trīsdesmit dienas pēc akūta koronāra notikuma (sk. 1. att.). Ar pārējiem 39 pacientiem (31%) nebija iespējams nodibināt telefonisku kontaktu.

Pacientu vidējais vecums bija $66,3 \pm 12,6$ gadi (no 34 līdz 91 gadam). Vidējais vecums pirmajā grupā – $48,7 \pm 9,3$ gadi, otrajā grupā – $67,2 \pm 12,2$ gadi, trešajā grupā – $69,8 \pm 10,1$ gadi. Visās riska grupās konstatēts vīriešu dzimuma pārsvars – 77,8% gadījumu zema riska grupā, 62,1% gadījumu vidēja riska grupā un 56,5% gadījumu augsta riska grupā.

Visās trīs riska grupās analizēti pamatjautājumi par ilgtermiņa riska un akūtā riska



1. attēls. Pacientu grupu raksturojums

AKS BSTE – akūts koronārs sindroms bez ST-segmenta elevācijas

Ne-Q-MI – ne-Q miokarda infarkts

NS – nestabilā stenokardija

novērtēšanu, aplūkota ārstēšanas stratēģija pirmajās 48 stundās pēc hospitalizācijas, analizētas kardiovaskulārās komplikācijas stacionētajiem pacientiem un iznākumu rezultāti trīsdesmit dienu laikā pēc AKS epizodes.

2. tabula

Ārstēšanas stratēģijas analīze riska grupās

Ārstēšana	Zema riska grupa	p	Vidēja riska grupa	p	Augsta riska grupa	p
	I	I-II	II	II-III	III	I-III
Aspirīns	100,0	0,660	97,9	0,483	100,0	-
Klopidogrels	33,3	0,914	31,6	0,768	34,8	0,938
MMH	88,9	0,784	91,6	0,149	100,0	0,104
NH	0	0,757	1,1	0,621	0	-
Nitrāti	100,0	-	100,0	-	100,0	-
β-adrenoblokatori	100,0	0,280	88,4	0,303	95,7	0,525
Statīni	88,9	0,967	88,4	0,453	82,6	0,660
GP IIb/IIIa RI	11,1	0,657	16,8	0,950	17,4	0,660
AKEI	66,7	0,032	90,5	0,611	87,0	0,186
PCI	11,1	0,657	16,8	0,307	26,1	0,357

MMH – mazas molekulas heparīni; NH – nefrakcionēts heparīns; GP IIb/IIIa RI – trombocītu glikoproteīnu IIb/IIIa receptoru inhibitori; AKEI – angiotenzīnu konvertējošā enzīma inhibitori; PCI – perkutānā koronārā intervence

Lietotās ārstēšanas stratēģijas analīzē (pirmajās 48 stundās pēc hospitalizācijas) statistiski ticamu atšķirību starp riska grupām nebija. Atšķirība novērota tikai starp zema un vidēja riska grupu AKEI lietošanā – attiecīgi 66,7% un 90,5% gadījumu ($p = 0,032$) (sk. 2. tab.).

Visiem 127 pacientiem (100% gadījumu) ārstēšanā tika izrakstīti nitrāti, aspirīns 100% gadījumu lietots tikai zema un augsta riska grupas pacientiem, MMH – 100% gadījumu augsta riska grupā, bet beta adrenoblokatori – 100% gadījumu tikai zema riska grupā.

Apmēram vienai trešdaļai pacientu katrā riska grupā tika ieteikts otrs ārstēšanas stratēģijā iekļautais antiagregants – klopidogrels – 33,3%, 31,6% un 34,8% attiecīgi zema, vidēja un augsta riska grupā.

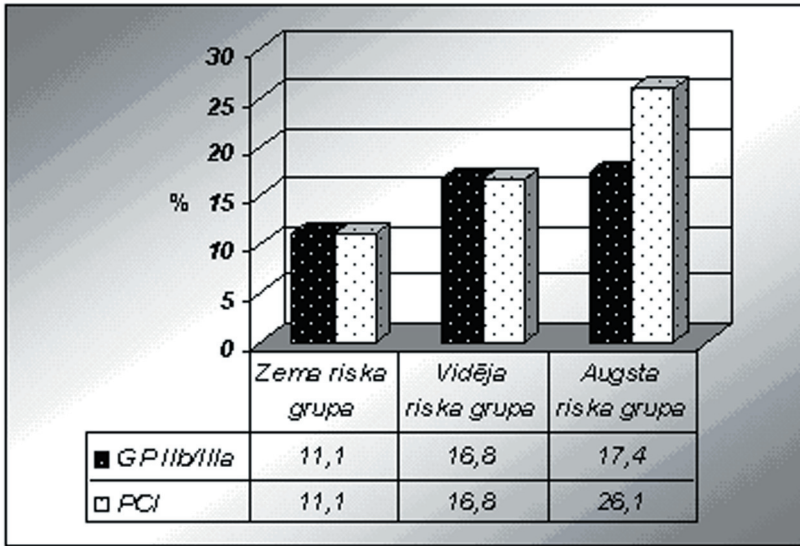
Starp pacientu ārstēšanā lietotajiem antikoagulantiem bija acīmredzams MMH pārsvars – NH bija ieteikts tikai vienam vidēja riska grupas pacientam (1,1%), savukārt MMH – 88,9% gadījumu zema riska grupā, 91,6% vidēja riska grupā un, kā jau minēts iepriekš, 100% augsta riska grupā.

Pretēji riska punktu skaitam mainījās statīnu lietošanas īpatsvars pacientu vidū: 88,9% – pirmajā, 88,4% – otrajā un 82,6% gadījumu trešajā riska grupā.

Taču bija vērojama pārliecinoši augstāka tendence GP IIb/IIIa RI un PCI lietošanā pacientiem augsta riska grupā salīdzinājumā ar divām pārējām pacientu riska grupām – 17,4% un 26,1% gadījumu pret 11,1% un 11,1% gadījumu zema riska grupā un 16,8% un 16,8% gadījumu vidēja riska grupā (sk. 2. att.).

Koronāro artēriju šuntēšana kā ārstēšanas metode netika lietota nevienā gadījumā nevienā riska grupā.

Pacientiem atrodies stacionārā, kardiovaskulārās komplikācijas nebija novērotas zema riska grupā, savukārt atkārtota išēmiskā lēkme vidēja riska grupā konstatēta 12,6% gadījumu un augsta riska grupā 17,4% gadījumu. Augsta riska grupā nebija konstatēts MI/atkārtots MI vai nāves gadījums, turpretim vidēja riska grupā atkārtots MI bija attīstījies vienam pacientam un viens pacients bija miris.



2. attēls. Perkutānās koronārās intervences un glikoproteīnu IIb/IIIa receptoru inhibitoru lietojums pacientiem dažādās riska grupās (%)

GP IIb/IIIa RI – trombocītu glikoproteīnu IIb/IIIa receptoru inhibitori;
 PCI – perkutānā koronārā intervence

Zema riska grupā trīsdesmit dienas pēc stacionēšanas ar AKS nebija konstatēts neviens kardiovaskulārs notikums (atkārtota išēmiskā lēkme, MI/atkārtots MI vai nāve).

3. tabula

Trīsdesmit dienas pēc AKS (rezultāti, %)

Trīsdesmit dienas pēc AKS	Zema riska grupa n=6	Vidēja riska grupa n=67	Augsta riska grupa n=15
• Atkārtota išēmiskā lēkme	0	7,5	6,7
• MI/atkārtots MI	0	3,0	6,7
• Miris	0	1,5	0

MI – miokarda infarkts

Vidēja un augsta riska grupā novēroja atkārtotu išēmisku lēkmi attiecīgi 7,5% un 6,7% gadījumu, bet MI/atkārtots MI konstatēts attiecīgi 3,0% un 6,7% gadījumu. Miris bija viens pacients, kurš pēc punktu skaita atbilda vidējai riska grupai (sk. 3. tab.).

Diskusija

AKS pacientu ārstēšana ir interaktīvs un salikts process, kas atkarīgs gan no ārsta kardiovaskulāro notikumu riska izpratnes un novērtēšanas, gan no riska mazināšanas iespējām ar pieejamiem terapeitiskajiem līdzekļiem, kā arī no adekvātas atbildes uz izraudzīto terapiju (9). GRACE pētījums parādīja, ka mirstība sešu mēnešu laikā tiem pacientiem, kas hospitalizēti ar AKS, bija 4,8% gadījumu pacientiem, kam ir MI ar ST segmenta elevāciju, 6,2% gadījumu pacientiem, kam ir MI bez ST segmenta elevācijas, un 3,6% gadījumu – kam ir nestabilā stenokardija (10).

Riska novērtēšanas modeļi ļauj noteikt tos pacientus, kuriem nepieciešams agrīni uzsākt invazīvo ārstēšanu un, iespējams, „agresīvāk” izmeklēt. Starp tādiem modeļiem ir minams nesen publicētais GRACE kardiovaskulāro notikumu prediktīvs modelis, kas ļauj novērtēt sešu mēnešu nāves risku pacientiem ar visu formu akūtiem koronāriem sindromiem (11).

Riska novērtēšanas modeļa izveidē autori pamatojās uz TIMI shēmu, kas izstrādāta, lai noteiktu riska punktu skaitu, ņemot vērā šādus notikumus – pēkšņa nāve, MI vai atkārtota išēmijas epizode pacientiem, kam ir NS/ne-Q-MI (6). Tāda vienkārša riska novērtēšanas shēma bez grūtībām var tikt inkorporēta klīniskajā praksē atšķirībā no citiem komplikētākiem modeļiem, kas radīti AKS riska novērtēšanai (8, 9, 12).

Šis prospektīvs pētījums demonstrē, kā NS vai ne-Q-MI slimnieku primārs novērtējums pēc standarta klīniskajiem parametriem, kas definēti kā ilgtermiņa un akūtā riska marķieri, tiek izmantots vienkāršas pacientu riska klasifikācijas shēmas izveidošanā. Atbilstoši tai būtu iespējams prognozēt kardiovaskulāro išēmisko notikumu un nāves risku tuvākā nākotnē un atkarībā no tā izvēlēties efektīvāku ārstēšanas stratēģiju.

Taču pagaidām šajā pētījumā iegūtajiem datiem ir daži trūkumi. Pirmkārt, rezultāti gūti par nelielu analizēto pacientu skaitu, kā arī pacienti novērtēti tikai vienā ārstniecības iestādē, tas traucē pētījumā piedāvātās riska klasifikācijas shēmas ieviest klīniskajā praksē. Otrkārt, kritiski ir jāvērtē informācija, kas iegūta telefoniskajā aptaujā.

Pētījuma rezultāti apliecina, ka ārstēšanas stratēģija pacientiem, kam ir NS vai ne-Q-MI, atbilst rekomendācijās ieteiktai taktikai atbilstoši riska grupu novērtējumam: PCI vairāk tika lietota augsta riska grupas pacientiem – 26,1% pret 11,1% gadījumu zema riska grupā un attiecīgi 16,8% gadījumu vidēja riska grupā.

Šie rezultāti ir līdzīgi tā pētījuma rezultātiem, kurš pierāda TIMI riska punktu skaitu – palielinoties punktu skaitam, pieauga arī to pacientu īpatsvars, kuriem veikta neatliekamā revaskularizācija – 20,9% gadījumu ar lielāko punktu skaitu (7) un 1,2 % gadījumu ar vismazāko punktu skaitu (0/1) (6). Šī ārstēšanas stratēģija tika pierādīta randomizētajos pētījumos, kuros atspoguļoti labāki rezultāti vidēja un augsta riska grupas pacientiem, lietojot PCI (13–15).

Joprojām nav vienota pieņēmuma par augsta riska AKS pacientu optimālu ārstēšanu hospitālajā posmā. Daži klīnicisti atbalsta agrīnās invazīvās ārstēšanas stratēģijas lietojumu – sirds asinsvadu kateterizāciju un revaskularizāciju pirmajās 24–48 stundās pēc AKS simptomu parādīšanās atbilstoši profesionālo kardiologu asociāciju rekomendācijās ieteiktai ārstēšanas taktikai (16). Savukārt citi vairāk atbalsta konservatīvās stratēģijas lietojumu, respektīvi, sākotnēju medikamentozu stabilizāciju, kurai sekotu sirds kateterizācija, ja pacientam joprojām draudētu augsts risks attīstīties kardiovaskulārām komplikācijām (atgriezeniskā miokarda išēmija vai sastrēguma sirds mazspēja) (17). Mūsu pētījumā pacienti, kuriem lietota PCI, stacionārā tika nogādāti vidēji pēc 12 stundām pēc AKS simptomu parādīšanās.

Analizējot invazīvās ārstēšanas metodes lietojumu, starp grupām netika novērota statistiski ticama atšķirība, ko var izskaidrot ar nelielu pacientu skaitu gan visā pētījumā, gan arī katrā grupā atsevišķi. Taču, konstatējot pacientu īpatsvara starpību starp dažāda riska grupām GP IIb/IIIa RI un PCI lietošanā, domājams, ka, palielinoties pacientu skaitam, statistiska ticamība tiks sasniegta.

Pētījuma rezultāti liecina, ka zināšanas par risku ietekmē klīnisko lēmumu pieņemšanu ārstēšanas procesā. Savukārt, pamatojoties gan uz starptautisko pētījumu rezultātiem šajā jomā, gan arī analizējot išēmiskos notikumus hospitalizācijas laikā un trīsdesmit dienas pēc AKS šajā pētījumā, autori sniedz šādu ārstēšanas stratēģijas izvēles pamatojumu pacientiem, kam ir AKS bez ST segmenta elevācijas – pacientiem ar zemu atkārtotu

kardiovaskulāro notikumu attīstīšanās risku ātra izrakstīšanās no stacionāra ir saprotama un attaisnojama – rekomendācijās ieteiktie medikamenti samazina išēmisko notikumu attīstību šajā grupā līdz minimumam. Vidēja riska grupas pacienti būtu iekļaujami t. s. „piesardzīgās gaidīšanas” stratēģijā: viņi būtu jānovēro intensīvās terapijas palātā, kur iespējams monitorēt išēmijas pazīmes un noteikt atkārtota miokarda bojājuma marķierus. Dažiem pacientiem būtu nepieciešama invazīvā terapija, citus varētu ārstēt arī konservatīvi (9). Savukārt augsta riska grupas pacientiem būtu apsverama specifiska antitrombotiskā terapija, sevišķi paaugstinātu sirds troponīnu līmeņu gadījumā – GP IIb/IIIa RI lietojums varētu samazināt MI/atkārtota MI attīstīšanos, bet PCI būtu sevišķa nozīme šajā riska grupā (1, 6, 8, 15).

Literatūra

- Bertrand M. E., Simoons M. L., Fox K. A. A. et al. Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2002, 23: 1809–1840.
- Kennon S., Price C. P., Mills P. G. et al. Cumulative Risk Assessment in Unstable Angina: Clinical, Electrocardiographic, Autonomic, and Biochemical Markers. *Heart* 2003, 89: 36–41.
- Cannon C. P., Turpie A. G. G. Unstable Angina and non-ST-Elevation Myocardial Infarction. Initial Antithrombotic Therapy and Early Invasive Strategy. *Circulation* 2003, 107: 2640–2645.
- Newby L. K., Christenson R. H., Ohman E. M. et al. Value of Serial Troponin T Measures for Early and Late Risk Stratification in Patients with Acute Coronary Syndromes. The GUSTO-IIa Investigators. *Circulation* 1998, 98: 1853–1859.
- Cannon C. P. Evidence-Based Risk Stratification to Target Therapies in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2002, 106: 1588–1591.
- Antman E. M., Cohen M., Bernink P. J. L. M. et al. The TIMI Risk Score for Unstable Angina/non-ST-Elevation MI. *JAMA* 2000, 284: 835–842.
- Hunziker P., Marsch S., Pfisterer M. Diagnosis and Risk Stratification of Acute Coronary Syndromes in General Practice and in the Hospital. *Ther Umsch* 2002, 59(2): 72–78.
- Solomon D. H., Stone P. H., Glynn R. J. et al. Use of Risk Stratification to Identify Patients with Unstable Angina likelist to Benefit from an Invasive versus Conservative Management Strategy. *JACC* 2001, 38 (4): 969–976.
- Boersma E., Pieper K. S., Steyerberg E. W. et al. Predictors of Outcome in Patients with Acute Coronary Syndromes without Persistent ST-Segment Elevation. *Circulation* 2000, 101: 2557–2567.
- Morrow D. A., Antman E. M., Charlesworth A. et al. TIMI Risk Score for ST-elevation Myocardial Infarction: a Convenient, Bedside, Clinical Score for Risk Assessment at Presentation: an Intravenous nPA for Treatment of Infarcting Myocardium Early II Trial Substudy. *Circulation* 2000, 102: 2031–2037.
- Goldberg R. J., Currie K., White K. et al. Six-Month Outcomes in a Multinational Registry of Patients Hospitalized with an Acute Coronary Syndrome (The Global Registry of Acute Coronary Events [GRACE]). *Am. J. Cardiol.* 2004, 93: 288–293.
- Eagle K. A., Lim M. J., Dabbous O. H. et al. A Validated Prediction Model for all Forms of Acute Coronary Syndrome Estimating the Risk of 6-Month Postdischarge Death in an International Registry. *JAMA* 2004, 291: 2727–2733.
- Cannon C. P., Weintraub W. S., Demopoulos L. A. et al. Comparison of Early Invasive and Conservative Strategies in Patients with Unstable Coronary Syndromes Treated with the Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor Tirofiban. Rationale and Study Design of the International TACTICS-TIMI 18 Trial. *N. Engl. J. Med.* 2001, 344: 1879–1887.
- Fragmin, and Fast Revascularisation during Instability in Coronary Artery Disease Investigators. Invasive Compared with non-Invasive Treatment in Unstable Coronary-Artery Disease: FRISC II Prospective Randomised Multicentre Study. *Lancet* 1999, 354: 708–715.
- Fox K. A. A., Poole-Wilson P. A., Henderson R. A. et al. Interventional versus Conservative Treatment for Patients with Unstable Angina or non-ST-Elevation Myocardial Infarction: the British Heart Foundation RITA 3 Randomised Trial. *Lancet* 2002, 360: 743–751.
- Neumann F. J. Intracoronary Stenting with Antithrombotic Regimen Cooling-Off (ISAR-COOL) Study. Presented at the American Heart Association Scientific Sessions. 2002.
- Cohen D. J. Invasive vs Conservative Management of Acute Coronary Syndromes. *JAMA* 2002, 15: 1905–1907.

Summary

Objectives: Risk assessment is an integral part of the management of acute coronary syndromes, and clinical factors at initial presentation may help categorize such patients. The aim of this study was to estimate the application of management strategy to patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction depending on a degree of risk and to analyse clinical outcomes – rate of cardiovascular complications (events) during hospitalization and thirty days after discharge.

Design and Methods: This was a prospective clinical study. We recruited 162 consecutive patients that were admitted to the intensive care unit at the Latvian Centre of Cardiology, Paul Stradins' Clinical University Hospital with the diagnosis of acute coronary syndrome without ST elevation between January 09, 2004 and March 10, 2004. Patients were divided into three groups according to the risk stratification scheme. Cardiac ischemic events and mortality rate were registered at the hospital and by telephone call to each patient thirty days after the acute coronary event.

Results: The mean age of the patients was 66.3 ± 12.6 years (from 34 to 91), and 37.8 % of patients were female. There was no statistical significance between risk groups in application of medical agents, excluded angiotensin-converting enzyme inhibitors in low- and intermediate-risk patients ($p=0.032$). The largest number of patients who received platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors and underwent percutaneous coronary intervention was observed in the high-risk group – 17.4 % and 26.1 % accordingly, in low risk group only in 11.1 %. During thirty days, recurrent ischemia was observed in 7.5 % and 6.7 % of patients in intermediate- and high-risk groups accordingly, myocardial (re)infarction was observed in 3.0 % and 6.7 % accordingly in these groups. None of the cardiovascular events was observed in low-risk group patients in the thirty day follow-up.

Conclusions: Risk stratification in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction influences clinical decision making of the treatment strategy. Less cardiovascular complications were observed in patients at low risk for coronary events during hospitalization and at thirty days follow-up. Nevertheless, the model for risk stratification should be evidence based for improvement of effective treatment.

Key words: acute coronary syndrome, cardiovascular events, risk stratification.

Onkoproteīna BCL-2, citokeratīna 19 un S-100 ekspresija mandeļu šūnās hroniska tonsilīta pacientiem

Oncoprotein BCL-2, S-100 and Cytokeratin 19 Expression in Palatine Tonsils' Cells in Chronic Tonsillitis

Sergejs Isajevs, Jurijs Markovs, Gundega Knipše, Aija Žileviča

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: george@pit.lv

Pētījuma mērķis ir novērtēt morfoloģiskās pārmaiņas mandelēs hroniska recidivējoša un hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem. Histoloģiskais materiāls tika ņemts no 12 operētiem pacientiem, kas bija 10–18 gadus veci un kam tika veikta tonsilektomija un mandeļu mikrobioloģiskā izmeklēšana. Bcl-2, citokeratīna 19 un S-100 noteikšanai audos tika izmantota imūnhistokīmiskā bioķīmiska un avidīna metode. Hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem starpfolikulāros apvidos novēro samazinātu T regulatoru limfocītu (Treg) skaitu, kas ekspresē bcl-2, kā arī palielinātu antigēnprezentētājšūnu skaitu un kriptālā epitēlija pastiprinātu infiltrāciju ar leukocītiem. Hroniskam hipertrofiskam tonsilītam savukārt raksturīga limfoidālo audu hipertrofija un starpfolikulāros apvidos palielināts Treg, kas ekspresē bcl-2. Turklāt šī onkoproteīna ekspresija korelē ar limfoidālo audu hipertrofijas pakāpi.

Veiktais pētījums liecina, ka uz Treg un antigēnprezentētājšūnu sistēmas pārmaiņu fona rezidentmikrofloras antigēni izraisa hronisku iekaisumu mandelēs.

Atslēgvārdi: hronisks tonsilīts, imunoloģiskā tolerance, mikroorganismi.

Ievads

Cilvēka patoloģijā aktuāla problēma ir augšējo elpceļu infekcijas, no kurām galvenā nozīme ir hroniskam tonsilītam, kas raksturīgs jauniem cilvēkiem, visbiežāk 10–18 gadu vecumā. Šī slimība ir plaši sastopama, jo, pēc bērnu otorinolaringologu datiem, tās īpatnsvars ir 10–15% no visām kakla, ausu, deguna saslimšanām (1, 2).

Slimība bieži vien noris slēptā veidā, tātad asimptomātiski. Hroniska tonsilīta pacienti ir pakļauti akūtas infekcijas briesmām, nonākot ekstremālos apstākļos (aukstums, karstums, lietains laiks, vējš un liela slodze). Turklāt hroniskam tonsilītam ir raksturīgas gan lokālas komplikācijas (piemēram, abscess, elpceļu tūska), gan sistēmiskas komplikācijas (piemēram, meningīts, miokardīts, artrīts un nefrīts) (3, 4).

Hroniska iekaisuma persistencē svarīga nozīme ir imunoloģiskās tolerances traucējumiem (5). Tāpēc pastāvīga antigēna invāzija pat nelielās devās (piemēram, rezidentmikrofloras antigēni) izraisa imūnatbildi hroniska iekaisuma veidā (6, 7). Visbiežāk nosacīti veselu cilvēku mandelēs ieperinās šādi mikroorganismi: anaerobie streptokoki, hemolītiskie un *viridans* streptokoki, neisērijas, koagulāzes negatīvie stafilokoki, laktobaktērijas un korinebaktērijas, retāk *S. aureus*, enterokoki, sēnes (8).

Tolerances uzturēšanā izšķiroša nozīme ir vairākiem faktoriem, pirmkārt un galvenokārt, adekvātai antigēnprezentētājšūnu (S-100 pozitīvās šūnas), T regulatoro limfocītu (Treg) un B limfocītu diferenciacijai un mijiedarbībai (9, 7). Ir zināms, ka Treg (CD25 pozitīvās šūnas) ekspresē bcl-2 proteīnu, kas nomāc apoptozi, tādējādi pasargājot šīs šūnas no bojāejas (10). Otrkārt, kriptu epiteliālā barjera selektīvai caurlaidībai, ko nodrošina kriptu epitēlija starpšūnu adhēzijas molekulas, piemēram, kladūns1 (11, 12). Tomēr, lai novērtētu minēto faktoru nozīmi imunoloģiskās tolerances uzturēšanā, hroniska recidivējoša un hipertrofiska tonsilīta pacientiem pilnībā trūkst vienlaicīgas bcl-2, S-100 un CK-19 ekspresijas un rezidentmikrofloras sastāva pārmaiņu korelatīvās izpētes.

Darba mērķis ir pētīt hroniska tonsilīta imunoloģisko traucējumu mehānismus, par kritērijiem izmantojot antigēnprezentētājšūnu un limfocītu mijiedarbību un kriptu epitēlija selektīvu caurlaidību (kriptu epitēlija marķieris – citokeratīns 19), kā arī rezidentmikrofloras kolonizācijas pakāpi.

Pacienti un metodes

Pacientu atlase

Histoloģiskais materiāls tika paņemts no 12 pacientiem, kas bija 10–18 gadus veci un kam tika veikta tonsilektomija. Izmeklējamās personas tika iedalītas divās grupās: 1) hroniska recidivējoša tonsilīta pacienti (galvenā pazīme ir bieži paasinājumi) un 2) hroniska hipertrofiska tonsilīta pacienti (galvenā pazīme – mandeļu hipertrofija).

Imūnhistokīmiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai audus fiksēja 10% formalīnā 48 stundas, pēc tam atūdeņoja un ieguldīja parafīnā. No blokiem pagatavoja 4 μm biežus griezumus, kurus izmeklēja imūnhistokīmiski. Antigēna demaskēšanai izmantoja mikrovilņu karstuma metodi. Imūnhistokīmisko analīzi veica pēc biotīna avidīna metodes, izmantojot DAKO firmas LSAB+ kitu. Visas reakcijas notika *Shandon* mitrā kamerā istabas temperatūrā. Preparātus inkubēja ar peroksidāzes bloķētājreaģentu 10 minūtes, tad skaloja TBS. Pēc tam 30 minūtes inkubēja ar primāro antivielu bcl-2, S-100 vai citokeratīnu 19 (CK-19).

Pēc inkubācijas griezumus 5 minūtes skaloja ar TBS un tad turpināja pusstundu garu inkubāciju ar biotinilēto sekundāro antivielu (kazas IgG). Pēc preparātu atkārtotas skalošanas TBS turpināja pusstundu garu inkubāciju ar mārurtku peroksidāzi iezīmētu antivielu. Tad 5 minūtes veica vizualizācijas reakciju ar diamīnbenzidīnu (DAB). Pēc sekojošas preparātu skalošanas destilētā ūdenī tiem uzpilināja *Glycergel*, uzlika segstiklīnu un mikroskopēja. Preparāti analizēti, izmantojot *Motic Image* programmu, šūnu skaits izteikts uz laukuma vienību (mm²).

Citokeratīna 19 gadījumā imūnmorfoloģiskās reakcijas pakāpe tika vērtēta ar puskvantitatīvās metodes palīdzību, subjektīvi nosakot, cik intensīvi hromogēns nokrāso šūnas: negatīva reakcija (-), vāji pozitīva (1+), vidēji pozitīva (2+) un augsti izteikta (3+).

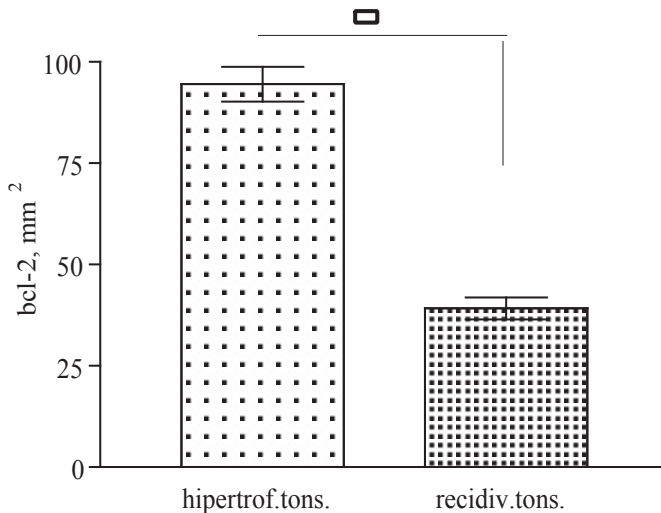
Pirms operācijas mikrobioloģiskajai izmeklēšanai visiem pacientiem tika ņemta uztriepe no mandelēm. Lai izdalītu tīrkultūru, materiālu uzsēja uz barotnēm pēc trīs svītru metodes (13). Tie mikroorganismi, kuru augšanas intensitāte bija liela, t. i., pārsniedza 50 kolonijas, tika uzskatīti par iespējamiem procesa ierosinātājiem. Tika izmantotas šādas barotnes: asins, Endo un sāls agars, kā arī Kandidu hromagars. Mikroorganismu bioķīmiskai identifikācijai tika izmantoti *Crystal* datorsistēmas testi.

Datu statistiskā apstrāde

Visi dati tika statistiski apstrādāti, izmantojot statistisko programmu *GraphPadPrism* trešo versiju. Grupas tika salīdzinātas, izmantojot *Mann-Whitney U* testu. Rezultāti tika novērtēti statistiski ticami, ja $p < 0,05$. Attēlos dati izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda.

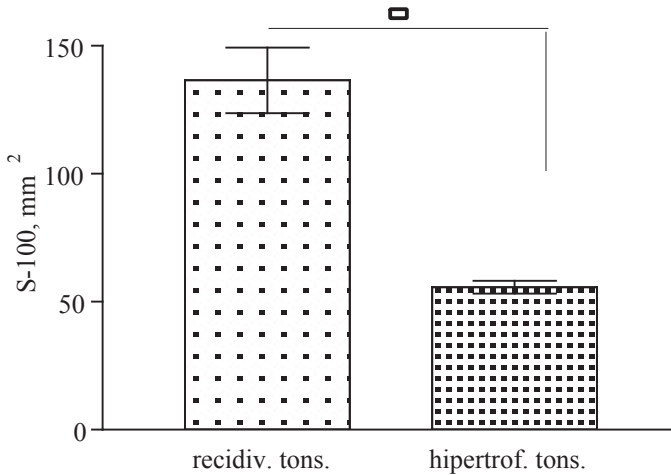
Rezultāti

Pētījumā iegūtie dati rāda, ka hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem, salīdzinot ar hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem, starpfolikulāros apvidos ir samazināts limfocītu skaits, kas ekspresē bcl-2 (atbilstoši 39 ± 6 un 94 ± 10 ; $p = 0,0022$; sk. 1. attēlu), un palielināts dendrītisko šūnu skaits (atbilstoši 136 ± 32 un 55 ± 16 ; $p = 0,002$; sk. 2. attēlu), bet kriptu epitēlijā ir palielināts S-100 šūnu skaits (atbilstoši 19 ± 6 un 8 ± 5 ; $p = 0,008$; sk. 3. attēlu) un samazināta citokeratīna 19 ekspresija (atbilstoši $1,33 \pm 0,51$ un $2,33 \pm 0,82$; $p = 0,06$; sk. 4. attēlu).



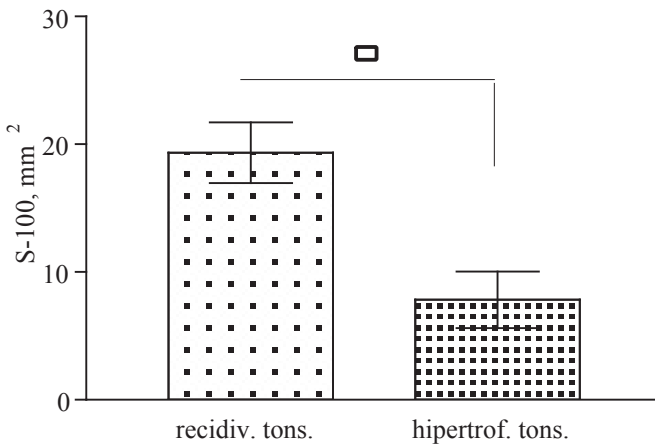
1. attēls. bcl-2 pozitīvās šūnas starpfolikulāros apvidos hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem (hipertrof. tons.) un recidivējoša tonsilīta pacientiem (recidiv. tons.). Dati izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda; $p = 0,0022$, salīdzinot pirmo un otro grupu

Bcl-2 positive cells in parafollicular regions of chronic hypertrophic and recurrent tonsillitis. Results are expressed as mean \pm SEM, $p = 0,0022$ compared chronic hypertrophic with recurrent tonsillitis patients



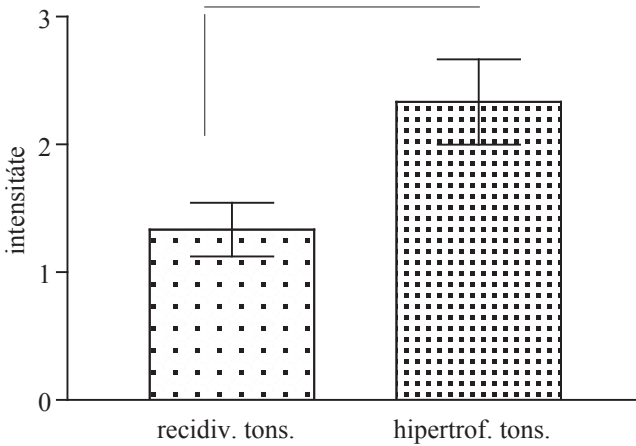
2. attēls. S-100 pozitīvās šūnas starpfollikulāros apvidos hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem (hipertrof. tons.) un hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem (recidiv. tons.). Dati izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda; $p = 0,002$, salīdzinot pirmo un otro grupu

S-100 positive cells in parafollicular regions of chronic hypertrophic and recurrent tonsillitis. Results are expressed as mean \pm SEM, $p = 0,002$ compared chronic hypertrophic with recurrent tonsillitis patients



3. attēls. S-100 pozitīvās šūnas kriptu epitēlijā hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem (hipertrof. tons.) un hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem (recidiv. tons.). Dati izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda; $p = 0,008$, salīdzinot pirmo un otro grupu

S-100 positive cells in cryptal epithelium of chronic hypertrophic and recurrent tonsillitis. Results are expressed as mean \pm SEM, $p = 0,008$ compared chronic hypertrophic with recurrent tonsillitis patients



4. attēls. Kriptāla epitēlija nokrāsošanās intensitāte ar CK-19 hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem (hipertrof. tons.) un hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem (recidiv. tons.). Dati izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda; $p = 0,06$, salīdzinot pirmo un otro grupu
Cytokeratin CK – 19 cryptal epithelium staining intensity of chronic hypertrophic and recurrent tonsillitis. Results are expressed as mean \pm SEM, $p = 0,06$ compared chronic hypertrophic with recurrent tonsillitis patients

Hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem, salīdzinot ar hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem, konstatēta palielināta mandeļu kolonizācija ar stafilokokiem un streptokokiem.

Diskusija

Pētījuma rezultāti liecina, ka hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem mandelēs ir samazināts Treg limfocītu skaits, kas ekspresē bcl-2 proteīnu un uztur imunoloģisko toleranci. Vienlaikus šo slimnieku limfoidālos audos ir palielināts antigēnprezentētājšūnu skaits, kā arī pastiprināta kriptu retikulārā epitēlija infiltrācija ar leikocītiem un antigēnprezentētājšūnām. Tas liecina par iekaisuma reakcijas persistenci.

Treg limfocītiem ir būtiska nozīme tolerances uzturēšanā. Šie limfocīti sekretē tādus regulatorus citokīnus kā Il-4, Il-10 un TGF- β . Savukārt bcl-2 proteīna ekspresija pasargā šīs šūnas no apoptozes (10, 15). Treg nomāc pārmērīgu iekaisuma atbildi. Nesen parādīts: šie efekti ir saistīti ar to, ka Il-10 un TGF- β nomāc nukleāra faktora- κ B aktivāciju (5). Eksperimentos ar dzīvniekiem ir parādīts, ka Il-10 *knockout* pelei attīstās iekaisuma zarnu slimības (16, 17).

Hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem ir paaugstināta kriptāla epitēlija caurlaidība. Tas savukārt sekmē pastiprinātu mandeļu kolonizāciju ar mikroorganismu antigēniem (3).

Arī citos pētījumos pierādīts, ka hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem, salīdzinot ar hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem, parafolikulāros apvidos un kriptāla epitēlijā ir palielināts antigēnprezentētājšūnu skaits (19, 20). Antigēnprezentētājšūnas ekspresē stimulētāj molekulas B7-1 un B7-2, kuras nepieciešamas Treg aktivācijai (9, 21).

Šo šūnu skaits hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem ir palielināts, tas liecina par pastiprinātu antigēna invāziju, tomēr imunoloģiskā tolerance netiek uzturēta, jo trūkst adekvātas antigēnprezentētājšūnu un Treg mijiedarbības (Treg skaita un reaģētspējas samazināšanas dēļ).

Šī pētījuma rezultāti līdzinās citu pētnieku datiem par streptokokiem un stafilokokiem kā galvenajiem mikroorganismiem, kas ierosina tonsilītu (4, 2).

Pastiprināta mandeļu kolonizācija ar šiem mikroorganismiem notiek sekundāra imūndeficīta attīstības dēļ (8).

Tādējādi pētījums liecina, ka uz Treg un antigēnprezentētājšūnu sistēmas pārmaiņu fona rezidentmikrofloras antigēni izraisa hronisku iekaisumu mandelēs. Šī parādība ir novērojama hroniski recidivējoša tonsilīta pacientiem. Savukārt, spriežot pēc normālas bcl-2 ekspresijas limfocītos, hroniska hipertrofiska tonsilīta pacientiem tolerance pret rezidentmikrofloru veidojas adekvāti. Var domāt, ka šiem pacientiem ir kavēta mandeļu fizioloģiskā involūcija, kas varētu būt saistīta ar samazinātu glikokortikoīdu receptoru ekspresiju limfocītos (22).

Secinājumi

Hroniska recidivējoša tonsilīta pacientiem attīstās imunoloģiskās tolerances traucējumi pret rezidentmikrofloru, par ko liecina samazināts limfocītu skaits starpfolikulāros apvidos, kā arī palielināts antigēnprezentētājšūnu skaits un kriptālā epitēlija pastiprināta infiltrācija ar leukocītiem.

Hroniskam hipertrofiskam tonsilītam savukārt raksturīga limfoidālo audu hipertrofija un palielināts bcl-2 pozitīvo limfocītu skaits starpfolikulāros apvidos. Tas liecina par adekvātu tolerances izveidošanos pret rezidentmikrofloru.

Pateicība

Darbs tika veikts ar **Eiropas Sociālā fonda** atbalstu.

Literatūra

1. Matilla, P. S., Tahkakallis, O., Tarkkane, J. (2001) Causes of Tonsillar Disease and Frequency of Tonsillectomy. *Arch. Otolaryng. Head and Neck Surg.*, 127, 37–44.
2. Хмельницкая, Н., Власова, В., Косенко, В. (2000) Оценка функционального состояния небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом. *Вестник оториноларингол.*, 4, 33–39.
3. Brandtzaeg, P. (1995) Immunocompetent Cells of the Upper Airway: Functions in Normal and Diseased Mucosa. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 252 (Suppl. 1), 8–21.
4. Manolis, E. (1997) Alterations to the Oropharyngeal and Nasopharyngeal Microbial Flora of Children after Tonsillectomy and Adenoidectomy. *J. Laryngol.*, 108, 763–767.
5. Garside, P., McIlMowat, A., Khoruts, A. (1999) Oral Tolerance in Disease. *Gut*, 44, 137–142.
6. Lanoue, A., Bona, C., von Boehmer. (1997) Conditions that Induce Tolerance in Mature CD4+ T Cells. *J. Exp. Med.*, 185, 405–414.
7. Maloy, K. J., Powrie, F. (2001) Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology. *Nat. Immunol.*, 2, 816–822.
8. Brook, I. (1999) Bacterial Interference. *Crit. Rev. Microbiol.*, 25 (3), 155–172.
9. Liu, L., Kuchroo, V. K., Weiner, H. L. (1999) B7.2 (CD86) Not B7.1 (CD80) Costimulation is Required for the Induction of Low Dose Oral Tolerance. *J. Immunol.*, 163, 2284–2290.
10. Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., Salmon, M., Poulter, L. W., Akbar, A. N. (2001) Human Anergic/Suppressive CD4(+)CD25(+)T cells: a Highly Differentiated and Apoptosis Prone Population. *Eur. J. Immunol.*, 31(4), 1122–1131.
11. Clark, M. A., Wilson, C., Sama, A., Wilson, J. A., Hirst, B. (2000) Differential Cytokeratin

- and Glycoconjugate Expression by the Surface and Crypt Epithelia of Human Palatine Tonsils. *Histochem. Cell. Biol.*, 114, 311–321.
12. Tang, X., Hori, S., Osamura, R. Y., Tsutsumi, Y. (1995) Reticular Crypt Epithelium and Intraepithelial Lymphoid Cells in the Hyperplastic Human Palatine Tonsil: an Immunohistochemical Analysis. *Pathol. Int.*, 45(1), 34–44.
 13. Žilēviča, A (2000) Metodiskie materiāli vispārīgajā mikrobioloģijā. Latvijas Universitāte, Rīga.
 14. Westendorf, A. M., Templin, M., Geffers, R. (2005) CD4+ T cell Mediated Intestinal Immunity: Chronic Inflammation versus Immune Regulation. *Gut*, 54, 60–69.
 15. Tsunoda, R., Heinen, E., Sugai, N. (2000) Follicular Dendritic Cells in vitro Modulate the Expression of Fas and bcl-2 on Germinal Center B Cells. *Cell Tissue Res.*, 299, 395–402.
 16. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D. (1993) Interleukin-10 Deficient Mice Develop Inflammatory Bowel Disease in T cell Receptor Mutant Mice. *Cell*, 75, 275–282.
 17. Roncarolo, M. G., Levings, M. K. (2000) The Role of Different Subsets of T Regulatory Cells in Controlling Autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 676–683.
 18. Strober, W., Kelsall, B., Marth, T. (1998) Oral Tolerance. *J. Clin. Immunol.*, 18, 1–30.
 19. Noble, B., Gorfien, J., Rossman, S., Brodsky, J. L. (1996) Microanatomical Distribution of Dendritic Cells in Normal Tonsils. *Acta Otolaryngol.*, 523, 94–97.
 20. Papadas, T., Batistatou, A., Ravazoula, P., Zolota, V., Goumas, P. (2001) S-100 Protein-Positive Dendritic Cells and CD-34 Positive Dendritic Interstitial Cells in Palatine Tonsils. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 258, 243–245.
 21. Plzak, J., Holikova, Z., Smetana, K., Riedel, F., Betka, J. (2003) The Role of Dendritic Cells in the Pharynx. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 260, 262–272.
 22. Zhang, T. Y., Ding, X., Daynes, R. A. (2005) The Expression of 11 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I by Lymphocytes Provides a Novel Means for Intracrine Regulation of Glucocorticoid Activities. *J Immunol.*, 15; 174(2), 879–889.

Summary

The aim of our research was to compare the inflammatory changes in palatine tonsils in patients with recurrent and hypertrophic tonsillitis. 12 patients with a history of tonsillitis were enrolled in the study. They were subdivided into two groups: 6 patients had recurrent tonsillitis and 6 patients had hypertrophic tonsillitis. Immunohistochemical methods were used to identify bcl-2, S-100 and cytokeratin 19 (CK-19) positive cells. The microflora of palatine tonsils were also studied. Obtained results have shown that patients with recurrent tonsillitis had fewer bcl-2 positive cells in parafollicular regions compared to hypertrophic tonsillitis. Furthermore, the CK-19 expression in cryptal epithelium had decreased in patients with recurrent tonsillitis. Patients with recurrent tonsillitis had more S-100 cells in parafollicular region and cryptal epithelium compared to hypertrophic tonsillitis, which correlates with intense microorganism proliferation. It is recognized that recurrent tonsillitis probably results from a lack of mucosal tolerance to commensal bacterial antigens.

Key words: chronic tonsillitis, immunological tolerance, microorganisms.

Pacientu individuāla agrīna sistēmiska iekaisuma reakcija uz polipropilēna protēzēm pēc cirkšņa trūču operācijām, tās izvērtējums

Individual Early Inflammation Reaction of Patients to Polypropylene Mesh after Groin Hernioplasties

Arnolds Jezupovs, Tālis Kauliņš, Māris Mihelsons

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

Latvijas Jūras Medicīnas centrs

Patversmes iela 23, Rīga, LV-1005

E-pasts: jezupovs@tvnet.lv

Darba mērķis ir izvērtēt pacientu individuālu agrīnu sistēmisku organisma iekaisuma reakciju uz polipropilēna protēzēm pēc cirkšņa hernioplastijām.

88 pacientiem pēc cirkšņa hernioplastijām Lihtenšteina modifikācijā ar 60 cm² lielu polipropilēna protēzi 1. un 4. pēcoperācijas dienā serumā noteikti: C-reaktīvais proteīns (CRP), leikocītu skaits, limfocītu un monocītu koncentrācijas un eritrocītu grimšanas ātrums (EGĀ). Pamatojoties uz CRP sadalījumu kvartīlēs, visi pacienti hipotētiski sadalīti 3 grupās: vājas iekaisuma reakcijas grupā (< 25%), mērenas iekaisuma reakcijas grupā (25%–75%), augsta iekaisuma reakcijas grupā (> 75%). Visām grupām aprēķinātas vidējās vērtības, kas salīdzinātas 1. un 4. pēcoperācijas dienā grupu ietvaros un starp grupām.

Kontatētas statistiski ticamas CRP atšķirības starp visām grupām 1. un 4. pēcoperācijas dienā, leikocītu skaita nemazināšanos 4. pēcoperācijas dienā augsta iekaisuma reakcijas grupā, limfocitopēniju 1. pēcoperācijas dienā visās grupās un tās saglabāšanos augsta iekaisuma reakcijas grupā 4. pēcoperācijas dienā, kā arī ticamu EGĀ palielināšanos augsta iekaisuma reakcijas grupā 4. pēcoperācijas dienā, salīdzinot ar vājas iekaisuma reakcijas grupu.

Pastāv individuāla organisma reakcija uz sintētisko materiālu. Pacientiem, kuriem ir augsta sistēmiska iekaisuma reakcija, ilgāk saglabājas imūnās sistēmas nomākums.

Atslēgvārdi: trūce, polipropilēna protēze, cilvēka organisms, iekaisums.

Ievads

Sintētisko materiālu izmantošana trūču ārstēšanā netiek nepārprotami atbalstīta, lai gan tā būtiski samazina recidīvu skaitu. Diskusiju pamatā ir sintētiskās protēzes ietekme uz organisma homeostāzi. Lai gan tiek izmantotas identiskas operāciju metodes un moderni materiāli – polipropilēns, tetrafluoretilēns un poliesters – tiek uzskatīti par bioloģiski inertiem un lielai daļai pacientu nerada nekādas sūdzības, tomēr ir gadījumi, kad pacientiem pēc operācijas klīniski konstatē pastiprinātu iekaisuma reakciju, kas izpaužas ar ilgstošām sāpēm, infiltrātiem un seromām operācijas vietas rajonā (1, 2, 3). Arī dažādu iemeslu dēļ izņemto protēžu paraugos reizēm konstatē hronisku iekaisumu (4, 5). Minētais liek secināt, ka pastāv individuālas organisma reakcijas, un rosina pārdomas, vai

eksistē atšķirīga iekaisuma atbildes reakcija arī starp pacientiem, kuriem pēcoperācijas periods noris bez klīniski konstatējamām protēžu izraisītām komplikācijām.

Materiāls un metodes

Pētījumā iekļauti 88 pacienti pēc cirkšņa trūču operācijas ar klīniski nekomplīcētu agrīno pēcoperācijas periodu un bez hroniskām iekaisuma, imunoloģiskām un onkoloģiskām blakusslimībām. Pirms operācijas visi pacienti saņēma antibakteriālo profilaksi (2 g 1. paudzes cefalosporīns *Reflin® Ranboxy*, Indija). Trūces plastikai izmantota polipropilēna protēze (*Surgipro® USSC ASV* un *Prolene® Ethicon ASV*) ar vidējo izmēru 60 cm². Operācijas veiktas spinālajā anestēzijā, izmantojot 15 mg bupivacaīnu (*Marcaïn® Astra Zeneca*, Zviedrija).

Operācijas protokols

Ar 5–7 cm garu griezienu pa kārtām tika atvērta cirkšņa kanāla priekšējā siena; izdalīta un paņemta uz gumijas turētāja sēklas saite; atrasts un izdalīts trūces maiss, kas slīpo trūču gadījumos pie pamatnes caursūts, liģēts un rezecēts. Cirkšņa kanāla mugurējā siena un trūces vārti noklāti ar polipropilēna protēzi, kas cirkulāri fiksēta pie apkārtējiem audiem ar neuzsūcošu diegu (*Baltibond 3/0 Sutura Baltica*, Latvija vai *Ticron 3/0 USS DG Sutures*, ASV). Pārdalītie audi pa kārtām sašūti ar uzsūcošu diegu (*Polisorb 0 USS DG Sutures*, ASV).

Eksperimenta protokols

15 ml venozo asiņu no perifērās vēnas savākti sterilā hermētiskā heparinizētā traukā 1. un 4. pēcoperācijas dienā. Asiņu paraugi centrifugēti 10 minūtes ar ātrumu 3 500 apgriezieni minūtē, pēc tam atdalītais serums sasaldēts 20 °C līdz izmeklējumu izdarīšanai. Atkausētajos seruma paraugos noteikta C-reaktīvā proteīna, leikocītu, limfocītu un monocītu koncentrācija, kā arī eritrocītu grimšanas ātrums.

C-reaktīvā proteīna koncentrācija noteikta ar nefelometrisko metodi, izmantojot komerciālos kitus (*Behring*, Vācija). Leikocīti, limfocīti un monocīti skaitīti ar elektrisko impedances metodi (MS-9 analizētājs, Francija). Eritrocītu grimšanas ātrums noteikts pēc Vestergrēna metodes.

Visiem izmeklējamajiem rādītājiem noteiktas vidējās vērtības Ņemot par individuālās sistēmiskās iekaisuma reakcijas izvērtējuma pamatu C-reaktīvā proteīna rādītājus 1. pēcoperācijas dienā, tā vidējās vērtības sadalītas pa kvartīlēm. Pacienti, kuru C-reaktīvā proteīna rādītāji ietilpa 1. kvartīlē (25%), hipotētiski tika uzskatīti par vājas iekaisuma reakcijas grupu, 2. un 3. kvartīles rādītāji (25%–75%) tika uzskatīti par mērenas iekaisuma reakcijas grupu un 4. kvartīles pacienti (> 75%) tika uzskatīti par augstas iekaisuma reakcijas grupas pacientiem.

Statistiskā analīze

Datu apstrāde veikta, izmantojot *GraphPad Prism® (Version 3 GraphPad, San Diego, California, USA)* datu statistiskās apstrādes datorprogrammu. Neatkarīgu izlašu analīzei izmantots *Mann-Whitney* tests, savukārt savstarpēji atkarīgas izlases analizētas, lietojot *Wilcoxon* testu. Par statistiski ticamām uzskatītas atšķirības ar $p < 0,05$.

Rezultāti

Iegūtie dati apkopoti 1., 2. un 3. tabulā.

1. tabula

Pacientu grupu vidējo laboratorisko rādītāju salīdzinājums 1. un 4. pēcoperācijas dienā

The mean values of the groups on the 1 and 4 post-operative day

Grupa	C-reaktīvais proteīns (N 0-5 mg/L)			Leikocīti (N 4,5-10,3 mm ³)			Limfocīti (N 22-40 %)			Monocīti (N 2-10 %)			Eritrocītu grimšanas ātrums (N 2-15 mm/h)		
	1. diena	4. diena	P	1. diena	4. diena	P	1. diena	4. diena	P	1. diena	4. diena	P	1. diena	4. diena	P
Vāja reakcija (n 22)	7,29	12,23	NS	9,21	6,96	0,002	19,46	30,84	0,0002	4,1	3,8	NS	8,68	12,33	NS
Mērena reakcija (n 44)	25,02	28,97	NS	8,47	5,79	0,0005	21,36	30,36	0,001	3,57	4,02	0,003	11,19	16,06	0,047
Augsta reakcija (n 22)	62,28	63,71	NS	9,3	9,3	NS	18,71	23,7	NS	4,12	3,94	NS	12,19	23,06	0,01

2. tabula

Vidējo laboratorisko rādītāju salīdzinājums starp grupām 1. pēcoperācijas dienā

The comparison of the mean values between groups on the 1 post-operative day

	P VR versus MR	Vājas reakcijas grupa (VR)	Mērenas reakcijas grupa (MR)	Augstas reakcijas grupa (AR)	P MR versus AR
C-reaktīvais proteīns	< 0,0001	7,29	25,02	62,28	< 0,0001 * < 0,0001
Leikocīti	NS	9,21	8,47	9,3	NS
Limfocīti	NS	19,46	21,36	18,71	NS
Monocīti	NS	4,1	3,57	4,12	NS
Egā	NS	8,68	11,19	12,19	NS

* P vērtība VR versus AR

3. tabula

Vidējo laboratorisko rādītāju salīdzinājums starp grupām 4. pēcoperācijas dienā

The comparison of the mean values between groups on the 4 post-operative day

	P VR versus MR	Vājas reakcijas grupa (VR)	Mērenas reakcijas grupa (MR)	Augstas reakcijas grupa (AR)	P MR versus AR
C-reaktīvais proteīns	0,0011	12,23	28,97	63,71	0,0093 * 0,0032
Leikocīti	NS	6,96	5,79	7,66	0,03
Limfocīti	NS	30,84	30,36	23,7	0,025 * 0,001
Monocīti	NS	3,8	4,02	3,94	NS
Egā	NS	12,33	16,06	23,06	NS * 0,038

* P vērtība VR versus AR

C-reaktīvais proteīns

Visās grupās netika konstatēta statistiski ticama vidējo vērtību samazināšanās vai palielināšanās 4. pēcoperācijas dienā.

1. un 4. pēcoperācijas dienā vājas iekaisuma reakcijas grupā ir statistiski ticami zemāki rādītāji nekā mērenas un augstas iekaisuma reakcijas grupā.

Tāpat 1. un 4. pēcoperācijas dienā mērenas iekaisuma reakcijas grupā arī ir zemākas vidējās vērtības nekā augstas iekaisuma reakcijas grupā.

Leikocīti

4. pēcoperācijas dienā vājas un mērenas iekaisuma reakcijas grupā konstatēts statistiski ticams leikocītu skaita samazinājums. Turpretī augstas iekaisuma reakcijas grupai leikocītu skaits 4. pēcoperācijas dienā ticami nemazinās, salīdzinot ar 1. pēcoperācijas dienu. 1. pēcoperācijas dienā nenovēro statistiski ticamas atšķirības starp grupām. 4. pēcoperācijas dienā augstas iekaisuma reakcijas grupā leikocītu skaits ir lielāks nekā mērenas iekaisuma reakcijas grupā.

Limfocīti

1. pēcoperācijas dienā visās grupās ir neliela limfocitopēnija, kas vājas un mērenas iekaisuma reakcijas grupā izzūd 4. pēcoperācijas dienā, bet saglabājas augstas iekaisuma reakcijas grupā, jo limfocītu skaits 4. pēcoperācijas dienā statistiski ticami nepalielinās, salīdzinot ar 1. pēcoperācijas dienu.

1. pēcoperācijas dienā statistiski būtiskas atšķirības starp grupām netika konstatētas, savukārt 4. pēcoperācijas dienā augstas iekaisuma reakcijas grupā limfocītu koncentrācija ir statistiski ticami zemāka nekā pārējās grupās.

Monocīti

4. pēcoperācijas dienā statistiski ticamu monocītu koncentrācijas palielināšanos konstatē tikai mērenas iekaisuma reakcijas grupā. 1. un 4. pēcoperācijas dienā nenovēro arī ticamas monocītu koncentrācijas atšķirības starp visām grupām.

Eritrocītu grimšanas ātrums

4. pēcoperācijas dienā EGĀ ticami pieaug mērenas un augstas iekaisuma reakcijas grupās, bet nemainās vājas iekaisuma reakcijas grupā. 1. pēcoperācijas dienā nenovēro EGĀ būtiskas izmaiņas starp grupām. 4. pēcoperācijas dienā EGĀ augstas iekaisuma reakcijas grupā ir ticami lielāks nekā vājas iekaisuma reakcijas grupā. Nekonstatē statistiski ticamas atšķirības starp grupām, salīdzinot pacientu vecumu, dzimumu, operācijas ilgumu un izmantotās protēzes lielumu un komerciālo veidu.

Diskusija

Ir zināms, ka dažādi materiāli izraisa atšķirīgu organisma reakciju. To pierāda klīniskie novērojumi (6), morfoloģiskie protēžu izmeklējumi (7, 5) un laboratoriskie pētījumi *in vitro* (8, 9).

Tāpat klīniski ir pierādīts, ka, samazinot sintētiskās protēzes jeb svešķermeņa masu, organisma iekaisuma reakcija pavājinās un izpaužas ar vājākām sāpēm pēcoperācijas periodā, kā arī ar samazinātu iekaisuma šūnu daudzumu protēzes rajonā (10, 11).

Domājams, ka pastāv arī individuāla organisma reakcija uz sintētiskajiem materiāliem, jo daļai pacientu protēzes nerada nekādas sūdzības, turpretī citiem izraisa ilgstošas sāpes operācijas apvidū, lai gan protēzes lielums un implantācijas tehnika ir vienādi.

Lai izvērtētu agrīnu sistēmisku iekaisuma reakciju cilvēka organismā pēc hernioplastijām ar sintētiskām protēzēm, par iekaisuma marķieri izmanto citokinīnus (IL 1, IL 6, IL 10, TNF) (12), asinsšūnu (leikocītu, granulocītu, monocītu, limfocītu) izmaiņas (13) un akūtās fāzes iekaisuma proteīnus: proteāzes inhibitorus (α_1 -antitripsīnu), koagulācijas proteīnus (fibrinogēnu, plazminogēnu) (14), transporta proteīnus (haptoglobīnu, ceruloplazmīnu) (15), daudzveidīgas darbības proteīnus (*C-reactive protein, serum amyloid A, fibronectin*) (16, 17), kas raksturo kādu noteiktu iekaisuma reakcijas posmu.

Darbā noteiktie iekaisuma marķieri atspoguļo iekaisuma reakcijā iesaistīto šūnu (leikocītu, monocītu, limfocītu) koncentrāciju un to darbības izpausmes (CRP, EGĀ).

CRP leikocītu un monocītu izdalīto interleikīnu ietekmē tiek sintezēts hepatocītos un ir tieši proporcionāli paaugstināts to koncentrācijai. CRP tiek uzskatīts par jutīgu un agrīnu sistēmiska iekaisuma rādītāju (18). To parāda arī iegūtie rezultāti, jo tā koncentrācija ir paaugstināta, lai gan leikocītu un monocītu daudzums ir normāls. CRP koncentrācijas paaugstinājums 1. un 4. pēcoperācijas dienā neatbilst normālam sadalījumam un var liecināt par individuālām organisma reakcijas īpatnībām, tāpēc pacientus var sagrupēt atbilstoši iekaisuma reakcijas grupai.

Literatūrā nav pētījumu, kas izskaidrotu tik atšķirīgas iekaisuma reakcijas iemeslus uz polipropilēnu, taču, interpretējot individuālās iekaisuma reakcijas pētījumus septiņiem pacientiem, var uzskatīt, ka galvenā nozīme iekaisuma reakcijā ir granulocītu un monocītu atšķirīgai spējai sintezēt interleikīnus, kā arī interleikīnu gēnu polimorfismam, kas var dažādi ietekmēt turpmākos iekaisuma procesus (19, 20, 21).

Darba rezultāti apliecina, ka CRP koncentrācijas statistiski ticamās izmaiņas starp vājas, mērenas un augstas iekaisuma reakcijas grupu nav atkarīgas no leikocītu un monocītu daudzuma. Visticamāk, to nosaka minēto šūnu dažādā interleikīnu produkcijas kapacitāte un, iespējams, arī hepatocītu jutīgums pret tiem.

Lai gan tiek uzskatīts, ka uz svešķermeņiem, tajā skaitā uz polipropilēna protēzi, galvenokārt reaģē monocīti, tomēr šajā darbā praktiski netika konstatētas būtiskas to koncentrācijas izmaiņas grupās, salīdzinot ar 4. pēcoperācijas dienu, kā arī atšķirības starp grupām 1. un 4. pēcoperācijas dienā. To varētu izskaidrot ar pacientu monocītu atšķirīgo spēju producēt interleikīnus – to pierāda pētījumi *in vitro*, kur atsevišķi izdalītas un kultivētas indivīdu monocītu kultūras izdala dažādu interleikīnu daudzumu uz vienu un to pašu sintētisko materiālu (22).

Limfocitopēniju pēc operācijām izskaidro ar operācijas radīto stresu un no tā izrietošo talamohipoadrenālās ass aktivāciju (15). Lai gan pētījumā iekļautajiem pacientiem aužu traumatiskas būtiski neatšķīrās, tomēr tika konstatēta palēnināta limfocītu koncentrācijas atjaunošanās 4. pēcoperācijas dienā augstas iekaisuma reakcijas grupā, salīdzinot ar pārējām grupām.

EGĀ izmaiņas, ņemot vērā multifaktoriālu ietekmi uz tā rādītājiem un vēlāku reaģēšanas spēju, nav jutīgs un agrīns iekaisuma reakcijas marķieris, tādēļ EGĀ nevar uzskatīt par objektīvu iekaisuma reakcijas atspoguļotāju. EGĀ rezultātus vajadzētu interpretēt tikai kontekstā ar CRP izmaiņām.

Kaut gan operācijas tehnika bija identiska, lietotās polipropilēna protēzes izmēri vienādi un pēcoperācijas periods norisēja klīniski līdzīgi, tomēr var pieļaut, ka pastāv individuāla organisma iekaisuma reakcija, ko hipotētiski var klasificēt kā vāju, mērenu un augstu iekaisuma reakciju.

Paliek neskaidri atšķirīgās iekaisuma reakcijas precīzi iemesli un mehānismi, kā arī nav skaidra tās nozīme pēcoperācijas periodā.

Pateicība

Pētījums veikts ar **Eiropas Sociālā fonda** finansiālo atbalstu.

Literatūra

1. Morris G. J., Hughes L. E. (1998) The Outcomes of Nonabsorbable Mesh Placed within the Abdominal Cavity: Literature Review and Clinical Experience. *Am. Coll. Surg.*, 186 (3), 352–367.
2. Tagaya N., Mikami H., Aoki H., Kubota K. (2004) Long-term Complications of Laparoscopic Ventral and Incisional Hernia Repair. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.*, 14 (1), 5–8.
3. Nienhuijs A. W., van Oort I., Keemers-Gels M. E., Strobbe L. J. A., Rosman C. (2005) Randomized Clinical Trial Comparing the Prolene Hernia System, Mesh Plug Repair and Lichtenstein Method for Open Inguinal Hernia Repair. *B. J. Surg.*, 90 (2), 33–38.
4. Klosterhalfen B., Klinge U., Schumpelick V. (1998) Functional and Morphological Evaluation of Different Polypropylene-Mesh Modifications for Abdominal Wall Repair. *Biomaterials*, 19: 2235–2246.
5. Klinge U., Klosterhalfen, Müller, M., Schumpelick V. (1999) Foreign Body Reaction to Meshes Used for the Repair of Abdominal Wall Hernias. *Eur. J. Surg.*, 165: 665–673.
6. Ortiz-Oshiro E., Civantos G., Villalta L., Furió-Basete V., Mayol Martínez J., Ortega López D., Fdez-Represa J. A. (1999) Non-Absorbable Prosthetic Meshes: Which Is the Best Option in the Repair of Abdominal Wall Defects? *Int. Surg.*, 84: 246–250.
7. Beets G. L., Go P. M. N. Y. H., van Mameren H. (1996) Foreign Body Reactions to Monofilament and Braided Polypropylene Mesh Used as Preperitoneal Implants in Pigs. *Eur. J. Surg.*, 162: 823–825.
8. Miller K. M., Anderson J. M. (1988) Human Monocyte/Macrophage Activation and Interleukin 1 Generation by Biomedical Polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 713–731.
9. Bernatchez S. F., Parks P. J., Gibbons D. F. (1996) Interaction of Macrophages with Fibrous Materials in vitro. *Biomaterials*. 17: 2077–2086.
10. Post S., Weiss B., Willer M., Neufang T., Lorenz D. (2004) Randomized Clinical Trial of Lightweight Composite Mesh for Lichtenstein Inguinal Hernia Repair. *B. J. Surg.* 91: 44–48.
11. O'Dwyer P. J., Klingsnorth A. N., Molloy R. G., Small P. K., Lammers B., Horeyscek G. (2005) Randomized Clinical Trial Assessing Impact of a Lightweight or Heavyweight Mesh on Chronic Pain after Inguinal Hernia Repair. *92 (2)*, 159–166.
12. Güerleyik E., Güerleyik G., Etinkaya F., Ünalmsir S. (1998) The Inflammatory Response to Open Tension-Free Inguinal Hernioplasty Versus Conventional Repairs. *Am. J. Sur.*, 175 (3), 179–182.
13. Takahara T., Uyama I., Ogivara H., Furuka T., Iida S. (1995) Inflammatory Responses in Open Versus Laparoscopic Herniorrhaphy. *J. Laparoendosc. Surg.*, 5: 317–326.
14. Di Vita G., Milano S., Frazzetta M., Patti R., Palazzolo V., Barbera C., Ferlazzo V., Leo P., Cillari E. (2000) Tension – Free Hernia Repair is Associated with an Increase in Inflammatory Response Markers Against the Mesh. *Am. J. Surg.*, 180 (3), 203–207.
15. Uzunköy A., Coskun A., Faruk A., Kocyigit A. (2000) Systemic Stress Responses after Laparoscopic or Open Hernia Repair. *Eur. J. Surg.*, 166: 467–471.
16. Suter M., Martinet O., Spertini F. (2002) Reduced Acute Phase Response after Laparoscopic Total Extraperitoneal Bilateral Hernia Repair Compared to Open Repair with the Stoppa Procedure. *Surg. Endosc.*, 16: 1214–1219.
17. Schwab R., Eissele S., Brückner U. B., Gebhard F., Becker H. P. (2004) Systemic Inflammatory Response after Endoscopic (TEP) vs Shoudice Groin Hernia Repair. *Hernia* 8 (3): 226–232.
18. Pepys M. B. (1996) The Acute Phase Response and C-Reactive Protein. In: *The Oxford Textbook of Medicine*, Ed. 3, Vol. 2., 1527–1533.
19. Schraut W., Wendelgass P., Calzada-Wack J. C., Frankenberger M., Ziegler-Heitbrock H. W. (1997) TNF Gene Expression in Monocytes of Low and High Responder Individuals. *Cytokine*. 9: 206–211.
20. Schroder J., Kahlke V., Book M., Stuber F. (2000) Gender Differences in Sepsis: Genetically Determined? *Schock*. 14: 307–310.
21. Emmanuel K., Weighardt H., Bartels H., Siewert J. R., Holzmann B. (2005) Current and Futures Concepts of Abdominal Sepsis. *World J. Surg.* 29 (1), 3–9.

22. Schachtrupp A., Klinge U., Junge K., Rosch R., Bhardwaj R. S., Schumpelick V. (2003) Individual Inflammatory Response of Human Blood Monocytes to Mesh Biomaterials. *B. J. Surg.*, 90: 114–120.

Summary

The aim of this clinical observation was to evaluate the inflammation reaction of patients to polypropylene mesh in the early stage after groin hernioplasties.

Materials and methods. A total of 88 patients after groin hernioplasty with Lichtenstein modification (mean size of the polypropylene mesh 60 cm²) because of non-complicated hernias were involved in the observation. No clinically diagnosed infection or technical errors of operation technique generating complications were observed in the postoperative period; immunology and oncological diseases did not appear either. All patients were subjected to laboratory tests: C-reactive protein (CRP), leucocyte, lymphocyte, monocyte level in serum, and erythrocyte sedimentation rate (ESR) on the first and fourth post-operative day. Low, moderate and high inflammatory responses were defined according to the distribution of the CRP concentrations in quartiles on the first post-operative day. Patients were defined as „low” responders when concentrations of CRP were below 25h percentiles, as moderate responders when concentrations of CRP were between 25h and 75 percentiles and as high responders when concentrations of CRP were above 75h percentiles respectively.

Results. There were significant differences in CRP increase between the all groups on the 1st and 4st postoperative day. All group patients showed a tendency for lymphocytopenia on the 1st postoperative day, which remains for „high” responders on the 4st postoperative day an increase of leucocyte counts and ESR on the 4st postoperative day for „high” responders.

Conclusions. It should be concluded that there exists individual inflammation reaction of patients to polypropylene mesh.

Key words: hernia, polypropylene mesh, human being, inflammation.

Slāpekļa oksīda nozīme cilvēka patoloģijā

The Role of Nitric Oxide in Human Pathology

Maija Dzintare¹, Dainuvīte Meirena¹, Nikolajs Sjakste^{1,2}

¹Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Aizkraukles iela 21, Rīga, LV-1006

E-pasts: maija.dzintare@gmail.com

²Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: Sjakste@lu.lv

Slāpekļa oksīds (NO) organismā piedalās daudzu fizioloģisku procesu regulācijā (gludās muskulatūras atslābināšanā, neurotransmisijā, lielās koncentrācijās – šūnu imunitātes reakcijās). Paaugstinātās koncentrācijās NO ir iesaistīts arī patoloģisku procesu ģenēzē. NO ir iesaistīts sirds asinsvadu slimību, aterosklerozes, išēmijas – reperfūzijas bojājuma, neurodeģeneratīvo slimību, muskulatūras distrofiju, insulīnkarīgā diabēta patoģenēzē, kanceroģenēzē un septiskā šoka ģenēzē.

Atslēgvārdi: slāpekļa oksīds, ateroskleroze, išēmija, neurodeģeneratīvās slimības, muskulatūras distrofijas, insulīnkarīgais diabēts, kanceroģenēze, septiskais šoks.

Ievads

Slāpekļa oksīda (NO) fizioloģiskās nozīmes atklāšana ir viens no 20. gadsimta ievērojamākajiem sasniegumiem bioloģijā un medicīnā, šai sakarībā ir radusies jauna izpratne par daudziem organismā notiekošajiem procesiem. NO ir būtiska nozīme tādos dzīvībai svarīgos procesos kā gludās muskulatūras atslābšana, signālpārnese nervu sistēmā, trombocītu aktivitātes regulēšana; lielākās koncentrācijās NO iedarbojas citotoksiski un piedalās organisma aizsardzībā – šūnu imunitātes reakcijās, bet var būt arī iesaistīts daudzos patoloģiskos procesos. Tādējādi atkarībā no NO veidošanās un metabolisma apstākļiem NO ietekme var būt:

- regulējoša (asinsvadu tonuss, šūnu adhēzija, asinsvadu caurlaidība, neurotransmisija, bronhodilatācija, trombocītu adhēzija, pretaudzēju imunitātes sistēma, nieru funkcijas);
- aizsargājoša (antioksidanta īpašības, leikocītu adhēzijas inhibēšana, aizsardzība pret audzēju nekrozes faktora- α toksisko darbību);
- toksiska (vairāku fermentu inhibēšana, DNS struktūras bojāšana, lipīdu peroksidācijas procesu izraisīšana, šūnas antioksidantu statusa pazemināšana, šūnas jutības paaugstināšana pret radiāciju, alkilējošiem aģentiem un toksiskiem metālu joniem).

Organismā NO sintēzi katalizē fermentu saime – NO sintāzes (NOS) (EC 1.14.23), kā vienīgo substrātu izmantojot L-arginīnu. No audiem ir izdalītas trīs NOS izoformas: endoteliālā (eNOS), neironālā (nNOS) un inducējamā (iNOS), ir identificēti trīs gēni, kas tās kodē, attiecīgi 7., 12. un 17. hromosomā. nNOS un eNOS ir konstitutīvi kalcija un

kalmodulīna atkarīgi fermenti, kas veido NO nelielās koncentrācijās, atbildot uz dažādiem fizioloģiskiem signāliem, kas paaugstina Ca^{2+} līmeni šūnā, kā, piemēram, acetilholīns asinsvadu endotēlijā vai glutamīnskābe nervu sistēmā (1). Turpretī iNOS aktivitātes regulācija notiek transkripcijas līmenī, kad dažādi iekaisuma faktori inducē iNOS proteīna (apofermenta) biosintēzi. Reiz sintezēts, šis ferments ir aktīvs nepārtraukti, jo kalmodulīns tam ir piesaistīts cieši kā prostētiskā grupa; tas inaktivējas, noārdoties proteasomās. Tas ļauj iNOS veidot NO lielās koncentrācijās (2, 3).

Zinot, cik svarīgas un daudzveidīgas ir NO funkcijas veselā organismā, var iedomāties arī to, cik plaša ir tā nozīme patoloģisku procesu attīstībā. Intensīvi tiek pētītas daudzas slimību grupas, kuru attīstībā ir raksturīgas novirzes NO metabolismā.

Sirds asinsvadu sistēmas slimības

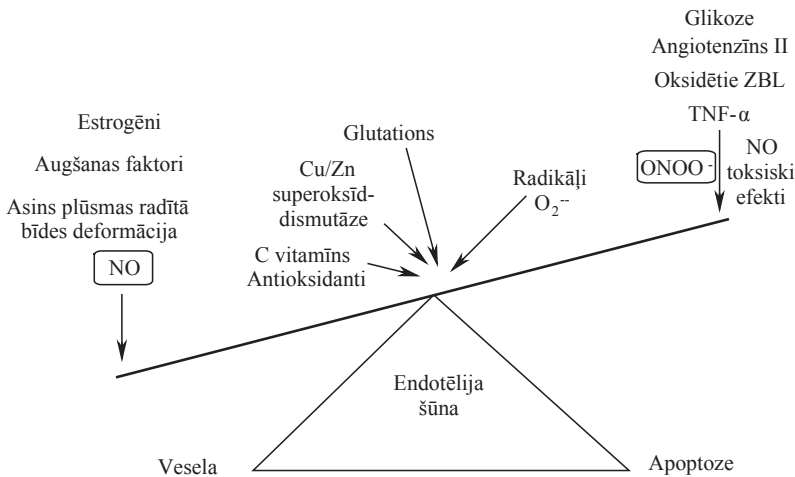
NO ir iesaistīts tādu sirds asinsvadu sistēmas slimību patoģenēzē kā ateroskleroze, hipertensija, diabēta miokardiopātija, aritmija, sirds mazspēja, išēmijas-reperfūzijas asinsvadu bojājums (4).

Agrīnam aterosklerotiskajam procesam ir raksturīga asinsvadu endotēlija disfunkcija – samazināta NO sintēze asinsvadu endotēlijā un (vai) samazināta NO aktivitāte. Bojāts endotēlijs lielā daudzumā ģenerē superoksīda radikāļus, kas strauji inaktivē NO. Tādējādi tiek traucēta NO atkarīgā asinsvadu tonusa regulācija, kas izraisa predispozīciju vazokonstrikcijai. Piemēram, acetilholīna ievadīšana sirds vainagartērijā sirds išēmiskās slimības pacientiem izraisa paradoksālu reakciju – vazokonstrikciju, nevis vazodilatāciju, kā tas būtu gaidāms. Endotēlija disfunkcija izraisa arī traucējumus trombocītu agregācijas un šūnu adhēzijas regulācijā – pastiprinās trombocītu un monocītu adhēzija pie asinsvadu sienas, un līdz ar to pieaug trombozes risks (4).

Endoteliālās disfunkcijas izcelsmes pamatā var būt dažādi faktori: endotēlijā esošo acetilholīna un serotonīna receptoru disfunkcija, samazināta eNOS ekspresija, kofaktora tetrahydrobiopterīna deficīts, tādēļ NOS veido skābekļa radikāļus. NOS substrāta L-arginīna deficīts audos pastiprina endotēlija disfunkciju, L-arginīna ievadīšana daļēji atjauno endotēlijatkarīgo vazodilatāciju hiperholesterinēmijas pacientiem un paplašina stenozētās koronārās artērijas sirds išēmiskās slimības gadījumā. L-arginīnu var izmantot terapijā pacientiem ar koronāro endoteliālo disfunkciju, neobstruktīvo koronāro sirds slimību un stenokardiju. Zināms, ka asinsvadu sienas gludās muskulatūras kontraktilā funkcija nav traucēta, jo aterosklerotiskās artērijās ar traucētu endotēlija funkciju NO donors nitroglicerīns izraisa dilatāciju (5).

Aterosklerozes attīstībā liela nozīme ir arī apoptozei, kas skar endotēlija šūnas, makrofāģus un gludās muskulatūras šūnas. Ir noskaidrots molekulārais mehānisms, kas endotēlija šūnu noved līdz apoptozei. NO saistībā ar apoptozes izraisīšanu ir divējāda nozīme (sk. 1. att.). Asinsvadu endotēlija izdalītais NO iedarbojas antiapoptotiski, un faktori, kas aktivē NO sintēzi endotēlijā (laminārā asinsplūsma, antioksidanti, estrogēni u. c.), iedarbojas antiaterogēni. NO lielās koncentrācijās, kas ir saistītas ar brīvo radikāļu reakcijām un peroksinitrīta (ONOO⁻) veidošanos, izraisa apoptozi endotēlija un gludās muskulatūras šūnās. Tādi faktori kā audzēju nekrozes faktors- α (TNF- α), oksidētie zema blīvuma lipoproteīdi (LDL), paaugstināts angiotenzīna II un augsts glikozes līmenis asinīs veicina aterosklerozes attīstību (6). Turpmākajos pētījumos varētu noskaidrot, kā novērst nelabvēlīgo proapoptotisko faktoru aktivēšanos asinsvadu sienā.

Ir hipotēze, ka organisma predispozīciju ateroģenēzei nosaka eNOS kodējošā gēna polimorfisms. Glu 298 → Asp substitūcijas mutācija korelē ar paaugstinātu koronārās sirds slimības un infarkta risku (4).



1. attēls. NO antiapoptotiskā un proapoptotiskā ietekme uz endotēlijšūnām
Anti- and proapoptotic action of NO on endothelium cells

Diabēts

Konstitutīvo izoformu eNOS un nNOS sintezētais NO piedalās insulīna sintēzē fizioloģiskos apstākļos. Pierādīts, ka glikoze aktivē NO veidošanos pankreasa α -šūnās vai endotēlija šūnās ar eNOS palīdzību, NO parakrīnā veidā stimulē insulīna izdalīšanos no β -šūnām (sk. 2. A att.) (7).

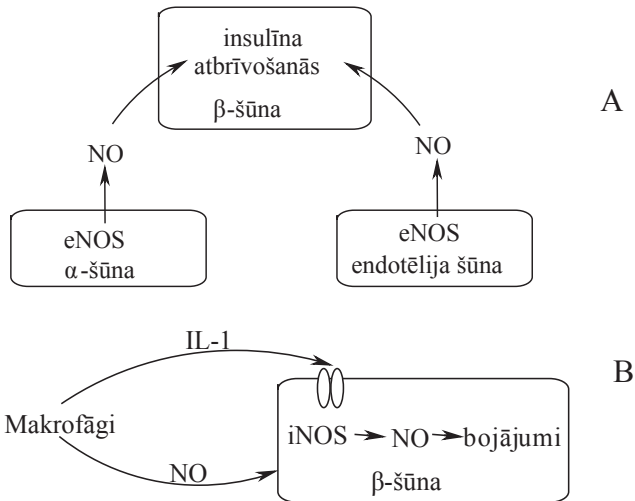
Turpretī iNOS lielās koncentrācijās sintezētais NO izraisa pankreasa Langerhansa saliņu β -šūnu bojājumus, kas ir saistīti ar insulīnatkarīgo (1. tipa) diabētu.

Insulīnatkarīga diabēta gadījumā insulīns nesintezējas, jo Langerhansa saliņu β -šūnas ir gājušas bojā autoimūna procesa dēļ. Ir pierādīts, ka autoimūnā diabēta sākumstadijā veidojas saliņu iekaisums – insulīts, kad saliņās infiltrējas aktivēti makrofāgi un T limfocīti helperi (Th), turklāt novēro T limfocītu subtīpu nomaiņu – Th2 vietā sāk dominēt Th1 ar tiem raksturīgajiem citokīniem: interferonu- γ , IFN- γ un TNF- α . Vēlākās stadijās novēro B limfocītu un citotoksisko CD8 limfocītu infiltrēšanos.

Galvenā citotoksiskā efektormolekula, kas izraisa β -šūnu bojāeju agrā insulīta stadijā, ir NO. To galvenokārt veido iNOS, kas ekspresējas infiltrētajos makrofāgos, saliņu kapilāru endotēlijā un pašās β -šūnās (sk. 2. B att.). NO parakrīni vai autokrīni iedarbojas uz β -šūnām, izraisot to bojāeju. Jāatzīmē, ka β -šūnās pie I tipa diabēta ir salīdzinoši zemāks brīvos radikāļus neitralizējošo fermentu līmenis. Šie fermenti ir glutationperoksīdāze (satur selēnu), Mn-atkarīgā superoksīddismutāze un katalāze.

Kaut arī NO ir galvenā nozīme β -šūnu destrukcijā grauzēju autoimūnā diabēta gadījumā, attiecībā uz cilvēka insulīnatkarīgo diabētu tas ir mazāk pierādīts. Cilvēka aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņas un β -šūnas, salīdzinot ar grauzējiem, ir izturīgākas pret NO inhibējošajiem efektiem. Šo izturību nodrošina to fermentu, kas piedalās oksidatīvā stresa novēršanā, salīdzinoši augstāks ekspresijas līmenis un augstāka DNS reparācijas kapacitāte (7).

In vitro pētījumos noskaidrots, ka NO izraisa bojājumus dažādās mitohondriju struktūrās:



2. attēls. NO divējā loma aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņās *Dual role of NO in pancreatic Langerhans islets*

A) NO nozīmē insulīna sintēzē: glikoze aktivē NO veidošanos α-šūnās vai endotēlija šūnās ar eNOS palīdzību, NO parakrīnā veidā stimulē insulīna izdalīšanos no β-šūnām.

B) NO nozīmē insulīnatkarīgā diabēta izraisīšanā: infiltrēto makrofāgu vai pašu β-šūnu izdalītie citokīni inducē NO sintēzi, kas rada β-šūnu bojājumus.

A) Role of NO in synthesis of insulin: glucose activates NO production in α-cells or endothelial cells via action of eNOS, NO stimulates insulin release out of β-cells in paracrine way.

B) Role of NO in induction of insulin-dependent diabetes: cytokins released from infiltrated macrophages or β-cells induce production of NO, the latter damages β-cells.

- 1) NO inhibē Krebasa cikla fermentu – akonitāzi, saistoties pie Fe-S grupām, kas samazina glikozes oksidēšanās un ATP veidošanās ātrumu, līdz ar to tiek traucēta insulīna biosintēze un sekrēcija;
- 2) NO inhibē hēmu saturošus fermentus – citohromoksidāzi (elpošanas ķēdes IV kompleksā), kas kavē elektronu pārnēsi un ATP veidošanos;
- 3) NO fragmentē mitohondriju DNS.

Tātad NO izraisītie bojājumi traucē mitohondriju funkcijas un ievērojami vājina šūnas energoapgādi (8).

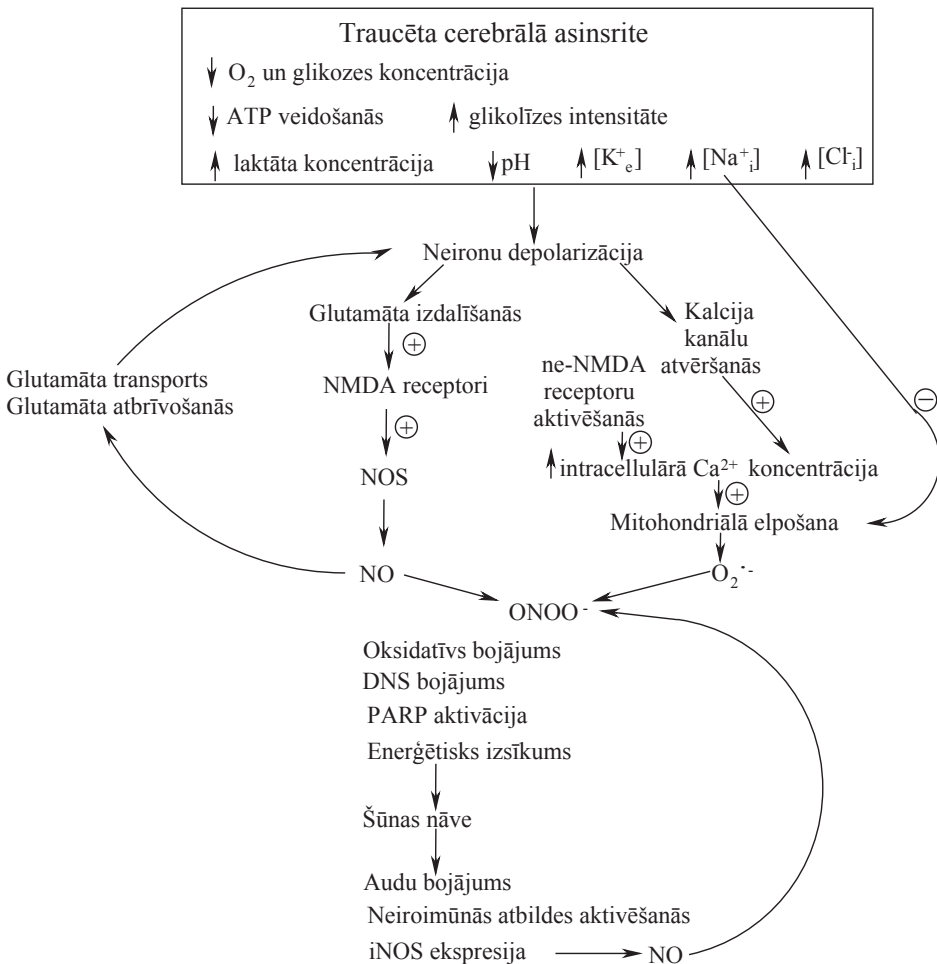
In vitro pētījumos noskaidrots, ka NO izraisa arī kodola DNS fragmentāciju un sekojošu apoptozi. 1. tipa diabēta pacientiem uz β-šūnu virsmas ir ekspresēts Fas (Apo-1, CD 95) receptors, kas piedalās ar apoptozi saistītā signālpārnēsē un ko nenovēro veselīem cilvēkiem. Kā apoptozi izraisošie citokīni ir zināmi: IL-1β, IFN-γ un TNF-α. Izmantojot gēnu mikročipu metodi (*microarray analysis*), ir daļēji noskaidrots molekulārais mehānisms – transkripcijas faktori, kas regulē β-šūnas „lēmumu” iet vai neiet apoptotisko ceļu (9).

β-šūnas bojāeju var izraisīt arī poli(adenozīndifosfātrībozes) polimerāzes (PARP) aktivēšana. Multiplu DNS bojājumu dēļ kā viens no pirmajiem aktivējas šis ferments, lai veiktu DNS reparāciju. Aktivētais PARP sintezē lielus ADP-ribozes polimērus un strauji patērē visu šūnā esošo NAD⁺ krājumu. Tas noved pie šūnas bojāejas (8).

Neirodeģeneratīvās slimības

NO ir galvenā nozīme ar glutamāta – N-metil-D-aspartāta (NMDA) – signālceļu saistītajos patoloģiskajos procesos. Šī t. s. glutamāta neirotoksicitāte ir pamatā tādām neiroloģiskām patoloģijām kā išēmiskam insultam, epilepsijai, neirodeģeneratīvām slimībām – Parkinsona slimībai, Alcheimera slimībai (10, 11).

NMDA receptorus – Ca^{2+} jonu kanālus – aktivē glutamīnskābes piesaistīšanās, receptors atveras, un postsinaptiskajā neironā ieplūst Ca^{2+} joni, aktivējas nNOS, un sintezējas NO, kas veic tālāku neurotransmisiju. Išēmijas laikā novēro ievērojamu glutamāta atbrīvošanos sinapsēs un paaugstinātu NMDA receptoru aktivitāti un reakciju kaskādi (sk. 3. att.), kas ietver NO biosintēzes palielināšanos un spēcīga oksidētāja – peroksinitrīta anjona (ONOO^-) – veidošanos. Peroksinitrīta anjons izraisa daudzveidīgus kaitīgus efektus: lipīdu peroksidāciju, mitohondriju bojājumus, DNS fragmentāciju, kas beigās rada (apoptotisku vai nekrotisku) neironu bojāeju un ilgstošus smadzeņu darbības traucējumus (12).



3. attēls. NO nozīme cerebrālās išēmijas izraisīto nervu audu bojājumā. PARP – poli(adenozīndifosfātrībozes) polimerāze. + aktivēšana; – inhibēšana
Role of NO in ischemic damage of nerve tissue. PARP – poly(adenosine-diphosphate-ribose) polymerase. + activation; – inhibition

Išēmijas laikā NO ir arī neiroprotektīva loma, īpaši tās sākumā:

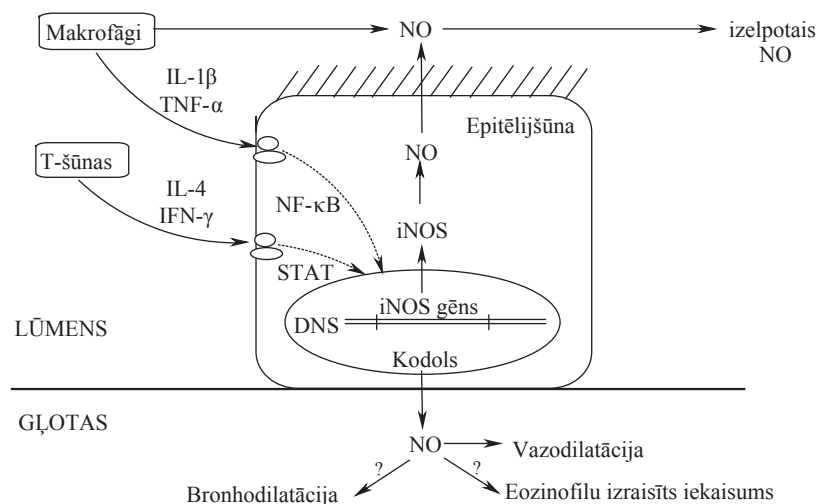
- tas nitrozilē NMDA receptorus un kavē Ca^{2+} iekļūšanu šūnā;
- inhibē ksantīnoksidāzi, kas veido O_2^- radikāļus;
- terminē lipīdu pāroksidēšanās reakcijas;
- optimizē lokālo asinsriti, kavē trombocītu agregāciju un leukocītu adhēziju.

Kā jau minēts, asinsvadu endotēlija veidotais NO uz nervu audiem iedarbojas aizsargājoši, jo, paplašinot asinsvadus, tas uzlabo asinsriti bojātajos audos. Eksperimentāli konstatēts, ka pelēm, kurām mutācijas dēļ nesintezējas eNOS, cerebrālās išēmijas bojājumi ir smagāki. Meklējot efektīvus terapijas līdzekļus, lai ārstētu neurodeģeneratīvās slimības, mēģina lietot NOS inhibitorus pret insultu un citām no NO atkarīgām CNS slimībām. Kā bija gaidāms, NOS inhibitori, kas inhibē gan eNOS, gan nNOS, nav efektīvi neiroprotektīvi aģenti, jo tie ietekmē cerebrālo asinsriti. Turpretī selektīvi nNOS inhibitori efektīvi pasargā no neironu bojājuma dzīvniekus eksperimentāli izraisīta insulta un Parkinsona slimības gadījumā (13).

Astma un citas plaušu slimības

Svarīga nozīme daudzu tādu plaušu slimību patoģenēzē kā astma, hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS), cistiskā fibroze ir iekaisumam. Iekaisuma apstākļos novēro NO hiperprodukciju plaušu audos (sk. 4. att.). Elpceļos esošie makrofāgi ekspresē iNOS, turklāt makrofāgu un T limfocītu izdalītie citokīni stimulē iNOS ekspresiju elpceļu epitēlijšūnās. Līdz ar to NO sintezējas lielās koncentrācijās, tas var veidot peroksinitrīta anjonus ar to izraisītajiem raksturīgajiem bojājumiem. NO līmeņa paaugstināšanās plaušu audos pastiprina eozinofilo leukocītu izraisītu iekaisumu un rada vazodilatāciju, tūsku un plazmas eksudāciju (14).

NO, difundējot ārā no audiem, nonāk izelpotajā gaisā. Izelpotā NO daudzums raksturo imūnšūnu aktivitāti plaušās, un to izmanto kā marķieri iekaisuma diagnostikā. Astmas pacientiem izelpotajā gaisā ir 3–4 reizes paaugstināta NO koncentrācija, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. NO koncentrācija izelpotajā gaisā korelē arī ar citiem iekaisuma marķieriem, piemēram, eozinofilo leukocītu daudzumu inducētajās krēpās (15).

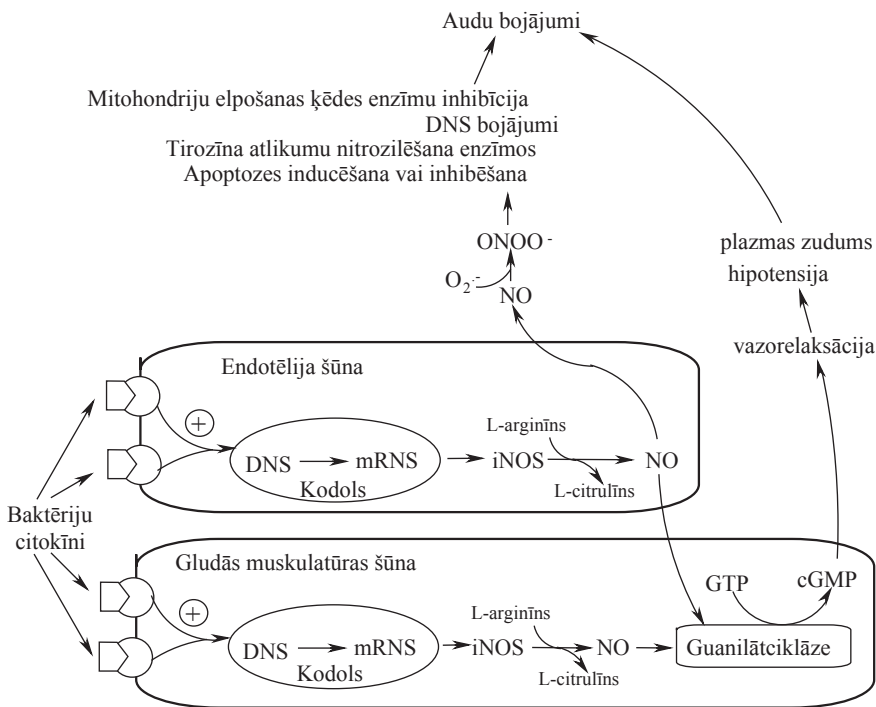


4. attēls. NO veidošanās plaušās pēc indukcijas ar iekaisuma mediatoriem
Production of NO in lung after induction by inflammation mediators

Pētot nNOS gēna polimorfismu, ir konstatētas atšķirības starp astmas pacientiem un veselajiem cilvēkiem. Tas liek domāt, ka šis gēns ir viens no astmas izraisītāju kandidāt-gēniem (16).

Sepsē

Dzīvniekiem ar eksperimentāli izraisītu sepsi, kā arī septiskā šoka pacientiem novēro pastiprinātu NO veidošanos daudzos audos iNOS darbības dēļ (sk. 5. att.) (17). Endotoksīna injekcija žurkām izraisa iNOS mRNS ekspresiju ar sekojošu iNOS proteīna ekspresiju un liela daudzuma NO veidošanos. Endotoksīns pēc ķīmiskās uzbūves ir lipopolisaharīds (LPS). iNOS inhibitoru klātbūtnē NO koncentrācijas pieaugumu nenovēro. Iespējams, zināma nozīme ir arī eNOS, jo *in vitro* eksperimentos pierādīts, ka cilvēku asinsvadu endotēlija šūnās citokīni var inducēt NO veidošanos, aktivējot eNOS (18).



5. attēls. NO nozīme audu bojājuma veidošanā sepsē laikā. GTP – guanozīntrifosfāts, cGMP – cikliskais guanozīn-3,5-monofosfāts

Role of NO in septic tissue damage. GTP – guanosinetriphosphate, cGMP – cyclic guanosine-3,5-monophosphate

Paaugstināta NO veidošanās izraisa septiskajam šokam raksturīgos simptomus – vazodilatāciju, hipotensiju un asinsvadu hiporeaktivitāti artērijās, vēnās, kapilāros. Sepses apstākļos cieš audu elpošana – lielās koncentrācijās NO iedarbojas ar superoksīdanjonu un veido peroksinitrītu, kas neatgriezeniski inhibē mitochondriju elpošanas ķēdes fermentus citohromoksidāzes, reaģējot ar to Fe-S grupām. Turklāt NO rada bojājumus DNS, nitrozilē tirozīna atlikumus fermentu aktīvā centra proteīnos. Šie faktori izraisa multiplu audu un orgānu bojājumus, kas draud ar letālu iznākumu (18).

Klīniskos pētījumos NO stabilo metabolītu – nitrītu un nitrātu (NO_x) – koncentrācija asins plazmā kontroles grupā ir 30–40 μM , bet pacientiem ar septisko šoku 60–100 μM . Šāds divkārtīgs vai pat trīskārtīgs NO_x pieaugums sepses gadījumā cilvēkam ir neliels, salīdzinot ar desmitkārtīgu pieaugumu, kas novērots grauzēju endotoksēmijas modeļos (19).

Septiskā šoka terapijā ir mēģinājumi lietot NOS inhibitorus, piemēram, izoformu nespecifisku inhibitoru N^G -monometil-L-arginīnu (L-NMMA). To lieto nelielās devās, jo pretējā gadījumā pieaug letālo iznākumu skaits, iespējams, tiek inhibēta fizioloģiski nepieciešmā NO veidošanās un izraisīta pārmērīga vazokonstrikcija. Iespējams, ka, lietojot selektīvus iNOS inhibitorus, sekmes būtu labākas (18).

Ir pārbaudīti vairāku NOS inhibitoru – guanidīna atvasinājumu – *in vivo* efekti eksperimentos ar žurkām. N^G -Nitro-L-arginīna metilesteris (L-NAME) inhibē gan bazālo, gan lipopolisaharīda (LPS) inducēto NO sintēzi visos pētītajos orgānos, aminoguanidīns uzrāda inhibējošas īpašības tikai sepses modelī. Guanobenzis inhibē bazālo NO produkciju smadzeņu garozā, citur tas ir vājš inhibitors (20).

Pretiekaisuma un imūnmodulējoša darbība ir raksturīga α -melanocītus stimulējošajam hormonam (MSH), kas inhibē iekaisuma citokīnu, NO biosintēzi un izdalīšanos no makrofāgiem. Tas var notikt divos veidos – aktivējot melanokortīna I receptorus un adenilātciklāzi, vai arī no cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) neatkarīgā ceļā, inhibējot kodola faktora- κB (NF- κB) translokāciju uz kodolu (21, 22). *In vivo* eksperimentos ar pelēm konstatēts, ka α -, β - un γ -MSH atkarībā no devas samazina ar LPS inducēto NO pieaugumu smadzenēs, t. i., modulē iekaisuma signālu smadzenēs. Turklāt lielāka aktivitāte piemīt β -, γ 1- un γ 2-MSH (23).

NO un skeleta muskulatūras distrofijas

Muskulatūrā ekspresējas daudz neironālās NOS mRNS, kas alternatīvā splaisinga dēļ veido muskuļu specifisku izoformu – nNOS μ . Daudz muskuļu nNOS proteīna ir ātrajās muskuļšķiedrās, to veidots NO samazina kontrakcijas spēku. Skeleta muskuļu nNOS ir koncentrēta pie plazmas membrānas (sarkolemmas) un ir saistīta ar proteīna distrofīna kompleksu.

Dišēna muskuļu distrofijas slimniekiem un mdx pelēm distrofīna gēnā ir mutācija, kas pilnīgi pārtrauc distrofīna sintēzi, tāpēc nNOS nevar piesaistīties pie plazmas membrānas. Mutācija distrofīna nūjveida (*rod-like*) domēnā, kas saistīta ar Bekera distrofiju (salīdzinoši vieglāku šīs slimības formu), izraisa šo nNOS nespēju saistīties pie sarkolemmas, bet neietekmē pārējos distrofīna kompleksa elementus. Distrofīna trūkums Dišēna distrofijas gadījumā izjauc normālo saikni starp ekstracelulāro matricu un muskuļšķiedras citoskeletu. Sarkolemmas nestabilitāte izraisa atkārtotu muskuļšķiedras deģenerāciju ar sekojošu reģenerāciju. nNOS pārdale no sarkolemmas uz citosolu, domājams, noved pie muskuļšķiedru nekrozes. Tā kā NO piedalās arī šūnu diferenciācijā, tad ar sarkolemmu saistītās nNOS iztrūkums Dišēna distrofijas gadījumā rada traucējumus arī muskuļu reģenerācijā (13).

Detalizētos bioķīmiskos pētījumos noskaidrots, kāds specifisks proteīns distrofīna kompleksā saista nNOS. Tas ir sintrofīns, kura aminogalā esošais PDZ proteīna motīvs saistās ar līdzīgu motīvu netālu no nNOS aminogala. Sintrofīns tieši saistās ar distrofīnu un pievieno nNOS distrofīna kompleksam. Iespējams, ka PDZ domēns sintrofīnā saistās arī ar citiem muskuļu proteīniem. Dišēna distrofijas gadījumā novēro sintrofīna saistīto proteīnu zudumu sarkolemmā, kas, domājams, izraisa šai slimībai raksturīgos traucējumus sarkolemmas integritātē (24).

Kancerogēnēze

NO nozīme audzēju bioloģijā ir daudzveidīga. NO piedalās šūnu malignizācijā. Ilgstoša un paaugstināta NO veidošanās uz audu hipoksijas un iekaisuma citokīnu sintēzes fona izraisa onkogēna p53 inaktivēšanu un mutantu šūnu veidošanos. Kancerogēna iedarbība ir NO un amīnu iedarbības produktiem – nitrozoamīniem.

NO regulē arī audzēja augšanas procesu. Audzējā esošās asinsvadu endotēlija šūnas, infiltrētās imūnšūnas un paša audzēja šūnas spēj ģenerēt NO. Audzēja audos novēro iNOS ekspresiju, paaugstinātu NOS aktivitāti un cikliskā guanozīnmonofosfāta (cGMP) līmeni. NO paaugstina asinsvadu caurlaidību, veicina angiogēnēzi, arī patoloģisko angiogēnēzi. Pastiprināta vaskularizācija korelē ar audzēja augšanas ātrumu. Metastāzes veidojošos audzējos angiogēnēze ir intensīvāka nekā kompakto audzējos, kur tā ir samazināta, jo ir inhibēta iNOS biosintēze.

NO var izraisīt arī audzēja samazināšanos, inducējot apoptozi.

Tiek pētīta NO sintēzi modificējošu preparātu izmantošana pretvēža terapijā. Tie inducē audzēja šūnu bojāeju un ietekmē audzēja asinsvadu tonusa regulāciju. Piemēram, NOS inhibitors nitroarginīns ievērojami samazina audzēja asinsapgādi, gandrīz neietekmējot asinsvadus kuņģī, sirdī, nierēs un smadzenēs. Ir arī dati, ka NO paaugstina ķīmijterapijas un radioterapijas efektivitāti (25).

Par slāpekļa oksīda nozīmi dažādu slimību izcelsmē ir noskaidrots ļoti daudz, turklāt salīdzinoši īsā laikā, kopš NO sāka intensīvi pētīt. Tomēr ir daudz neskaidru jautājumu. Kā plašu darba lauku var minēt iespējas izmantot šos pētījumus dažādu terapeitisku līdzekļu izstrādāšanā, piemēram, lietot NO donorus vai dažādu izoformu NOS inhibitorus.

Literatūra

1. Marietta M. A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell*. 1994, 78: 927–930.
2. Ducrocq C., Servy C., Cudic M., Blanchard B. Intervention du monoxide d'azote, NO, et de ses dérivés oxidés, particulièrement chez les mammifères. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001, 79: 95–102.
3. Musial A., Eissa N. T. Inducible Nitric-Oxide Synthase is Regulated by the Proteasome Degradation Pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (26): 24268–24273.
4. Napoli C., Ignarro L. J. Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Biology and Chemistry*. 2001, 5: 88–97.
5. Bult H., Matthys K. E., Kockx M. M. Nitric Oxide and Atherosclerosis. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, V 143, Nitric oxide, Mayer, B., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2000, 571–617.
6. Rössig L., Dimmeler S., Zeiher A. M. Apoptosis in the Vascular Wall and Atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* 2001, 96: 11–12.
7. Spinaz G. A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -cells. *News Physiol. Sci.* 1999, 14: 4–54.
8. Burkart V., Kolb H. Nitric Oxide in the Immunopathogenesis of Type 1 diabetes. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, V 143, Nitric oxide, Mayer, B., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2000, 571–617.
9. Eizirik D. L., Kutlu B., Rasshaert J., Darville M., Cardozo A. K. Use of Microarray Analysis to Unveil Transcription Factor and Gene Networks Contributing to β Cell Dysfunction and Apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003, 1005: 55–74.
10. Башкатова В. Г., Раевский К. С. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата. *Биохимия*. 1998, 63 (3): 1020–1028.
11. Barnham K. J., Masters C. L., Bush A. Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress. *Nature Reviews*. 2004, 3: 205–214.
12. Bockaert J. Formation of Oxygen Radicals and NO Induced by Glutamate: Roles in Neurotoxicity. *Molecular Mechanisms of Signal Transduction*. Bos, J. L. (Ed.). IOS Press. 2000, 231–243.
13. Brenman J. E., Bredt D. S. Synaptic Signalling by Nitric Oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997, 7: 374–378.

14. Гуревич К. Г., Шимановский Н. Л. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2000, 4: 16–21.
15. Kharitonov S. A., Yates D., Robbins R. A., Logan-Sinclair R., Shinebourne E. A., Barnes P. J. Increased Nitric Oxide in Exhaled Air of Asthmatic Patients. *Lancet*. 1994, 343: 133–135.
16. Grasmann H., Yandava C. N., Storm van's Gravesande K., Deykin A., Pillari A., Ma J. et al. A Neuronal NO Synthase (NOS 1) Gene Polymorphism is Associated with Asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 272: 391–394.
17. Kirkebøen K. A., Strand Ø. A. The Role of Nitric Oxide in Sepsis – an Overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1999, 43: 275–288.
18. Vallance P., Rees D., Moncada S. Therapeutic Potential of NOS Inhibitors in Septic Shock. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, V 143, Nitric oxide, Mayer, B., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2000, 385–397.
19. Vallance P., Charles I. Nitric Oxide as an Antimicrobial Agent: Does NO Always Mean NO? *Gut*. 1998, 42: 313–314.
20. Dambrova M., Kirjanova O., Baumane L., Liepinsh E., Zvejniece L., Muceniece R., Kalvinsh I., Wikberg J. E. EPR Investigation of in vivo Inhibitory Effect of Guanidine Compounds on Nitric Oxide Production in Rat Tissues. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003, 54(3): 339–347.
21. Mandrika I., Muceniece R., Wikberg J. E. Effects of Melanocortin Peptides on Lipopolysaccharide/interferon-gamma-Induced NF-kappaB DNA Binding and Nitric Oxide Production in Macrophage-like RAW 264.7 Cells: Evidence for Dual Mechanisms of Action. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61: 613–621.
22. Muceniece R., Krigere L., Suli-Vargha H., Wikberg J. E. Effects of Alpha-Melanotropin C-terminal Tripeptide Analogues on Macrophage NO Production. *Peptides*. 2003, 24(5): 701–707.
23. Muceniece R., Zvejniece L., Kirjanova O., Liepinsh E., Krigere L., Baumane L., Kalvinsh I., Wikberg J. E., Dambrova M. beta- and gamma-Melanocortins Inhibit Lipopolysaccharide Induced Nitric Oxide Production in Mice Brain. *Brain. Res.* 2004, 995(1): 7–13.
24. Chao D. S., Gorospe R. M., Brenman J. E., Rafael J. A., Peters M. F., Froehners S. C., Hoffman E. P., Chamberlain J. S., Bredt D. S. Selective Loss of Sarcolemmal Nitric Oxide Synthase in Becker Muscular Dystrophy. *J. Exp. Med.* 1996, 184: 609–618.
25. Проскуряков С. Я., Конопляников А. Г., Иванников А. И., Скворцов В. Г., Биология окиси азота. Успехи современной биологии. 1999, 119: 380–395.

Summary

Nitric oxide (NO) participates in the regulation of many physiological processes (relaxation of smooth muscles, neurotransmission, and at higher concentrations – in cell immune response). Besides that, especially at high concentrations NO is involved in the genesis of many pathological processes. NO participates in the pathogenesis of many diseases of the heart and vascular blood vessel system, atherosclerosis, reperfusion – ischemia damage, neurodegenerative diseases, muscle dystrophies, insulin dependent diabetes and septic shock genesis.

Iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos HOPS pacientiem

Inflammatory Changes in Central and Peripheral Airways in COPD

Sergejs Isajevs, Immanuel Taivans, Uldis Kopeika, Gunta Strazda

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: z90030@lanet.lv

Pētījuma mērķis ir raksturot iekaisīgās pārmaiņas centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā nesmēķētājiem un smēķētājiem, kā arī HOPS pacientiem.

Pētījumā izmantots histoloģiskais materiāls no 22 pacientiem, kuriem tika operēts solitārs veidojums plaušās. Izmeklējamās personas tika iedalītas trijās grupās: nesmēķētāji ar normālu plaušu funkciju ($n = 6$), smēķētāji ar normālu plaušu funkciju ($n = 8$) un HOPS pacienti ($n = 8$). CD8 limfocītu, makrofāgu un neitrofilu noteikšanai audos izmantota imūnhistoķīmiskā biotīna un avidīna metode.

HOPS pacientiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, ir izteiktāka centrālo, perifēro elpceļu un plaušu parenhīmas infiltrācija ar CD8 limfocītiem, neitrofilu un makrofāgiem. Asimptomātiskiem smēķētājiem iekaisīgās pārmaiņas mazākā mērā nekā HOPS pacientiem novērojamas gan centrālajos un perifērajos elpceļos, gan plaušu parenhīmā. Turklāt CD8 limfocītu, makrofāgu un neitrofilu infiltrācija elpceļos korelē ar elpošanas funkcionālajiem rādītājiem.

Pētījumā noskaidrots, ka HOPS pacientiem iekaisīgās pārmaiņas ir vairāk izteiktas perifērajos nekā centrālajos elpceļos, savukārt asimptomātiskiem smēķētājiem iekaisuma pārmaiņas galvenokārt skar centrālos elpceļus.

Atslēgvārdi: HOPS, FEV₁%, iekaisīgās pārmaiņas.

Ievads

Hroniskai obstruktīvai plaušu slimībai (HOPS) ir raksturīga progresējoša un neatgriezeniska plaušu funkciju pasliktināšanās, ko izraisa hroniska elpceļu obstrukcija. Elpceļu obstrukciju novērtē, izmantojot spirometriju (13). HOPS pašlaik ir ceturtais biežākais mirstības cēlonis Eiropā un ASV, taču tiek prognozēts, ka, smēķētāju skaitam pieaugot, 2020. gadā šī slimība būs jau trešais biežākais nāves cēlonis (1). Turklāt tas ir vienīgais strauji progresējošais nāves iemesls. Epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka aptuveni 60 miljoni cilvēku visā pasaulē cieš no HOPS, no tiem 15–20 miljoni ASV, un katru gadu aptuveni 2,75 miljoni mirst (1, 13).

Tabakas dūmi ir nozīmīgākais HOPS riska faktors, kas izraisa strauju FEV₁ krišanos un lielāku mirstību smēķējošiem HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar nesmēķējošiem (1, 16). Tabakas dūmi ir bagātīgs oksidantu avots. Tie satur vairākus komponentus: dūmu darvas komponentu un gāzes komponentu (15). Tabakas dūmu darvas komponents satur hinona-hidrohinona redokskompleksu, kas reducē O₂ par O₂⁻, savukārt tabakas dūmu

gāzes komponents satur vairāk nekā 10^{16} organisko radikāļu vienā cigaretē (11). Tie galvenokārt ir oglekļa un slāpekļa radikāļi, kā arī alkēni un diēni. Šīs vielas aktivē iekaisuma mediatoru sintēzi bronhu epitēlijšūnās, neitrofilajos leukocītos un makrofāgos (15).

Pētījumi liecina, ka HOPS pacientiem iekaisuma izraisītas pārmaiņas ir novērojamas gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos. Galvenās elpceļu iekaisuma šūnas ir CD8 limfocīti (18, 5). Savukārt ir iegūti pretrunīgi dati par neitrofilajiem leukocītiem un makrofāgiem. Vieni pētnieki uzskata, ka nav būtiskas atšķirības starp šo šūnu infiltrāciju dažādos elpceļu līmeņos (9, 10, 18), turpretim citi to noliedz (5, 14). Pēc autoru domām, pretrunu iemesls ir tas, ka iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos, kā arī plaušu parenhīmā netiek pētītas vieniem un tiem pašiem indivīdiem.

Darba mērķis ir salīdzināt iekaisuma šūnu skaitu un spektru centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā vieniem un tiem pašiem asimptomātiskajiem nesmēķētājiem un smēķētājiem, kā arī smēķētājiem ar HOPS.

1. tabula

Pētījumā iekļauto personu raksturojums
Description of investigated persons

Grupa	Skaitis	Vecums (gadi)	Pakgadi	FEV ₁ %	FEV ₁ /FVC %
Nesmēķētāji	6	62,7 ± 7,6	-----	99,1 ± 11,1*	76,3 ± 5,5
Asimptomātiski smēķētāji	8	65,25 ± 3,28	35 ± 10,6	94,5 ± 8,7*	77,3 ± 5,7
HOPS pacienti	8	63,4 ± 8,3	24,6 ± 14,1	58,1 ± 9,4	61,1 ± 8,5

(Tabulā dati izteikti kā vidējais aritmētiskais ± vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda)

$p < 0,05$, salīdzinot pirmo ar trešo grupu un otro ar trešo grupu

Pacienti un metodes

Pacientu atlase. Pētījumā tika izmantots histoloģiskais materiāls, kas iegūts no 22 pacientiem, kuriem operēts solitārs veidojums plaušās. Izmeklējamās personas tika iedalītas trijās grupās (sk. 1. tabulu):

- 1) nesmēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju ($n = 6$; FEV₁ > 80% FEV₁/VC > 70%);
- 2) smēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju ($n = 8$);
- 3) smēķētāji ar vidēji smagu HOPS ($n = 8$; FEV₁ < 80% FEV₁/VC < 70%).

Visiem pacientiem tika noteikta plaušu ventilācijas funkcija, izmantojot firmas *Jaeger* spirogrāfu *Master Screen*. Tika novērtēta VC, FEV₁, FEV₁/VC% pirms β2 agonista (400 μg salbutamola) inhalācijas un 15 minūtes pēc tās un aprēķināta FEV₁% reversibilitāte. FEV₁% reversibilitāte ir starpība starp FEV₁% 15 minūtes pēc β2 agonista inhalācijas un FEV₁% pirms inhalācijas.

Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai audi tika fiksēti 48 stundas 10% formalinā, pēc tam atūdeņoti un ieguldīti parafinā. No blokiem tika pagatavoti un imūnhistoķīmiski izmeklēti 4 μm biezi griezumumi. Antigēna demaskēšanai tika izmantota sakarsēšanas metode mikroviļņu krāsni 180 W – preparāti tika ievietoti citrāta bufera vannā ar pH = 6,2 un 30 min inkubēti. Savukārt, identificējot CD8 limfocītus, preparāti tika inkubēti bufera vannā ar pH 9,0. Pēc tam tika veikta imūnhistoķīmiskā krāsošana, izmantojot biotīna avidīna metodi ar DAKO firmas LSAB kitu. Visas reakcijas tika veiktas istabas temperatūrā

Shandon mitrajā kamerā. Preparāti tika inkubēti 10 min peroksidāzes bloķētājreaģentu klātbūtnē un skaloti TBS, pēc tam 30 min inkubēti primāro antivielu CD8, MPO (neitrofilo leukocītu mieloperoksidāze) un CD68 klātbūtnē. Pēc inkubācijas griezumai 5 min tika skaloti ar TBS un vēlreiz 30 min inkubēti ar biotinilēto sekundāro antivielu pret kazas IgG. Pēc preparātu atkārtotas skalošanas TBS tika veikta 30 min ilga inkubācija ar trešo antivielu, kas bija iezīmēta ar mārtruku peroksidāzi. Tad notika 5 min vizualizācijas reakcija ar diaminobenzidīnu (DAB). Pēc preparātu skalošanas destilētā ūdenī tiem uzpilināja *Glycergel*, uzlika segstikliņu un mikroskopēja. Preparāti tika analizēti, izmantojot *Motic Image* programmu, šūnu skaits tika izteikts uz laukuma vienību ($1/\text{mm}^2$).

Datu statistiskā apstrāde

Visi dati tika apstrādāti, izmantojot statistisko programmu *GraphPadPrism* trešo versiju. Grupas tika salīdzinātas, izmantojot *Kruskal-Wallis* testu ar Danna pēctestu (*Dunns post test*). Korelācijas tika izvērtētas, izmantojot *Spearman* testu. Rezultāti tika novērtēti kā statistiski ticami, ja $p < 0,05$. Attēlos dati tika izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda.

Rezultāti

CD8 limfocīti centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā

CD8 limfocītu absolūtais skaits centrālajos elpceļos HOPS pacientiem ir būtiski augstāks nekā nesmēķētājiem (281 ± 92 un 81 ± 33 , $p < 0,01$) un ar zemāku ticamību augstāks nekā asimptomātiskiem smēķētājiem (172 ± 98 , $p > 0,05$). Līdzīga likumsakarība tika novērota attiecībā uz CD8 limfocītu skaitu perifērajos elpceļos HOPS pacientiem un nesmēķētājiem (417 ± 108 un 54 ± 25 ; $p < 0,001$). HOPS pacientiem un asimptomātiskiem smēķētājiem CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka plaušu parenhīmā ($p < 0,01$) salīdzinājumā ar centrālajiem elpceļiem un ar zemāku ticamību perifērajos elpceļos nekā centrālajos elpceļos ($p > 0,05$). Savukārt asimptomātiskiem nesmēķētājiem CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka centrālajos nekā perifērajos elpceļos ($p > 0,05$), bet visvairāk šo šūnu ir plaušu parenhīmā, salīdzinot ar centrālajiem ($p < 0,05$) un perifērajiem elpceļiem ($p < 0,01$). (sk. 2. tabulu). Analizējot datus par visiem pacientiem kopā (sk. 1. att.), tika konstatēta negatīvā korelācija starp $\text{FEV}_1\%$ un CD8 limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā, kā arī negatīvā korelācija starp CD8 infiltrāciju perifērajos elpceļos un $\text{FEV}_1/\text{FVC}\%$ ($r = -0,607$; $p = 0,0027$).

Neitrofilie leukocīti centrālajos un perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā

Netika atrasta būtiska statistiski ticama korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju centrālajos elpceļos asimptomātiskiem nesmēķētājiem, smēķētājiem un HOPS pacientiem. Savukārt, analizējot neitrofilo leukocītu skaitu perifērajos elpceļos, tika konstatēts, ka HOPS pacientiem šo šūnu infiltrācija ir izteiktāka salīdzinājumā ar asimptomātiskiem nesmēķētājiem (438 ± 63 un 68 ± 21 , $p < 0,0001$) un lielāka nekā asimptomātiskiem smēķētājiem (232 ± 61 , $p < 0,05$).

Neitrofilo leukocītu infiltrācija plaušu parenhīmā ir ticami lielāka arī HOPS pacientiem salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (491 ± 94 un 182 ± 62 , $p < 0,001$).

Salīdzinot neitrofilo leukocītu infiltrāciju asimptomātiskiem smēķētājiem, tā ir izteiktāka centrālajos nekā perifērajos elpceļos (245 ± 148 un 68 ± 21 ; $p < 0,05$). Arī nesmēķētājiem neitrofilo leukocītu infiltrācija ir lielāka centrālajos elpceļos, salīdzinot ar perifērajiem elpceļiem un plaušu parenhīmu (245 ± 61 , 68 ± 21 un 182 ± 63). Savukārt HOPS pacientiem neitrofilo leukocītu infiltrācija, izrādās, ir lielāka perifērajos nekā centrālajos elpceļos (438 ± 63 un 298 ± 105 ; $p < 0,05$), kā arī šo šūnu infiltrācija plaušu parenhīmā ir izteiktāka nekā centrālajos elpceļos (atbilstoši 491 ± 94 un 298 ± 105 ; $p < 0,01$).

2. tabula

Šūnu skaits un spektrs nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) centrālajos, perifērajos elpceļos un alveolās
Number and spectrum of cells in central, peripheral airways and alveoli nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (HOPS)

Elpceļi	CD8 limfocīti/mm ²			Makrofāgi, mm ²			Neitrofili, mm ²		
	NS	S	HOPS	NS	S	HOPS	NS	S	HOPS
Centrālie	81 ± 33*	172 ± 98	281 ± 92	214 ± 54	338 ± 137	522 ± 97	245 ± 61	245 ± 148	298 ± 105
Perifērie	68 ± 12*	232 ± 61®	438 ± 63	135 ± 45ψ	266 ± 54	297 ± 134	68 ± 12*	232 ± 61®	438 ± 63
Alveolas	274 ± 65	309 ± 30	526 ± 76	412 ± 91ψ	601 ± 92	515 ± 139	205 ± 57*	182 ± 62	491 ± 94

(Tabulā dati izteikti kā vidējais aritmētiskais ± vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūda)

* $p < 0,05$, salīdzinot NS ar HOPS

® $p < 0,05$, salīdzinot S ar HOPS

ψ $p < 0,05$, salīdzinot S ar NS

Analizējot datus par visiem pacientiem kopā (sk. 2. att.), tika konstatēta statistiski ticama negatīva korelācija starp neitrofilu infiltrāciju elpceļos un FEV₁%, toties pozitīva korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju perifērajos elpceļos un smēķēšanas pakādiem (sk. 3. att.). Tika konstatēta statistiski ticama negatīva korelācija starp neitrofilu infiltrāciju perifērajos elpceļos un FEV₁/FVC% ($r = -0,6269$; $p = 0,0018$).

Makrofāgi centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā

Veiktā pētījuma rezultāti liecina, ka makrofāgu absolūtais skaits centrālajos elpceļos ir būtiski augstāks HOPS pacientiem nekā veselīgiem nesmēķētājiem (522 ± 97 un 214 ± 54 , $p < 0,01$) un ar zemāku ticamību augstāks nekā veselīgiem smēķētājiem – 338 ± 137 ($p > 0,05$). Savukārt makrofāgu skaits perifērajos elpceļos asimptomātiskiem smēķētājiem ir būtiski augstāks nekā asimptomātiskiem nesmēķētājiem (atbilstoši 266 ± 54 un 135 ± 45 ; $p < 0,05$). Līdzīga likumsakarība tika novērota attiecībā uz makrofāgu infiltrāciju plaušu parenhīmā, salīdzinot asimptomātiskos smēķētājus un nesmēķētājus (601 ± 92 un 412 ± 91 ; $p < 0,05$).

Analizējot datus par visiem pacientiem kopā, tika konstatēta arī negatīva korelācija starp makrofāgu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos un FEV₁% (sk. 4. att.).

Diskusija

Šis ir pasaules literatūrā pirmais pētījums, kurā salīdzināts iekaisuma šūnu skaits un to spektrs centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā vieniem un tiem pašiem nesmēķētājiem, asimptomātiskiem smēķētājiem un smēķētājiem ar HOPS.

Pētījuma rezultāti rāda, ka CD8 limfocītu infiltrācija centrālajos un perifērajos elpceļos ir izteiktāka HOPS pacientiem nekā nesmēķētājiem un asimptomātiskiem smēķētājiem. Pētījumā tika konstatēta negatīva korelācija starp FEV₁% un CD8 limfocītu skaitu centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā. Arī citos pētījumos ir konstatēts, ka CD8 limfocītu skaits centrālajos, perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā HOPS pacientiem ir lielāks nekā nesmēķētājiem un asimptomātiskiem smēķētājiem (5, 10, 20, 23).

Turklāt ir novērota ticama negatīva korelācija starp CD8 limfocītu infiltrāciju elpceļos un FEV₁% (10, 12). Tomēr šādi pētījumi nav veikti vieniem un tiem pašiem HOPS pacientiem un asimptomātiskiem smēķētājiem. Šī pētījuma dati liecina, ka asimptomātiskiem nesmēķētājiem CD8 limfocītu infiltrācija vairāk ir izteikta centrālajos nekā perifērajos elpceļos, savukārt HOPS pacientiem CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos elpceļos.

Pētījums liecina par svarīgu CD8 limfocītu nozīmi HOPS patoģenēzē. CD8 limfocīti izdala dažādus citokīnus, tostarp IL-6, IL-8 un TNF α (8, 2). Turklāt CD8 šūnas izdala perforīnus un granzīmus, tādējādi izraisot alveolāro epiteliocītu apoptozi (7, 15). Pētījuma autori nav atraduši būtiskas atšķirības starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju centrālajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. Līdzīgi rezultāti ir iegūti arī citos pētījumos (5, 9, 10, 19). Pētījuma rezultāti neapstiprina Pesci datus (14). Viņš novēroja palielinātu neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos elpceļos HOPS slimniekiem.

Neitrofilo leukocītu skaits perifērajos elpceļos ir būtiski lielāks HOPS pacientiem nekā nesmēķētājiem un asimptomātiskiem smēķētājiem. Šie dati apstiprina Boskena pētījuma datus (4), bet ir pretstatā Saetas iegūtajiem datiem (19) – viņš neatrada būtiskas neitrofilo leukocītu skaita atšķirības. Autori atklājuši, ka neitrofilo leukocītu infiltrācija plaušu parenhīmā ir izteiktāka HOPS pacientiem, salīdzinot ar asimptomātiskiem nesmēķētājiem. Saetas pētījumā (20) šāda tendence netika atrasta. Pēc autoru domām, tas izskaidrojams ar dažādām pētījuma materiāla analīzes metodēm. Saeta neitrofilo leukocītu infiltrāciju pētījis tikai alveolārajā epitēlijā (20), bet šajā pētījumā tā noteikta gan alveolārajā epitēlijā, gan alveolārajās ejās, kur neitrofilo leukocītu infiltrācija bija izteiktāka. Iegūtos rezultātus apstiprina bronhoalveolārās lavāžas materiāla pētījumi, kur galvenās iekaisuma šūnas ir neitrofilie leukocīti (17, 22).

Arī šajā pētījumā, līdzīgi kā citos, konstatēta negatīva korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju centrālajos elpceļos (10), perifērajos elpceļos (4) un plaušu parenhīmā (7) un FEV₁. Līdzīgi kā Boskena pētījumā (4), tika konstatēta pozitīva korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju perifērajos elpceļos un smēķēšanas pakgadiem.

Vairākos pētījumos konstatētā būtiskā neitrofilo leukocītu skaita atšķirība starp centrālajiem un perifērajiem elpceļiem joprojām pilnībā nav izskaidrota. Daļēji to varētu skaidrot ar smēķēšanas un HOPS ilgumu, materiāla paņemšanas laiku (HOPS recidīvs vai remisija).

Iegūtie rezultāti liecina, ka makrofāgu absolūtais skaits centrālajos elpceļos ir būtiski augstāks HOPS pacientiem nekā veseliem nesmēķētājiem un ar zemāku ticamību augstāks nekā veseliem smēķētājiem. Līdzīgi rezultāti ir iegūti citos pētījumos (5, 17).

Savukārt citi pētnieki nav atraduši būtiskas atšķirības starp makrofāgu skaitu centrālajos elpceļos HOPS pacientiem un asimptomātiskiem nesmēķētājiem (10, 18).

Makrofāgu skaits perifērajos elpceļos asimptomātiskiem smēķētājiem izrādījās būtiski augstāks nekā asimptomātiskiem nesmēķētājiem, turklāt tika konstatēta negatīva korelācija starp makrofāgu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos un FEV₁%. Makrofāgu infiltrācija plaušu parenhīmā ir izteiktāka asimptomātiskiem smēķētājiem salīdzinājumā ar nesmēķētājiem; līdzīgi dati atrodami Finkelsteina pētījumā (7).

Iegūtie rezultāti liecina, ka no tabakas dūmiem izdalītie oksidanti *per se* var aktivēt alveolāros makrofāgus un NF- κ B aktivitāti. Rezultātā makrofāgi sintezē virkni iekaisuma citokīnu (IL-1 β , IL-6, IL-8 un TNF α), kas izraisa iekaisuma procesu plaušās (3, 6, 15). Svarīgi, ka aktivēti makrofāgi paši izdala vairākus oksidantus, piemēram, no O₂ Fe²⁺ klātbūtnē veidojas hidroksila radikālis OH. Makrofāgiem ir būtiska nozīme plaušu em-

fizēmas un fibrozes attīstībā. Makrofāgu metaloproteāzes sagrauj plaušu audu elastisko karkasu, tādējādi veicinot emfizēmas attīstību, bet TGF- β un PAF veicina fibrozi (21).

Iekaisuma pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos, un plaušu parenhīmā ir novērojamas gan asimptomātiskiem smēķētājiem, gan HOPS pacientiem. HOPS pacientiem iekaisuma pārmaiņas ir vairāk izteiktas perifērajos nekā centrālajos elpceļos, savukārt asimptomātiskiem smēķētājiem iekaisuma pārmaiņas galvenokārt skar centrālos elpceļus.

Secinājumi

HOPS pacientiem salīdzinājumā ar nesmēķētājiem ir izteiktāka centrālo, perifēro elpceļu un plaušu parenhīmas infiltrācija ar CD8 limfocītiem, neitrofilajiem leukocītiem un makrofāgiem.

Asimptomātiskiem smēķētājiem iekaisuma pārmaiņas ir izteiktākas centrālajos elpceļos, bet HOPS pacientiem – perifērajos elpceļos.

Pateicība

Darbs tapis ar **Eiropas Sociālā fonda** atbalstu.

Literatūra

1. Anto J. M., Vermeire P., Vestbo J., Sunyer J. (2001) Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.*, 17, 982–994.
2. Barnes P. J. (2003) New Concepts in COPD. *Annu. Rev. Med.*, 54, 113–129.
3. Barnes P. J., Karin M. (1997) Nuclear Factor κ B : a Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N. Engl. J. Med.*, 336, 1066–1071.
4. Bosken C. H., Hards J., Gatter K., Hogg J. C. (1992) Characterization of the Inflammatory Reaction of Peripheral Airways of Cigarette Smokers Using Immunohistochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, 911–917.
5. Di Stefano A., Turato G., Mastrelli P., Mapp C. E., Ruggieri M. P., Roggeri P., Boschetto L. M., Fabbri L. M., Saetta M. (1996) Airway Limitation in Chronic Bronchitis is Associated with T-lymphocytes and Macrophages Infiltration in Bronchial Mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153, 629–632.
6. Di Stefano A., Caramori G., Oates T., Capelli A., Lusuardi M., Gnemmi I., Ioli F., Chung K. F., Donner C. F., Barnes P. J., Adcock I. M. (2002) Increased Expression of Nuclear Factor- κ B in Bronchial Biopsies from Smokers and Patients with COPD. *Eur. Respir. J.*, 20, 556–563.
7. Finkelstein R., Fraser R. S., Ghezzi H., Cosio M. G. (1995) Alveolar Inflammation and Its Relation to Emphysema in Smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 1666–1672.
8. Keatings V. M., Collins P. D., Scott D. M., Barnes P. J. (1996) 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.*, 153(2), 530–534.
9. Lacoste J. Y., Bousquet J., Chanez P. (1993) Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma, Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 92, 537–548.
10. Lams B. E. A., Sousa A. R., Rees P. J., Lee T. H. (2000) Subepithelial Immunopathology of Large Airways in Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.*, 15, 512–516.
11. Lannan S., Donaldson K., Brown D., MacNee, W. (1994) Effects of Cigarette Smoke and its Condensates on Alveolar Cell Injury in vitro. *Am. J. Physiol.*, 266, L92–L100.
12. O'Shaughnessy T. C., Ansari T. W., Barnes N. C., Jeffery P. K. (1997) Inflammation in Bronchial Biopsies of Subjects with Chronic Bronchitis: Inverse Relationship of CD8+ T-Lymphocytes with FEV₁. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155, 852–857.
13. Pauwels R. A., Buist A. S., Calverey M. A., Jenkins C. R., Hurd S. S. (2001) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163, 1256–1276.
14. Pesci A., Majori M., Cuomo A. (1998) Neutrophils Infiltration Bronchial Epithelium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir. Med.*, 92, 863–870.

15. Rahman I., MacNee, W. (2000) Oxidative Stress and Regulation of Glutathione in Lung Inflammation. *Eur. Respir J.*, 16, 534–554.
16. Rijcken B., Britton J. (1998) Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. Mon.*, 7, 41–73.
17. Rutgers S. R., Timens W., Kaufmann H. F., Mark T. W., Koeter G. H., Postma D. S. (2000) Comparison of Induced Sputum with Bronchial Wash, Bronchoalveolar Lavage and Bronchial Biopsies in COPD. *Eur. Respir. J.*, 15, 109–115.
18. Saetta M., Di Stefano A., Mastrelli P. (1993) Activated T-lymphocytes and Macrophages in Bronchial Mucosa of Subjects with Chronic Bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993, 147, 301–306.
19. Saetta M., Di Stefano A., Turato G., Facchini F. M., Corbino L., Mapp C. E., Maestrelli P., Ciaccia A., Fabbri L. M. (1998) CD8+ T-lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 822–826.
20. Saetta M., Baraldo S., Corbino L., Turato G., Braccioni F., Rea F., Cavallese G., Tropeno C., Mapp C. E., Maestrelli P., Ciaccia A., Fabbri L. M. (1999) CD8+ve Cells in the Lungs of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160, 711–717.
21. Saetta M., Turato G., Maestrelli P., Mapp C. E., Fabbri L. M. (2001) Cellular and Structural Bases of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163, 1304–1309.
22. Thompson A. B., Daughton D., Robbins R. A., Ghafouri M. A., Oehlerking M., Rennard S. I. (1989) Intraluminal Airway Inflammation in Chronic Bronchitis. Characterization and Correlation with Clinical Parameters. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140, 1527–1537.
23. Turato C., Zuin R., Miniati M., Baraldo S., Rea F., Beghe B., Monti S., Formichi B., Boschetto P., Harari S., Papi A., Maestrelli P., Fabbri L. M., Saetta M. (2002) Airway Inflammation in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Relationship with Lung Function and Radiological Emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166, 105–110.

Summary

Immunohistochemical, morphometrical and pulmonary function tests were performed to study inflammatory cells infiltration in central, peripheral airways and lung parenchyma in nonsmokers, asymptomatic smokers and in smokers with COPD.

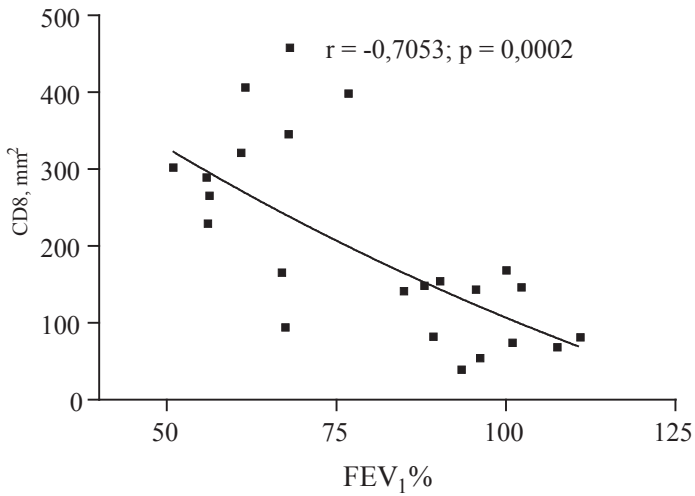
Obtained results have shown that in asymptomatic smokers inflammatory changes mostly occur in central compared to COPD patients. Subjects with COPD had more CD8 lymphocytes, macrophages and neutrophils in central, peripheral airways and lung parenchyma compared with nonsmokers and asymptomatic smokers.

A negative correlation between CD8 lymphocytes infiltration in central, peripheral airways and lung parenchyma and FEV₁% was observed. There was a negative correlation between neutrophil infiltration in peripheral airways and FEV₁% and positive correlation with pack-years.

A negative correlation between macrophages in central and peripheral airways and FEV₁% was observed.

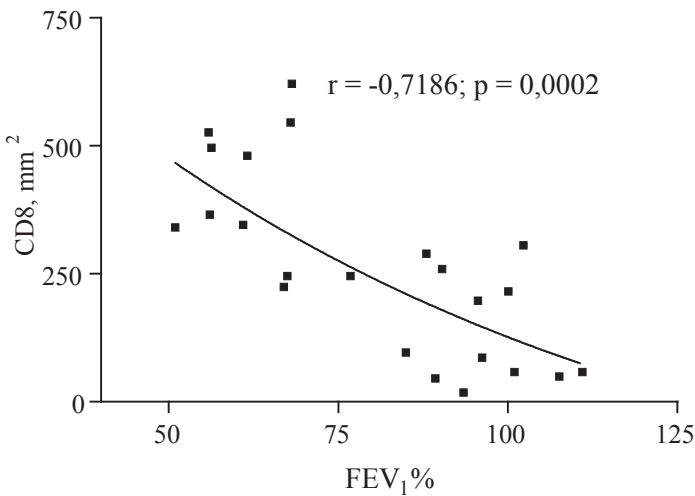
It has been concluded that both asymptomatic smokers and COPD patients had inflammatory changes in central, peripheral airways and lung parenchyma. However, in COPD inflammatory changes mostly occur in peripheral airways compared to asymptomatic smokers.

Key words: COPD, FEV₁%, inflammatory changes.

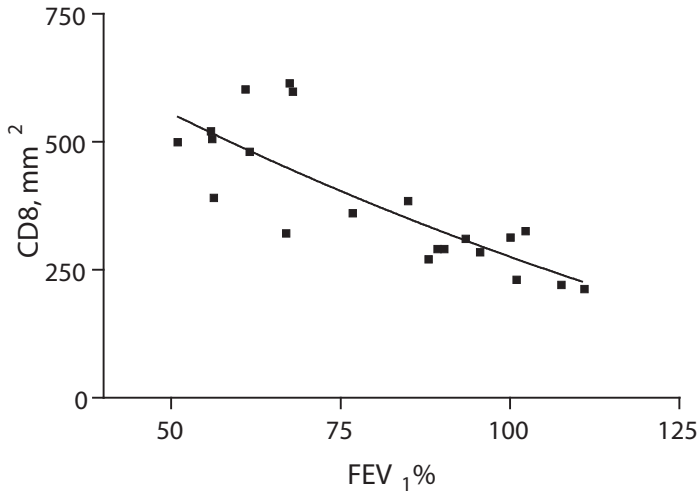


1. attēls. Korelācija starp CD8-limfocītu infiltrāciju centrālajos (a) un perifērajos (b) elpceļos, plaušu parenhīmā (c) un FEV₁%
Correlation among CD8 lymphocytes infiltration in central (a) and peripheral (b) airways, lung parenchyma (c) and FEV₁%

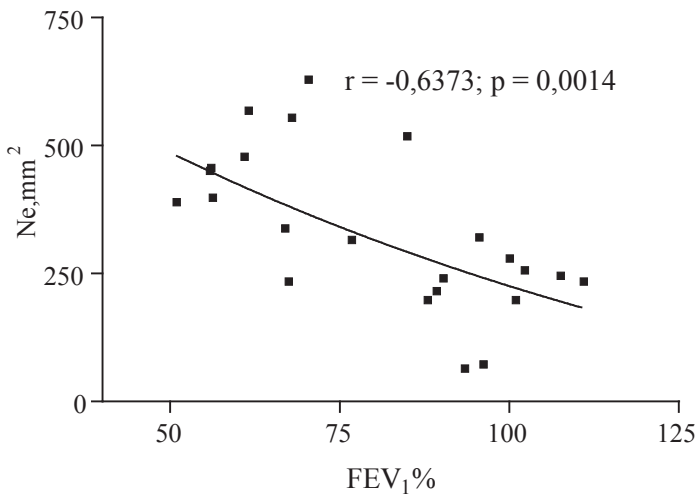
a) FEV₁% un CD8 limfocīti centrālajos elpceļos ($r = -0,7053$; $p = 0,0002$)



b) FEV₁% un CD8 limfocīti perifērajos elpceļos ($r = -0,7186$; $p = 0,0002$)

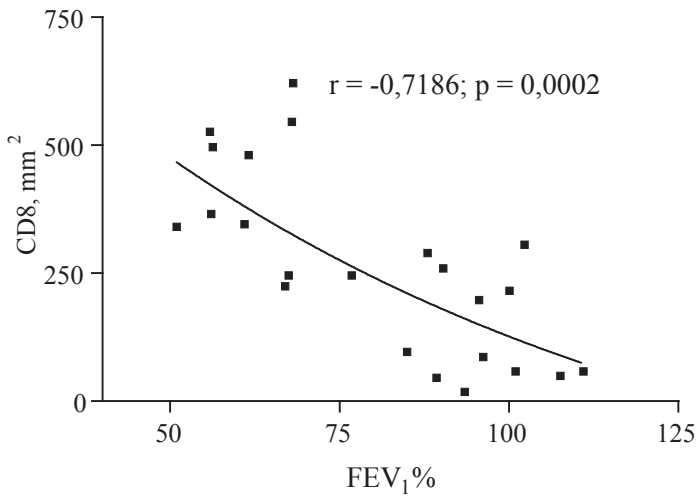


c) $FEV_1\%$ un CD8 limfocīti plaušu parenhīmā ($r = -0,8048$; $p = 0,0001$)

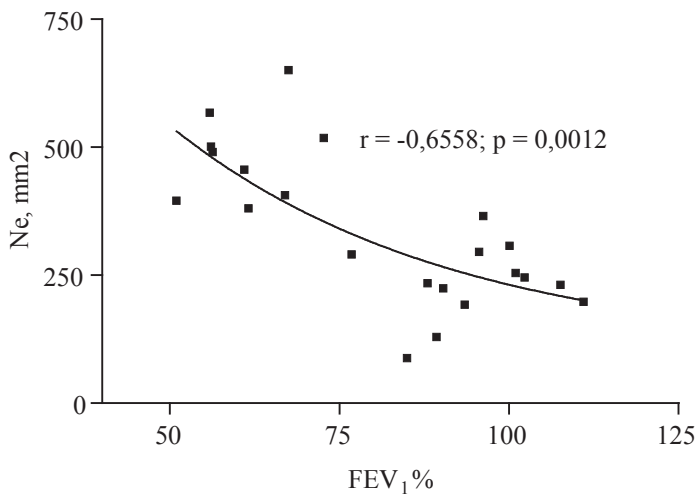


2. attēls. Korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju centrālajos (a) un perifērajos (b) elpceļos, plaušu parenhīmā (c) un $FEV_1\%$
Correlation among neutrophil leucocytes infiltration in central (a) and peripheral airways (b), lung parenchyma (c) and $FEV_1\%$

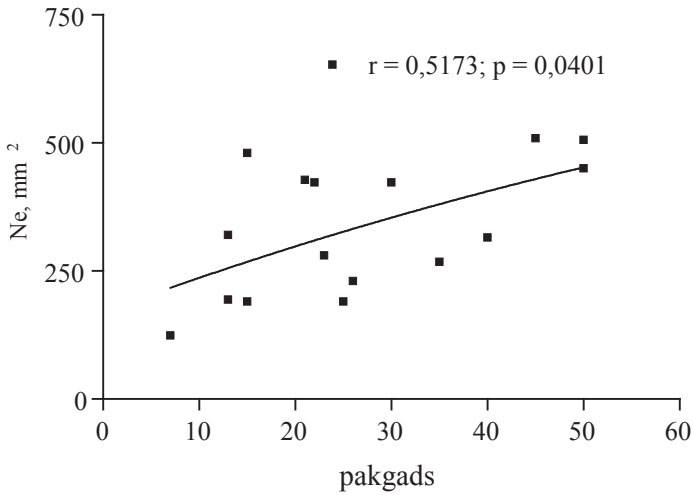
a) $FEV_1\%$ un neitrofilie leukocīti (Ne) centrālajos elpceļos ($r = -0,6373$; $p = 0,0014$)



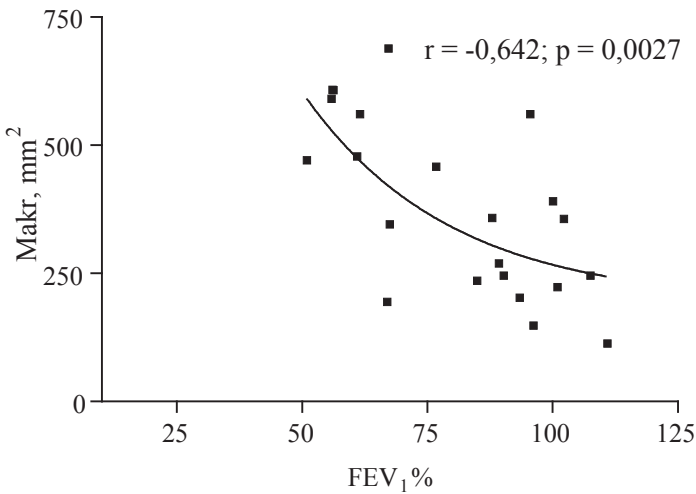
b) FEV₁% un neitrofilie leukocīti (Ne) perifērajos elpceļos ($r = -0,808$; $p < 0,0001$)



c) FEV₁% un neitrofilie leukocīti (Ne) plaušu parenhīmā ($r = -0,6558$; $p < 0,0012$)

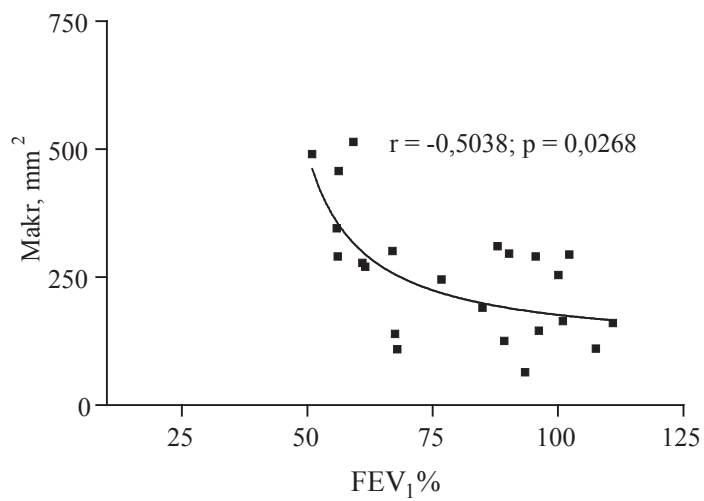


3. attēls. Korelācija starp neitrofilo leukocītu (Ne) infiltrāciju perifērajos elpceļos un pakgadiem ($r = 0,5173$; $p = 0,0401$)
Correlation between neutrophil leucocytes (Ne) infiltration in peripheral airways and pack-years ($r = 0,5173$; $p = 0,0401$)



4. attēls. Korelācija starp makrofāgu infiltrāciju centrālajos (a) un perifērajos (b) elpceļos un FEV₁%
Correlation among infiltration of macrophages in central (a) and peripheral (b) airways and FEV₁%

a) Korelācija starp makrofāgu infiltrāciju centrālajos elpceļos un FEV₁% ($r = -0,642$, $p = 0,0027$)



b) Korelācija starp makrofāgu infiltrāciju perifērajos elpceļos un FEV₁% ($r = -0,5038$, $p = 0,0168$)

Tumorasociēto antigēnu inkorporācija vīrusveidīgās daļiņās

Incorporation of Tumor-Associated Antigens in Virus-Like Particles

Reinis Balmaks, Jānis Freivalds, Pauls Pumpēns, Andris Kazāks

LU Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1067

E-pasts: andris@biomed.lu.lv

Ar gēnu inženierijas metodēm tika konstruēta virkne himēru B hepatīta vīrusa nukleokapsīda proteīna (HBc) gēnu, kuri ietvēra tumorspecifiskā MAGE-3 antigēna epitopu. Ekspresējot šos gēnus *Escherichia coli* šūnās, tikai viens no septiņiem himērajiem HBc-MAGE proteīniem saglabāja spēju veidot vīrusveidīgas daļiņas (*virus-like particles*, VLP). Himērās VLP tika attīrītas no *E. coli* proteīniem, lai inkorporētu to sastāvā imūnstimulējošus oligonukleotīdus. Šādas struktūras varētu tikt izmantotas kā antitumoru vakcīnas.

Atslēgvārdi: vīrusveidīgas daļiņas, B hepatīta vīrusa nukleokapsīds, CTL epitopi, vakcīnas.

Ievads

VLP tehnoloģijas pamatā ir vīrusu apvalku proteīnu spēja pašsociēties organizētās struktūrās bez citu vīrusa sastāvdaļu klātbūtnes. Tā kā VLP nesatur vīrusa genomu, tās ir neinfekciozas, bet augstmolekulārās uzbūves dēļ – relatīvi viegli attīrāmas. B hepatīta vīrusa iekšējo apvalku (nukleokapsīdu) veidojošais HBc proteīns pašlaik ir viens no visplašāk pētītajiem VLP modeļiem, kas ticis sekmīgi izmantots vairāk nekā 100 dažādas izcelsmes sekvenču inkorporācijai (8, 9).

Tumorspecifiskos antigēnus, kurus spēj pazīt citotoksiskie T limfocīti (CTL), iespējams izmantot antitumoru vakcīnu izstrādei. Dažādu histoloģisko tipu tumori (galvenokārt melanoma) intensīvi ekspresē MAGE-3 gēnu, savukārt normālās šūnās tā ekspresija nenotiek (5). Tāpēc MAGE-3 gēna produkts, kas parādās uz audzēja šūnu virsmas, ir izmantojams kā drošs tumorspecifisks mērķis autologo T-šūnu darbībai. Veiksmīgas klīniskās pārbaudes tika veiktas ar MAGE-3 CTL epitopu sekvencēm atbilstošiem sintētiskiem peptīdiem (3, 2), taču šo peptīdu iekļaušana specifiskos molekulāros nesējos (piemēram, VLP) varētu radīt daudz intensīvāku terapeitisko efektu.

Šajā darbā pētītas iespējas inkorporēt HBc-VLP sastāvā MAGE-3 HLA-A1 epitopu 168-EVDPIGHL-176, kas jau peptīda veidā uzrāda izteiktu antitumoru CTL indukciju (2).

Materiāli un metodes

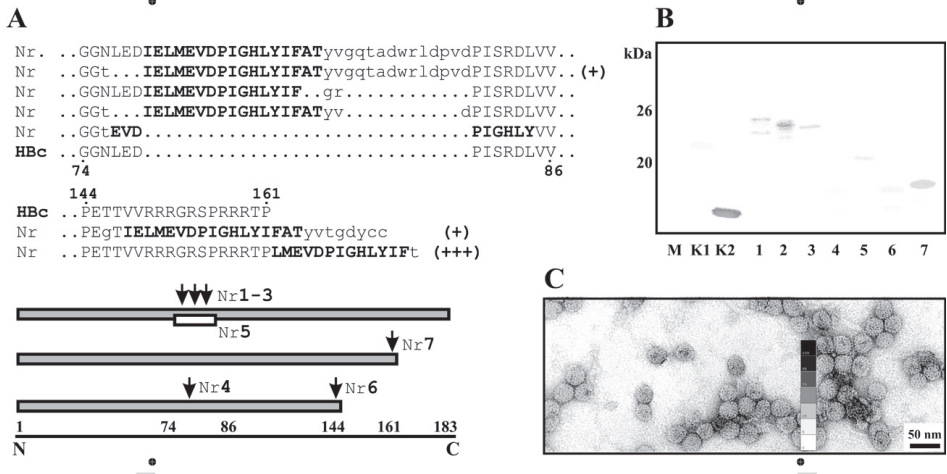
HBc-MAGE himērie gēni tika konstruēti uz plazmīdas pHBc3 (1) bāzes ar gēnu inženierijas standartmetodēm (11), izmantojot MBI *Fermentas* (Viļņa, Lietuva) ražotus fermentus.

Hbc-MAGE gēni tika ekspresēti *E. coli* celmā K802 triptofāna operona promotera kontrolē, līdzīgi kā aprakstīts Kazaka pētījumā (6). Imunoblota analīze tika veikta ar monoklonālajām anti-Hbc antivielām 14E11 (10).

E. coli šūnu lizēšana, himēro VLP attīrīšana Sefarozes CL-4B gelfiltrācijas kolonnā un elektronmikroskopija tika veikta, līdzīgi kā aprakstīts A. Kazaka pētījumā (6).

Rezultāti

Pamatojoties uz rentgenstruktūras datiem par B hepatīta nukleokapsīda uzbūvi (14), MAGE-3 CTL epitopu kodējošā DNS sekvenca tika klonēta Hbc gēna imunodominantajā rajonā (MIR), kā arī tā C-galā (sk. 1. A att.). Par matricām tika izmantoti gan pilna 183 aminoskābju (aa) garuma, gan saīsinātie (161 un 145 aa) Hbc proteīni, kas visi veido VLP. Lai palielinātu daļiņu veidošanās spēju, insercijām MIR tika izmantotas dažādas MAGE-3 CTL flankējošās sekvences (konstrukcijas Nr. 1–4), bet konstrukcijā Nr. 5 tika veikta precīza Hbc aa 76–84 nomaiņa ar MAGE-3 aa 168–176, jo šīs sekvences uzrāda izteiktu homoloģiju. Konstrukcijās Nr. 6–7 klonēšana tika veikta Hbc gēna C-galā, attiecīgi aiz 145. un 161. aminoskābes (sk. 1. A att.).



1. attēls. Himēro Hbc-MAGE VLP iegūšana

(A) Augšējā panelī: himēro Hbc-MAGE proteīnu struktūra. Trekniem burtiem izceltas MAGE-3 specifiskās aa, ar mazajiem burtiem apzīmētas flankējošās aa. (+) un (+++) parāda proteīnu spēju veidot VLP, ja (+++) atbilst natīvam Hbc. Apakšējā panelī: Hbc-MAGE gēnu vispārīga konstruēšanas shēma. Bultiņas norāda epitopa insercijas vietas Hbc gēnā. Cipari pie bultiņām atbilst konstrukciju numuriem. Apakšējā skalā atzīmētas Hbc aminoskābju pozīcijas.

(B) Hbc-MAGE gēnu ekspresijas imunoblots. M, molekulsvara marķieris; K1-K2 kontroles – attiecīgi 183 un 145 aa Hbc – proteīni. Treki 1–7 atbilst attiecīgi konstrukcijām Nr. 1–7.

(C) Attīrītu Hbc-MAGE Nr. 7 VLP elektronmikroskopija.

Visos gadījumos šūnās uzkrājās proteīni, kas specifiski reaģēja imunoblota ar anti-Hbc antivielām (sk. 1. B att.). Izrādījās, ka MIR nav piemērots MAGE-3 CTL epitopa insercijām, jo tikai konstrukcijas Nr. 2 gadījumā šūnu lizātā tika detektēts neliels VLP daudzums, kas nebija pietiekams, lai uzsāktu attīrīšanu. Samērā negaidīti konstrukcijai

Nr. 5, kur tika izmainītas tikai dažas aa, VLP formēšanās netika detektēta vispār. Ievērojami labāki rezultāti tika iegūti ar C-gala insercijām. Ja konstrukcijas Nr. 6 gadījumā situācija bija līdzīga kā Nr. 2, tad MAGE-3 epitopa insercija aiz 161. aminoskābes (konstrukcija Nr. 7) praktiski netraucēja VLP veidošanos. *E. coli* šūnas tika sagrautas ar ultraskaņu, un šķīstošajā frakcijā esošie proteīni frakcionēti gelfiltrācijas kolonnā. Attīrīšanas gaitā netika novērotas būtiskas atšķirības no natīva (neizmainīta) HBc. Kopumā izdevās iegūt 4–5 mg tīru VLP no 1 g šūnu (sk. 1. C att.).

Diskusija

Kopējais VLP kandidātu skaits jau ir pārsniedzis vairākus desmitus, un uz to bāzes tiek veiksmīgi konstruētas gan profilaktiskas, gan arī terapeitiskas vakcīnas. Inkorporēt „svešus” peptīdus VLP sastāvā iespējams, pirmkārt, ar gēnu inženierijas metožu palīdzību un, otrkārt, ķīmiski „piešujot” attiecīgo peptīdu pie aminoskābes lizīna. Otrā stratēģija liekas pievilcīgāka „problemātisku” sekvenču (piemēram, CTL epitopu) eksponēšanai, un nesen tā sekmīgi demonstrēta *E. coli* ekspresētū rekombinantu B hepatīta un bakteriofāga Q β VLP gadījumā (4, 12). Nesen Q β VLP iegūtas arī *Saccharomyces cerevisiae* un *Pichia pastoris* raugā. Jāatzīmē, ka raugos iegūtie proteīni nesatur cilvēkam kaitīgus endotoksīnus un tātad būtu īpaši piemēroti vakcīnu izstrādei.

VLP kvantitatīva disociācija un reasociācija rada iespēju iepakot tajās nemetilētus CG motīvus saturošus oligonukleotīdus (t. s. CpG), kas ir spēcīgi CTL atbildes potenciētāji un vieni no daudzsoļākajiem šobrīd zināmajiem vakcīnu adjuvantiem (13, 7). CpG iepakošana VLP ievērojami samazina to jutību pret nukleāzēm, kā arī izslēdz tādu negatīvu blakusparādību kā splenomegāliju (12).

Secinājumi

Iegūtie rezultāti liecina, ka CTL epitopi, neraugoties uz to nelielo garumu, ir telpiski grūti savietojami ar VLP struktūru. Funkcionālu CTL epitopu saturošu VLP iegūšanai tādējādi nepieciešams mērķtiecīgi kombinēt bakteriālās un eikariotiskās ekspresijas sistēmas, kā arī gēnu inženierijas un proteīnu ķīmijas metodes.

Pateicība

Pateicamies V. Osei par elektronmikroskopijas attēliem, kā arī L. Kovaļevskai un J. Ozolam par tehniku palīdzību. Darbs tika veikts ar LZP grantu 01.0238 un 04.1147 un Eiropas Sociālā fonda finansējumu.

Literatūra

1. Borisova G. P., Pumpen P. P., Bychko V. V., Pushko P. M., Kalis J. V., Dishler A. V., Gren E. J., Tsibinogin V. V., Kukaine R. A. (1984) Structure and Expression in *Escherichia Coli* Cells of the Core Antigen Gene of the Human Hepatitis B Virus (HBV). Dokl. Akad. Nauk. SSSR (in Russian) 279: 1245–1249.
2. Coulie P. G., Karanikas V., Colau D., Lurquin C., Landry C., Marchand M., Dorval T., Brichard V., Boon T. (2001) A Monoclonal Cytolytic T-Lymphocyte Response Observed in a Melanoma Patient Vaccinated with a Tumor-Specific Antigenic Peptide Encoded by Gene MAGE-3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 10290–10295.
3. Gaugler B., Van den Eynde B., van der Bruggen P., Romero P., Gaforio J. J., De Plaen E., Lethe B., Brasseur F., Boon T. (1994) Human Gene MAGE-3 Codes for an Antigen Recognized on a Melanoma by Autologous Cytolytic T Lymphocytes. J. Exp. Med., 179: 921–930.
4. Jegerlehner A., Tissot A., Lechner F., Sebbel P., Erdmann I., Kundig T., Bachi T., Storni T., Jennings G., Pumpens P., Renner W. A., Bachmann M. F. (2002) A Molecular Assembly System that Renders Antigens of Choice Highly Repetitive for Induction of Protective B Cell Responses. Vaccine, 20: 3104–3112.

5. Jungbluth A. A., Busam K. J., Kolb D., Iversen K., Coplan K., Chen Y. T., Spagnoli G. C., Old L. J. (2000) Expression of MAGE-Antigens in Normal Tissues and Cancer. *Int. J. Cancer*, 85: 460–465.
6. Kazaks A., Borisova G., Cvetkova S., Kovalevska L., Ose V., Sominskaya I., Pumpens P., Skrastina D., Dislers A. (2004) Mosaic Hepatitis B Core Particles Presenting Complete Pres Sequence of Viral Envelope on their Surface. *J. Gen. Virol.*, 85: 2665–2670.
7. Krieg A. M. (2004) Antitumor Application of Stimulating Toll-Like Receptor 9 with CpG Oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep.*, 6: 88–95.
8. Pumpens P., Grens E. (2001) HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes. *Intervirology*, 44: 98–114.
9. Pumpens P., Grens E. (2002) Artificial Genes for Chimeric Virus-Like Particles. In: *Artificial DNA: Methods and Applications*. CRC Press LLC, Boca Raton, 249–327.
10. Pushko P., Sällberg M., Borisova G., Ruden U., Bichko V., Wahren B., Pumpens P., Magnus, L. (1994) Identification of Hepatitis B Virus Core Protein Regions Exposed or Internalized at the Surface of HBcAg Particles by Scanning with Monoclonal Antibodies. *Virology*, 202: 912–920.
11. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.
12. Storni T., Ruedl C., Schwarz K., Schwendener R. A., Renner W. A., Bachmann M. F. (2004) Nonmethylated CG Motifs Packaged into Virus-Like Particles Induce Protective Cytotoxic T Cell Responses in the Absence of Systemic Side Effects. *J. Immunol.*, 172: 1777–1785.
13. Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Marsden R., Beck L., Corbeil J., Richman D. D., Eiden J. J. Jr., Spiegelberg H. L., Raz E. (2000) Conjugation of Protein to Immunostimulatory DNA Results in a Rapid, Long-Lasting and Potent Induction of Cell-Mediated and Humoral Immunity. *Eur. J. Immunol.*, 30: 1939–1947.
14. Wynne S. A., Crowther R. A., Leslie A. G. W. (1999) The Crystal Structure of the Human Hepatitis B Virus Capsid. *Mol. Cell*, 3: 771–780.

Summary

A number of chimeric hepatitis B virus core protein (HBc) genes with incorporated coding sequence from tumor-specific MAGE-3 antigen epitope were generated by gene engineering techniques. The relevant genes were expressed in *Escherichia coli*, but only one out of seven chimeric HBc-MAGE proteins was competent for self-assembly into virus-like particles (VLPs). The chimeric particles were purified from *E. coli* proteins for further loading with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. Such VLPs could possibly be used as antitumor vaccines.

Key words: virus-like particles, hepatitis B core protein, CTL epitopes, vaccines.

Kadmija koncentrāciju noteikšana Latvijas iedzīvotājiem, kam ir dažādas patoloģijas

Detection of Cadmium Concentration of Inhabitants with Different Pathologies in Latvia

Valentīna Gordjušina¹, Mārīte Ārija Baķe², Dagmāra Sprūdža²

¹LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedra

Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

E-pasts: gova@lanet.lv

²Rīgas Stradiņa universitātes Darba un vides veselības institūts

Dzirčiema iela 16, Rīga, LV-1007

E-pasts: dagmara-IOEH@rsu.lv

Ar atomu absorbcijas spektrofotometrijas metodi tika analizēts kadmija līmenis nierēs 51 cilvēkam. Nieres ņemtas no mirušiem cilvēkiem, kuru dzīvesvieta bija Rīga un Rīgas rajons un vecums no 26 līdz 92 gadiem. Vidējā kadmija koncentrācija nierēs bija $17,0 \pm 7,1$ $\mu\text{g/g}$. Augstāks kadmija līmenis nierēs tika atrasts piecdesmitgadīgo grupā. Kadmija koncentrācija nierēs smēķētājiem bija divreiz augstāka nekā nesmēķētājiem. Pastāv izteikta korelācija starp kadmija koncentrāciju nierēs un smēķēšanu, kā arī tendence saistībai ar diagnozi. Salīdzinot ar citu valstu datiem, vidē esošā kadmija ietekme uz cilvēku Latvijā ir salīdzinoši neliela.

Atslēgvārdi: kadmija, bioloģiskie paraugi, nieres, histopatoloģija.

Ievads

Kadmija ir atrodams dabā nelielos daudzumos: apkārtējā gaisā, putekļos, pārtikā, dzērāmajā ūdenī, tabakas dūmos un profesionālajā vidē. Tomēr tas tiek uzskatīts par vienu no visbīstamākajiem vides piesārņotājiem, jo ir noturīgs apkārtējā vidē un spēj akumulēties cilvēka organismā (1, 2, 3).

Kadmija savienojumi tiek lietoti kā pigmenti un polimērmateriālu stabilizatori. Kadmiju lieto arī kā elektrodu sastāvdaļu niķeļa-kadmija sārmu baterijās. Apkārtējā vidē esošo kadmiju cilvēks uzņem ēdot, dzerot ūdeni, ieelpojot gaisu, putekļus, smēķējot. Nesmēķētājiem, kuriem nav kontakts ar kadmiju darba vidē, pārtika ir galvenais kadmija avots.

Lielākajā daļā valstu vidējais kadmija daudzums, ko dienā uzņem ar pārtiku, ir no 10 līdz 25 μg (4). Organismā absorbētais kadmija pārsvarā koncentrējas aknās un nierēs. Nieres un aknas kopā saista vairāk nekā pusi no organismā uzņemtā kadmija. Nieres ir kadmija mērķorgāns (kritiskais orgāns), kurā galvenokārt tiek novērota kadmija toksiskā iedarbība (5).

Kadmija izdalīšanās no organisma ir ļoti lēna. Matemātiski modelētais bioloģiskais pussabrukšanas periods nieru garozā ir 20 gadi (4).

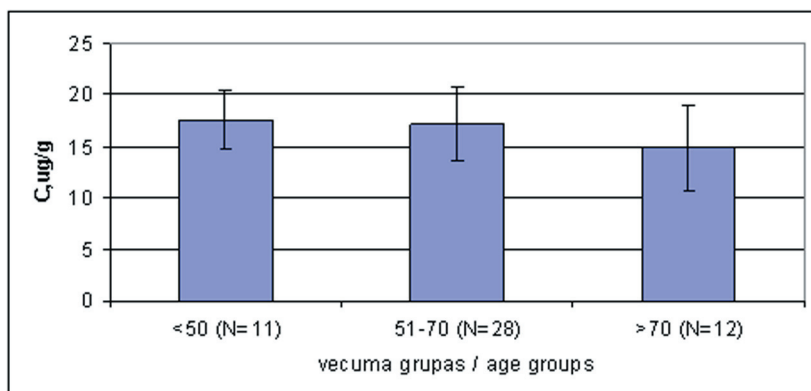
Kadmiji ir ietverts Apvienoto Nāciju Vides programmas prioritāšu sarakstā (6). Šī pētījuma mērķis ir noteikt kadmija koncentrāciju nierēs dažādās iedzīvotāju grupās Latvijā.

Materiāli un metodes

Post mortem kadmija koncentrācija orgānos (aknas, nieres) labi atspoguļo vides ietekmi. Kadmija līmenis analizēts nieru audos, kuri tika iegūti Latvijas Patoloģijas centrā. Pētījumam tika saņemta RSU Ētikas komisijas atļauja sekcijas materiāla analīzei. Uzreiz pēc sekcijas audi tika ievietoti polietilēna konteinerā, 24 stundas izturēti 10% slāpekļskābē un paraugu konteineros ledū transportēti uz laboratoriju analīzei. Kadmija koncentrācija nierēs tika vērtēta 51 personai (26 sievietes un 25 vīrieši vecumā no 28 līdz 92 gadiem), lielākā daļa no tiem bija Rīgas un Rīgas rajona iedzīvotāji. Vidējais vecums $63,0 \pm 22,3$ gadi. Tika uzskaitīta informācija par dzimumu, vecumu, smēķēšanas paradumiem, ķermeņa svaru, abu nieru svaru, profesiju, dzīvesvietu, klīnisko diagnozi un patoloģisko izmeklējumu rezultātu. Dati tika iegūti no slimnīcām un intervējot tuviniekus (ja tas bija iespējams). Informācija par profesiju un smēķēšanas paradumiem ne vienmēr bija precīza. Pārsvarā nāves cēlonis bija komplikācijas pēc sirds išēmiskās slimības (14 gadījumi), nieru patoloģija (10 gadījumi), dažādas lokalizācijas ļaundabīgie audzēji (13 gadījumi), tuberkuloze (5 gadījumi) un citi. Kadmija koncentrācija nierēs tika noteikta ar atomu absorbcijas spektrometru (Perkin Elmer 403 HGA 2200), pirms tam elektrotermāli sadalot paraugus grafitā kivetē. Paraugi tika mineralizēti koncentrētā slāpekļskābē un peroksīdā (2:2:1) 120–125 °C hermētiskās teflona mēģenēs. Rādītāju atšķirības nozīmīgums tika novērtēts, izmantojot Stjudenta kritēriju ($p < 0,05$).

Rezultāti un diskusija

Kadmija līmenis nierēs svārstās no 6,2 līdz 56,6 $\mu\text{g/g}$ mitras audu masas atkarībā no vecuma, dzimuma, ieradumiem un slimībām. Vidējā koncentrācija nierēs novērtētajā grupā ir $17,0 \pm 7,1$ $\mu\text{g/g}$. Kadmija koncentrācija būtiski neatšķīrās dažādās vecuma grupās, izņemot grupu virs 70 gadiem: vecumā no 28 līdz 50 gadiem – $17,6 \pm 2,0$ $\mu\text{g/g}$, vecumā no 51 līdz 70 gadiem – $17,2 \pm 3,6$ $\mu\text{g/g}$. Vecuma grupā virs 70 gadiem kadmija koncentrācija ir ievērojami zemāka $14,9 \pm 4,2$ $\mu\text{g/g}$ (sk. 1. att.). Literatūrā arī minēts, ka dažādās

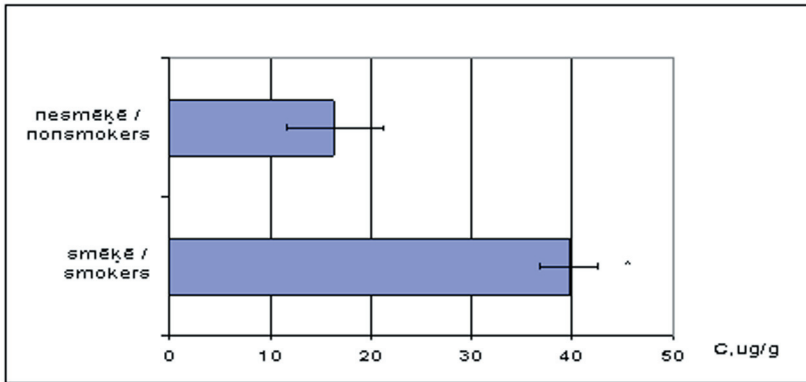


1. attēls. Kadmija koncentrācija nierēs ($C \mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) dažāda vecuma grupām (N – personu skaits)

Concentration of cadmium ($C \mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) in kidney in different age groups (N – number of persons)

valstīs kadmija koncentrācija nierēs pēc 60–70 gadiem samazinās, tas pats vērojams arī vecumā virs 90 gadiem (7). Visaugstākā kadmija koncentrācija tika novērota vecumā ap 50 gadiem (20,0–1,9 $\mu\text{g/g}$), iegūtie rezultāti apstiprina citu autoru datus (8).

Vidējais kadmija līmenis smēķētājiem (39,7 $\mu\text{g/g}$) ir divkārtšs (sk. 2. att.), salīdzinot ar nesmēķētājiem (16,4 $\mu\text{g/g}$). Statistiski ticama atšķirība (izmantojot Stjudenta kritēriju t pie $p \leq 0,05$) novērota tikai starp minētajām grupām. Smēķēšanas ietekmi uz kadmija koncentrāciju nierēs var izskaidrot ar augsto kadmija saturu cigaretēs. Divdesmit cigarešu smēķēšana dienā ir ekvivalenta 5–6 $\mu\text{g/g}$ kadmija, un gadā tas var izraisīt 0,5 mg kadmija uzkrāšanos organismā (4, 9).



2. attēls. Kadmija koncentrācija nierēs ($C \mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) personu grupās atkarībā no smēķēšanas ieraduma (personu skaita sadalījums: 15 smēķētāji, 26 nesmēķētāji, 11 personas nav identificētas)

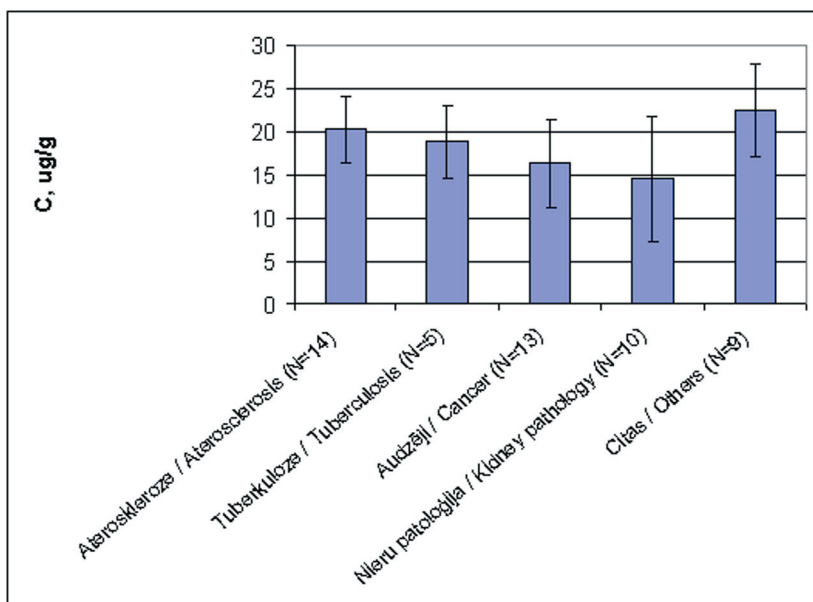
Concentration of cadmium ($C \mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) in kidney for smokers and nonsmokers groups (15 smokers, 26 nonsmokers, 11 non identified persons)

Pamatojoties uz Beļģijas zinātnieku pētījumiem, kritiskā kadmija koncentrācija nieru garozā populācijā ir 50 $\mu\text{g/g}$ audu masas (10). Diemžēl smēķētāju grupa šajā pētījumā nav pietiekama, lai varētu izdarīt secinājumus par Latvijas populāciju kopumā.

Kadmija koncentrācija ir atšķirīga atkarībā no dzimuma: vīriešiem $18,8 \pm 4,5 \mu\text{g/g}$ un sievietēm $15,2 \pm 3,5 \mu\text{g/g}$. Būtiska atšķirība kadmija koncentrācijā atkarībā no klīniskās diagnozes un nodarbošanās netika novērota. Nedaudz palielināts kadmija līmenis novērots personām ar aterosklerotisko slimību (sk. 3. att.). Nieru paraugu histopatoloģiskie dati ņemti no personām, kas mirušas no slimību komplikācijām. Personām, kuras mirušas no nieru patoloģijas, 5,9% gadījumos tika novērots ekstrakapilārs eksudāts un ātri progresējošs glomerulonefrīts.

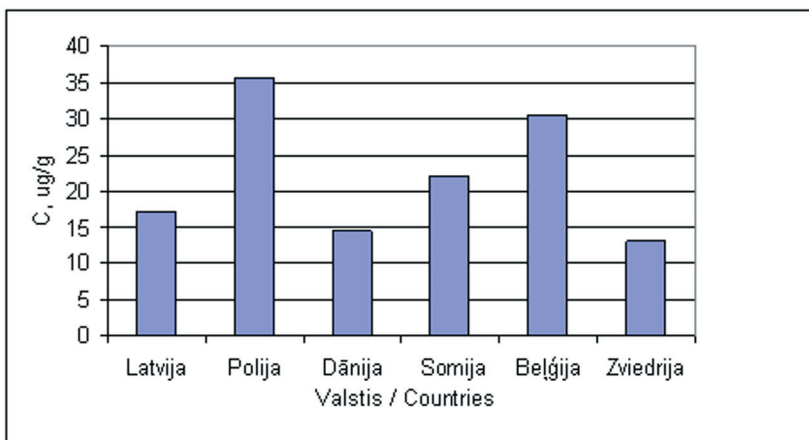
Analizējot literatūras datus, redzams, ka novērotā kadmija koncentrācija nierēs Latvijas iedzīvotājiem ir līdzīga kā 20. gs. astoņdesmitajos gados Zviedrijā un Indijā, bet tā ir zemāka nekā Beļģijā, Japānā un Dienvidslāvijā tajā pašā laikā (5).

Salīdzinot kadmija līmeni nierēs 20. gs. deviņdesmitajos gados izmeklētajām personām Baltijas reģionā (2, 5) ar šajā pētījumā novēroto, jāsecina, ka Latvijā kadmija koncentrācija nierēs ir līdzīga kadmija koncentrāciju līmeņiem Dānijā, Somijā un Zviedrijā (sk. 4. att.). Smēķēšanas ietekme uz kadmija koncentrāciju cilvēka organismā ir būtiska, bet pētījumā novērotais kadmija līmenis nepārsniedz 50 $\mu\text{g/g}$ – Eiropas populācijai noteikto references līmeni. Pētījumu rezultāti dod tikai ieskatu par kadmija uzņemšanu



3. attēls. Kadmija koncentrācija nierēs (C µg/g ± SD) personu grupām (N – personu skaits) ar dažādām diagnozēm

Concentration of cadmium in kidney (C µg/g ± SD) in relation to diseases (N – number of persons)



4. attēls. Kadmija koncentrācija nierēs (C µg/g) dažādu valstu iedzīvotājiem (Latvijā no šī pētījuma, pārējās valstīs pēc literatūras datiem (2, 5, 11))

Concentration of cadmium (C µg/g) in kidney in different countries (Latvia in accordance with this investigation, for other countries – data of literature (2, 5, 11))

organismā. Lai iegūtu vispārinošus datus par kadmija līmeņiem organismā Latvijas iedzīvotājiem, nepieciešams veikt plašākus pētījumus. Informācijas trūkums par pētījumā iekļauto mirušo cilvēku nodarbošanos neļāva izvērtēt arodvides ietekmes risku uz kadmija koncentrāciju organismā. Latvijas iedzīvotājiem kadmija daudzums nierēs, kuru tie uzņem no apkārtējās vides, ir mērens un salīdzināms ar citām Eiropas valstīm, un riska pakāpe kadmija iedarbībai uz veselību ir prognozējama kā zema.

Literatūra

1. Friberg L., Piscator M., Nordberg G. F., Kjellstrom T. Cadmium in the Environment. Ohio, Cleveland: CRC Press, 1974, 57.
2. Mortada W. I., Sobh M. A., El-Defrawy M. M. The Exposure to Cadmium, Lead and Mercury from Smoking and its Impact on Renal Integrity. *Med. Sci. Monit.* 2004. 10(3): 112–116.
3. Гильденскольд Р. С., Новиков Е. В., Хамидулин Р. С. Тяжелые металлы в окружающей среде и влияние на здоровье. *Гиг. и санит.* 1992, 5/6: 6–8.
4. Friberg G. F., Kjellstrom T., Nordberg G. F. Cadmium. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Vol. 2. Amsterdam, 1986, 84–130.
5. Orłowski C., Piotrowski J., Kubow M. The Levels of Cadmium, Zinc and Copper in IHE Renal Cortex and Liver of the Inhabitants of the Copper Basin. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 1996, 9 (3): 255–263.
6. Keita-Quane F. UNEP Chemicals' Work: Breaking the Barriers to Information Access. *Toxicology.* 2003, 190 (1/2): 135–139.
7. Schaller K. H. Selected Metals. In: *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace*. Vol.1. Geneva: WHO, 1996, 52–73.
8. Scott R., Aughey E., Fell G. S., Quinn M. J. Cadmium Concentration in Human Kidneys from the UK. *Hum. Toxicol.* 1987, 6: 111–119.
9. Bronisz H., Szost T., Lipska M., Zawada M. Cadmium Content Cigarettes. *Bromat. Chem. Toksikol.* 1983, 24: 121–127.
10. Buchet J. P., Lauwerys R., Roels H. Renal Effects of Cadmium Body Burden of the General Population. *Lancet.* 1990, 336: 699–702.
11. Vahter M. Assessment of Human Exposure to Lead and Cadmium Through Biological Monitoring. 1982, Stockholm, 136.

Summary

The level of cadmium in kidneys was analysed in 51 people living in Riga and the Riga District (age 26–92 years). The mean cadmium concentration in kidneys, determined by flame AAS, was $17.0 \pm 7.1 \mu\text{g/g}$. A broad range of cadmium levels was found in kidneys, with the highest values in the 50-year age group. The levels of cadmium in smokers were twice higher than in non-smokers. An insignificant correlation was found between concentration of cadmium in kidneys and clinical diagnosis and occupation. Compared with other countries, the environmental exposure of humans to cadmium is moderate in Latvia.

Key words: cadmium, biological samples, kidney, histopathology.

Jaunais perspektīvais produkts – saldinātājs fruktāna sīrups

A New Prospective Product – Sweetener Fructan Syrup

Valentīna Gordjušina¹, Dagmāra Sprūdža², Māra Marauska³, Mārtiņš Beķers³

¹LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedra

Lielvārdes iela 68–4, Rīga, LV-1006

²Rīgas Stradiņa universitātes Darba un vides veselības institūts

Dzirciema iela 16, Rīga, LV-1007

³LU Mikrobioloģijas institūts

Kronvalda bulvāris 4, Rīga, LV-1586

E-pasts: gova@latnet.lv

Fruktāna sīrups ir jauns saldinātājs ar samazinātu enerģētisko vērtību, ražots no konvencionālā cukura ar enzimatisku metodi un satur bioloģiski aktīvus fruktozes komponentus: fruktoooligosaharīdu un levānu. Pētījumos ar laboratorijas dzīvniekiem konstatēts, ka fruktāna sīrups ir netoksisks produkts. Fruktāna sīrupam, izmantojot to kā pārtikas piedevu (1 g uz 1 kg ķermeņa svara dienā), ir tendence samazināt holesterīna līmeni un paaugstināt augsta blīvuma holesterīna (HDL) frakciju asins plazmā žurkām. Ņemot vērā, ka fruktoooligosaharīdi tiek lietoti kā piedeva jogurtam, izpētīta fruktāna sīrupa ietekme uz *Bifidobacterium* attīstību. Fruktāna sīrupa piedeva (10% w/w) stimulē *Bifidobacterium lacticum* 12 attīstību no taukiem brīva piena un auzu putras barotnēs pirmajās fermentācijas stundās. Fruktāna sīrups ir acīmredzami perspektīvs produkts, kas lietojams kardiovaskulāru un gremošanas sistēmas saslimšanu novēršanai.

Atslēgvārdi: fruktāna sīrups, saldinātājs, holesterīns, *Bifidobacterium*.

Ievads

Mūsdienās palielinās interese par antihiperlipidēmiskiem un pretaptaukošanās aģentiem. Ir zināmi zāļu līdzekļi, kuri samazina lipīdu daudzumu asins serumā, piemēram, nikotīnskābe un tās derivāti, holesterīna sintēzes inhibitori un ūdenī šķīstošās diētiskās šķiedras, kuras satur pektīnu. Šiem līdzekļiem dokumentēti dažādi blakusefekti, tādi kā karstuma viļņi, nieze, muskuļu vājums. Holesterīna līmeņa samazināšanai asinīs pektīns būtu jālieto no desmit gramiem līdz vairākiem desmitiem gramu dienā. Šādu pektīna daudzumu uzņemt ir ļoti sarežģīti pektīna augstās viskozitātes dēļ. Kā lipīdus pazeminošas šķiedras var arī lietot β-glukānus (1). Nesagremojami saldinātāji, tādi kā steviozīds un aspartāms, tiek lietoti, lai novērstu aptaukošanos. Arī šos saldinātājus nav iespējams lietot lielā daudzumā. Fruktoooligosaharīdi ir perspektīvi saldinātāji ar mazu kaloriju daudzumu, tie stimulē bifidobaktēriju augšanu un uzlabo zarnu mikrofloras īso ķēžu taukskābju produkciju, kurai, kā tiek uzskatīts, ir pozitīva ietekme uz cilvēka veselību. Fruktoooligosaharīdu spēja izmainīt holesterīna un triglicerīdu līmeni ir aprakstīta vairākās publikācijās (2, 3, 4). Fruktoooligosaharīdu kaloritātes vērtība ir 1,0 līdz 1,5 kcal/g vai 25–40% no fruktozes (5). Dažas fruktozi saturošās sastāvdaļas, tādas kā fruktoooligosaharīdi un polimēri (inulīns un levāns), ir pazīstamas kā fruktāns. Šīs sastāvdaļas tajā

pašā laikā ir prebiotīki, kas stimulē *Bifidobacterium sp.* attīstību gastrointestinālajā traktā (5, 6). Eksperimenti ar žurkām rāda, ka fruktozes polimērs levāns adsorbē holesterīnu intestinālajā traktā (7). Išihara (*Ishihara*) (8) ziņo, ka eksperimentos ar žurkām un trušiem konstatēta levāna hidrolizāta ietekme uz holesterīna līmeni asins serumā. Jaunākie pētījumi (9, 10) rāda, ka ir svarīgi palielināt augsta blīvuma lipoproteīdu frakciju asins serumā, lai samazinātu kardiovaskulāro slimību risku. 1993. g. LU Biotehnoloģijas un mikrobioloģijas institūtā tika izstrādāta tehnoloģija levāna ražošanai, izmantojot *Zymomonas mobilis* fruktāna sīrupu, kas producēts no saharozes, kā arī *Zymomonas mobilis* baktēriju un levāna-saharozes enzīmu (11). Komerציāls fruktooligosaharīdu preparāts tiek ražots Japānā ar nosaukumu *Neosugar* (12). Fruktāna sīrups, kas iegūts no *Z. mobilis*, atšķiras no šī produkta ar to, ka satur fruktozes polimēru levānu. Fruktooligosaharīdi ir saldinātāji ar samazinātu enerģētisko vērtību un specifisku *Bifidobacteria* stimulāciju gastrointestinālajā traktā. Levāns ir imunomodulators, asins plazmas substitūts, holesterīna adsorbents, zāļu iedarbību paildzinošs aģents. Fruktāna sīrups ir daudzsološs uztura bagātinātājs, kā arī medikaments, kopš tas pieder pie šķīstošo šķiedru grupas (13, 14).

Darba mērķis

Darba mērķis ir izpētīt fruktāna sīrupa toksicitāti, tā ietekmi uz holesterīna un HDL frakciju līmeni žurku asins serumā un noteikt tā ietekmi uz *Bifidobacterium* attīstību.

Materiāli un metodes

Fruktāna sīrups piegādāts no Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta. Tas veidots laboratorijas apstākļos saskaņā ar patentētu metodi (15). Atbilstoši Latvijas Tehniskajiem noteikumiem fruktāna sīrups ir kvalificēts kā pārtikas produkts un kā pārtikas rūpniecības izejviela („Tehniskie noteikumi” LV US 41503019956-01:2001 akceptēti Latvijas Pārtikas centrā 2001. gada 25. aprīlī). Ķīmiskās sīrupa sastāvdaļas redzamas 1. tabulā. Fruktooligosaharīdu un levāna koncentrācija fruktāna sīrupā ir attiecīgi 17,2% un 3,4%. Gan fruktooligosaharīdi, gan levāns ir nesagremojami produkti. Fruktooligosaharīds ir salds, bet levāns – bezgaršīgs.

1. tabula

Fruktāna sīrupa sastāvs
Content of syrup compositions

Sastāvdaļas	%
Ogļhidrāti:	
fruktooligosaharīdi	17,2
levāns	3,4
saharoze	18,6
reducētais cukurs (glikoze + fruktoze)	31,0
Kopā	70,2
Ūdens	29,8

Eksperimenti ar dzīvniekiem tika veikti saskaņā ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komisijas prasībām. Dzīvnieki (peles un žurkas) saņemti no Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas. Dzīvnieki tika baroti ar speciālu granulēto barību, kas satur proteīnus, vitamīnus, mikroelementus, karbohidrātus un taukus (ražotājfirma SIA „Straume” Latvijā).

Akūtās toksicitātes pētījumos tika izmantotas trīsdesmit baltas peles (tēviņi), ķermeņa masa 20–25 g, desmit katrā grupā. Fruktāna sīrups tika dots perorāli natīvā formā katrai grupai 0,2 ml (ņemot vērā sīrupa blīvumu pie 20 °C attiecīgi – 0,25 mg); 0,4 ml (0,5 mg); 2,0 ml (2,5 mg). Eksperiments ilga 14 dienas.

Pētījumā par fruktāna sīrupa ietekmi uz holesterīna līmeni asins serumā tika izmantotas divdesmit abu dzimumu baltās žurkas (līnija *Wistar*) ar ķermeņa masu 220–260 g. Žurkas tika sadalītas divās grupās. Pirmā, kontroles grupa (5 mēfītes un 5 tēviņi), saņēma standartbarību un 0,6 g/ķermeņa masas kg glikozes dienā. Otrā, eksperimentālā grupa, saņēma standartbarību un fruktāna sīrupu 1 g/ķermeņa masas kg. Sīrups un glikoze tika ievadīti perorāli. Eksperiments izstrādāts trīs mēnešu laikā. Holesterīna līmenis asinīs, tā HDL frakcija un citi bioķīmiskie rādītāji noteikti pēc pirmā un trešā mēneša beigām. Holesterīna un glikozes koncentrācija tika mērīta ar ILAB-500 analizatoru, izmantojot holesterīnoksidāzes/peroksīdāzes (CHOD/POD) noteikšanas metodi (16).

Eitanazēto dzīvnieku orgāni tika novērtēti vizuāli. Histoloģiski izpētīti iekšējie orgāni: plaušas (asinsvadi, limfātiskie vadi, alveolas un bronhi), sirds (koronārās artērijas, perikards, miokards un endokards), liela kalibra asinsvadi (aorta, pulmonālā artērija), barības vads, kuņģis un zarnas. Audu fragmenti tika fiksēti neitrālā formalīnā un krāsoti ar hemotoksīnu un eozīnu (pēc Van Gieson metodes), ar rezorcīnu un fuksīnu (pēc Veigerta metodes), ar Sudānu III (pēc Perlisa metodes, pēc Shiffa) un ar alciana zilo (17).

Fruktāna sīrupa ietekme uz *Bifidobacterium* attīstību tika pētīta, izmantojot *Bifidobacterium lacticum* 12 kultūru (*certificate of Christofer Hansen's Applied Technological Lab., Denmark*). Lai pētītu baktēriju biomasas attīstību, *Bifidobacterium* augšana tika noteikta divās atšķirīgās barotnēs: 1. – no taukiem atbrīvotā tīrā pienā un 2. – ūdenī gatavotā auzu tumē, kurā cukuri daļēji noārdīti ar pārtikas fermentiem (18). Fruktāna sīrups tika pievienots 5, 10 un 15% koncentrācijā abās barotnēs. Paraugi tika kultivēti 37 °C 6 st. (standarta fermentācijas laiks jogurtam) un analizēti pēc 0, 2, 4 un 6 kultivācijas stundām. Dzīvotspējīgo šūnu skaits tika noteikts ar „atšķaidīšanas metodi” beztauku pienā (19). Sensorās sajūtas tika noteiktas ar paraugu degustāciju.

Analītiskās metodes. Cukura koncentrācija fruktāna sīrupā tika noteikta pēc hidrolīzes, izmantojot *Lane-Eynon* metodi (20) un HPLC metodi (14). Levāns tika precipitēts ar etanolu un noteikts kā fruktoze polisaharīda hidrolizātā. Totāla fruktooligosaharīda koncentrācija tika aprēķināta no kopējās cukura koncentrācijas šķīdumā, kurā nav levāna, pirms hidrolīzes un pēc tās (14).

Rezultāti

Akūta toksicitāte. Dodot pelēm fruktāna sīrupu perorāli 0,2, 0,4 un 2 ml daudzumā, 14 dienu eksperimenta laikā vizuāli netika novērotas nekādas izmaiņas dzīvnieku uzvedībā, izskatā un barības patēriņā. Dzīvnieku svars neatšķīrās no kontroles grupas. Dzīvnieku iekšējos orgānos netika konstatētas patoloģiskas izmaiņas.

Fruktāna sīrupa ietekme uz holesterīna līmeni asins serumā. Pētījuma laikā eksperimentālās un kontroles grupas dzīvnieku uzvedība, izskats un barības patēriņš neatšķīrās. Dažiem eksperimentālās grupas dzīvniekiem pirmajās divās dienās novēroja nenožīmīgu caureju. Eksperimenta laikā novēroja dzīvnieku normālu attīstību un ķermeņa masas pieaugumu. Letāli gadījumi netika novēroti. Izmaiņas dzīvnieku ķermeņa masā redzamas 2. tabulā. Konstatēts, ka fruktāna sīrupa diēta viegli samazina ķermeņa masu. Ar fruktāna sīrupu barotajā grupā ķermeņa masas samazināšanās tēviņiem bija lielāka nekā mēfītēm, salīdzinot ar kontroles grupu.

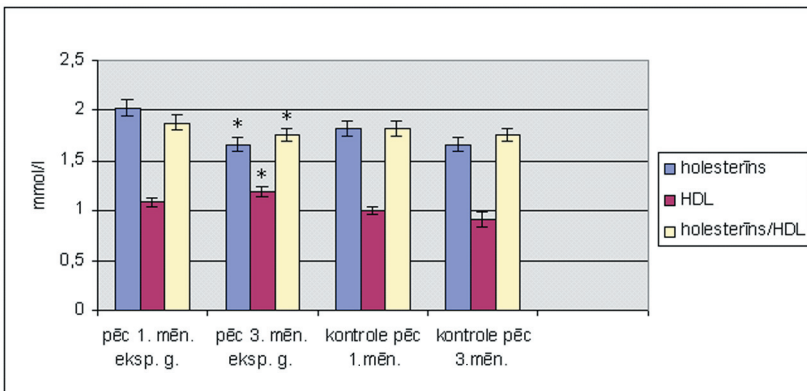
2. tabula

Eksperimentālo dzīvnieku ķermeņa masas izmaiņas trīs mēnešos
Changes of experimental animals body weight during three month's periods

Grupa (5 dzīv. katrā grupā)	ķermeņa masa, g (M ± m)				
	pirms eksperimenta	pēc 1. mēn.	pēc 2. mēn.	pēc 3. mēn.	pieaugums, g
Kontrole, vīr. k.	240 ± 18	286 ± 17	302 ± 12	325 ± 20	85 ± 17
Fruktāna sīrups, vīr. k.	251 ± 22	287 ± 18	310*21	320 ± 17	69 ± 19*
Kontrole, siev. k.	239 ± 23	279 ± 18	297 ± 17	310 ± 17	71 ± 19
Fruktāna sīrups, siev. k.	258 ± 16	291 ± 18	337 ± 23	350 ± 20	92 ± 20*

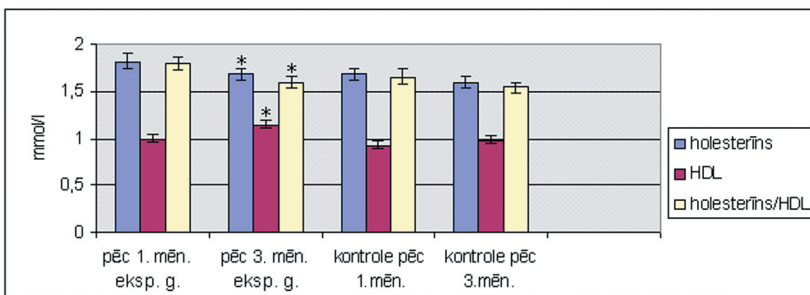
*Starpība pēc Stjudenta testa statistiski ticama, salīdzinot ar kontroles grupu pie $p \leq 0,05$

Pēc trim barošanas mēnešiem eksperimentālā grupā holesterīna līmenis samazinājās; paaugstinājās HDL frakcijas līmenis; samazinājās totālā holesterīna attiecība pret HDL līmeni, salīdzinot ar pirmā mēneša rezultātiem ($p \leq 0,05$). Tomēr holesterīna un HDL frakcijas proporcijas eksperimentālā un kontroles grupā atšķirās. Kontroles grupas dzīvniekiem eksperimenta laikā bija mazāk izteiktas izmaiņas un nebija statistiskas atšķirības



1. attēls. Holesterīna līmenis baltajām žurkām (vīr. k.), kuras saņēma fruktāna sīrupu trīs mēnešos

Cholesterol level of rats (male) treated with fructan syrup during three month's periods



2. attēls. Holesterīna līmenis baltajām žurkām (siev. k.), kuras saņēma fruktāna sīrupu trīs mēnešos

Cholesterol level of rats (female) treated with fructan syrup during three month's periods

* Statistiski ticama starpība, salīdzinot 3. mēn. rezultātus ar 1. mēn. rezultātiem

starp pirmā un trešā mēneša rezultātiem (1. un 2. attēls). Glikozes koncentrācija dzīvnieku asins serumā bija robežās no 5,8 līdz 6,9 mmol/l, tā statistiski neatšķīrās starp grupām.

Histoloģisko pētījumu rezultātā eksperimentālo dzīvnieku orgānos (plaušās, sirdī, barības vadā, lielajos asinsvados – aortā, pulmonālajā artērijā) patoloģiskas izmaiņas netika atrastas. Histoloģiski novērotas tikai vieglas tauku infiltrācijas pazīmes hepatocītos dzīvniekiem, kuri saņēma fruktāna sīrupu trīs mēnešus.

Kontroles grupā novērotas nelielas izmaiņas hepatocītos, kas nepārsniedza normas robežas.

Fruktāna sīrupa ietekme uz *Bifidobacterium* attīstību. Fruktāna sīrups stimulē *Bifidobacterium* attīstību pirmajās sešās kultivēšanas stundās. *Bifidobacterium* izauga beztauku piena barotnē ar fruktāna sīrupa piedevām 5–15% koncentrācijā. Pirms eksperimenta šūnu skaits 102 uz 1 ml, pēc 2 st. kultivēšanas ar 10% fruktāna sīrupa piedevu – pieaugums līdz 10^5 , un 4 st. turpmākā augšanas periodā šūnu skaits sasniedza 10^6 līdz 10^7 . Titrējamā aciditāte un pH bija līdzīgi (pH 4,0–4,1) visos paraugos. Ar fruktāna sīrupu (10–15%) bagātinātā jogurta garša bija patīkama – saldskābena. Auzu putra, bagātināta ar 10% fruktāna sīrupu, uzrādīja labu *Bifidobacterium* augšanu barotnē jau pēc 4 st.

Diskusija

Veiktie pētījumi parādīja, ka fruktāna sīrups ir netoksisks, dod līdz 2000 mg/kg ķermeņa masas, neizraisa toksisku vai letālu efektu. Fruktāna sīrupa ķermeņa svara pieauguma samazinošais efekts šķiet būtisks. Iespējams, ka šis produkts var tikt lietots kā pretaptaukošanās aģents. Līdzīgus rezultātus ieguva K. Išihara (8) eksperimentā ar žurkām, izmantojot fruktāna sīrupu kā piedevu barībai 1,5% koncentrācijā. Svarīgs efekts ir holesterīna un tā frakciju līmenis asinīs. Šajā eksperimentā tika pētīta tikai totālā holesterīna un HDL frakcija. Pievienojot barībai fruktāna sīrupu HDL, holesterīna frakcija pieauga eksperimentālajā grupā no 1,08 līdz 1,18 mmol/l (par 9,2%). Kā kontrasts kontroles grupā HDL samazinājās no 1,0 līdz 0,83 mmol/l vai 23,1%. Mātītēm šis efekts bija mazāk izteikts. Zināma ietekme fruktāna sīrupam var būt uz tauku metabolismu hepatocītos, par to liecina histoloģiskie hepatocītu izmeklējumi. Literatūrā ir norādes, ka nozīmīgs riska faktors pie kardiovaskulārām saslimšanām ir HDL frakcijas samazināšanās asins serumā, totālā holesterīna, LDL un triglicerīdu koncentrācijas pieaugums (21, 10). Fruktāna sīrupa ietekme uz LDL un triglicerīdu līmeni ir turpmāko pētījumu uzdevums.

Nemot vērā fruktāna sīrupa uzrādīto tendenci palielināt HDL frakciju asins serumā un pazemināt totālā holesterīna līmeni, fruktāna sīrups varētu būt perspektīvs produkts kardiovaskulāro saslimšanu riska mazināšanai pēc plašāku pētījumu veikšanas. Fruktooligosaharīdi tiek lietoti kā prebiotiki jogurtos. Meiji Seika kompānija (Japāna) ražo *Ologo Yogurth* uz fruktooligosaharīdu bāzes (6). Prebiotiku devas jogurtā ir 2–5 g/100 ml. Pieņemts, ka dienā uzņemto fruktooligosaharīdu daudzums ir ap 0,8 g uz 1 kg ķermeņa masas (22). Ievērojot pieredzi ar līdzīgiem preparātiem ASV un Eiropas valstīs, Latvijā varētu būt lietderīgi sākt ar 5–10 g fruktāna sīrupa piedevu uz 100 ml jogurta.

Literatūra

1. Peterson D., Quereshi A. Effects of Tocols and β -glucan on Serum Lipid Parameters in Chickens. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73: 417–424.
2. Rombeau J. L., Kripke S. A. Metabolic and Intestinal Effects of Short-Chain Fatty Acids. *J. Parent. Enieral. Nutr.* 1990, 14: 181–185.
3. Roberfroid M. B. Functional Effects of Food Components and the Gastrointestinal System: Chicory Fructooligoaccharides. *Nutr. Rev.* 1996, 54: 38–42.
4. Cummings J. H., Roberfroid M. B. A New Look at Dietary Carbohydrate: Chemistry,

- Physiology and Health. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997, 51: 417–423.
5. Gibson G. R., Roberfroid M. B. Dietary Modulation of the Human Caloric Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125: 1401–1412.
 6. Brien J. O. Prebiotics: Prospects and Problems. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.* 1998, 63: 1491–1492.
 7. Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Jizuka M., Matsumoto O., Saeki S., Yamaguchi H. In vitro Digestibility and Fermentability of Levan and its Hypocholesterolemic Effects in Rats. *J. Nat. Biochem.* 1999, 10: 13–18.
 8. Ishihara K. Antihyperlipidemic and Antiobesity Agent Comprising Levan or Hydrolysis Products There of Obtained from *Streptococcus Salivarius*. United States Patent. 1996, 5: 527, 784.
 9. Anonymous. Framingham Study. *Am. J. Cardiol.* 1995, 75: 1196–1201.
 10. Segrest J. P. The role of non-LDL: non-HDL Particles in Atherosclerosis. *Curr. Diab. Rep.* 2002, 2(3): 282–288.
 11. Bekers M., Švinka J., Raipulis J., Laivenieks J., Pankova L., Melbārde I. Celms. *Zymomonas mobilis* - levāna producents [Strain *Zymomonas mobilis*, producer of levan]. Latvijas patents. 1993, LV 5709.
 12. Tokunaga T., Oku T., Hosoya N. Utilization and Excretion of a New Sweetener, Fructooligosaccharide (Neosugar), in Rats. *J. Nutr.* 1989, 119(4): 553–559.
 13. Bekers M., Laukevics J., Upite D., Kaminska E., Linde R. Flame-Burned Stainless Steel Wire Spheres as Carriers of *Zymomonas Mobilis* Cells and Extracellular Levansucrose. *Acta Biotechnol.* 1999, 19: 341–348.
 14. Bekers M., Vigants A., Laukevics J., Toma M., Rapoport A., Zikmanis P. The Effect of Osmo-Induced Stress on Product Fermentation by *Zymomonas Mobilis* on Sucrose. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 55: 147–150.
 15. Bekers M., Laukevics J., Upite D., Kaminska E., Vigants A., Viesturs U. Method for Obtaining Fructan from Sucrose, Patent Pending. 2000, 173.
 16. Лифшиц В. И., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы [Medical Laboratory Analyses]. Москва: Триада-Х, 2000, 435.
 17. Pearse A. G. Histochemistry Theoretical and Applied. 2nd edn. London: Churchill Ltd, 1960, 962.
 18. Bekers M., Maraуска M., Laukevics J., Grube M., Vigants A., Karklina D., Skudra L., Viesturs U. Oats and Fat-Free Milk Based Functional Food Product. *Food Biotechnol.* 2001, 15(1): 1–12.
 19. Банникова Л., Королева Н., Силихипа В. Основы микробиологии молочной промышленности [Basic Microbiology for Dairy Industry]. Москва: Агропромиздат, 1987, 297.
 20. Великая В. Методы контроля броидильных производств [General Methods for Control in Fermentation Industry]. Москва: Пищевая промышленность, 1964, 274.
 21. Горам П. Холестерин и здоровый образ жизни [Cholesterol and Healthy Lifestyle]. Москва: Крон-пресс, 1998, 126.
 22. Roberfroid M. B., Delzenne N. M. Dietary Fructans. *Annu. Rev. Nutr.* 1998, 18: 117–143.

Summary

Fructan syrup, a new sweetener with a reduced energetic value, is produced from conventional sugar by enzymatic method and contains biologically active fructose components: fructooligosaccharides and levan. Fructan syrup has been investigated as a food additive for mice and rats. Investigation of the acute toxicity in mice has shown that fructan syrup in a quantity up to 2000 mg per 1 kg body weight is a nontoxic product. Fructan syrup used as a food additive (1 g per 1 kg body weight per day) tends to decrease the cholesterol level and increase the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol fraction in blood plasma of rats. Taking into account that fructooligosaccharide is used as an additive in yoghurt the influence of fructan syrup on *Bifidobacteria* was investigated. The fructan syrup additive (10% w/w) stimulated development of *Bifidobacterium lacticum* 12 in a fat-free milk and oat mash medium during the first fermentation hours. Fructan syrup is clearly a prospective product for the prevention of cardiovascular and gastrointestinal diseases.

Key words: fructan syrup, sweetener, cholesterol, *Bifidobacterium*.

Agrīna aizkuņģa dziedzera vēža diagnostika. Vai reāla? Early Pancreatic Cancer Diagnostics. Is it Realistic?

Aiga Stāka, Aldis Puķītis, Juris Pokrotnieks

Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Gastroenteroloģijas centrs
Pilsuņu iela 13, Rīga, LV-1002
E-pasts: kamene@latnet.lv

Aizkuņģa dziedzera vēzis ir viens no agresīvākajiem audzējiem. Tas ir 4. vietā audzēju mirstības ziņā. Statistikas dati liecina, ka saslimstība ir proporcionāla mirstībai, 5 gadu dzīvildze ir mazāka par 5%. Audzējs ir rezistents gan pret ķīmijterapiju, gan staru terapiju. Pasaulē ir veikti daudzi karcinogēnēzes mehānisma pētījumi, lai varētu izstrādāt agrīnas diagnostikas metodes un skrīninga kritērijus augsta riska personām. Līdz šim nav atrasts neviens pietiekami jutīgs un specifisks agrīnas diagnostikas onkomarķieris. No pašreiz pieejamām radioloģiskām diagnostikas metodēm agrīna diagnostika ir iespējama ar jaunākās paaudzes trīsfažu spirāles datotomogrāfiju ar ultraplāniem griezumiem (1–2 mm) un kontrastvielas ievadi, kā arī ar endoskopisko ultrasonogrāfijas izmeklēšanu. Nākotnē perspektīva agrīna diagnostika varētu būt kombinētam molekulāro testa marķieru panelim.

Atslēgvārdi: aizkuņģa dziedzera adenokarcinoma, agrīna diagnostika, karcinogēnēze, molekulārie marķieri, datotomogrāfija.

Ievads

Aizkuņģa dziedzera audzēji veido apmēram vienu trešdaļu no visām aizkuņģa dziedzera slimībām, savukārt aizkuņģa dziedzera duktāla adenokarcinoma ir apmēram 80% no visiem aizkuņģa dziedzera audzējiem. Gastrointestinālo audzēju grupā pēc saslimstības biežuma aizkuņģa dziedzera duktāla adenokarcinoma ir trešajā vietā aizkuņģa un kolorektālā vēža. Aizkuņģa dziedzera vēzis ir viens no „agresīvākajiem” audzējiem ar visaugstākajiem mirstības rādītājiem. Pēc plaušu, kolorektāla, prostatas un kuņģa audzēja vīriešiem un krūts, kolorektāla, plaušu un olnīcu audzēja sievietēm aizkuņģa dziedzera vēzis ir 4. vietā audzēju mirstības ziņā (11). To ir grūti diagnosticēt agrīnā stadijā. No diagnosticētiem gadījumiem tikai 20% ir operējami, bet 80% – neoperējami un ar attālām metastāzēm. Audzējs ātri progresē, ir ar sliktu prognozi un agrīnu letalitāti. Pēc statistikas datiem, saslimstība ir proporcionāla mirstībai, un piecu gadu dzīvildze ir mazāka par 5% pat radikāli operētiem slimniekiem (10, 11). Turklāt šis audzējs ir rezistents pret staru un ķīmijterapiju. Slimības sliktā prognoze ir saistīta gan ar agresīvo slimības gaitu, vēlīno diagnostiku, gan arī ar skrīninga kritēriju trūkumu riska grupas atļasei. No riska faktoriem pārliecinoši ir pierādīts tikai smēķēšanas kaitīgums (dubulto risku), kā arī ilgstoši noritotšs hronisks pankreatīts – kumulatīvais risks apmēram 4% pēc 25 gadiem (1, 6, 8). Aizkuņģa dziedzera adenokarcinomas ģimenes anamnēze nav bieži pierādīta, taču palielina dažādu audzēju attīstības risku citiem asinsradiniekiem. Ir pierādīta aizkuņģa dziedzera vēža pārmantojamība dažās ģimenēs, tādējādi šo slimnieku asinsradiniekiem ir paaugstināts risks saslimt ar aizkuņģa dziedzera vēzi, taču šie slimnieki procentuāli veido tikai nelielu

daļu (1–2%) no visiem saslimšanas gadījumiem ar aizkuņģa dziedzera vēzi (1, 7, 8). Nav skaidru etioloģisko faktoru, taču liela nozīme ir gēnu mutācijām (hereditāra pankreatīta gadījumā risks saslimt pieaug 50 reizes) (8). Pēdējos gados pasaulē ir veikti daudzi pētījumi aizkuņģa dziedzera karcinogēzes mehānisma izpētei. To mērķis būtu apzināt augsta riska indivīdus, izstrādāt diagnostikas metodes skrīningam un agrīnai diagnostikai.

Epidemioloģija

Ar aizkuņģa dziedzera vēzi pasaulē katru gadu saslimst aptuveni 185 000–200 000 cilvēku. Saslimstībai ir tendence pieaugt, ko izskaidro gan ar dzīvildzes pieaugumu (80% slimnieku ir vecumā no 60 līdz 80 gadiem), gan ar labāku diagnostiku (10, 11). Vīrieši slimo nedaudz biežāk nekā sievietes (1,5–2 : 1). Saslimstība Rietumvalstīs ir vidēji 10/100 000 vīriešiem un 7/100 000 sievietēm. Ja salīdzina ar skaitļiem citur pasaulē, tad visaugstāko saslimstību novēro starp afroamerikāņiem (~ 20/100 000), savukārt zemāko – starp Indijas, Singapūras un Kuveitas iedzīvotājiem (~ 1/100 000) (4, 5, 10, 11). Saslimstības rādītāji Latvijā 2004. gadā ir šādi: kopā 377 gadījumi, no tiem 190 vīrieši (17,9/100 000) un 187 sievietes (15,0/100 000); 2005. gadā: kopā 367 gadījumi, no tiem 199 vīrieši (18,7/100 000) un 168 sievietes (13,5/100 000) (20). Šie skaitļi ir daudz augstāki nekā vidēji Eiropas valstīs.

Aizkuņģa dziedzera vēzis ir tipiska gados vecāku cilvēku slimība. Aptuveni 80% slimnieku ir vecumā starp 60 un 80 gadiem, bet tikai 2% slimnieku ir jaunāki par 40 gadiem (11).

Diagnostika

Laboratoriskā diagnostika. Rutīnas laboratorijas testi – pilna asins analīze, bioķīmijas analīze, koagulogramma – nespecifiski, slimības sākuma stadijā bieži vien ir neizmainīti, un būtiskas izmaiņas tajos var konstatēt tikai slimības vēlīnās stadijās (ja ir holestāze, divpadsmitpirkstu zarnas obstrukcija vai audzēja perforācija uz divpadsmitpirkstu zarnu ar asiņošanu).

Specifiskie aizkuņģa dziedzera funkciju testi. Enokrīnās funkcijas testi – glikozes tolerances un arginīna tests. Testi diezgan komplicēti, tādējādi reti izmantojami (11).

Eksokrīnās funkcijas testi. Tiešie aizkuņģa dziedzera funkcijas testi – sekretīna, holecistokinīna vai cerulīna testi. Analīzei izmanto aizkuņģa dziedzera sulu, ko iegūst divpadsmitpirkstu zarnas zondēšanas laikā pirms un pēc hormonu stimulācijas. Aizkuņģa dziedzera vēža diagnostikā reti lietojami, parasti izmanto specializētos centros ierobežotam pacientu skaitam. Orālie aizkuņģa dziedzera funkciju testi (N-benzoil-L-tirozil-p-aminobenzolskābes tests un pankreolaurila tests), kā arī fekālie aizkuņģa dziedzera funkciju testi aizkuņģa dziedzera vēža agrīnā diagnostikā ir mazinformatīvi, bet atsevišķos gadījumos, piemēram, endokrīnās un eksokrīnās substitūcijas terapijas uzsākšanai, noderīgi (11). Zemās jutības un specifiskuma dēļ tie neietilpst nevienā diagnostikas algoritmā.

Seroloģiskie marķieri. Seroloģiskos marķierus var klasificēt sīkāk: seruma enzīmi, ar tumoru saistīti antigēni, ektoiski producēti regulējoši peptīdi un hormoni. Ar tumoru saistītiem antigēniem vajadzētu būt vislabākajiem seruma diagnostikas marķieriem, bet līdz šim neviens specifisks tumora antigēns vai specifisks aizkuņģa dziedzera vēža antigēns nav identificēts, izņemot dažus marķierus slimības vēlīnās stadijās.

Visbiežāk izmantotais onkomarķieris aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā – CA 19–9 (karbohidrāta antigēns) ar 80% jutību un 90% specifiskumu. Normas skaitļi – < 39 U/ml. Tas nav stingri specifisks tikai aizkuņģa dziedzera adenokarcinomai,

paaugstinātos skaitļos to var atrast arī citu gastrointestinālo audzēju vēlīnās stadijās, kā arī aknu cirozes, holestāzes, akūta un hroniska pankreatīta gadījumā. Diemžēl tas nav derīgs ne skrīningam, ne aizkuņģa dziedzera agrīno stadiju diagnostikai, kad audzējs vēl teorētiski ir rezekcējams, jo tikai 55% pacientu, kuriem audzējs < par 3 cm, šis marķieris ir paaugstināts. Tomēr to var izmantot prognozes noteikšanai, terapijas efektivitātes izvērtēšanai un recidīva diagnostikai pēc ķirurģiskas operācijas (9, 11).

Jaunāks marķieris ir M2 piruvātkināze (M2PK) jeb piruvātkināzes izoforma, kas tika atrasts nediferencētu un proliferējošu audzēju audos. Neaktīvās dimēru un monomēru subformas var noteikt serumā. Sākotnējie rezultāti bija daudzsološi, jo to nekonstatēja veseliem indivīdiem, bet atrada aizkuņģa dziedzera vēža pacientu serumā. Tomēr tālākā izpēte nebija tik daudzsološa, jo to atrada arī labdabīgu aizkuņģa dziedzera slimību, īpaši hroniska pankreatīta, gadījumos. Tas, vai šis marķieris būs derīgs aizkuņģa dziedzera vēža agrīnai diagnostikai, vēl nav zināms (11).

Arī citi onkomarķieri, kā CEA (karcinoembriogēnais antigēns), alfa fetoproteīns, CA 125, CA 242, tiek atrasti pavairotos daudzumos aizkuņģa dziedzera vēža vēlīnās stadijās, tomēr tiem ir zemāka diagnostiskā vērtība nekā CA 19-9. Izpētes stadijā tiek noteikti arī POA (*pancreatic oncofetal antigen*), Span-1, DU-PAN-2, TAG-72 onkomarķieri.

Tiek pētīta jaunāko onkomarķieru – disintegrīna, metalloproteīnāzes (ADAM9), aknu-intestinālā kadherīna – nozīme aizkuņģa dziedzera vēža agrīnā diagnostikā (8). Papildus izmantojot divdimensiju poliakrilamīda gela elektroforēzi, tiek pētīti arī proteoma marķieri, resp., specifiski audzēja izdalīti proteīni, un tiek identificētas kalretikulīna specifiskās izoformas (1, 2).

Molekulārā diagnostika. Tā kā notiek aizkuņģa dziedzera vēža intensīva izpēte, palielinās arī zināšanas par šī audzēja ģenētiskām un molekulārām aberācijām.

Aizkuņģa dziedzera adenokarcinomu raksturo šādas ģenētiskās izmaiņas:

- 1) onkogēnu aktivācija – K-ras mutācija, sastopama 90% aizkuņģa dziedzera vēža slimnieku;
- 2) tumora supresorgēnu inaktivācija – p53 tumora supresorgēna 5,7 un 8 eksona mutācija (50%);
tumora supresorgēnu CDKN2A/p16, DPC4/Smad delēcija;
BRCA2 gēna mutācijas;
- 3) DNS *mismatch repair* gēnu defekti – MLH1 un MSH2 (4%) – sastopami aizkuņģa dziedzera vēža hereditāru formu gadījumā.

Aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā atrodama arī dažādu augšanas faktoru pavairota ekspresija: TGF-β (*tumor growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), aberantu mucīnu (MUC4) ekspresija utt. Izmantojot hromosomu un gēnu analīzes metodes, aizkuņģa dziedzera vēža šūnās tika atrastas multiplas citoģenētiskās izmaiņas, kariotipa izmaiņas ar hromosomu vai hromosomu plecu (1p, 9p, 17p un 18q) delēcijām, kā arī noteiktu alēļu zudums (heterozigotās LOH zudums).

Lai varētu izstrādāt aizkuņģa dziedzera vēža agrīnās diagnostikas metodes, ir labi jāizprot aizkuņģa dziedzera vēža karcinoģenēze. Kā notiek normāla aizkuņģa dziedzera duktilā epitēlija pārveidošanās par duktilu adenokarcinomu? Līdzīgi kā citiem dziedzera epitēlijaudzējiem, tas notiek vairākās PanIN (*pancreatic intraepithelial neoplasia*) displāzijas stadijās (PanIN-1A, 1B, 2 un 3). Tomēr joprojām nav skaidrs, kuras ģenētiskas alterācijas un kādā secībā sastopamas PanIN stadijās. Izmantojot mikrodisekcijas metodes, var analizēt iepriekšminētās gēnu mutācijas, delēcijas vai ekspresijas šajās displāzijās. Pirmie rezultāti liecina, ka CDKN1A kombinācijā ar K-ras un HER-2/*neu* sastop agrīnākās PanIN stadijās, turpretim p53 mutāciju un DPC4/Smad4 delēcija sastopama vēlīnākās PanIn stadijās, kā arī jau invazīvas adenokarcinomas stadijā (11).

Aizvien lielāka uzmanība molekulārajā diagnostikā, skrīninga un pamatprincipu izstrādē tiek pievērsta t. s. ģimenes aizkuņģa dziedzera vēža sindromiem. Piemēram, personām ar BRCA2 mutāciju risks saslimt ar aizkuņģa dziedzera vēzi ir 10 reizes lielāks, p16 gēna mutācijas pacientiem ar ģimenes multiplo melanomu – 20 reizes, bet pacientiem ar hereditāro pankreatītu (PRSSI gēna mutācija) – 50 reizes lielāks (11).

Rezumējot iepriekš minēto, jāsecina, ka testu klīniskā izmantojamība, ņemot vērā molekulāro testu specifiskumu, jutību un komplicētību, joprojām nav skaidra. Tā kā ģenētiskās mutācijas ir daudzveidīgas un nav skaidra to progresija no priekšvēža stāvokļa līdz metastatiskai karcinomai, nākotnē molekulārai diagnostikai būs nozīme, kombinējot dažādus molekulāros testa marķierus. Tiek veikti dažādi pētījumi par molekulāriem marķieriem, un rezultāti ir ļoti dažādi, pat pretēji. Tādējādi aizvien plašāk tiek diskutēts par vienotu pacientu analīžu paņemšanu un standartizētu molekulārbioloģisko testu ieviešanu, lai multicentru pētījumos iegūtie rezultāti būtu ar ticamu reproduktivitāti, jutību, specifiskumu, resp., t. s. *evidence-based medicine*.

Molekulārā diagnostika tiek lietota specializētos centros, taču diezgan reti, galvenokārt iedzimtu sindromu (hereditārais pankreatīts un ģimenes pārmantotais aizkuņģa dziedzera vēzis) gadījumos.

Radioloģiskā diagnostika

Ultrasonoskopija. Agrīnai diagnostikai ir maza diagnostiska vērtība. Aptuveni 10–20% gadījumu aizkuņģa dziedzera nav vizualizējams vai vizualizējams daļēji. Testa jutība un specifiskums dažādos literatūras avotos ļoti variē un ir atkarīgs no ārsta radiologa pieredzes. Pieredzējis ārsts sniedz rezultātu ar jutību 90%, specifiskumu 99%. Papildinot izmeklēšanu ar Doplera sonogrāfiju un kontrastvielas ievadi, kas palīdz diferencēt audu vaskularizāciju, metodes jutība un specifiskums ir ievērojami palielinājusies (jutība līdz 87%, specifiskums līdz 94%). Tādējādi, ievērojot metodes pieejamību un vienkāršo izmeklēšanu, tā aizvien ir pirmā izmeklēšana gan stacionārā, gan ambulatorajā praksē, ja ir aizdomas par aizkuņģa dziedzera patoloģiju (11, 12).

Datortomogrāfija (DT). Šai metodei pašlaik ir vislielākā diagnostiskā vērtība. Tā ir izvēles metode aizkuņģa dziedzera agrīnā diagnostikā un stadijas novērtēšanā, kurā izmanto jaunākās paaudzes trīsšķāžu spirāles DT ar ultraplāniem griezumiem (1–2 mm) un kontrastvielas ievadi (arteriālā, parenhimatozā, portovenozā fāze). Metodes jutība – 90%, audzējiem < 2 cm – 78%, specifiskums – līdz pat 100% (14). Kā izņēmums ar viltus negatīviem rezultātiem tiek minēti audzēji, kas lokalizējas tuvu papillai, ja iepriekš ir veikta papilotomija ar stenta implantāciju. Šinī situācijā, palielinoties šī rajona vaskularizācijai (asiņošanas un iekaisuma dēļ), zūd aizkuņģa dziedzera kontrasts, kas labi redzams, ievadot kontrastvielu un novērtējot parenhimatozo un portovenozo fāzi. Tāpat viltus negatīvi rezultāti tiek aprakstīti gadījumos, ja aizkuņģa dziedzera vēzis attīstās paralēli iekaisumam aizkuņģa dziedzera galviņā (11). Metodes jutība ir zemāka, izmantojot duālās fāzes kontrastpastipriņošu spirāles DT. Piemēram, audzējiem, mazākiem par 1,5 cm, jutība ir tikai 67% (15). Jāpiebilst, ka tieši tumora lielumam diagnostikas brīdī ir izšķirošā nozīme. 100% 5 gadu dzīvildze tiek sasniegta, ja audzējs diagnostikas brīdī ir mazāks par 1 cm, resp., lokalizējas pie intraduktālā epitēlija bez parenhīmas, asinsvadu, perineirālas un limfvadu iesaistīšanās (16). Dzīvildze krasi samazinās, ja audzēja lielums diagnostikas brīdī ir lielāks par 1 cm.

Endoskopiskā ultrasonogrāfija (EUS). Laba diagnostikas metode maza izmēra audzēju diagnostikai, v. *portae* infiltrācijas noteikšanai, limfmezglu metastāžu un maza izmēra ascīta noteikšanai (resp., audzēja stadijas un pirmsoperācijas rezecējamības

noteikšanai). Gan DT, gan EUS tiek minētas kā vienlīdz labas maza izmēra audzēju diagnostikā, tomēr vienā pētījumā priekšroka tiek dota EUS (17). Neskaidros gadījumos iespējama aspirācijas citoloģija, kas palielina jutību līdz 95%, specifiskumu līdz 100% (19). Metodes trūkums ir procedūras invazīvuums un tas, ka lielu audzēju gadījumos ne vienmēr precīzi iespējams izvērtēt asinsvadu infiltrāciju. Savukārt NEST (*No Endosonographic Detection of Tumor*) pētījuma rezultāti liecina, ka 20 pacientiem ar aizkuņģa dziedzera adenokarcinomu sākotnējā diagnoze ir hronisks pankreatīts (13), difūza infiltrējoša karcinoma (3), akūts pankreatīts (1), resp., daudz viltus negatīvu rezultātu. 5 pacientiem ar sākotnēji negatīvu EUS pēc 2–3 mēnešiem atkārtoti veicot EUS, tika konstatēta aizkuņģa dziedzera adenokarcinoma (18).

Magnētiskās rezonanses izmeklējums (MRI). Trūkst pētījumu, kuros tiktu salīdzināta šī izmeklēšanas metode ar DT un EUS. Daži speciālisti uzskata, ka DT un EUS būtu priekšrocība aizkuņģa dziedzera vēža agrīnā diagnostikā. Īpaši kombinējot ar MR angiogrāfiju, speciālisti pielīdzina šīs metodes jutību un specifiskumu gan DT, gan EUS izmeklējumam. Ja ir aizdomas par žultsceļu vai aizkuņģa dziedzera intraduktālu patoloģiju, priekšroka būtu dodama magnētiskās rezonanses holangiopankreatogrāfijai.

Endoskopiskā retrogrādā holangiopankreatogrāfija (ERHP). Attīstoties jaunākām, mazāk invazīvām izmeklēšanas metodēm (DT, EUS, MRI), ERHP ir zaudējusi savu agrāko diagnostikas nozīmi. Priekšrocība būtu dodama vienīgi neskaidru žultsceļu vai aizkuņģa dziedzera vadu patoloģijas gadījumā, kad ir iespējama intraduktāla sonoskopija vai pankreatoskopija ar histoloģijas, citoloģijas materiāla iegūšanu, kā arī mazu papīllas tumoru diagnostikā (11, 12). Nākotnē perspektīva varētu būt aizkuņģa dziedzera sulas analīze (K-ras mutācijas, p53, p16 mutācijas noteikšana) agrīnai vēža diagnostikai. Joprojām aktuāla ir terapeitiskā ERHP, piemēram, stenta ievietošana paliatīvos nolūkos obstruktīvas dzeltes gadījumā.

Positronu emisijas tomogrāfija nav rutīnas metode aizkuņģa dziedzera diagnostikā, tā tiek rekomendēta attālu metastāžu un recidīvu diagnostikā (11, 12).

Secinājumi

Aizkuņģa dziedzera vēža agrīna diagnostika joprojām ir aktuāla visā pasaulē. Lielākajai daļai pacientu diagnoze tiek noteikta novēloti (80%), tikai 20% pacientu ir iespējama radikāla operācija, bet agrīno recidīvu dēļ 5 gadu dzīvildze ir mazāka par 5%.

Izvēles diagnostikas metodes aizkuņģa dziedzera vēža agrīnākai diagnostikai un pirmsoperācijas rezecējamības noteikšanai ir spirāles datortomogrāfija un endoskopiskā ultrasonogrāfija.

Joprojām nav pietiekami jutīgu un specifisku seromarķieru slimības agrīnai diagnostikai un riska grupu skrīningam. Nākotnē perspektīva agrīna diagnostika varētu būt kombinētam molekulāro testa marķieru panelim.

Pateicība

Raksts tapis ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu.

Literatūra

1. Verma M. Pancreatic Cancer Epidemiology. *Technology in Cancer Research & Treatment*, June, 2005, Vol. 4, No. 3, 295–301.
2. Hong S., Misek D. E., Wang H., Puravs E., Giordano T. J. et al. An Autoantibody-Mediated

- Immune Response to Calreticulin Isoforms in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 2004, 64, 5504–5510.
3. Lowenfel A. B., Maisonneuve P. Epidemiology and Prevention of Pancreatic Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2004, 34(5), 238–244.
 4. Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. Cancer Statistics, 2002. *Ca. Cancer J. Clin.*, 2002, 52, 23–47.
 5. Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2005, 55, 74–108.
 6. Ahlgred J. D. Epidemiology and Risk Factors in Pancreatic Cancer. *Semin. Oncol.*, 1996, 23, 241–250.
 7. Efthimiou E., Crnogorac-Jurevic T., Lemoine N. R., Brentnall T. A. Inherited Predisposition to Pancreatic Cancer. *Gut.*, 2001, 48(2), 143–147.
 8. Lowenfel A. B., Maisonneuve P., DiMagno E. P., Elitsur Y., Gates L. K. J., Perrault J. et al. Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, 89, 442–446.
 9. Takhar A. S., Palaniappan P., Dhingsa R., Lobo D. N. Recent Developments in Diagnosis of Pancreatic Cancer. *British Medical Journal*, September 2004, vol. 329, 668–673.
 10. Büchler M. W., Uhl W., Malfertheiner P., Sarr M. Diseases of the Pancreas. Karger, 2004, 136–156.
 11. Löhr J. M., Heinemann V., Friess H. Pancreatic Cancer. UNI-MED Verlag AG, D-28323 Bremen, 2005, 24–90.
 12. Feldman M., Friedman L. S., Brandt L. J. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Saunders Elsevier, 2006, 8th Edition, Vol. 1, 1309–1325.
 13. Bayless T. M., Diehl A. M. Advanced Therapy in Gastroenterology and Liver Disease. B. C. Decker Inc., 2005, 5th Edition, 813–823.
 14. Bronstein Y., Loyer E., Kaur H., Chol H. et al. Detection of Small Pancreatic Tumors with Multiphasic Helical CT. *American Journal of Roentgenology*, 2004, 182, 619–623.
 15. Legmann P., Vignaux O., Dousset B. et al. Pancreatic Tumors: Comparison of Dual-Phase Helical CT and Endoscopic Sonography. *American Journal of Roentgenology*, 1998, 170, 1315–1322.
 16. Ariyama J., Suyama M., Satoh K., Sai J. Imaging of Small Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 1998, 16, 396–401.
 17. Midwinter M. J., Beveridge C. J., Wildson J. B., Bennet M. K., Baudouin C. J., Charnley R. M. Correlation between Spiral Computed Tomography, Endoscopic Ultrasonography and Findings at Operation in Pancreatic and Ampullary Tumors. *British Journal of Surgery*, 1999, 86, 189–193.
 18. Bhutani M. S., Gress F. G., Giovanni M., Erickson R. A., Catalano M. F. et al. The No Endosonographic Detection of Tumor (NEST) Study. *Endoscopy*, 2004, 36(5), 453–454.
 19. Stāka A., Puķītis A., Pokrotņieks J. Aizkuņģa dziedzerā cistisko veidojumu diagnostika, izmantojot endoskopiskās ultrasonogrāfijas aspirācijas punktāta analīzi. *Latvijas Universitātes Raksti*, 2005, 694. sēj., Medicīna IV, 98–101.
 20. Latvijas Vēža slimnieku reģistra dati.

Summary

Pancreatic cancer (PC) is one of the most aggressive cancers. It represents the fourth leading cause of cancer-related mortality, Statistic date shows that morbidity is equal to mortality, 5 year survival is less than 5 %. PC has been resistant to all conventional and modern therapies available. Many clinical and experimental studies have been done in the past few years for detecting the mechanisms of the pancreatic carcinogenesis, PC genetics in order to identify individuals at increased risk, and for establishing of diagnostic methods for screening. Until now no serum markers with high enough sensitivity and specificity are available for early diagnostic of PC. From radiological methods available the best assessments have been achieved by thin-section triple-phase helical computer tomography and endoscopic ultrasonography. In the future perspective early diagnostic could be done in combination with several molecular test markers.

Key words: pancreatic carcinoma, early diagnostics, carcinogenesis, molecular markers, computer tomography.

BBOX1 un eNOS gēna polimorfisma asociācija ar arteriālo hipertensiju Latvijas populācijā

Possible Association of the BBOX1 and eNOS Gene Polymorphism in the Latvian Population

Jeļizaveta Sokolovska¹, Maija Dzintare², Tatjana Sjakste³, Gustavs Latkovskis⁴, Nikolajs Sjakste^{2,5}

¹Latvijas Universitāte, Medicīniskās pēcdiploma izglītības institūts
Skolas iela 1a, Rīga

E-pasts: lizsjak@yahoo.com

²Latvijas Organiskās sintēzes institūts
Aizkraukles iela 21, Rīga, LV-1006

³Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts
Miera iela 3, Salaspils, LV-2169

⁴Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvijas Kardioloģijas centrs
Pilsonu iela 13, Rīga, LV-1002

⁵Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001

Arteriālā hipertensija ir mūsdienās ļoti izplatīta slimība ar multifaktoriālu etioloģiju. Hipertensijas patofizioloģijas galvenie elementi ir palielināta asinsvadu perifērā rezistence un kreisā kambara disfunkcija. Tādējādi, meklējot asociāciju ar hipertensiju, īpaši interesanti ir gēni, kas regulē karnitīna sintēzi un transportu, kā arī gēni, kas ir iesaistīti slāpekļa oksīda produkcijā.

Darba mērķis ir pētīt gamma-butirobetaīna hidroksilāzes (BBOX1) gēna un endoteliālas slāpekļa oksīda sintāzes (eNOS) gēna polimorfismu asociāciju ar hipertensiju Latvijas populācijā.

DNS paraugi saņemti no Latvijas genoma kolekcijas. BBOX1 un eNOS gēni analizēti bioinformātiski. Genotipēšana, izmantojot MALDI TOF tehnoloģiju un sekvenčēšanu, pasūtīta Latvijas Biomedicīnas centrā. Statistiskai datu apstrādei izmantotas *Microsoft Word Excel* un *Fisher's & Chi* programma.

BBOX1 gēnā identificēts 241 SNP. eNOS gēnā identificēti 162 SNP. Genotipēšanai izvēlēti BBOX1 gēna SNP C⁻¹ → T un eNOS gēna cSNP A³³⁵ → G, un cSNP C⁸⁹⁴ → A. Nav konstatēta izvēlēto polimorfismu asociācija ar esenciālo hipertensiju Latvijas populācijā. Polimorfismam cSNP A³³⁵ → G Latvijas populācijā novērota tikai G alēle un GG genotips. Novērota tendence, ka eNOS cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipam AA ir paaugstināts biežums hipertoniijas slimnieku grupā un BBOX1 SNP C⁻¹ → T genotipam TT ir paaugstināts biežums hipertoniijas slimnieku grupā.

Neviens no pētītajiem polimorfismiem nav asociēts ar arteriālo hipertensiju Latvijas populācijā. Tomēr BBOX1 gēna polimorfisma SNP C⁻¹ → T genotips TT un eNOS gēna cSNP C⁸⁹⁴ → A AA genotips ir biežāk novērojami primārās arteriālās hipertensijas slimnieku grupā.

Atslēgvārdi: primāra arteriāla hipertensija, BBOX1 gēns, eNOS gēns, polimorfisms, Latvijas populācija.

Ievads

Hipertensija ir viena no izplatītākajām mūsdienu slimībām, saslimstība ar to pieaug visur pasaulē. Pēc aptuveniem aprēķiniem, 7–8 miljoni cilvēku katru gadu mirst no paaugstināta asinsspiediena sekām, bet 59 miljoni cilvēku cieš no tā. Vislielāko saslimstību ar hipertensiju un mirstību no tās novēro attīstītajās Rietumvalstīs: ASV un Rietumeiropā. Taču arī attīstības valstīs šī slimība kļūst aizvien izplatītāka (22).

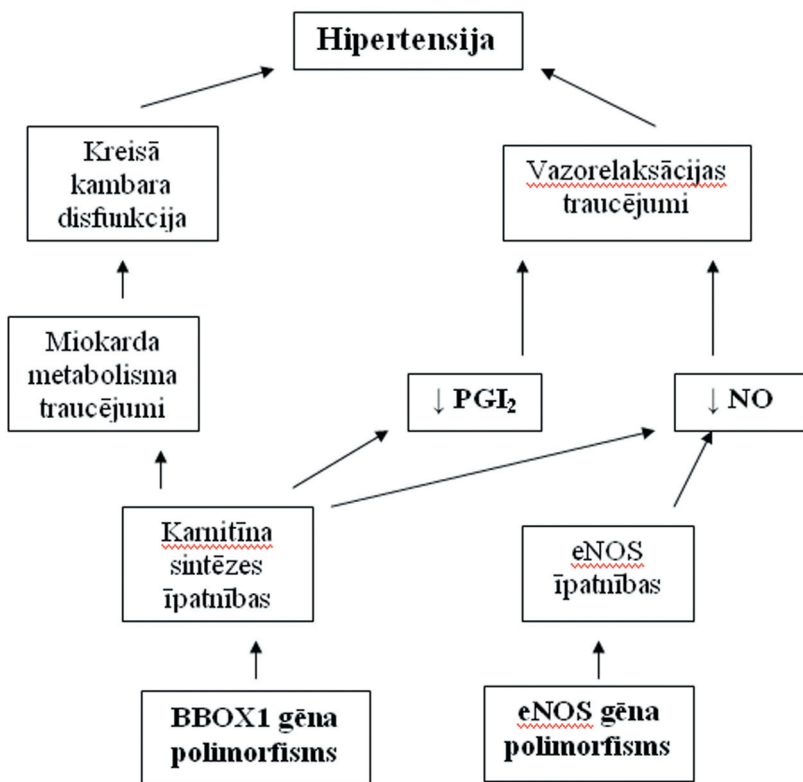
Latvijā kardiovaskulārās patoloģijas (tajā skaitā hipertensija) ir galvenais hospitālās saslimstības un mirstības cēlonis. Piemēram, 2004. gadā no slimnīcas izrakstīto un mirušo pacientu skaits ar diagnozi „arteriālā hipertensija” bija 11194. Kopumā izrakstīto un mirušo pacientu skaits ar diagnozēm „hipertensija”, „koronārā sirds slimība” un „miokarda infarkts” bija 32424 (pēc Veselības statistikas un medicīnas tehnoloģiju valsts aģentūras datiem).

Hipertensija ir galvenais riska faktors tādām kardiovaskulārām komplikācijām kā insults, miokarda infarkts, trombembolija u. c. Tāpēc īpaša nozīme ir savlaicīgai hipertensijas diagnozei un ārstēšanai. Tomēr mazāk nekā trešdaļai hipertensijas pacientu hipertensija tiek atklāta sākumstadijā, nevis to komplikāciju dēļ. Grūtības laikus diagnosticēt paaugstinātu asinsspiedienu un adekvāti to kontrolēt ir daļēji izskaidrojamas ar hipertensijas multifaktoriālo etioloģiju. (22).

30% gadījumu arteriālās hipertensijas cēlonis ir iedzimtība (1). Pēdējās desmitgadēs ir identificēti vairāki hipertensijas kandidātģēni. Galvenās šo gēnu grupas: renīn-angiotenzīna-aldosterona sistēmas gēni, α un β adrenoreceptoru gēni, lokālo asinsvadu tonusu regulējošo proteīnu gēni, G proteīnu gēni, α un β adučina gēni, lipoproteīdu apoproteīnu un to receptoru gēni.

Hipertensijas patoģenēzes pamatelementi ir kreisā kambara disfunkcija un palielinātā asinsvadu perifērā pretestība. Pastāv uzskats, ka hipertensijas patoģenēzē sākotnēji (iespējams, palielinātas adrenergiskās aktivitātes dēļ) palielinās sirds izviede. Kā atbilde uz palielināto sirds minūtes tilpumu pieaug asinsvadu perifērā pretestība. Ja tā paliek palielināta ilgstoši, sirds kreisais kambaris ar laiku hipertrofējas, tajā tiek traucēts metabolisms, kas var radīt tādas komplikācijas kā, piemēram, sirds mazspēja. Paaugstināta spiediena apstākļos attīstās arī endotēlija disfunkcija, veicinot strauju aterosklerozes progresiju un palielinot trombembolijas, insulta un miokarda infarkta risku. Taču šo komplikāciju attīstības ātrums dažādiem pacientiem ir atšķirīgs. Tāpēc saistībā ar hipertensiju zinātniekus interesē gan gēni, kuri regulē miokarda metabolismu (piemēram, karnitīna metabolismu), gan arī gēni, kuri varētu sekmēt endotēlija funkciju saglabāšanu paaugstināta spiediena apstākļos (vazodilatējošās substances, piemēram, slāpekļa oksīds). Šim pētījumam autori ir izvēlējušies divus gēnus – gamma-butirobetaīna hidroksilāzes gēnu jeb BBOX1 (gamma-butirobetaīna hidroksilāze katalizē karnitīna veidošanos) un endotēliālas slāpekļa oksīda sintāzes gēnu jeb eNOS (eNOS katalizē NO veidošanos endoteliocītos). Apkopojot dažādu pētījumu datus, ir izveidota darba hipotēze (sk. 1. att.).

Darba mērķis ir izpētīt gamma-butirobetaīna hidroksilāzes un eNOS gēna polimorfismus, izmantojot pieejamās datubāzes, un izvēlēties polimorfismus, kas varētu būt perspektīvi, pētot asociāciju ar hipertensiju, noteikt izvēlēto polimorfismu alēļu sadali Latvijas populācijā un salīdzināt polimorfismu alēļu sadali kontroles un hipertensijas slimnieku grupā.



*1. attēls. eNOS un BBOX1 gēna polimorfisma iespējamā ietekme uz hipertensijas attīstību
Possible role of eNOS and BBOX1 genes in pathogenesis of essential hypertension*

Apkopots pēc Tripodi et al, 2005 un Bueno et al, 2005, un Wolff et al, 2005. BBOX1 – gamma-butirobetaīna hidroksilāze, eNOS – endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze, PGI₂ – prostaglandīns I₂ (prostaciklīns), NO – slāpekļa oksīds, ↓ – samazināts

Summarized after Tripodi et al, 2005 un Bueno et al, 2005 un Wolff et al, 2005. BBOX1 - gamma-butyrobetaine hydroxylase, eNOS - endothelial nitric oxide synthase, PGI₂ - prostoglandin I₂, NO - nitric oxide, ↓ - decreased

Materiāli un metodes

Populācija. Pacientu DNS paraugi saņemti no Latvijas Ģenoma centra kolekcijas ar LR Centrālās ētikas komisijas atļauju. Pamatojoties uz pacientu anketās esošo informāciju, kas sastāv no ārsta aizpildītās daļas un pacienta aizpildītās daļas, tika izveidotas divas pacientu grupas: gadījumu grupa (hipertensijas pacienti) un kontroles grupa.

Gadījumu grupas raksturojums. Kritēriji iekļaušanai gadījumu grupā: diagnoze „arteriālā hipertensija” pacientu anketas pirmajā lapā, ko aizpilda slimnīcas ārsts, un pacienta pozitīva atbilde uz anketas jautājumu „Vai jums ir diagnosticēts paaugstināts asinsspiediens?” Gadījumu grupu veido 110 pacienti ar diagnozi „arteriālā hipertensija”. 92% gadījumu grupas pacientu ir no Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas kardioloģijas nodaļām un slimo ar koronāro sirds slimību. 8% pacientu ir no citu Rīgas

slimnīcu onkoloģijas un reimatoloģijas nodaļām. Vidējais vecums grupā – 61,2 gadi. 44% no gadījumu grupas pacientiem ir sievietes, 66% – vīrieši. Vidējais ķermeņa masas indekss (ĶMI) gadījumu grupā – 28,9. 68% šīs grupas pacientiem ķermeņa masa pārsniedz normas robežu (ĶMI > 25). Vidējais holesterīna līmenis asinīs gadījumu grupas pacientiem – 5,45 mmol/l. 23% šīs grupas pacientu ir aktīvi smēķētāji, 41% pacientu ir bijušie smēķētāji, 30% – nekad nav smēķējuši, 6% nav datu par smēķēšanu. 10% gadījumu grupas pacientu slimo ar cukura diabētu (diabēta tips neprecizēts), 9% dati par cukura diabēta diagnozi nav precīzi.

Kontroles grupas raksturojums. Kritēriji iekļaušanai kontroles grupā: diagnozes „primārā arteriālā hipertensija” trūkums ārsta aizpildītajā anketas daļā un negatīva atbilde uz jautājumu „Vai jums ir diagnosticēts paaugstināts asinsspiediens?” Kontroles grupu veido 109 pacienti. Vidējais vecums grupā – 43,2 gadi. 66% no tiem ir jauni veseli brīvprātīgie, 34% ir onkoloģijas un neiroloģijas nodaļu pacienti ar normālu asinsspiedienu. 77% no kontroles grupas pacientiem ir sievietes, 23% – vīrieši. Vidējais ĶMI šīs grupas pacientiem – 24,1. 23% pacientu ķermeņa masa pārsniedz normas robežu (ĶMI > 25). Dati par holesterīna līmeni asinīs un smēķēšanas statusu šīs grupas pacientiem nav zināmi.

BBOX1 un eNOS gēnu bioinformātiskā analīze. BBOX1 un eNOS gēni un to viena nukleotīda aizvietoējumi analizēti ar NCBI datubāzes (www.ncbi.nih.gov) un PupaSNP programmas (<http://pupasnp.bioinfo.ochoa.fib.es/>) palīdzību.

DNS paraugu sagatavošana. DNS paraugi krājumu koncentrācijās saņemti no Latvijas Genoma centra kolekcijas. DNS koncentrācija krājumos ir 20–800 ng/μl. DNS šķīdumi ar darba koncentrāciju 60 ng/μl izveidoti, pievienojot sterilo ūdeni nepieciešamā daudzumā. DNS šķīdumi uzglabāti -20 °C.

DNS fragmentu amplifikācija. Darbā izmantota alēļspecifiskā PCR BBOX1 gēna marķiera SNP C⁻¹ → T genotipēšanai ar alēļspecifiskiem praimeriem un 300 bp fragmenta amplifikācija ap SNP C⁻¹ → T sekvencēšanai. Strādājot ar eNOS gēnu, tika amplificēts 474 bp liels fragments ap cSNP A³³⁵ → G un 246 bp liels fragments ap cSNP C⁸⁹⁴ → A to tālākai apstrādei ar restriktāzēm un sekvencēšanai.

Praimeru izstrāde. Praimeri izstrādāti ar programmu *primer3* (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), tie pasūtīti firmā *Metabion International AG* (*Lena-Christ-Strasse 44/I, D-82152 Martinsried/Vācija*).

Praimeru kušanas temperatūra aprēķināta pēc formulas: $t^{\circ} \approx 4(G + C) + 2(A + T)$. Praimeru piesaistes temperatūra izvēlēta, pamatojoties uz to kušanas temperatūru.

PCR – DNS fragmentu amplifikācija. BBOX1 gēna SNP C⁻¹ → T izmantota alēļspecifiskā amplifikācija. Ar katru DNS paraugu veiktas divas PCR reakcijas (ar katru alēļspecifisko tiešo praimeru atsevišķi). eNOS gēna fragmentu amplifikācijai un BBOX1 gēna fragmenta amplifikācijai (tie bija paredzēti tālākai sekvencēšanai un restrikcijai) tika veikta viena PCR reakcija ar katru DNS paraugu.

PCR reakcijās izmantoti *Fermentas* firmas reaģenti:

- 1) desmitkārtīgs PCR buferis bez magnija hlorīda (sastāvs: 100mM Tris-HCl (pH 8,8 25 °C), 500mM KCl un 0,8% Nonidet P40);
- 2) desmitkārtīgs PCR buferis ar (NH₄)₂SO₄ (sastāvs: 750 mM Tris-HCl (pH 8,8 25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20;
- 3) 25 mM magnija hlorīda šķīdums;
- 4) 10mM dNTP šķīdums (satur pa 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- 5) rekombinantā Taq DNA polimerāze 5u/μl;
- 6) 10 pmol/μl praimeru šķīdumi sterilajā ūdenī.

Amplifikācijas produkta restrikcija ar alēļspecifiskām restriktāzēm. eNOS gēna marķieru cSNP A³³⁵ → G un cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšana veikta ar restrikcijas fragmentu analīzi. Restrikcijas saiti atrasti ar programmas *RestrictionMapper* palīdzību (www.restrictionmapper.org). Izmantotas restriktāzes NaeI un MboI. Restriktāzes NaeI un MboI un restrikcijas buferi iegādāti firmā *Fermenta*.

Restrikcijas reakcijām nepieciešami:

- 1) 10x buferis *Y+/Tango™* (sastāvs: 33 mM Tris-acetāts (pH 7,9 37 °C), 10 mM magnija acetāts, 66 mM kālija acetāts, 0,1 mg/ml BSA), restriktāze NaeI (10 u/μl);
- 2) 10x buferis R⁺ (sastāvs: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5 37 °C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA), restriktāze MboI (10 u/μl), sterils ūdens.

PCR produktu analīze veikta ar gela elektroforēzes palīdzību.

SNP genotipēšana ar MALDI-TOF masas spektrometru (genoSNIP). SNP genotipēšana ar MALDI-TOF MS (genoSNIP) un DNS sekvencēšana ar *Abi Prizm 3100 Genetic Analyzer* sekvenatoru pasūtīta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Sekvencu salīdzināšana (*multiple alignment*) ar *Clustalw* programmu. Sekvencu salīdzināšana jaunu polimorfismu atpazīšanai veikta ar *Clustalw* programmas palīdzību (<http://clustalw.genome.jp>).

Datu apstrāde un statistiskā analīze. No iegūtajiem rezultātiem aprēķinātas alēļu un genotipu frekvences katram lokusam hipertensijas gadījumu grupā un kontroles grupā ar *Microsoft Excel* programmu. Katrai alēlei noteikts sagaidāmais heterozigotātes indekss, kas rāda, cik liela daļa no populācijas genotipa ir heterozigotā stāvoklī. Noteikšanā izmantota formula:

$$h = \left(1 - \sum p_i^2\right)$$

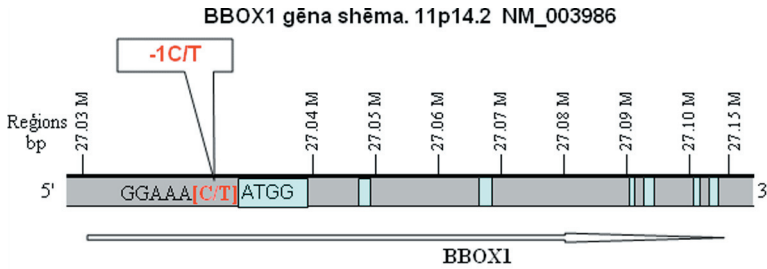
Alēļu un genotipu frekvenču atšķirības statistiskā ticamība starp gadījumu un kontroles grupu noteikta ar hī kvadrātā (χ^2) kritērija metodi pie ticamības $p < 0,05$, izmantojot datorprogrammu *Fisher's + Chi*.

Rezultāti

Bioinformātiskā analīze

BBOX 1 gēna analīze. Datubāzu analīze rāda, ka BBOX1 gēns atrodas 11 hromosomā p14,2 un ir 86 Kbp garš, satur 7 eksonus, un tā transkripts ir 1438 bp garš. BBOX1 gēnam ir nekanoniska Kozaka sekvence. Gēns satur 241 SNP, no kuriem 2 atrodas nekodējošās gēna daļās, 3 – eksonos, 236 – intronos. Eksonos esošie SNP ir sinonīmiski, proti, tie neizraisa aminoskābes maiņu. Viens SNP –1 pozīcijā atrodas Kozaka sekvencē, divi – eksonu splaisinga enhanseru (ESE) rajonos (vietās, kurās pie RNS saistās serīnu saturošie proteīni (SR proteīni), kas regulē splaisinga mehānismu), viens SNP – gēna 3' galā (sk. 1. tab.). Polimorfisma izpētei tika izvēlēts SNP –1 pozīcijā SNP C⁻¹ → T (rs2305095), jo nukleotīdu aizvietoējumi Kozaka sekvencē varētu ietekmēt ribosomu saistošā saita aktivitāti un tādējādi proteīna sintēzi (sk. 2. att.).

eNOS gēna analīze. eNOS gēns atrodas 7. hromosomā q36, tas ir 23,5 Kbp garš, satur 26 eksonus, tā transkripts ir 4400 bp garš. Gēnā ir identificēti 162 SNP, no kuriem 16 atrodas eksonos, 20 nekodējošās gēna daļās, 126 – intronos. No eksonos esošajiem SNP 7 ir nesinonīmiski (izraisa aminoskābes maiņu), 9 ir sinonīmiski SNP (sk. 2. tab.).



2. attēls. BBOX1 gēna shēma pēc avota NM_003986
Scheme of BBOX1 gene after NM_003986

Tumšpelēki – introni; gaišpelēki – eksoni, kvadrātiekvās – SNP C⁻¹ → T polimorfisms. Parādīta BBOX1 gēna Kozaka sekvence

Dark grey - introns, light grey - exons, in square brackets - polymorphism SNP C⁻¹ → T. The Kozak sequence of BBOX1 gene is shown

1. tabula

Interesantākie BBOX1 gēna SNP
The most interesting SNPs of BBOX1 gene

SNP grupa	SNP rs kods	SNP alēles	AS pozīcija	AS maiņa	Nozīme	Ietekmējamais SR proteīns
kodējošie	10767598	T/C	47	Ser/Ser	ESE	sc35
	3183973	T/C	136	His/His	ESE	srp55
	1044273	A/G	302	Val/Val	sinonīmisks	-
netranslējamās gēna daļās	2305095	C/T	-	-	A t r o d a s K o z a k a sekvencē	-
	1044281	T/G	-	-	-	-

Izvērtējot eNOS gēna SNP iespējamo funkcionālo nozīmi ar PupaSNP programmu, konstatēts, ka 7 SNP atrodas ESE rajonos.

eNOS gēna polimorfisma izpētei izvēlēti 2 nesinonīmiski SNP: cSNP A³³⁵ → G (rs3918166), kura G alēle nodrošina, bet A alēle novērš SR proteīna sf2 saistīšanos; un cSNP C⁸⁹⁴ → A (rs1799983), par kuru ir ļoti daudz literatūras datu un kura alēļu maiņa ietekmē SR proteīna sc35 saistīšanos (sk. 3. att.).

Kopumā genotipēšanai izvēlēti 3 polimorfismi (sk. 3. tab.)

BBOX1 gēna SNP C⁻¹ → T genotipēšana

BBOX1 gēna SNP C⁻¹ → T genotipēšana ar alēļspecifisko PCR. Genotipējot katru DNS paraugu, ar to veiktas 2 PCR reakcijas: atsevišķi ar katru alēļspecifisko tiešo praimeru un ar vienu un to pašu reverso praimeru.

Pēc visu DNS paraugu genotipēšanas rezultāti apstrādāti ar *Microsoft Office Excel* programmu, lai aprēķinātu SNP C⁻¹ → T alēļu frekvences un genotipu sadali. Novērtējot iegūto rezultātu ticamību, tika aprēķināts gaidāmais heterozigotātes indekss pēc formulas

$$h = (1 - \sum p_i^2)$$

2. tabula

Interesantākie eNOS gēna kodējošie SNP
The most interesting coding SNPs of eNOS gene

SNP rs kods	SNP alēles	AS pozīcija	AS maiņa	Nozīme	Ietekmējamo SR proteīns
3918166	A/G	112	Gln/Arg	ESE	sf2
1549758	C/T	258	Asp/Asp	sinonīmisks	
9282803	C/T	283	Asn/Asn	sinonīmisks	
9282804	C/T	287	Asp/Asp	sinonīmisks	
1799983	C/A	298	Glu/Asp	ESE	sc35
7792133	A/G	665	His/Arg	ESE	sc35, srp40
2566514	G/C	666	Ala/Ala	sinonīmisks	
11552661	T/C	737	Leu/Leu	sinonīmisks	
3918232	A/G	827	Met/Val	ESE	sc35, srp55
3918201	T/G	885	Met/Arg	ESE	sf2
3918233	T/C	946	Pro/Pro	sinonīmisks	
3918234	T/A	982	Leu/Gln	ESE	sf2, sc35
6947833	C/G	991	Ser/Cys	ESE	sc35, srp55
1064353	T/C	1010	Ile/Ile	sinonīmisks	
3730011	A/G	1060	Glu/Glu	sinonīmisks	
3918211	C/T	1117	Val/Val	sinonīmisks	

3. tabula

Datu apkopojums par izvēlētiem BBOX1 un eNOS gēna marķieriem
SNPs genotyped in this study

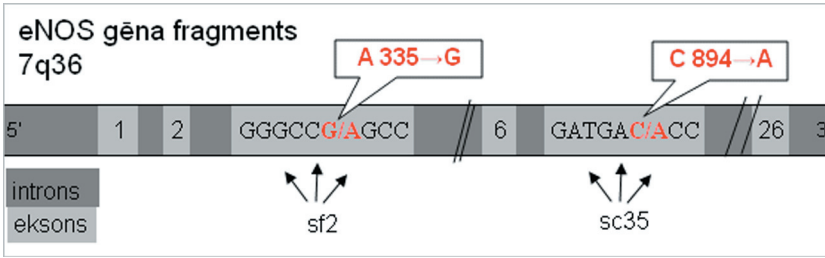
Gēns	SNP kods	SNP nosaukums	Funkcija	Nozīme
BBOX1	Rs2305095	SNP C ⁻¹ → T	sinonīmisks	Atrodas Kozaka sekvencē
eNOS	Rs3918166	cSNP A ³³⁵ → G	Gln112 → Arg	<i>ESE</i>
eNOS	Rs1799983	cSNP C ⁸⁹⁴ → A	Glu298 → Asp	<i>ESE</i>

Izrādījās, ka gaidāmais heterozigotātes indekss ir ļoti atšķirīgs no pētījuma autoru iegūtā rezultāta (gadījumi: iegūtais 0,70; sagaidāmais 0,49; kontroles: iegūtais 0,76, sagaidāmais 0,49). Šī iemesla dēļ genotipēšana tika atkārtota ar MALDI-TOF tehnoloģiju.

BBOX1 gēna SNP C⁻¹ → T genotipēšana ar MALDI TOF tehnoloģiju. Biežāk sastopamā alēle abās pacientu grupās ir C alēle, retāk sastopama T alēle, kaut gan alēļu frekvences ir līdzīgas. C alēles frekvence gadījumu grupā ir 0,89; kontroles grupā – 0,90. T alēles frekvence gadījumu grupā ir 0,11; kontroles grupā – 0,10 (sk. 4. att.). Visbiežāk sastopamais genotips abās grupās ir C/C. Tas novērots ar frekvenci 0,82 gadījumu grupā un 0,80 – kontroles grupā. C/T genotipa frekvence ir 0,15 un 0,20 attiecīgi gadījumu un kontroles grupā. T/T genotips konstatēts ar frekvenci 0,03 gadījumu grupā un ar frekvenci 0,00 kontroles grupā (sk. 5. att.). Apstrādājot iegūtos rezultātus pēc χ^2 kritērija, statistiski ticama atšķirība starp alēļu un genotipu sadali gadījumu un kontroles grupā netika novērota – *p* vērtība lielāka 0,05.

eNOS gēna cSNP A³³⁵ → G genotipēšana

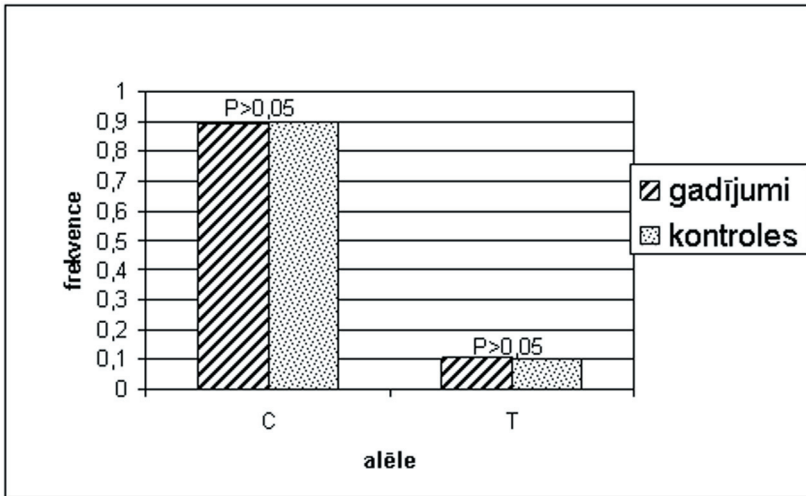
cSNP A³³⁵ → G genotipēšana ar restrikcijas fragmentu analīzi. eNOS gēna polimorfisma cSNP A³³⁵ → G genotipēšana uzsākta ar restrikcijas fragmentu analīzes metodi



3. attēls. eNOS gēna fragmentu shēma
Scheme of eNOS gene fragment

Tumšpelēki – introni, gaišpelēki – eksoni, parādīti SNP (trešajā eksonā – polimorfisms cSNP A³³⁵ → G; septītajā eksonā – polimorfisms cSNP C⁸⁹⁴ → A). Slīpās svītras – tiek izlaists gēna fragments. Zem gēna – SR proteīni sf2 un sc35 un to aptuvenās saistīšanās vietas (bultiņas)

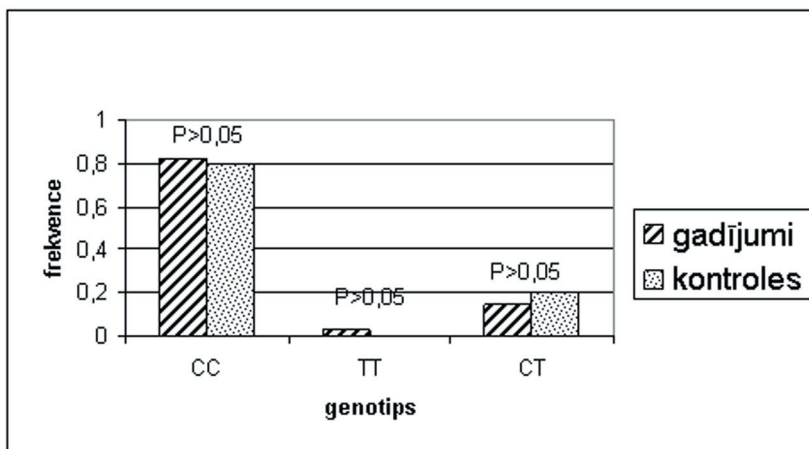
Dark grey - introns, light grey - exons, the SNPs of interest are shown (in exon 3 - polymorphism cSNP A³³⁵ → G; in exon 7 - polymorphism cSNP C⁸⁹⁴ → A)



4. attēls. SNPC⁻¹ → T alēļu frekvences gadījumu un kontroles grupā
Frequencies of SNPC⁻¹ → T alleles in groups of cases and controls

y ass – alēļu frekvence, x ass – alēles. Svīroti stabiņi – alēļu frekvence gadījumu grupā; punktoti stabiņi – alēļu frekvence kontroles grupā. Pa kreisi – C alēles frekvence, pa labi – T alēles frekvence. Virs stabiņiem norādīta p vērtība, kas raksturo alēļu frekvences atšķirības statistisko ticamību starp gadījumu un kontroles grupu.

Lined columns - allele frequencies in cases group, dotted columns - allele frequencies in control group. To the left - Frequency of C allele, to the right - frequency of T allele. p value, which characterizes the difference between the groups, is shown above the columns



5. attēls. $SNPC^{-1} \rightarrow T$ genotipu sadale gadījumu un kontroles grupā
Frequencies of $SNPC^{-1} \rightarrow T$ genotypes in groups of cases and controls

y ass – genotipu frekvence; x ass – genotipi. Svītroti stabiņi – genotipu frekvence gadījumu grupā; punktoti stabiņi – genotipu frekvence kontroles grupā. Pa kreisi – CC genotipa frekvence, vidū – TT genotipa frekvence, pa labi – CT genotipa frekvence. Virs stabiņiem norādīta p vērtība, kas raksturo genotipu frekvences atšķirības statistisko ticamību starp gadījumu un kontroles grupu

Lined columns - genotype frequencies in cases group, dotted columns - genotype frequencies in control group. To the left - frequency of CC genotype, center - frequency of TT genotype, to the right - frequency of CT genotype. p value, which characterizes the difference between the groups, is shown above the columns

24 paraugos. PCR produkta pilnīga restrikcija ar NaeI restriktāzi netika novērota nevienā paraugā. Analizējot reakcijas produktus uz elektroforēzes gela, vienmēr konstatēti sašķeltie fragmenti ar garumu 280 bp un 193 bp un nesašķeltais fragments ar garumu 474. Tādējādi var secināt, ka visos 24 paraugos novērojama heterozigotāte – G/A genotips. Lai pārbaudītu šo rezultātu ticamību, tika sekvencēti 474 bp gari DNS fragmenti, kas satur cSNP A³³⁵ → G pozīcijā 280.

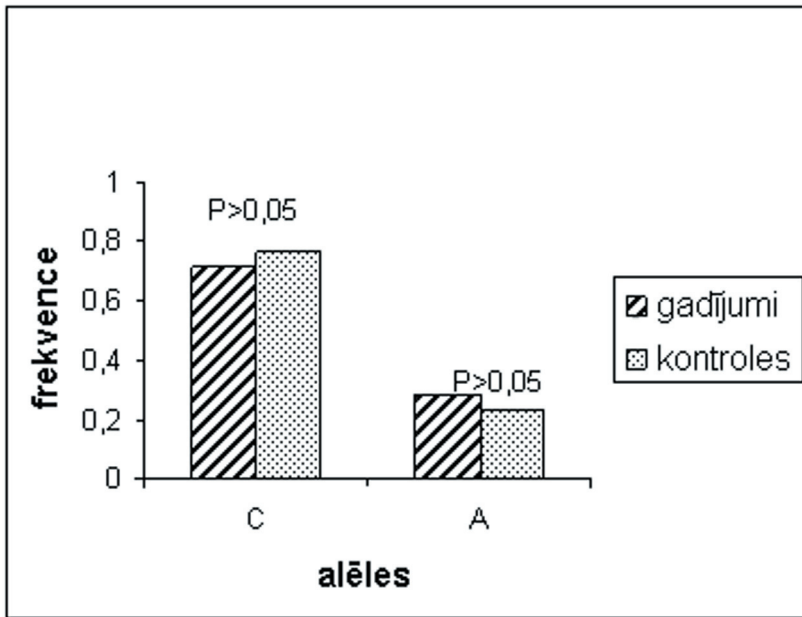
cSNP A³³⁵ → G saturošo fragmentu sekvencēšana. Visos 24 paraugos pēc sekvencēšanas rezultātiem tika novērots GG genotips. Tas nozīmē, ka restrikcijas reakciju neizdevās optimizēt pietiekami, lai nodrošinātu pilnīgu PCR produkta šķelšanu. Tāds rezultāts bija sagaidāms, jo NaeI restriktāzes šķelšanas vieta pieder pie rezistento DNS saītu grupas.

Tā kā šajā gadījumā nebija iespējams atšķirt nepareizus rezultātus no patiesiem rezultātiem, analizējot restrikcijas produktu garumu, visi paraugi tika genotipēti ar MALDI TOF tehnoloģiju.

cSNP A³³⁵ → G genotipēšana ar MALDI TOF tehnoloģiju. Gadījumu un kontroles grupā polimorfismam cSNP A³³⁵ → G novērota tikai G alēle un GG genotips. Tādējādi G alēles un GG genotipa frekvence abās grupās ir 1,00.

eNOS gēna cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšana

eNOS gēna cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšana ar restrikcijas fragmentu analīzi. eNOS gēna polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšana tika uzsākta ar restrikcijas fragmentu analīzes metodi 24 paraugos. Pēc restrikcijas analīzes rezultātiem genotipu sadale ir šāda: CC – 0,63; CA – 0,33; AA – 0,04. Pārbaudot šos rezultātus ar sekvencēšanu, 20% genotips pēc restrikcijas un sekvencēšanas datiem nesakrīta. Tādējādi visi DNS paraugi tika genotipēti ar MALDI TOF Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.



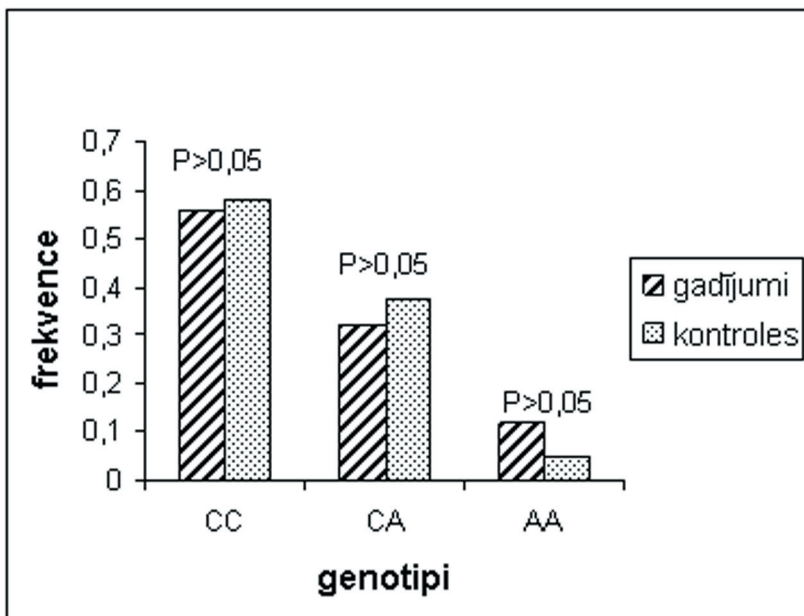
6. attēls. cSNP C⁸⁹⁴ → A alēļu frekvences gadījumu un kontroles grupā
Frequencies of cSNP C⁸⁹⁴ → A alleles in groups of cases and controls

y ass – alēļu frekvence, x ass – alēles. Svītroti stabiņi – alēļu frekvence gadījumu grupā; punktoti stabiņi – alēļu frekvence kontroles grupā. Pa kreisi – C alēles frekvence, pa labi – A alēles frekvence. Virs stabiņiem norādīta p vērtība, kas raksturo alēļu frekvences atšķirības statistisko ticamību starp gadījumu un kontroles grupu

Lined columns - allele frequencies in cases group, dotted columns - allele frequencies in control group. To the left - Frequency of C allele, to the right - frequency of A allele. p value, which characterizes the difference between the groups, is shown above the columns

eNOS gēna cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšana ar MALDI TOF tehnoloģiju. Polimorfismam cSNP C⁸⁹⁴ → A iegūtās alēļu frekvences gadījumu grupā ir šādas: C – 0,72; A – 0,28; kontroles grupā: C – 0,77; A – 0,23 (sk. 6. att.). Statistiski ticama atšķirība starp alēļu frekvencēm gadījumu un kontroles grupā netika novērota ($p > 0,05$).

Visbiežāk sastopamais genotips ir CC genotips – tā frekvences attiecīgi gadījumu un kontroles grupā ir 0,56 un 0,58. CA genotipa frekvence ir 0,32 gadījumu grupā un 0,37



7. attēls. cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipu sadale gadījumu un kontroles grupā

Frequencies of cSNP C⁸⁹⁴ → A genotypes in groups of cases and controls

y ass – genotipu frekvence; x ass – genotipi. Svītroti stabiņi – genotipu frekvence gadījumu grupā; punktoti stabiņi – genotipu frekvence kontroles grupā. Pa kreisi – CC genotipa frekvence, vidū – CA genotipa frekvence, pa labi – AA genotipa frekvence. Virs stabiņiem norādīta p vērtība, kas raksturo genotipu frekvences atšķirības statistisko ticamību starp gadījumu un kontroles grupu

Lined columns - genotype frequencies in cases group, dotted columns - genotype frequencies in control group. To the left - frequency of CC genotype, center - frequency of CA genotype, to the right - frequency of AA genotype. p value, which characterizes the difference between the groups, is shown above the columns

kontroles grupā. AA genotips tika novērots ar frekvenci 0,12 gadījumu grupā un ar frekvenci 0,05 kontroles grupā (sk. 7. att.). Statistiski ticama atšķirība starp genotipu sadali abās pacientu grupās netika novērota, taču AA genotips biežāk sastopams gadījumu grupā (statistiskā varbūtība 0,09).

Gaidāmais heterozigotātes indekss ir 0,41 gadījumu grupai un 0,35 kontroles grupai, tas ir tuvu iegūtajai CA genotipa frekvencei abās pacientu grupās.

Jaunu polimorfismu meklēšana. Tika sekvencēti 24 DNS fragmenti ar garumu 246 bp un polimorfismu cSNP C⁸⁹⁴ → A pozīcijā 160, 24 DNS fragmenti ar garumu 474 bp un polimorfismu cSNP A³³⁵ → G pozīcijā 280, 24 DNS fragmenti ar garumu 300 bp un polimorfismu SNP C⁻¹ → T pozīcijā 130. Iegūtās sekvences (24 katram polimorfismam) tika analizētas ar *Chromas* datorprogrammu, vizuāli meklējot papildu heterozigotus lokusus un ar interneta programmu *Clustalw* salīdzinot iegūtās sekvences FASTA formātā (<http://clustalw.genome.jp/>). Polimorfi rajoni, par kuriem vēl nav ziņots, netika atrasti.

Diskusija

Šis darbs ir veltīts:

- 1) BBOX1 un eNOS gēnu bioinformātiskai analīzei un šo gēnu funkcionāli svarīgo SNP identifikācijai;
- 2) asociācijas meklēšanai starp BBOX1 gēna polimorfismu SNP C⁻¹ → T un eNOS gēna polimorfismu cSNP A³³⁵ → G un cSNP C⁸⁹⁴ → A variantiem un arteriālo hipertensiju gadījumu-kontroles pētījumā.

Pacientu grupu lielums ir 110 gadījumi un 109 kontroles. Visi pacienti ir Latvijas populācijas pārstāvji. Pacientu DNS paraugi atlasīti no Latvijas genoma kolekcijas. Galvenais kritērijs iekļaušanai gadījumu vai kontroles grupā ir attiecīgi arteriālās hipertensijas diagnoze vai tās trūkums.

BBOX1 gēna polimorfisma SNP C⁻¹ → T asociācija ar hipertensiju. Autoriem neizdevās pierādīt BBOX1 gēna polimorfisma SNP C⁻¹ → T asociāciju ar hipertensiju.

Polimorfismam SNP C⁻¹ → T iegūtās alēļu frekvences gadījumu grupā ir: C – 0,89; T – 0,11; kontroles grupā: C – 0,90; T – 0,10. Statistiski ticama atšķirība starp alēļu frekvencēm gadījumu un kontroles grupā netika novērota ($p > 0,05$).

Visbiežāk sastopamais genotips ir CC genotips – tā frekvences attiecīgi gadījumu un kontroles grupā ir 0,82 un 0,80. CT genotipa frekvence ir 0,15 gadījumu grupā un 0,2 kontroles grupā. TT genotips tika novērots ar frekvenci 0,03 gadījumu grupā un ar frekvenci 0 kontroles grupā. Statistiski ticama atšķirība starp genotipu sadali abās pacientu grupās netika novērota, tomēr genotips TT biežāk sastopams gadījumu grupā (varbūtība 7,85%).

Pēdējā laikā palielinās interese par karnitīna metabolisma nozīmi arteriālās hipertensijas etioloģijā un komplikāciju attīstībā. Kreisā kambara funkcija, kas piedalās sirds minūtes tilpuma apjoma noteikšanā (tas hipertensijas attīstības posmā ir palielināts), tiešām ir perifērās asinsvadu pretestības pieauguma svarīgs veicinošais faktors. Līdz šim uzskatīja, ka par palielināto sirds minūtes tilpumu hipertensijas attīstības posmā ir atbildīga paaugstināta adrenerģiskā aktivitāte, taču jāievēro tas, ka šī hipertensijas patoģenēzes elementa attīstībā piedalās arī citi kardiālie faktori, piemēram, karnitīna metabolisms.

No otras puses, viena no hipertensijas komplikācijām ir kreisā kambara hipertrofija, kas attīstās kā atbilde uz paaugstināto perifēro pretestību. Hipertensīva kreisā kambara hipertrofija ir saistīta ar paaugstinātu kardiovaskulāru risku. Pēc Iemitsu (*Iemitsu*) 2003. gadā publicētajiem datiem, hipertensijas slimnieku hipertrofētā sirdī mainās karnitīna metabolismu regulējošo gēnu ekspresija (acil CoA sintāzes, karnitīna palmitoil-transferāzes un izocitrāta dehidrogenāzes gēnu ekspresija) salīdzinājumā ar šo gēnu ekspresiju atlēta sirdī (fizioloģisks sirds hipertrofijas variants). Tripodi (*Tripodi*) 2005. gadā ziņoja par četrus gēnu polimorfismu, kas regulē karnitīna transportu (OCTN2, CPT1A, CPT1B, CPT2), un to saistību ar hipertensīvo kardiomiopātiju. Autori izmantoja 13 SNP un identificēja 23 iespējamus haplotipus, no kuriem 5 haplotipi saistīti ar hipertensīvo kreisā kambara hipertrofiju. Tas ļauj uzskatīt karnitīna transportieru gēnus par potenciāliem kreisā kambara masas modificētajiem hipertensijas gadījumā (43).

Ir dati arī par to, ka propionil-L-karnitīns veicina prostaciklīna sintēzi, izraisot vazorelaksāciju (8). Tādējādi no karnitīna līmeņa serumā zināmā mērā ir atkarīga endotēlija vazorelaksējošo faktoru produkcija, kas ir svarīgs kompensatorais mehānisms paaugstinātās perifērās rezistences apstākļos (5).

Tādējādi, kaut arī pētījumā iegūti negatīvi rezultāti par BBOX1 gēna polimorfisma SNP C⁻¹ → T asociāciju ar hipertensiju, autori uzskata, ka karnitīna metabolismu regulējošo gēnu polimorfisma izpēte ir perspektīvs lauks asociācijas meklēšanai ar hipertensiju. Nākamajos pētījumos vajadzēs paplašināt pētāmo gēnu skaitu.

eNOS gēna polimorfisma cSNP A³³⁵ → G asociācija ar hipertensiju. Uzsākot šo projektu 2005. gada septembrī, polimorfisms cSNP A³³⁵ → G tika izvēlēts tā funkcionālās nozīmes dēļ, kā arī pamatojoties uz NCBI datubāzē sniegto informāciju par šī polimorfisma alēļu sadali (G – 0,42; A – 0,58) un augstu heterozigotātes indeksu (0,39). Latvijas populācijā gadījumu un kontroles grupā polimorfismam cSNP A³³⁵ → G novērota tikai G alēle un GG genotips – to frekvence abās pacientu grupās ir 1,00. Tādējādi var secināt, ka Latvijas populācijā šis eNOS gēna polimorfisms nav piemērots asociācijas meklēšanai ar hipertensiju un citām slimībām. To pierāda arī jauni rezultāti par cSNP A³³⁵ → G polimorfisma genotipēšanu. Piemēram, pēc PGA-*European-Panel* projekta rezultātiem, Eiropas populācijā G alēles un GG genotipa frekvence ir 1,00. A alēli novēro tikai Āfrikas populācijā.

Par eNOS gēna polimorfisma cSNP A³³⁵ → G asociāciju ar hipertensiju ziņojumu literatūrā nav.

eNOS gēna polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A asociācija ar hipertensiju. Pētījumā netika atrasta asociācija starp eNOS gēna polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A (Glu298Asp) variantiem un arteriālo hipertensiju gadījumu un kontroles grupā.

Polimorfismam cSNP C⁸⁹⁴ → A iegūtās alēļu frekvences gadījumu grupā ir: C – 0,72; A – 0,28; kontroles grupā: C – 0,77; A – 0,23. Statistiski ticama atšķirība starp alēļu frekvencēm gadījumu un kontroles grupā netika novērota ($p > 0,05$).

Visbiežāk sastopamais genotips ir CC genotips – tā frekvences attiecīgi gadījumu un kontroles grupā ir 0,56 un 0,58. CA genotipa frekvence ir 0,32 gadījumu grupā un 0,37 kontroles grupā. AA genotips novērots ar frekvenci 0,12 gadījumu grupā un ar frekvenci 0,05 kontroles grupā. Statistiski ticama atšķirība starp genotipu sadali abās pacientu grupās netika novērota, taču AA genotips biežāk sastopams gadījumu grupā (statistiskā varbūtība 0,09).

eNOS gēna polimorfisms cSNP C⁸⁹⁴ → A (Glu298Asp) tiek plaši pētīts kardiovaskulāro patoloģiju kontekstā. Pēc literatūras datiem, šī polimorfisma A alēles un AA genotipa frekvences pieaugums ir asociēts ar spazmatiskās stenokardijas, koronārās sirds slimības, Fabri slimības un citu slimību paaugstinātu risku – slimībām, kuru kopējā pazīme ir endotēlija disfunkcija. Dati par Glu298Asp polimorfisma asociāciju ar hipertensiju ir ļoti pretrunīgi. Pirmie ziņotāji par eNOS polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A asociāciju ar esenciālo hipertensiju bija Miyamoto (*Miyamoto*) 1998. gadā un Lakolejs (*Lacolley*) 1998. gadā. Miyamoto izmantoja gadījumu-kontroles pieeju japāņu populācijā, bet Lakollejs – Francijas slimnīcu un ambulatoro pacientu DNS paraugus. Japāņu pētījumā hipertensīvo pacientu grupā A alēles frekvence bija 10,3%, bet kontroles grupā 5%. Turpretim franču pētījumā aprakstīti pretēji rezultāti, uzrādot gadījumu grupā lielāku C alēles frekvenci gadījumu grupā (0,45 pret 0,28 kontroles grupā).

Šoji (*Shoji*) 2000. gadā konstatēja lielāku A alēles frekvenci (0,128) indivīdiem ar paaugstinātu asinsspiedienu Japānas salas Honšu populācijā.

Jačimova (*Jachymova*) 2001. gadā ziņoja par A alēles ietekmi uz antihipertensīvās terapijas efektivitāti Čehijas populācijā. No 112 hipertensijas pacientiem 74 nepakļāvās konvencionālai antihipertensīvai terapijai. A alēles frekvence hipertensīvo grupā un pret terapiju rezistentu pacientu grupā bija statistiski ticami augstāka nekā kontroles grupā (80 pacienti). Autoriem neizdevās konstatēt statistiski ticamu atšķirību starp alēļu frekvencēm pret terapiju rezistentu pacientu grupā un to pacientu grupā, kuri labi pakļāvās terapijai. Taču bija novērota tendence uz biežāku A alēles sastopamību rezistentu pacientu grupā. Autori izdarīja secinājumu par potenciālo polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A ietekmi uz antihipertensīvās terapijas efektivitāti.

Bonārdo (*Bonnardeaux*), izmantojot sibsū pāru metodi, neatrada saistību starp eNOS genotipu un hipertensiju trīs Francijas lielo kopienu (Parīze, Bordo un Tulūza) indivīdiem.

Divos pētījumos no divām kopienām Japānā (Sjuta un Tokio) arī netika konstatēta asociācija (44, 24).

Bendžafilds (*Benjafield*) 2000. gadā ziņoja par cSNPC⁸⁹⁴ → A polimorfisma asociācijas ar hipertensiju trūkumu angloķeltu austrāliešiem. Pētījumā genotipēti 112 hipertensijas pacienti, kuriem abi vecāki ir hipertensīvi, un 112 normotensīvie cilvēki, kuru abiem vecākiem ir normāls asinsspiediens. Polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A alēles frekvence gadījumu un kontroles grupā bija attiecīgi 0,30 un 0,32. Statistiski ticama atšķirība starp genotipu frekvencēm gadījumu un kontroles grupā netika novērota.

Somu populācijas gadījumu-kontroles pētījumā (23) piedalījās 600 gadījumu grupas pacienti un 600 kontroles grupas pacienti. Polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A asociācija ar paaugstinātu asinsspiedienu netika atrasta. Atšķirību starp genotipu un alēļu frekvencēm starp gadījumu un kontroles grupu nebija (A alēles frekvence bija attiecīgi 0,299 un 0,288).

2005. gadā Volfs (*Wolff*) publicēja datus par pētījumu, kurā polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A asociācija ar hipertensiju meklēta 4219 lielā populācijā (Vācijas ziemeļaustrumu piekrastes reģiona iedzīvotāji). CC, CA un AA genotipu frekvences bija 49,2, 42,0 un attiecīgi 8,8%. A alēles frekvence neatšķīrās normotensīvo un hipertensīvo pacientu grupā (attiecīgi 29,7% un 29,9%). Asociācija netika atrasta starp CA genotipu, A alēles frekvenci un AA homozigotāti un hipertensiju. Tādējādi, kaut arī *in vitro* un *in vivo* pētījumos iegūtie dati liecina par eNOS polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A nozīmi palielinātā ģenētiskajā uzņēmībā pret hipertensiju, tomēr pētījumi cilvēku populācijās tos neapstiprina (45).

Var secināt, ka autoru iegūtās polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A alēļu frekvences atbilst iepriekšējo pētījumu datiem. Iespējams, ka šajā pētījumā novērotā tendence uz biežāku AA genotipa sastopamību hipertensijas gadījumu grupā varētu kļūt par statistiski ticamu atšķirību, paplašinot pacientu grupas. No otras puses, šo tendenci varētu skaidrot ar lielo koronārās sirds slimības pacientu skaitu gadījumu grupā, jo pozitīvu ziņojumu par cSNPC⁸⁹⁴ → A polimorfisma A alēles asociāciju ar koronāro sirds slimību ir vairāk nekā šādu ziņojumu par asociāciju ar hipertensiju.

Apkopojot minēto ziņojumu datus, var secināt, ka polimorfisma cSNPC⁸⁹⁴ → A asociācija ar hipertensiju joprojām nav skaidra. A alēles un AA genotipa frekvence, kurus uzskata par kardiovaskulārā riska noteicējiem, atšķiras dažādās populācijās. Nenoliedzami, ka šī polimorfisma genotipēšanas rezultātus ietekmē arī pētījuma veids un pacientu atlase.

Pētījuma dati norāda uz AA genotipa saistību ar hipertensiju Latvijas populācijā; lai rezultāts kļūtu ticams, jāpalielina kontroles un slimnieku grupa, veicot rūpīgāku slimnieku atlasi.

Grūtības hipertensiju noteicošo ģenētisko faktoru identifikācijā. Hipertensija ir multifaktoriāla slimība ar pierādītu ģenētisko komponenti tās etioloģijā. Tomēr asociācijas pētījumu rezultāti starp hipertensijas kandidātģēnu polimorfismu un hipertensiju bieži nav atkārtojami vai ir pretrunīgi. Viens iemesls tādai nesaskaņai varētu būt tas, ka hipertensiju izraisa nevis viena gēna defekts, bet daudzu ģenētisko faktoru mijiedarbība ar vides un dzīvesveida faktoriem. Cits pretrunīgo rezultātu iemesls ir nespēja adekvāti salīdzināt dažādos pētījumos izmeklētās populācijas. Attiecībā uz populācijām nozīme ir diviem aspektiem. Pirmais ir hipertensijas pacientu un kontroles grupas pacientu atlase. Vairumā gadījumu hipertensijas pacientiem ir arī citas kardiovaskulārās slimības,

kas ietekmē hipertensijas attīstību. Ne mazāk svarīgs faktors ir adekvātas kontroles grupas veidošana. Diemžēl nav vienota uzskata par nepieciešamajiem kritērijiem iekļaušanai hipertensijas kontroles grupā.

Pētīto populāciju salīdzināšanas procesu (tātad arī pētījuma rezultātu interpretāciju) sarežģī tas, ka hipertensiju izraisa vairāku ģenētisko faktoru mijiedarbība, un atsevišķu faktoru loma katrā populācijā var būt atšķirīga. Šo faktoru kopējā iedarbība izraisa hipertensijas attīstību.

Esenciālā hipertensija ir slimība, kuras ģenētisko pamatu izpētei ir jāatrod īpaša pieeja. Iespējams, ka turpmākajos pētījumos vajadzētu ļoti precīzi veikt populāciju atlasī, vairāk uzmanības veltīt iespējamai savstarpējai gēnu mijiedarbībai un ģenētisko faktoru mijiedarbībai ar vides faktoriem.

Alēļspecifiskas PCR metodes un restrikcijas saitu polimorfisma pieejas kļūdainu rezultātu cēloņi

Restrikcijas saitu polimorfisma pieejas kļūdainu rezultātu cēloņi. Strādājot ar NaeI restriktāzi, nevienā paraugā autoriem neizdevās panākt pilnīgu PCR produkta restrikciju. Optimizējot restrikcijas reakciju, tika mainīts šķelšanas laiks (no 1 stundas līdz 16 stundām), restriktāzes koncentrācija (0,5–2 vienības uz 1 µg DNS), DNS daudzums vienā reakcijā (0,3–1 µg DNS). Tomēr nekad netika novērota pilnīga PCR produkta šķelšana, kas būtu saskaņā ar polimorfisma cSNP A³³⁵ → G alēli G, kas vēlāk tika novērota visos genotipētos paraugos ar sekvencēšanas metodi.

Strādājot ar MboI restriktāzi polimorfisma cSNP C⁸⁹⁴ → A genotipēšanā, 24 DNS paraugos novēroti dažādi restrikcijas reakcijas rezultāti, tajā skaitā arī pilnīga PCR produkta šķelšana, kas norāda uz AA genotipu. Taču, pārbaudot restrikcijas reakcijas rezultātus ar sekvencēšanu, 20% gadījumu rezultāts nebija patiess.

Veidojot restrikcijas reakciju, autori bija izmantojuši neattīrītu PCR produktu. Masveida genotipēšanas eksperimentos tādu pieeju lieto vairums molekulārās bioloģijas laboratoriju. Tomēr kļūdaini restrikcijas reakcijas rezultāti lika domāt, ka nepilnvērtīgas šķelšanās iemesls varētu būt Taq polimerāzes un restriktāžu buferu nesaderība, kuras dēļ tiek izjaukta restriktāzei nepieciešamā vide. Ir aprēķinātas izmaiņas restritāžu buferu jonu sastāvā, tās notiek pie 5 µl neattīrītā PCR produkta izmantošanas 20 µl restrikcijas reakcijai. 4. tabulā redzams, ka sāļu koncentrācija *Y⁺/TangoTM* buferī (restriktāzei NaeI) palielinās no 6,6 mM līdz 11,6 mM, kas veido papildu jonu spēku, kā arī palielinās restrikcijas reakcijas bufera pH. 5. tabulā redzams, ka R⁺ buferī (restriktāzei MboI) KCl koncentrācija izmainās no 10 mM līdz 22,5 mM. Tādas izmaiņas restrikcijas reakciju apstākļos varētu kavēt restriktāžu aktivitāti, kas arī izskaidro kļūdainu rezultātu rašanos. Tādējādi, strādājot ar restrikcijas saitu polimorfismu, pirms restrikcijas vajadzētu attīrīt PCR produktu, taču masveida genotipēšanas projektos tas nav iespējams, jo attīrīšanai vajag pārāk daudz laika.

Grūtības darbā ar NaeI restriktāzi varētu noteikt arī tāds faktors kā identisku restrikcijas saitu nevienlīdzīga šķelšana vai „izvēlīga šķelšana”. 1975. gadā Tomass (*Thomas*) un Deiviss (*Davis*) novēroja, ka *EcoRI* šķeļ tās piecus atpazīšanas saitus λ DNS ar dažādu ātrumu un dažādos laika posmos (41). Līdzīgas parādības konstatēja arī pie citu restriktāžu šķelšanas. Šķiet, ka šķelšanas efektivitāti ietekmē tādi faktori kā flankējošās sekvences un restrikcijas saitu daudzums substrātā. Vēl dramatiskāku „izvēlīgu šķelšanu” novēro *EcoRII*, *NaeI*, *NarI*, *SacII*, *HpaII*, *AtuBI*, *BspMI*, *Ksp632I*, *Cfi9I* un *Eco57I*. Strādājot ar šīm restriktāzēm, dažu DNS rajonu pilnīgu šķelšanu nenovēro nekad, pat izmantojot lielu enzīma koncentrāciju vai pagarinātu inkubāciju (13). Iespējams, ka adekvātu NaeI šķelšanas aktivitāte autoru pētījumā netika novērota arī tādēļ, ka polimorfisms cSNP A³³⁵ → G ir DNS rezistentā saita sastāvdaļa.

4. tabula

NaeI restriktāzes bufera izmaiņas pēc neattīrīta PCR produkta pievienošanas
Changes in NaeI buffer composition after addition of non-purified PCR product

1xTaq polimerāzes buferis	1x Y ⁺ /Tango TM buferis	Restriktācijas reakcijas vide pēc 5 μl PCR produkta pievienošanas
75 mM Tris	3,3 mM Tris	22,05 mM Tris
20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	6,6 mM K ⁺ acetāts	11,6 mM sāļi
0,01% Tween	0,01 ng/ml BSA	
1 mM MgCl ₂	1 mM Mg acetāts	1,25 mM Mg ²⁺
pH 8,8	pH 7,9	pH > 7,9

5. tabula

MboI restriktāzes bufera izmaiņas pēc neattīrīta PCR produkta pievienošanas
Changes in MboI buffer composition after addition of non-purified PCR product

1xTaq polimerāzes buferis	1x R ⁺ buferis	Restriktācijas reakcijas vide pēc 5 μl PCR produkta pievienošanas
10 mM Tris	1 mM Tris	6 mM Tris
50 mM KCl	10 mM KCl	22,5 mM KCl
0,8% Nonidet	0,01 ng/ml BSA	
1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	1,25 mM Mg ²⁺
pH 8,8	pH 8,5	pH ≈ 8,5

Alēļspecifiskās PCR metodes kļūdainu rezultātu cēloņi. Genotipējot polimorfismu SNP C⁻¹ → T, tika iegūts daudz viltus pozitīvu rezultātu pēc amplifikācijas ar T-alēļes specifisko praimeru. Izskaidrot šādu parādību ir grūti. Iemesls varētu būt PCR reakcijas nepietiekamā optimizācija, DNS paraugu kvalitāte, praimeru īpašības, arī reparatīvā aktivitāte. Turpmāk plānojot genotipēšanu ar šo metodi, jāvērtina uzlabot visu eksperimenta posmu kvalitāte.

Secinājumi

Šajā darbā nav pierādīta asociācija starp pētītiem BBOX1 un eNOS gēna polimorfismiem un primāru arteriālu hipertensiju. Tomēr ir novērota tendence uz biežāku BBOX1 SNP C⁻¹ → T TT genotipa (varbūtība 7,85) un eNOS cSNP C⁸⁹⁴ → A AA genotipa (varbūtība 0,09) sastopamību arteriālās hipertensijas slimnieku grupā. Šīs parādības turpmāka izpēte ir perspektīvs pētījumu virziens. Alēļspecifiskas PCR metodes un restriktācijas saitu polimorfisma pieeja atsevišķos gadījumos dod kļūdainus rezultātus, tie ir jāpārbauda, izmantojot citas metodes.

Pateicība

Latvijas Biomedicīnas centra darbiniekiem Lienei Ņikitinai-Zaķei un Jānim Kloviņam par palīdzību DNS paraugu atlasē, genotipēšanā un sekvencēšanā.

Literatūra

1. Agarwal A., Williams G. H., Fisher N. D. L. (2005) Genetics of Human Hypertension. In press.
2. Agerholm-Larsen B., Nordestgaard B. G., Tybjærg-Hansen A. (2000) ACE Gene Polymorphism in Cardiovascular Disease: Metaanalyses of Small and Large Studies in Whites. *Atheroscler. Tromb. Vasc. Biol.*, 20, 484–492.

3. Benjafeld A. V., Morris B. J. (2000) Association Analyses of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism in Essential Hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 13, 994–998.
4. Bonnardeaux A., Nadaud S., Charru A., Jeunemaitre X., Corvol P., Soubrier F. (1995) Lack of Evidence for Linkage of the Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Gene to Essential Hypertension. *Circulation*, 91, 96–102.
5. Bueno R., De Sotomayor M. A., Perez-Guerrero C., Gomez-Amores L., Vasquez C., Herrera M. D. (2005) L-carnitine and Propionyl-L-carnitine Improve Endothelial Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats: Different Participation of NO and COX - Products. *Life Sciences*, 77, 2082–2097.
6. Cardillo C., Panza J. A. (1998) Impaired Endothelial Regulation of Vascular Tone in Patients With Systemic Arterial Hypertension. *Vasc. Med.*, 3, 138–144.
7. Christe M. E., Rodgers R. L. (1994) Altered Glucose and Fatty Acid Oxidation in Hearts of the Spontaneously Hypertensive Rat. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 26, 1371–1375.
8. Cippola M. J., Nicoloff A., Rebello T., Amato A., Portes J. M. (1999) Propionyl-L-carnitine Dilates Human Subcutaneous Arteries Through an Endothelium-Dependent Mechanism. *J. Vasc. Surg.*, 29, 1097–1103.
9. Cosentino F., Luscher T. F. (1996) Nitric Oxide and Endothelial Regulation of Vascular Tone. *Methods Neurosci*, 31, 215–228.
10. Digiesi V., Cantini F., Bisi G., Guarino G., Brodbeck B. (1994) L-carnitine Adjuvant Therapy in Essential Hypertension. *La Clinica Terapeutica*, 144, 391–395.
11. Fagard R. H. (1997) Impact of Different Sports and Training on Cardiac Structure and Function. *Cardiol. Clin.*, 15, 397–412.
12. Farfel Z., Henry R., Iiri T. (1999) The Expanding Spectrum of G Protein Diseases. *N. Engl. J. Med.*, 340, 1012–1020.
13. Fermentas 2002–2003, Site Preferences by Restriction Endonucleases, 109.
14. Greenspan F. S., Gardner D. G. (2004) *Basic&Clinical Endocrinology*, 7th edition. McGraw-Hill, 415–437.
15. Guttmacher A. (2003) Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.*, 349, 60–72.
16. Herrera M. D., Bueno R., De Sotomayor M. A., Perez-Guerrero C., Vazquez C. M. (2002) Endothelium-Dependent Vasorelaxation Induced by L-carnitine in Isolated Aorta from Normotensive and Hypertensive Rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1423–1427.
17. Hingorani A. D., Jia H., Stevens P. A., Monteith M. S., Brown M. J. (1995) A Common Variant in Exon 7 of the Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene. *Clin. Sci.*, 88, 21.
18. Iemitsu M., Miyauchi T., Maeda S., Sakai S., Fujii N., Miyazaki H., Kakinuma Y., Matsuda M., Yamaguchi I. (2003) Cardiac Hypertrophy by Hypertension and Exercise Training Exhibits Different Gene Expression of Enzymes in Energy Metabolism. *Hypertens. Res.*, 26, 829–837.
19. Iyer R. N., Khan A. A., Gupta A., Vajifdar B. U., Lokhandwala Y. Y. (2000) L-carnitine Moderately Improves the Exercise Tolerance in Chronic Stable Angina. *J. Ass. Physicians Ind.*, 48, 1050–1052.
20. Jachymova M., Horky K., Bultas J., Kozich V., Jindra A., Peleska J., Martasek P. (2001) Association of the Glu298Asp Polimorphism in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene with Essential Hypertension Resistant to Conventional Therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284, 426–430.
21. Jeerooburkhan N., Jones L. C., Bujec S., Cooper J. A., Miller G. J., Vallance P., Humphries S., Hingorani A. (2001) Genetic and Environmental Determinants of Plasma Nitrogen Oxides and Risk of Ischemic Heart Disease. *Hypertension*, 38, 1054–1061.
22. Kaplan N., Opie L. H. (2006) Controversies in Hypertension. *Lancet*, 367, 168–176.
23. Karvonen J., Kauma H., Kervinen K., Rantala M., Ikaheimo M., Paivansalo M. et al. (2002) Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Glu298Asp Polymorphism and Blood Pressure, Left Ventricular Mass and Carotid Artery Atherosclerosis in a Population-Based Cohort. *J. Intern. Med.*, 251, 102–110.
24. Kato N., Sugiyama T., Morita H., Nabika T., Kurihara H., Yamori Y., Yazaki Y. (1999) Lack of Evidence for Association Between the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Hypertension. *Hypertension*, 33, 933–936.
25. Koopmans R., Insel P., Michel M. (2003) Pharmacogenetics of Hypertension Treatment: a Structured Review. *Pharmacogenetics*, 13, 705–713.
26. Kuznetsova T., Staessen J., Stolarz K., Ryabikov A., Tkhonoff V. et al. (2004) Relationship Between Left Ventricular Mass and the ACE D/O Polymorphism Varies According to Sodium Intake. *J. Hypertens.*, 22, 287–295.
27. Kuznetsova T., Staessen J. A., Wang J. G., Gasowski J., Nikitin Y., Ryabikov A. et al. (2000) Antihypertensive Treatment Modulates the Association between the D/I ACE Gene Polymorphism and Left Ventricular Hypertrophy: a Meta-Analysis. *J. Hum. Hypertens.*, 14, 447–454.

28. Lacolley P., Gautier S., Poirier O., Penier B., Cambien F., Benetos A. (1998) Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism, Blood Pressure and Aortic Stiffness in Normotensive and Hypertensive Subjects. *J. Hypertens.*, 16, 31–35.
29. Lopaschuk G. (2000) Regulation of Carbohydrate Metabolism in Ischemia and Reperfusion. *Am. Heart. J.*, 139, 115–119.
30. Miyamoto Y., Saito Y., Kajijama N., Yoshimura M., Shimasaki Y., Nakayama M. (1998) Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene is Positively Associated with Essential Hypertension. *Hypertension*, 32, 3–8.
31. Naber C. K., Siffert W. (2004) Genetics of Human Arterial Hypertension. *Minerva Med.*, 95, 347–356.
32. Nakamura T., Sugihara H., Kinoshita N. (2000) Can Serum Carnitine Levels Distinguish Hypertrophic Cardiomyopathy from Hypertensive Hearts? *Hypertension*, 36, 215–219.
33. Oemas B. S., Tschudi M. R., Godoy N. (1998) Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. *Circulation*, 97, 2494–2498.
34. Pankow J. S., Rose K. M., Oberman A., Hunt S. C., Atwood L. D. et al (2000) Possible Locus on Chromosome 18 q Influencing Systolic Blood Pressure Changes. *Hypertension*, 36, 471–476.
35. Perola M., Kainulainen K., Pajukanante P., Terwilliger J. D. et al. (2000) Genome-Wide Scan of Predisposing Loci for Increased Diastolic Blood Pressure in Finnish Siblings. *J. Hypertens.*, 18, 1579–1585.
36. Richey P. A., Brown S. P. (1998) Pathological Versus Physiological Left Ventricular Hypertrophy: a Review. *J. Sports Sci.*, 16, 129–141.
37. Rizos I. (2000) Three-Year Survival of Patients with Heart Failure Due to Myocardial Infarction. *Coronary Artery Disease*, 15, 65–71.
38. Shoji M., Tsutaya S., Saito R., Takamatu H., Yasujima M. (2000) Positive Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism with Hypertension in Northern Japan. *Life Sci.*, 66, 2557–2562.
39. Staessen J. A., Wang J. G., Ginacchio G., Petrov V., Saavedra A. P. et al. (1997) The Deletion/Insertion Polymorphism of the Angiotensin Converting Enzyme Gene and Cardiovascular Renal Risk. *J. Hypertens.*, 15, 1579–1592.
40. Stoll M., Kwitek-Black A. E., Cowley A. W., Harris E. L., Horrap S. B., Krieger J. E. et al. (2000) New Target Regions for Human Hypertension Via Comparative Genomics. *Genome Res.*, 10, 473–482.
41. Thomas M., Davis R. W. (1975) Studies on the Cleavage of Bacteriophage Lambda DNA with EcoRI Restriction Endonuclease. *J. Mol. Biol.*, 91, 315–328.
42. Tomaszewski M., Brain N., Chanchar F., Wang W., Lacka B., Padmanabhan S. et al (2002) Essential Hypertension and β_2 -adrenergic Receptor Gene. Linkage and Association Analysis. *Hypertension*, 40, 286–291.
43. Tripodi G., Modica R., Stella A., Bigatti G., Bianchi G., Stella P. (2005). Haplotype Analysis of Carnitine Transporters and Left Ventricular Mass in Human Essential Hypertension. *J. Renal. Nutrition*, 1, 2–7.
44. Tsujita Y., Baba S., Yamauchi R., Mannami T., Kinoshita M., Yamamoto R. et al. (2001) Association Analyses Between Genetic Polymorphisms of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Hypertension in Japanese: The Suita Study. *J. Hypertens.*, 19, 1941–1948.
45. Wolff B., Grabe H.-J., Schlüter C., Popowski K., Völzke H., Lüdermann J., John U., Felix S. B., Cascorbi I. (2005) Endothelial Nitric Oxide Synthase Glu298Asp Gene Polymorphism, Blood Pressure and Hypertension in a General Population Sample. *J. Hypertens.*, 23, 1361–1366.

Summary

Arterial hypertension is a common and complex cardiovascular disease caused by many interacting factors, such as heredity, lifestyle and environment. The main elements in the pathophysiology of hypertension are increased peripheral vascular resistance and left ventricular dysfunction. Endothelial dysfunction and left ventricular hypertrophy promote the steady increase in blood pressure values and are associated with a high risk of cardiovascular complications. That is why the polymorphism of genes involved in carnitine synthesis and transport, as well as genes regulating nitric oxide synthesis are of potential interest for hypertension studies. In this study, gamma-butyrobetaine hydroxylase (BBOX1) gene and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene have been studied in association with hypertension. BBOX1 catalyzes the synthesis of carnitine from gamma-butyrobetaine. eNOS is responsible for NO synthesis, which produces relaxation of endothelium. The goal of this work was to analyse BBOX1 and eNOS genes and their polymorphic loci and to find the possible association of the chosen markers with hypertension in case/control study.

The DNA samples were obtained from the Latvian genome collection. BBOX1 and eNOS genes were analysed with the help of data bases NCBI and Pupa SNP. Genotyping with MALDI TOF technology and sequencing have been performed in the Latvian Center of Biomedicine. For statistical analyses, Microsoft Word Excel and Fisher's & Chi programme were used.

In BBOX1 gene, 241 single nucleotide polymorphisms (further SNP) were found. In eNOS gene, 162 SNPs were found. In BBOX1 gene, SNP C⁻¹ → T was chosen for genotyping. In eNOS gene, cSNP A³³⁵ → G and cSNP C⁸⁹⁴ → A were chosen for genotyping. No statistically significant association was found between the studied polymorphisms and human arterial hypertension. In the Latvian population, only allele G of cSNP A 335 → G was observed. For cSNP C 894 → A, genotype AA a tendency for increase in the group of cases was observed.

None of the studied polymorphisms were associated with arterial hypertension in the Latvian population, however genotype TT of BBOX1 gene polymorphism SNP C⁻¹ → T and AA genotype of eNOS polymorphism cSNP C⁸⁹⁴ → A were observed more often in the group of cases.

Key words: arterial hypertension, BBOX1 gene, eNOS gene, polymorphism, Latvian population.