

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



**LEIKOTRIĒNA B₄ UN LIPOKSĪNA A₄ LOMA PLAUŠAUDU
IEKAISUMA HRONIZĀCIJAS PATOĢENĒZĒ**

Līga Balode

PROMOCIJAS DARBS MEDICĪNAS ZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA
IEGŪŠANAI PATOLOĢIJAS APAKŠNOZARĒ

Rīga, 2013

Darba zinātniskais vadītājs:

Medicīnas zinātņu habilitētais doktors, LU profesors Immanuels Taivans

Recenzenti:

Dr. habil. biol., prof. Nikolajs Sjakste

Dr. biol., asoc. prof. Andrejs Šķesters

Dr. habil. med., prof. Vaiva Lesauskaite

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Dr. med., prof. Valdis Pīrāgs

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm., doc. Kristīne Saleniece

Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts:



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē”.

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

KOPSAVILKUMS

Hronisku obstruktīvu plaušu slimību (HOPS) raksturo iekaisuma persistence lielajos un mazajos elpceļos, kuru izraisa netipiska iekaisuma reakcija pret kaitīgu aģentu, kas turpinās arī tad, kad šis kairinātājs vairs nedarbojas. Iekaisuma persistencees iemesls joprojām nav noskaidrots. Viens to iespējamiem mehānismiem varētu būt iekaisuma nespēja atrisināties sakarā ar iekaisumu veicinošo un iekaisumu samazinošo mediatoru disbalansu.

Tā kā iekaisuma procesa regulācijā ir iesaistīti arahidonskābes derivāti – leukotriēns B_4 (LtB_4) un lipoksīns A_4 (LXA_4) - , par pētījuma mērķi izvirzījām noskaidrot kādu lomu HOPS patoģenēzē tie spēlē. Salīdzinājām, kā šo savienojumu koncentrācija izmainās inducētajās krēpās akūtas pneimonijas un HOPS saasinājuma gadījumā.

Darbā pētījām arī LXA_4 un LtB_4 saturu izelpas gaisa kondensātā. Iegūtie dati liecina, ka to koncentrācija kondensātā ir niecīga, bieži zem noteikšanas sliekšņa un stipri variē vienas grupas ietvaros, tāpēc tā pielietojums nākotnē varētu būt ierobežots. Izelpas gaisa kondensātā LtB_4/LXA_4 attiecība HOPS pacientiem bija samazināta salīdzinājumā ar pneimonijas pacientiem.

Rezultāti parādīja, ka aptuveni nedēļu pēc akūta iekaisuma vai slimības paasinājuma sākuma LXA_4 līmenis inducētajās krēpās abām pacientu grupām bija samazināts. Pneimonijas pacientiem LtB_4 līmenis bija zemāks nekā kontroles grupai, savukārt HOPS pacientiem tas būtiski neatšķīrās no veselajiem indivīdiem. Tai pat laikā LtB_4/LXA_4 proporcija krēpās HOPS pacientu grupā bija būtiski paaugstināta salīdzinājumā gan ar kontroles grupu, gan pneimonijas pacientiem. Palielināta LXA_4 receptora (ALXR) ekspresija absolūtos skaitļos tika novērota HOPS pacientu krēpu polimorfonukleārajās un mononukleārajās šūnās. Savukārt plaušu audu materiālā, kas tika iegūts operācijas laikā, HOPS pacientiem tika novērota samazināta ALXR ekspresija salīdzinājumā ar pārējām grupām, un tā būtiski atšķīrās no ALXR ekspresijas asimptomātisku smēķētāju audos.

Samazinātā LtB_4 koncentrācija pneimonijas pacientu inducētajās krēpās norāda uz akūta iekaisuma spēju atrisināties, kamēr paaugstinātā mediatora koncentrācija HOPS pacientiem (salīdzinājumā ar akūtu iekaisumu) liek domāt par LtB_4 lomu iekaisuma persistencē. Tāpat uz iekaisuma nespēju atrisināties norāda zemā LXA_4 koncentrācija

un paaugstinātā LXA₄ receptora ekspresija HOPS pacientu krēpās, veicinot receptora saistīšanos ar tā iekaisuma veicinošiem ligandiem, uzturot pastāvīgu akūtu iekaisumu. Savukārt zemā LXA₄ receptora ekspresija stabilu HOPS pacientu plaušu audos salīdzinājumā ar asimptomātiskiem smēķētājiem varētu norādīt uz to, ka HOPS pacientiem ir nomākta šī aizsargreakcija pret cigarešu dūmu izraisītajiem kaitīgajiem efektiem plaušās.

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized with inflammation persistence in large and small airways that is caused by abnormal inflammatory reaction to noxious agents and that persists even when this irritant is not present any more. The reason of the persistence of inflammation is still unknown. One of the probable mechanisms may be the inability of inflammation to resolve due to the disbalance of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators.

Since in the regulation of inflammatory process are involved lipoxygenases-derived arachidonic acid metabolites – leukotriene B₄ (LtB₄) and lipoxin A₄ (LXA₄) – as the aim of this study we determined to clarify the role of these mediators in the pathogenesis of COPD. As well as we compared how changes the concentration of these compounds in induced sputum in acute pneumonia and exacerbation of COPD.

We have studied the content of LXA₄ and LtB₄ in exhaled breath condensate. Obtained data indicate that the concentrations in the condensate are very small, often under the detection limit and strongly varies in one group therefore its use in the future may be very limited. In exhaled breath condensate the ratio LtB₄/LXA₄ in COPD was decreased compared to pneumonia.

Our data showed that approximately one week after the beginning of acute inflammation or exacerbation onset LXA₄ level was reduced in induced sputum of both patient's groups. In pneumonia patients LtB₄ concentration was reduced compared to healthy controls, whereas in COPD patients it did not significantly differ from healthy individuals. At the same time LtB₄/LXA₄ ratio in sputum in COPD patients was significantly increased compared to healthy controls, as well as pneumonia's patients. The highest expression of LXA₄ receptor (ALXR) in absolute count was determined in COPD patient's sputum mononuclear and polymorphonuclear cells. In lung tissue samples that were obtained during lung surgery the highest ALXR expression was observed in asymptomatic smokers and it differed significantly from ALXR expression in COPD patient's lung tissue.

Decreased sputum LtB₄ concentration in pneumonia patients indicates the ability of acute inflammation to resolve while increased level of this mediator in COPD patients (compared to acute inflammation) suggests of LtB₄ role in persistence of an

inflammation. Item the persistence of the inflammation denotes low LXA₄ concentration and increased expression of LXA₄ receptor in sputum of COPD patients, favouring receptor's binding with its pro-inflammatory ligands maintaining persistent acute inflammation. Whereas, low expression of LXA₄ receptor in lung tissue of stable COPD patients compared to asymptomatic smokers indicates that this defence reaction to noxious effects of cigarette smoke in COPD patients is suppressed.

SAĪSINĀJUMI

AA - arahidonskābe

ABH - ABO asins grupu antigēni organisma šķidrums

AChE - acetilholīnesterāze

AhR - arilohļūdeņraža receptors

AHR - elpceļu hiperreaktivitāte

Akt - proteīna kināze B

ALXR - lipoksīna A₄ receptors

AM - alveolārais makrofāgs

ANXA1 - aneksīns A1

AP-1 - aktivācijas proteīns 1

ATF - adenozīna trifosfāts

ATL - aspirīna ietekmē veidotais lipoksīns

Aβ₄₂ - amiloīda β peptīds 42

BAFF - B šūnu aktivējošais faktors

BAL - bronhu alveolārais skalojums

BALT - ar bronhiem saistītie limfoīdie audi

BLt - LtB₄ receptors

BPI - īsā sāpju izmeklēšanas shēma

Ca²⁺ - kalcija joni

cAMP - cikliskais adenozīna monofosfāts

CCL - hemokīna (C-C tipa) ligands

CCR - C-C hemokīna receptors

CF - cistiskā fibroze

CINC-1 - citokīna inducēts neitrofilo leikocītu hemotakses aģents 1

CK β 8-1 - cilvēka β hemokīns

COX-2 - ciklooksigenāze 2

cPLA₂ - citosoliskā fosfolipāze A₂

CRO - C reaktīvais proteīns

CS - kortikosteroīdi

CTGF - saistaudu augšanas faktors

CTGFR - saistaudu augšanas faktora receptors

CXCL - hemokīna (C-X-C tipa) ligands

CXCR - hemokīna (C-X-C tipa) receptors

CYP4F3 - LtB₄ omega hidroksilāzi 2 kodējošais gēns

cys-Lts - cisteinilleikotriēni

cysLt₁ - cisteinilleikotriēna receptors 1

cysLt₂ - cisteinilleikotriēna receptors 2

DAB - 3,3'-diaminobenzidīns

DAMP – ar bojājumiem saistītās molekulārās struktūras

EBC - izelpas gaisa kondensāts

EGF - epidermālais augšanas faktors

ELISA - ar enzīmu saistītā imūnanalīze

EPA - eikosapentānskābe

ERK - ekstracelulāro signālu regulējošā kināze

FEF - forsētas izelpas plūsmas vidējais ātrums

FEV₁ - forsētas izelpas tilpums pirmajā sekundē, kas veikta pēc pilnas ieelpas

FEV₁/FVC - Tifno indekss

FLAP - 5-lipoksigenāzi aktivējošais proteīns

fMLP - N-formil peptīda receptors

FPR - formil peptīda receptors

FPRL-1 / ALXR - lipoksīna A₄ receptors

FVC - forsētā vitālā kapacitāte

G-CSF - granulocītu koloniju stimulējošais faktors

GM-CSF - granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošais faktors

GOLD - Globālā Obstruktīvā Plaušu Slimība

GPCR - ar G proteīnu saistītais receptors

GTF - guanozīna trifosfāts

Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, G_O, G_Z un Gα₁₆ – G proteīna apakšvienības

HAT - hormonu aizstājējterapija

HAT - histonu acetiltransferāze

HCl - sālsskābe

HDAC2 - histonu deacetylāze 2

HOPS - hroniska obstruktīva plaušu slimība

HUVEC - cilvēka nabassaites vēnas endotēlija šūnas

H₂O₂ - hidrogēna peroksīds

iBALT - inducējamie, ar bronhiem saistītie limfoīdie audi

ICS - inhalējamie kortikosteroīdi

IgG – imūnglobulīns G

IL - interleikīns

IFN- γ - interferons γ

IP3 - inozitola trifosfāts

I κ B α - kapa vieglā polipeptīda gēna nukleārā faktora B šūnu inhibitorā α

kDa - kilodaltons

ĶMI - ķermeņa masas indekss

LPS - lipopolisaharīds

Lts - leukotriēni

LtA₄ - leukotriēns A₄

LtB₄ - leukotriēns B₄

LtC₄ - leukotriēns C₄

LtD₄ – leukotriēns D₄

LSP-1 - limfocītu specifiskais proteīns 1

LXA₄ - lipoksīns A₄

LXB₄ - lipoksīns B₄

LXs - lipoksīni

Mac-1 - makrofāga 1 antigēns

MAPK - mitogēn-aktivētā proteīnkināze

MCP-1 - monocītu hemotakses proteīns-1

MEF - maksimālās plūsmas ātrums forsētā izelpā

MHC - lielais audu saderības komplekss

MIP-1 α – makrofāgu iekaisuma faktors-1 α

MMP - matricas metaloproteināze

MN - mononukleārās šūnas

MPO - mieloperoksidāze

MUC5AC - gēns, kas kodē proteīnu mucīnu-5AC

NaCl - nātrija hlorīds

NK - dabīgās galētājšūnas

NF- κ B - nukleārais faktors kapa B

NO - slāpekļa oksīds

O₂⁻ - superoksīda anjons

OER - oksoeikosanoīdu reduktāze

p – statistiskā ticamība

PAF - trombocītu aktivācijas faktors

PDGF - trombocītu izcelsmes augšanas faktors

PDGFR β - trombocītu izcelsmes augšanas faktora receptors β

PEF - izelpas maksimālpļūsma

PGD₂ - prostaglandīns D₂

PGE₂ - prostaglandīns E₂

PGF_{2 α} – prostaglandīns F_{2 α}

PIPP - poliizoprēna fosfāts

PI3K- δ - fosfoinozitīda-3-kināze δ

PI-3 – fosfora trijodīds

PKC - proteīna kināze C

PLA₂ - fosfolipāze A₂

PLD - fosfolipāze D

PMN - polinukleārie leikocīti (neitrofilie leikocīti)

PPAR α - peroksisomu proliferatora aktivētais receptors α

PrP₁₀₆₋₁₂₆ - priona proteīns 106-126

PRR - struktūru atpazīstošais receptors

PSDP - preskalēna difosfāts

PVO - Pasaules Veslības organizācija

r – korelācijas koeficients

r² – determinācijas koeficients

RAGE - neenzimātisko glikozilēto galaproduktu receptors

RANTES - signālmolekula ar nosaukumu „aktivācijas regulēta, normālu T šūnu ekspresēta un sekretēta”

RhoA - Ras homologa gēnu saimes A loceklis

ROS - skābekļa reaktīvie savienojumi

SAA - seruma amiloīds A

SHP-2 – tirozīna fosfatāze

SIRT1 - sirtuīnu 1 kodējošais gēns

SOCS-2 - citokīnu signalizācijas supresors 2

TGF- β - transformējošais augšanas faktors β

Th - T *helper* šūnas

TIMP - metaloproteināžu audu inhibitori

TLR - Toll-līdzīgais receptors

TNF- α - tumora nekrozes faktors α

TX - tromboksāns

uPA - urokināzes plazminogēna aktivators

VEGF - vaskulārā endotēlija augšanas faktors

VEGFR – vaskulārā endotēlija augšanas faktora receptors

ZO-1 – endotēlija blīvos savienojumus veidojošais proteīns

α1-AT - α1-antitripsīns

5-HPETE - 5-hidroperoksieikosatetraēnskābe

5-LO - 5-lipoksigenāze

8-iso-PGF_{2α} - 8-izo-prostaglandīns F_{2α}

12-LO - 12-lipoksigenāze

15-LO - 15-lipoksigenāze

15S-HETE - 15-hidroksieikosatetraēnskābe

15-PGDH - 15-hidroksi/oksoeikosanoīdā oksireduktāze

%CV - variācijas koeficients

SATURA RĀDĪTĀJS

1. IEVADS.....	20
2. LITERATŪRAS APSKATS.....	23
2.1. Hroniska obstruktīva plaušu slimība	23
2.1.1. Definīcija	23
2.1.1.1. Emfizēma	23
2.1.1.2. Sīko elpceļu slimība - bronhiolīts.....	23
2.1.1.3. Hronisks bronhīts.....	24
2.1.1.4. Sistēmiskās izpausmes.....	24
2.1.1.5. GOLD smaguma pakāpes	24
2.1.2. Izplatība	25
2.1.3. Riska faktori.....	27
2.1.3.1. Gēni.....	27
2.1.3.2. Inhalējamās substances	28
2.1.3.3. Dzimums	29
2.1.3.4. Infekcijas.....	29
2.1.3.5. Bronhiālā astma	30
2.1.3.6. Sociāli ekonomiskais statuss.....	30
2.1.4. HOPS patoģenēze	30
2.1.4.1. Iekaisums. Nespecifiskā imunitāte	32
2.1.4.1.1. Makrofāgi un neitrofilie leukocīti.....	34
2.1.4.1.2. Epiteliālās šūnas	35

2.1.4.1.3. Tuklās šūnas.....	35
2.1.4.1.4. Dabīgās galētājšūnas	35
2.1.4.1.5. Dendrītiskās šūnas.....	36
2.1.4.2. Iedzimtās (specifiskās) imunitātes mehānismi.....	36
2.1.4.2.1. T šūnas.....	36
2.1.4.2.2. B šūnas.....	37
2.1.4.3. Proteāzes un antiproteāzes	38
2.1.4.4. Oksidatīvā stresa nozīme plaušās	39
2.1.4.5. Iekaisuma persistence	41
2.1.4.6. Faktori, kas uztur iekaisuma procesu HOPS slimniekiem.....	41
2.2. Arahidonskābe.....	42
2.3. Eikosanoīdi.....	43
2.4. Leikotriēni.....	43
2.4.1. Veidošanās.....	43
2.4.2. Leikotriēna B ₄ inaktivācija	45
2.4.3. Leikotriēna B ₄ receptori	46
2.4.4. Leikotriēna B ₄ darbība.....	46
2.5. Iekaisuma atrisināšanās.....	47
2.6. Lipoksīni	48
2.6.1. Lipoksīnu biosintēze	49
2.6.1.1. Lipoksīnu sintēze šūnu mijiedarbības rezultātā 15-LO un 12-LO ietekmē	50
2.6.1.2. 5-LO iniciēta lipoksīnu veidošanās	51

2.6.1.3. Lipoksīnu sintēze no iekšējiem lipīdu avotiem	52
2.6.1.4. Aspirīna ietekmē izveidojušies lipoksīni - ATL.....	52
2.6.2. Lipoksīnu inaktivācija	53
2.6.3. Lipoksīnu darbība	54
2.6.4. Lipoksīnus saistošie receptori.....	61
2.6.5. Lipoksīna A ₄ receptors	61
2.7. Lipoksigenāzes atvasinātie mediatori respiratoro slimību gadījumā.....	66
2.7.1. LtB ₄ un LXA ₄ hroniskas obstruktīvas plaušu slimības gadījumā.....	66
2.8. Lipoksīni iekaisuma un slimības apstākļos.....	68
3. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI.....	72
4. PACIENTI UN IZMANTOTĀS METODES.....	73
4.1. Pētījuma norise un iesaistītās pacientu un veselo cilvēku grupas	73
4.2. Izelpas gaisa kondensāta ieguve.....	74
4.3. Bronhodilatācijas tests.....	74
4.4. Krēpu indukcija	75
4.5. Inducēto krēpu pirmaprāde.....	76
4.5.1. Krēpu šūnu krāsošana pēc Meja-Grīnvalda-Gimzes metodes	77
4.6. Lipoksīna A ₄ receptora imūncitoķīmiska identifikācija krēpu šūnās	78
4.7. Bioķīmiskās analīzes	79
4.7.1. Izelpas gaisa kondensāta paraugu koncentrēšana	79
4.7.2. Krēpu supernatanta sagatavošana ELISA analīzei.....	79
4.7.3. Leikotriēna B ₄ noteikšana.....	79

4.7.4. Lipoksīna A ₄ noteikšana	84
4.8. Plaušu audu parauga iegūšana operācijas laikā un tā apstrāde	87
4.9. Lipoksīna A ₄ receptora imunoloģiska identifikācija plaušu audu paraugā.....	87
4.10. Datu statistiskā analīze.....	89
5. REZULTĀTI.....	92
5.1. Pētījumā iesaistīto personu raksturojums	92
5.2. Eikosanoīdu daudzums izelpas gaisa kondensātā	93
5.2.1. Alveolārā izelpas gaisa kondensāta frakcija.....	94
5.2.2. Bronhiālā izelpas gaisa kondensāta frakcija.....	95
5.2.3. Kopējais izelpas gaisa kondensāts (alveolārā + bronhiālā frakcija)	95
5.3. Šūnu spektrs inducētajās krēpās	97
5.4. Eikosanoīdi inducētajās krēpās	101
5.5. Lipoksīna A ₄ receptora ekspresija krēpu šūnās.....	103
5.6. Eikosanoīdu koncentrācijas un LXA ₄ receptora ekspresijas krēpās atkarība no atraššanās dienas stacionārā	106
5.7. Rezultātu savstarpējās saistības.....	109
5.7.1. LXA ₄ koncentrācija inducētajās krēpās	109
5.7.2. LtB ₄ /LXA ₄ attiecība krēpās	113
5.7.3. LtB ₄ alveolārajā izelpas gaisa kondensāta frakcijā.....	116
5.7.4. LtB ₄ /LXA ₄ attiecība alveolārajā izelpas gaisa kondensāta frakcijā.....	118
5.7.5. LtB ₄ /LXA ₄ attiecība kopējā (alveolārā + bronhiālā frakcija) izelpas gaisa kondensātā.....	120

5.8. Lipoksīna A ₄ receptora ekspresija plaušu audos	122
6. DISKUSIJA	126
6.1. LtB ₄ un LXA ₄ izelpas gaisa kondensātā	126
6.2. Eikosanoīdi inducētajās krēpās	132
6.3. Lipoksīna A ₄ receptora ekspresija krēpu šūnās	137
6.4. Lipoksīna A ₄ receptora ekspresija plaušu audos	141
7. SECINĀJUMI	142
8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	143
9. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTUS ATSPoguĻOJOŠO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	165
10. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTU PREZENTĀCIJAS KONFERENCĒS	166
11. PATEICĪBAS	168

1. IEVADS

Hroniska obstruktīva plaušu slimība ir plaši izplatīta iekaisīga saslimšana visā pasaulē, kas īpaši skar cilvēkus pusmūžā un vēlāk. Pēdējo divu desmitgažu laikā turpina pieaugt arī mirstība no HOPS, īpaši sieviešu vidū (Eisner *et al.*, 2010), un tā turpinās palielināties lielā smēķējošo cilvēku skaita dēļ, īpaši pieaugot sieviešu smēķētāju skaitam, un pasaules populācijai „novecojot” sakarā ar vidējā dzīves ilguma palielināšanos (Halbert *et al.*, 2006; Buist *et al.*, 2007). Pēc Pasaules Veselības Organizācijas (PVO) datiem 2001. gadā HOPS bija piektais biežākais nāves iemesls attīstītajās pasaules valstīs, sastādot 3-8% no kopējā nāves iemeslu skaita, un sestais biežākais nāves iemesls jaunattīstības valstīs, sastādot 4-9% no kopējā nāves iemeslu skaita (Mannino, Buist, 2007), bet tiek lēsts, ka 2020. gadā HOPS jau būs trešais biežākais nāves iemesls pasaulē (Buist *et al.*, 2007). Efektīvas terapijas, kas izārstē šo slimību, vēl joprojām nav. Vienīgā acīmredzamā ārstēšanas metode, kas samazina slimības attīstības ātrumu un attālina mirstību, ir smēķēšanas pārtraukšana un skābekļa terapija (Eisner *et al.*, 2010).

Klīniski nozīmīgs HOPS ir diagnosticēts 9-10% cilvēku no pasaules populācijas vecumā virs 40 gadiem (Halbert *et al.*, 2006), tomēr šis skaitlis neatspoguļo patieso situāciju, jo daudziem cilvēkiem slimība netiek diagnosticēta, jo viņi nevērsas pie ārsta, īpaši valstīs ar zemiem ienākumiem un jaunattīstības valstīs.

HOPS raksturo progresējoša gaisa plūsmas samazināšanās sakarā ar elpceļu sašaurināšanos, kas nav pilnīgi atgriezeniska (Chilosi *et al.*, 2012). Galvenais slimības iemesls ir smēķēšana. Tomēr, lai gan visiem smēķētājiem elpceļos un plaušās var novērot iekaisumu, tikai nelielai daļai (vidēji 15-25% smēķētāju (Roth, 2008)) attīstās klīniski nozīmīga slimība. Tas liek domāt, ka pastāv vēl nenoskaidroti faktori, kas veicina HOPS attīstību. Iespējams, ka slimības patoģenēzē nozīme ir arī ģenētiskajai predispozīcijai (Sevenoaks, Stockley, 2006), kas nosaka indivīda jutīgumu pret cigarešu dūmu un to komponentu izsuktajiem efektiem elpceļos. Tāpat jāmin, ka HOPS izraisa arī citi faktori, jo aptuveni 5% no visiem pacientiem ir nesmēķētāji. Slimību var izraisīt individuāla uzņēmība pret izplūdes gāzēm, industriālajiem putekļiem, mājāsaimniecībā izmantoto apkures veidu (piem., cietais kurināmais materiāls), tāpat dažas bērnībā pārciestas infekcijas slimības vēlākā dzīves laikā var palielināt risku saslimšanai ar HOPS. HOPS pacientiem novēro izmainītu plaušu iekaisuma reakciju pret kaitīgo aģentu (Kardos, Keenan, 2006; Provinciali *et al.*,

2011), kura persistē, un plaušu ventilācijas funkcija turpina samazināties, pat pārtraucot slimību izraisošo aģenta iedarbību (Roth, 2008). Precīzs iemesls šai persistencei nav zināms. Mūsu hipotēze HOPS iekaisuma persistencei ir tā nespēja atrisināties, kas saistīta ar iekaisumu veicinošā mediatora leikotriēna B₄ (LtB₄) un iekaisumu samazinošā aģenta lipoksīna A₄ (LXA₄) koncentrācijas disbalansu.

LXA₄ ir galvenais lipīdu izcelsmes iekaisumu samazinošs mediators (Bannenberg, Serhan, 2010), kas pirmais tiek iesaistīts iekaisuma limitācijas procesā, tādējādi kalpojot par iekaisuma stop signālu (Serhan, 2002; Schwab, Serhan, 2006). Lipoksīni ir arahidonskābes derivāti, kas veidojas lokāli iekaisuma vietā 5-lipoksigenāzes (5-LO), 12-LO vai 15-LO klātbūtnē. 5-LO ir galvenais enzīms LXA₄ sintēzes procesā; lai gan galvenais fermenta produkts ir leikotriēns A₄ (LtA₄), kas LtA₄ hidrolāzes ietekmē tiek pārveidots par LtB₄. Savukārt trombocītos, 12-LO iedarbojoties uz LtA₄, tas tiek pārvērsts par iekaisumu samazinošo mediatoru LXA₄ un tālāk par lipoksīnu B₄ (LXB₄), (Haworth, Levy, 2007; Ryan, Godson, 2010). Tātad pirmais LXA₄ sintēzes posms ir iekaisumu veicinošo leikotriēnu veidošanās, LXA₄ tiek uzskatīts par LtB₄ antagonistu, un lipoksīnu sintēze sākas līdz ar iekaisuma procesu (Haworth, Levy, 2007). LtB₄ ir spēcīgākais neitrofilo leikocītu (PMN) hemotakses aģents (Serhan, 2002). Tāpat LtB₄ aktivē PMN iekaisuma vietā (Widegren *et al.*, 2011), ierosina reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) atbrīvošanu no granulocītiem, inducē lizosomālo enzīmu atbrīvošanu, palielina vaskulāro caurlaidību, uzlabo lokālo asinsplūsmu. Lipoksīni var veidoties arī epiteliālajās šūnās 15-LO klātbūtnē. Šī enzīma produkts 15S-hidroperoksieikosatetraēnskābe (15S-HETE) tālāk leikocītos 5-LO ietekmē tiek pārveidota par LXA₄ (McMahon, Godson, 2004).

Lipoksīni veicina iekaisuma atrisināšanos. LXA₄ inhibē PMN hemotaksi, transmigrāciju caur postkapilārajām vēnulām, superanžona veidošanos, azurofīlo granulu degranulāciju (Serhan, 2007) un eozinofīlo leikocītu sastrēgumu (Bandeira-Melo *et al.*, 2000), stimulē apoptisko PMN fagocitozi, ko veic makrofāgi (Godson *et al.*, 2000), samazina vaskulāro caurlaidību (Schwab, Serhan, 2006), bloķē dabīgo galētājšūnu (NK) citotoksicitāti (Haworth, Levy, 2007) un tumora nekrozes faktora (TNF)-α atbrīvošanu no T šūnām (Ariel *et al.*, 2003). LXA₄ piemīt anti-fibrotiska darbība (Rodgers *et al.*, 2005).

LXA₄ savu darbību veic, saistoties ar specifisku G proteīna saistīto LXA₄ receptoru (ALXR). Ir pierādīts, ka palielināta ALXR ekspresija saistīta ar ievērojamu PMN

infiltrācijas samazināšanos (Schwab, Serhan, 2006), samazinot PMN hemotaksi, transendoteliālu migrāciju un degranulāciju (Bannenberg, Serhan, 2010). ALXR signalizācija PMN notiek, pārveidojot poliizoprenilfosfātu (PIPP) un inhibējot leukocītu specifiskā proteīna-1 fosforilāciju, kas samazina p38-mitogēn-aktivētās proteīna kināzes kaskādi (Haworth, Levy, 2007).

Zema lipoksīnu biosintētiskā kapacitāte novērota dažādās hroniskās iekaisīgās slimībās, piemēram, smagos elpceļu iekaisumos (Haworth, Levy, 2007), hroniskas astmas (McMahon, Godson, 2004), cistiskas fibrozes (Karp *et al.*, 2005) un hroniskas aknu slimības gadījumā (McMahon, Godson, 2004).

Vachier ar līdzautoriem (Vachier *et al.*, 2005) pētīja LXA₄ koncentrāciju inducētajās krēpās HOPS un bronhiālās astmas gadījumā. Pētījuma dati neuzrādīja būtiskas LXA₄ līmeņa atšķirības starp HOPS pacientiem un kontroles grupu; bet vieglas gaitas astmas gadījumā lipoksīnu daudzums bija palielināts (Vachier *et al.*, 2005).

LtB₄ līmenis inducētajās krēpās un izelpas gaisa kondensātā (EBC) ir noteikts vairākos pētījumos, tomēr iegūtie dati ir pretrunīgi. Vairāki autori parādījuši, ka HOPS pacientiem LtB₄ koncentrācija EBC ir paaugstināta, kamēr inducēto krēpu materiālā mediatora koncentrācija variē (Kostikas *et al.*, 2005; Corhay *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2009). Pretrunīgie rezultāti varētu būt saistāmi ar slimības fāzi, kādā izmeklēti pacienti, galvenokārt tas darīts stabilā HOPS slimības stadijā. Tāpēc mēs uzskatījām, ka svarīgi būtu izpētīt iekaisumu veicinošo un iekaisumu samazinošo mediatoru līmeni HOPS paasinājuma stadijā.

Lai pierādītu hipotēzi par iekaisumu veicinošā aģenta LtB₄ un iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ disbalansu HOPS iekaisuma patoģenēzē, mēs pētījumam rekrutējām pacientus, kas ārstējās slimnīcas stacionārā – HOPS pacientus paasinājuma fāzē, pneimonijas pacientus - , atspoguļojot akūta iekaisuma modeli, un veselus, nesmēķējošus indivīdus kontroles grupai un noteicām LtB₄, LXA₄ koncentrāciju izelpas gaisa kondensātā un inducētajās krēpās, kā arī LXA₄ receptora ekspresiju krēpu šūnās un atsevišķām pacientu grupām plaušu audos.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Hroniska obstruktīva plaušu slimība

2.1.1. Definīcija

Pēc Globālās Obstruktīvās Plaušu Slimības (GOLD) vadlīnijām hroniska obstruktīva plaušu slimība tiek definēta, kā „novēršama un ārstējama slimība, ko raksturo persistējoša elpceļu limitācija, kas ir progresējoša un saistīta ar paaugstinātu hroniska iekaisuma reakciju elpceļos un plaušās pret kaitīgām daļiņām un gāzēm. Slimības paasinājumi un blakus stāvokļi nosaka individuālu slimības smaguma pakāpi” (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf; skat. 05.07.2012.).

HOPS tiek uzskatīta par heterogēnu slimību grupu ar līdzīgām manifestācijām un ietver atšķirīgus, bieži pārklājošos slimību procesus – emfizēmu, bronhiolītu, astmu, bronhektāzes un hronisku bronhītu (Stockley *et al.*, 2009). Galvenās slimības komponentes ir emfizēma un sīko elpceļu slimība jeb bronhiolīts, bet kā pavadoša slimība, kas skar gandrīz visus smēķētājus, ir hronisks bronhīts.

2.1.1.1. Emfizēma

Iekaisuma šūnu akumulācija emfizēmas gadījumā novērojama terminālajos elpceļos, proteāžu darbības rezultātā tiek bojāts ekstracelulārais matrikss, izsaucot respiratoro bronhiolu un alveolu sabrukšanu (Sutherland, Martin, 2003) un veidojot gaisa slazdus sakarā ar samazinātiem elastiskajiem spēkiem, kas notur atvērtus elpceļus izelpas fāzē (Daheshia, 2005).

2.1.1.2. Sīko elpceļu slimība - bronhiolīts

HOPS gadījumā vislielākā elpceļu obstrukcija ir novērojama sīkajos elpceļos, kuru diametrs nepārsniedz divus milimetrus. Visiem smēķētājiem sīkajos elpceļos attīstās strukturālas pārmaiņas. Hronisku bronhiolīta iekaisumu raksturo neitrofilo leukocītu, makrofāgu un limfocītu infiltrācija gļotādā, kas izraisa epiteliālo šūnu sairšanu, gludo muskuļšūnu hipertrofiju un fibrozi. Iekaisums var progresēt sakarā ar alveolāro savienojumu destrukciju sīko elpceļu ārējās sienīnās (MacNee, 2005).

2.1.1.3. Hronisks bronhīts

Hronisks bronhīts pati par sevi nav viena no HOPS komponentēm, bet ļoti bieži tā ir HOPS pavadošā slimība, jo parasti attīstās vairumam smēķētāju, arī tiem, kam vēlāk nenovēro elpceļu obstrukciju.

Par hronisku bronhītu runā, ja klepus ar krēpu veidošanos novērojams trīs mēnešus ilgi divus gadus pēc kārtas (Daheshia, 2005).

Slimībai raksturīgais klepus un krēpu izdalīšanās veidojas iedzimtās imūnās reakcijas rezultātā pret kaitīgu daļiņu un gāzu ieelpošanu. Attīstās epitēlija iekaisums centrālajos elpceļos un gļotas veidojošajos dziedzeros. Iekaisums ir saistīts ar gļotu palielinātu veidošanos, samazinātām mukociliārās attīrīšanās spējām un palielinātu gaisa telpu epitēliālo barjeru caurlaidību (MacNee, 2005).

Domājams, ka hroniska gļotu hipersekrecija varētu būt saistīta ar iekaisuma reakciju zemgļotādas dziedzeros. Iekaisuma šūnas atbrīvo serīna proteāzes, kas stimulē gļotu veidošanos. Tāpat gļotu saturošā mucīna pārāk lielā daudzuma sintēze varētu būt saistāma ar oksidantiem, kas veidojas cigarešu dūmos un ko atbrīvo iekaisuma šūnas, inducējot MUC5AC gēnu (MacNee, 2005).

2.1.1.4. Sistēmiskās izpausmes

Lai gan primāri HOPS ir hroniska plaušaudu iekaisuma slimība, tai raksturīgas daudzas sistēmiskas manifestācijas. Slimībai progresējot, pacientiem novēro muskuļu vājumu un svara samazināšanos, osteoporozi, anēmiju, kardiovaskulāras slimības, sirds palielināšanos, pulmonāru hipertenziju, plaušu vēzi, obstruktīvu miega apnoju, apātiju un depresiju (Daheshia, 2005; Cazolla *et al.*, 2007).

2.1.1.5. GOLD smaguma pakāpes

HOPS iedala vairākās smaguma pakāpēs:

0.stadija – riska grupa. Ir HOPS riska faktori, novēro hronisku klepu un krēpu izdalīšanos, bet spirometriskie dati ir normas robežās;

1.stadija – vieglas pakāpes HOPS. Viegla elpceļu limitācija: $FEV_1 \geq 80\%$ no paredzamās vērtības, $FEV_1/FVC < 70\%$ no paredzamās vērtības. Simptomi – hronisks klepus ar krēpu izdalīšanos - var būt un var nebūt.

2.stadija – vidēji smagas pakāpes HOPS. Gaisa plūsmas ierobežojuma progresēšana: $50\% < FEV_1 < 79\%$; $FEV_1/FVC < 70\%$ no paredzamās vērtības. Novēro simptomu paasināšanos – elpas trūkumu ar izteiktu klepu un krēpu veidošanos.

3.stadija – smagas pakāpes HOPS. Elpceļu limitācija progresē $30\% < FEV_1 < 49\%$ no paredzamās vērtības, $FEV_1/FVC < 70\%$. Pastiprinās elpas trūkums un tiek novēroti slimības paasinājuma stāvokļi. Samazinās fiziskās darbaspējas.

4.stadija – ļoti smagas pakāpes HOPS. Dzīves kvalitāte ir ļoti ierobežota, $FEV_1 < 30\%$ no paredzamās vērtības, $FEV_1/FVC < 70\%$ no paredzamās vērtības. Rodas komplikācijas – hroniska elpošanas nepietiekamība un kardiovaskulāras slimības (Rabe *et al.*, 2007).

2.1.2. Izplatība

Pašlaik HOPS ir piektais biežākais nāves iemesls pasaulē, un Pasaules Veselības organizācija (PVO) prognozē, ka tuvākajos gados mirstība no šīs slimības pasaulē pieaugs par vairāk nekā 30%, 2020. gadā kļūstot par trešo biežāko nāves iemeslu. HOPS ir vienīgā hroniskā slimība pasaulē, no kuras mirstība turpina palielināties (Tan, Ng, 2008). Tas galvenokārt saistāms ar augsto smēķēšanas īpatsvaru, īpaši sieviešu vidū, un tā kumulatīvo efektu, kā arī ar demogrāfiskām izmaiņām pasaulē, attīstīto valstu iedzīvotāju dzīves ilguma palielināšanos.

Pēdējo pētījumu dati liecina, ka ar HOPS saslimst vismaz 15% - 50% no visiem smēķētājiem (Cosio *et al.*, 2009; Ohar *et al.*, 2011), turklāt klīniski nozīmīga slimība attīstās 25% smēķētāju (Løkke *et al.*, 2006). Nesmēķētāji sastāda līdz 15% no visiem HOPS pacientiem (Ohar *et al.*, 2011).

Literatūrā pieejamie dati parāda, ka vecumā virs 40 gadiem ar HOPS slimo 9-10% pasaules populācijas (Halbert *et al.*, 2006). Turklāt Siafakas un līdzautoru veiktā pētījuma dati parādīja, ka ar HOPS slimo daudz vairāk cilvēku, bet tikai 25% gadījumu slimība tiek diagnosticēta (Siafakas *et al.*, 1995). Saslimtība ar HOPS tiek saistīta arī ar sliktāku dzīves kvalitāti un darbaspēju samazināšanos, kā arī biežākiem ārsta apmeklējumiem (daCosta DiBonaventura, 2012).

Skatoties uz HOPS izplatību dažādās pasaules valstīs un daļās, saslimtības tendences ir dažādas un mainīgas. Piemēram, Norvēģijā un Ziemeļtālrijā HOPS ir diagnosticēta 6% vīriešu un sieviešu visās vecuma grupās (Bakke *et al.*, 1991; Viegli, 2003).

Spānijā HOPS konstatēts 4,5% iedzīvotāju vecumā no 40-69 gadiem, un, kas bijis pārsteigums pašiem pētniekiem, slimības izplatība salīdzinājumā ar iepriekš veiktu līdzīgu pētījumu pirms 10 gadiem šajā Dienvideiropas valstī ir samazinājusies; daļēji tas tiek skaidrots ar atšķirīgiem pētījumu protokoliem, kā arī nelielu smēķēšanas samazinājumu valstī (Soriano *et al.*, 2010).

Pēdējo divdesmit piecu gadu laikā kopējā HOPS izplatība ir samazinājusies arī holandiešu populācijā (t.i., no 72,7 līdz 54,5 uz 1000 pacientiem). Samazinoties smēķējošo vīriešu skaitam, slimības izplatība viņu vidū samazinās. Turpretim, lai arī holandiešu sievietes smēķētāju skaits samazinās, HOPS izplatība sievietes vidū pieaug, turklāt ir sagaidāms, ka tuvākajos gados tā vēl palielināsies. Visvairāk HOPS pacientu Holandē ir vecuma grupā virs 65 gadiem un ar zemāku sociāli ekonomisko statusu (Bischoff *et al.*, 2009).

Austrijā, Zalcburgā HOPS GOLD I stadijā novērojama 26,1% no iedzīvotāju populācijas, un tas ir vienlīdz izplatīts sievietes un vīriešu vidū (Schirnhofner *et al.*, 2007).

HOPS prevalence Kopenhāgenā, Dānijā sastāda 17,4% no indivīdiem vecumā virs 35 gadiem. Šis rādītājs salīdzinājumā ar iepriekš veiktiem pētījumiem ir pieaudzis. Lai gan saslimstība ar HOPS vīriešu vidū ir lielāka salīdzinājumā ar sievietēm, uz kopējā pasaules fona slimības izplatība Kopenhāgenas sievietes vidū ir ļoti augsta lielā smēķēšanas īpatsvara dēļ (Fabricius *et al.*, 2011).

Arī Āzijas valstīs HOPS ir nopietna problēma. Tiek uzskatīts, ka tās izplatība svārstās no 3,5% Honkongā un Singapūrā līdz 6,7% Vjetnamā, vidēji reģionā 6,3%. Elpceļu obstrukcija Japānā novērota 10,9% cilvēku virs 40 gadu vecuma, bet 70 un vairāk gadu vecumā – jau 24% iedzīvotāju, no kuriem aptuveni divas trešdaļas ir smēķētāji, bet viena trešdaļa - nesmēķētāji (Tan, Ng, 2008).

Saūda Arābijā HOPS sastopama 14,2% iedzīvotāju virs 40 gadu vecuma (Ghobain *et al.*, 2011).

Latīņamerikā HOPS izplatība vecumā virs 40 gadiem svārstās no 7,8% Mehiko līdz 19,7% Montevideo (Menezes *et al.*, 2005).

Pirmo reizi Libānā veiktā pētījuma dati uzrādīja, ka HOPS izplatība šajā Āfrikas valstī ir 9,7% iedzīvotāju populācijas virs 40 gadu vecuma. Augstāka HOPS iespējamība konstatēta vīriešiem, vecākiem cilvēkiem, ar zemāku sociāli ekonomisko statusu un tiem, kuri dzīvo vieni; tāpat augstāks HOPS risks novērojams Libānas galvaspilsētas Beirūtas un citu lielo pilsētu iedzīvotājiem. HOPS izplatība ir saistāma ar cigarešu un arī ūdens pīpes smēķēšanas kumulatīvo efektu, turklāt izplatība pieaug to indivīdu vidū, kuri smēķē abus tabakas veidus (Waked *et al.*, 2011).

Lai gan Latvijā nav veikti HOPS izplatības pētījumi, tiek uzskatīts, ka šeit ir līdzīgas tendences kā citur Eiropā un pasaulē. Turpinot palielināties smēķējošo iedzīvotāju skaitam, īpaši satraucoši ir tas, ka Latvijā ir viens no augstākajiem smēķējošu jauniešu īpatsvaram Eiropā, turklāt pieaug tieši meiteņu un sieviešu smēķētāju skaits, tiek prognozēts, ka saslimstība un mirstība no HOPS tikai pieaugs. Tāpat tiek lēsts, ka pašlaik Latvijā HOPS netiek diagnosticēts 85 - 90% gadījumu, ko varētu skaidrot ar iedzīvotāju neregulāriem ārsta apmeklējumiem, zemiem ienākumiem un sava veselības stāvokļa nenovērtēšanu, griežoties pēc palīdzības tikai tad, kad slimība jau sāk traucēt ikdienas aktivitātēm; arī ārstu neinformētība par šo slimību, īpaši vecākās ārstu paaudzēs.

2.1.3. Riska faktori

Galvenais un visvairāk pētītais riska faktors HOPS attīstībai ir smēķēšana. Tomēr pastāv daudz citu endogēnas un eksogēnas izcelsmes faktori, kas veicina slimības attīstību, un tieši ģenētisko faktoru un apkārtējās vides aģentu mijiedarbības kontekstā HOPS attīstās.

2.1.3.1. Gēni

Iedzimts **α 1-antitripsīna (α 1-AT) deficīts** (homozigotā Z un S alēlē) veicina agrīnu slimības attīstību pat nesmēķējošiem indivīdiem. α 1-AT - 52 kDa liels glikoproteīns, ko sintezē hepatocīti un mazākā mērā arī plaušu epiteliālās šūnas un fagocīti, - ir cirkulējošs serīna proteāžu inhibitors, kas aizsargā plaušaudus no neitrofilās elastāzes iedarbības (Luisetti, Seersholm, 2004). Šis serīna proteāzes inhibitors ir iekodēts 14q32.1 hromosomā (Hersh *et al.*, 2004). Lai gan šī patoloģija ir samērā bieži sastopama – 1:2000-5000 indivīdiem – , tā tiek reti diagnosticēta (Kaplan, Cosentino,

2010; Stoller, Aboussouan, 2012). Šī proteīna deficīts visbiežāk novērojams Ziemeļeiropā mītošiem iedzīvotājiem (Rabe *et al.*, 2007).

Cutis laxa ir rets, iedzimts elastisko šķiedru bojājums, kas saistīts ar mutācijām elastīna gēnā. Šī sindroma gadījumā emfizēma attīstās jau bērna un pusaudža vecumā (Rodriguez-Revena *et al.*, 2004). Citi ģenētiskie sindromi, kam ir netieša saistība ar HOPS, ir **Marfana sindroms** (Dominguez *et al.*, 1987), **Ēlera-Danlosa sindroms** (Dowton *et al.*, 1996), **Birt-Hogg-Dubé sindroms** (Ayo *et al.*, 2007) un **iedzimts spontāna pneimotoraksa sindroms** (Bense *et al.*, 2002). Pārējo iepriekš minēto patoloģiju gadījumā plaušās veidojas gaisa pūšļi un iespējama pneimotoraksa attīstība (Eisner *et al.*, 2010).

Tiek pētīti vairāki iespējamie HOPS kandidātgēni – ABH nesekretējošais statuss, mikrosomālā epoksīda hidrolāze, glutaciona S-transferāze, α 1-antihimotripsīns, komplementa sistēmas komponente GcG, TNF- α un mikrosatelīta nestabilitāte. Tomēr to loma HOPS izcelsmē nav pierādīta (Tan, Ng, 2008).

2.1.3.2. Inhalējamās substances

Cigarešu dūmi

Cigarešu smēķētājiem biežāk novēro respiratorus simptomus un plaušu funkcijas pārmaiņas, straujāku ikgada FEV₁ samazināšanos un lielāku mirstību no HOPS salīdzinājumā ar nesmēķētājiem. Pīpes un cigāra smēķētājiem ir lielāka HOPS komplikāciju un mirstības iespējamība salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, tomēr tā nav tik liela kā cigarešu smēķētājiem. Arī pasīvā smēķēšana var izraisīt respiratorus simptomus un HOPS progresiju, palielinot kopējo ieelpojamo daļiņu un gāzu noslodzi plaušās (Rabe *et al.*, 2007). Tāpat tiek uzskatīts, ka ūdens pīpes un bidi (Austrumu zemēs satopamas mazas brūnas cigaretes, kuras satur tabaku, kas ir ierullēta tendu vai temburni lapā) smēķēšana ir riska faktors HOPS attīstībai (Tan, Ng, 2008; Ghobain, 2011). Smēķēšana grūtniecības laikā, traucējot normālai augļa plaušu attīstībai un augšanai *in utero*, bērnu var pakļaut slimības attīstībai vēlākos gados (Rabe *et al.*, 2007).

Industriālais piesārņojums un ķīmikālijas

Pie šīs grupas pieder organiskas un neorganiskas izcelsmes putekļi, ķīmiski aģenti un dūmi (Rabe *et al.*, 2007). Pēc Amerikas Torakālās biedrības datiem izriet, ka industriālas izcelsmes aģenti respiratorus simptomus vai HOPS izraisa 10-20% no visiem slimības gadījumiem (Balmes *et al.*, 2003).

Iekštelņu un ārvides gaisa piesārņojums

Iekštelņu piesārņojums, ko rada biomasas kurināmā materiāla izmantošana ēdiena pagatavošanai un telpu sildīšanai slikti ventilētā mājoklī ir būtisks HOPS riska faktors (īpaši sievietes vidū jaunattīstības valstīs). Liels pilsētu vides gaisa piesārņojuma līmenis nelabvēlīgi ietekmē pacientus ar plaušu un sirds slimībām, tomēr ārvides gaisa piesārņojuma nozīme HOPS izcelsmē ir neskaidra (Rabe *et al.*, 2007), lai gan ikdienas ārvides gaisa piesārņojuma ekspozīcija korelē ar akūtiem HOPS paasinājumiem (Eisner *et al.*, 2010).

2.1.3.3. Dzimums

Pētījumu dati, kas veikti attīstītajās valstīs, parāda, ka slimības izplatība vīriešu un sievietes vidū pašlaik ir gandrīz vienlīdzīga, atspoguļojot smēķēšanas īpatnības. Tāpat tiek pieļauts, ka sievietes ir uzņēmīgākas pret cigarešu dūmu kaitīgo ietekmi uz organismu (Rabe *et al.*, 2007) vai ka viņām HOPS norit smagākā formā (Carter *et al.*, 1994). Viens no iespējamiem skaidrojumiem varētu būt saistāms ar sievišķā dzimumhormona estrogēna līmeni (Ohar *et al.*, 2011). Carlson ar līdzautoriem pētījumā novēroja, ka sievietēm, kas post-menopauzes vecumā saņēma hormonu aizstājējterapiju (HAT), ir mazāka plaušu funkcijas pasliktināšanās un mazāka obstrukcija salīdzinājumā ar sievietēm, kuras šādu terapiju nesaņēma (Carlson *et al.*, 2001).

2.1.3.4. Infekcijas

Smagas respiratorās infekcijas bērnībā tiek saistītas ar samazinātu plaušu funkciju un palielinātu respiratoro simptomu iespējamību pieaugušā vecumā. Uzņēmība pret virālām infekcijām var būt saistīta ar zemu svaru dzimšanas brīdī, kas pats par sevi ir riska faktors HOPS attīstībai (Rabe *et al.*, 2007).

2.1.3.5. Bronhiālā astma

Pastāv saistība starp bronhiālo astmu un hronisku elpceļu obstrukciju un paātrinātu plaušu funkcijas samazināšanos. Ilgstošs hronisks iekaisuma process, kas raksturīgs slikti kontrolētai bronhiālajai astmai, var tieši izraisīt hronisku obstruktīvu plaušu slimību; un līdz ar to uzskatāms, ka astma predisponē HOPS attīstīšanos (Eisner *et al.*, 2010).

2.1.3.6. Sociāli ekonomiskais statuss

HOPS attīstīšanās risks ir apgriezti proporcionāls indivīda sociāli ekonomiskajam stāvoklim. Tā specifika nav skaidra, iespējams, tas atspoguļo cigarešu dūmu ekspozīciju, iekšelpu un ārvides gaisa piesārņojumu, pārapspirdzību un sliktu uzturu (Rabe *et al.*, 2007).

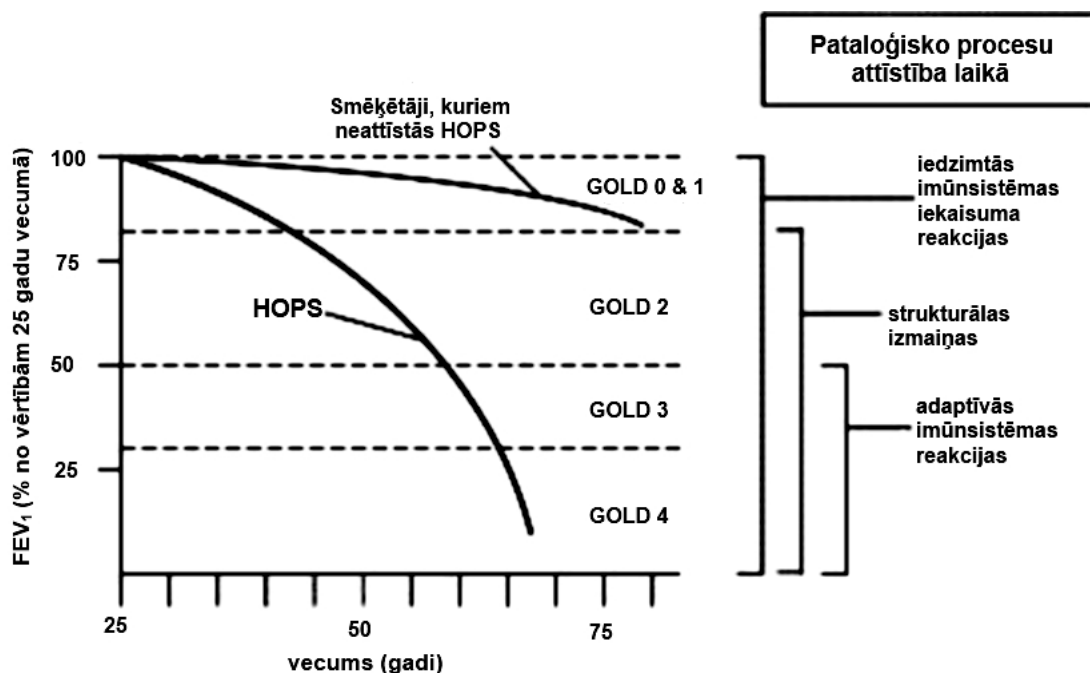
2.1.4. HOPS patoģenēze

HOPS ir hroniska iekaisuma slimība. Tā attīstās lēnām, līdz parādās pirmie simptomi – klepus ar krēpu izdalīšanos, elpas trūkums fiziskas slodzes vai, slimībai progresējot, miera laikā. Iekaisums plaušaudos un elpceļos persistē, arī pārtraucot kaitīgā aģenta ekspozīciju (Brusselle *et al.*, 2011).

Galvenā HOPS iezīme ir gaisa plūsmas limitācija, kas nav pilnīgi atgriezeniska un ir saistīta ar pastiprinātu iekaisuma reakciju sīkajos elpceļos un alveolās. Sīkajos elpceļos veidojas iekaisuma šūnu infiltrāts un sabiezinās elpceļu sienas, samazinot elpceļu diametru un palielinot gaisa plūsmas rezistenci. Tāpat novērojami iekaisuma infiltrāti alveolārajās sienās, alveolu sabrukšana un gaisa telpas paplašināšanās. Minētās pazīmes ir tipiskas bronhiolītam un emfizēmai, kuras rezultātā samazinās elastiskais spriegums, kas uztur atvērtus sīkos elpceļus, nodrošinot izelpas plūsmu (Cosio *et al.*, 2009).

Neatkarīgi no smēķēšanas ilguma un izsmēķēto cigarešu daudzumu visiem smēķētājiem plaušās attīstās iekaisums. Tomēr tikai nelielai daļai šis iekaisuma process pastiprinās, izraisot tālāku hroniskas obstruktīvas plaušu slimības veidošanos elpceļos un plaušaudos (skat. 1. attēlu). Konkrēts cēlonis, kāpēc tas notiek, nav zināms; tomēr tiek uzskatīts, ka iekaisuma persistenci un slimības progresēšanu ietekmē ģenētiskie un epigenētiskie faktori, kā arī ielpoto daļiņu un gāzu daudzums

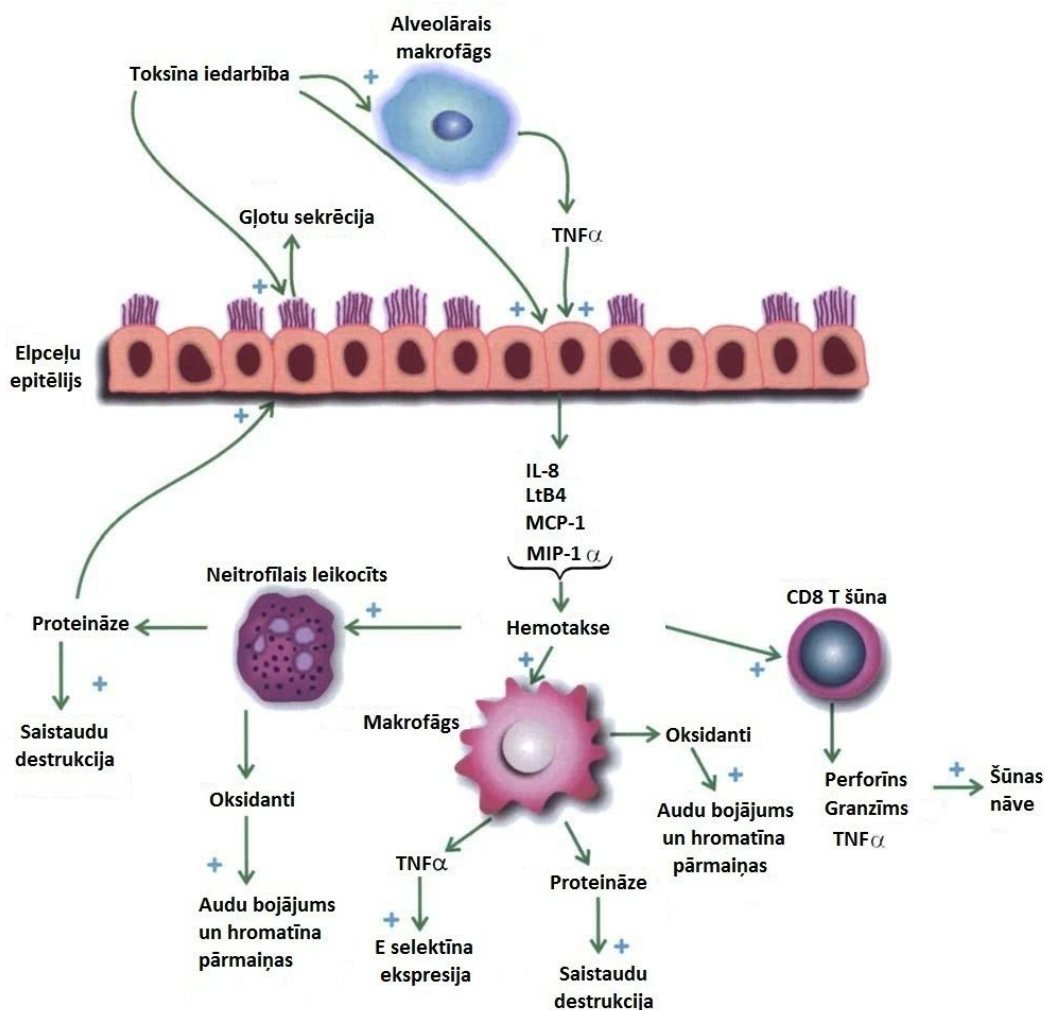
(Curtis *et al.*, 2007). Pastāv trīs galvenie mehānismi, kas raksturo slimību: (1) izmainīta, persistējoša iekaisuma reakcija pret kaitīgo stimulu; (2) oksidatīvais stress un (3) proteāžu – antiproteāžu disbalanss (Brusselle *et al.*, 2011).



1. attēls. Korelācija starp HOPS patoloģisko izmaiņu sākumu un GOLD smaguma pakāpi. Tikai nelielai daļai smēķētāju novēro strauju FEV_1 (forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē) samazināšanos, kas veicina smagas (GOLD 3) vai ļoti smagas (GOLD 4) pakāpes slimības attīstīšanos. Makrofāgu, neitrofilo leukocītu un limfocītu infiltrāciju novēro perifērajos plaušaudos simptomātiskiem smēķētājiem ar normālu FEV_1 (GOLD 0). Iekaisuma šūnu infiltrācija pieaug – gan šūnu skaita, gan skarto plaušaudu ziņā – slimībai progresējot no vieglas pakāpes līdz ļoti smagai. Adu pārstrukturēšanās process (sīko elpceļu sieniņu sabiezēšanās un to lūmena oklūzija ar gļotu saturošu iekaisuma eksudātu) pieaug no vidējas līdz ļoti smagai slimības pakāpei, kā arī limfoīdo folikulu veidošanās, kas strauji pieaug smagas un ļoti smagas slimības fāzē, liekot domāt par iegūtās imūnās sistēmas lomu HOPS patoģenēzē (Curtis *et al.*, 2007).

2.1.4.1. Iekaisums. Nespecifiskā imunitāte

Smēķēšana iedarbina iedzimtās un iegūtās imūnās reakcijas mehānismu, palielinot gļotu veidošanos, samazinot elpceļu mukociliārās attīrīšanas spējas un degradējot epiteliālo barjeru, kā arī veicinot neitrofilo leukocītu (PMN), monocītu un makrofāgu, CD4⁺, CD8⁺ T šūnu un B šūnu limfocītu, un dendrītisko šūnu un dabīgo galētājšūnu (NK) iekļūšanu bojātajos audos (skat. 2. attēlu), (Curtis *et al.*, 2007; Brusselle *et al.*, 2011).



2.attēls. HOPS patoģenēzes molekulārās un celulārās komponentes. Toksīnu iedarbības ietekmē plaušās tiek aktivēti alveolārie makrofāgi un elpceļu epitēlijs, kas veido hemotakses aģentus, kurus atbrīvojot, tiek iedarbināta notikumu kaskāde, izsaucot plaušu audu infiltrāciju ar leikocītiem, kas tieši vai iedarbojoties aerosola daļiņām atbrīvo destruējošus faktorus, bojājot plaušu struktūrelementus. Piedevām infiltrētās šūnas pašas var kalpot par hemotakses aģentiem, nodrošinot pastāvīgu iekaisuma procesu plaušās, izraisot hronisku un progresējošu slimību. TNF- α –tumora nekrozes faktors α , IL-8 – interleikīns 8, LtB₄ – leukotriēns B₄, MCP-1 – monocītu hemotakses proteīns 1, MIP-1 α – makrofāgu iekaisuma proteīns 1 α (Daheshia, 2005).

HOPS iekaisumā dominē neitrofilie leikocīti, aktivēti makrofāgi, aktivētas T šūnas (galvenokārt CD8⁺, mazāk CD4⁺), (Stockley *et al.*, 2009), paasinājuma fāzē - arī eozinofīlie leikocīti (Sutherland, Martin, 2003).

Plaušu šūnas atbrīvo augšanas faktoros, kas, iedarbojies uz kaulu smadzenēm, palielina iekaisuma šūnu veidošanos. Tāpat mediatori, kas sekmē iekaisuma šūnu rekrutāciju, veidojas no ekstracelulārā matricas sabrukšanas produktiem. Skatot visu kopumā, iekaisums, kas inducē audu bojājumu, iniciē persistējošu mediatoru ciklu (Rennard, 2011).

2.1.4.1.1. Makrofāgi un neitrofilie leukocīti

Cigarešu dūmu ekspozīcija aktivē struktūru atpazīstošos receptorus (PRRs), ko ekspresē alveolārie makrofāgi, dendrītiskās šūnas un epiteliālās šūnas. Cigarešu dūmu kompromitēti elpceļi veicina ar bojājumiem saistīto molekulāro struktūru (DAMPs) atbrīvošanu toksisku aģentu, oksidatīvā stresa, infekciju un audu hipoksijas ietekmē. PRRs, ieskaitot Toll-līdzīgo receptoru (TLRs) un neenzimātisko glikolizēto galaproduktu receptoru (RAGE), aktivēšana palielina pro-interleikīna 1 β ekspresiju, kas sašķelšanas rezultātā tiek pārveidots par IL-1 β (Brusselle *et al.*, 2011).

Cigarešu dūmi un citi kairinātāji iniciē alveolāros makrofāgus un dendrītiskās šūnas sekretēt iekaisuma šūnu hemotakses faktoros - IL-8 un citus CXC hemokīnus, monocītu hemotakses proteīnu-1 (MCP-1), LtB₄, reaktīvos skābekļa savienojumus (ROS), kā arī matricas metaloproteināzes (MMPs) MMP-2, MMP-9, MMP-12, katepsīnus L, K un S (MacNee, 2005). MMP-12 iniciē makrofāgus izdalīt TNF- α , veicinot neitrofilo leukocītu rekrutāciju, visticamāk aktivējot vaskulārās endoteliālās šūnas (Sutherland, Martin, 2003). Savukārt pašu cirkulējošo monocītu un nenobriedušu dendrītisko šūnu rekrutēšanu HOPS pacientu elpceļos nodrošina hemokīni CCL2, CCR2, un CXCL1 (Curtis *et al.*, 2007; Stockley *et al.*, 2009) vai MCP-1 (MacNee, 2005). Arī citi šīs hemokīnu grupas pārstāvji iesaistīti minēto šūnu rekrutēšanā un aktivēšanā, kā, piemēram, CCR5 un tā ligands CCL4 saistīti ar vieglu un vidēji smagu slimības norisi. CCL5 palielinātā daudzumā elpceļos atrodams slimības paasinājuma laikā (Curtis *et al.*, 2007).

Aktivēti makrofāgi un neitrofilie leukocīti atbrīvo elastolītiskos enzīmus, galvenokārt neitrofilo elastāzi un MMP-9, veicinot emfizēmas attīstību un iekaisuma šūnu rekrutāciju plaušās. Šūnu kultūrā Tc1 šūnas ierosina I tipa alveolāro šūnu apoptozi, izdalot perforīnus. Iekaisuma un fibrozes rezultātā sašaurinās mazie elpceļi, veicinot progresējošu elpceļu limitāciju un gaisa slazdu veidošanos (Sutherland, Martin, 2003; O'Donnell *et al.*, 2006; Stockley *et al.*, 2009).

Sekvestrēti neitrofilie leukocīti, izmantojot E-selektīna adhēzijas molekulu, pieķeras endoteliālajām šūnām un hemotakses aģentu – LtB₄, IL-8, ar augšanu saistītā onkogēna- α un no epiteliālām šūnām atvasinātā neitrofilo leukocītu hemotakses aģenta 78 - kontrolē spēj nokļūt elpošanas ceļos (MacNee, 2005).

Neitrofilie leukocīti sintezē trīs serīna proteāzes (neitrofilo elastāzi, katepsīnu G un proteīnāzi 3), kuras veicina emfizēmas veidošanos (MacNee, 2005). Bez tam PMN veido arī citus mediatorus – MMPs un cisteīna proteāzes, kas līdzīgi serīna proteāzēm sekmē audu bojājuma un emfizēmas rašanos. Tāpat arī citas iekaisuma šūnas sekrētē proteāzes, līdz ar to HOPS pacientu apakšējos elpceļos akumulējas liels skaits iekaisumu veicinošo mediatoru, pastiprinot audu bojājumu. Proteāzes aktivē citas iekaisuma šūnas, neitrofilā elastāze stimulē gļotu veidošanos un ierosina dziedzeršūnu metaplāziju elpceļos (Rennard, 2011).

2.1.4.1.2. Epiteliālās šūnas

Aktivētas elpceļu epiteliālās šūnas sekretē iekaisuma mediatorus - TNF- α , IL-1 β , granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošo faktoru (GM-CS), IL-8 (MacNee, 2005), makrofāgu iekaisuma proteīnu-1 α un MCP-1 (Daheshia, 2005). Sīko elpceļu epitēlijs izdala arī transformējošo augšanas faktoru β (TGF- β), veicinot lokālas fibrozes attīstīšanos (MacNee, 2005). Turklāt epiteliālās šūnas aktivē mitogēn-aktivēto proteīna kināzi un NF- κ B (Daheshia, 2005). Tāpat epiteliālās šūnas sintezē antioksidantus, antiproteāzes un transporta imūnglobulīnu- α (MacNee, 2005).

2.1.4.1.3. Tuklās šūnas

HOPS patoģenēzē ir iesaistītas arī tuklās šūnas. Histoloģiski plaušu pētījumi parādījuši, ka, slimībai progresējot, tuklās šūnas maina savu blīvumu, morfoloģiju un sadalījumu, pieaugot lumenālo tuklo šūnu skaitam (Andersson *et al.*, 2010).

2.1.4.1.4. Dabīgās galētājšūnas

Palielināts dabīgo galētājšūnu (NK) daudzums un paaugstināta šo šūnu citotoksiskā aktivitāte, ekspresējot perforīnu un granzīmu B, novērota HOPS pacientu inducētajās krēpās salīdzinājumā ar asimptomātiskiem smēķētājiem. NK darbojas kā citolītiski izpildītāji-limfocīti, kas tieši inducē vīrusinficētu šūnu, tumora šūnu, kā arī plaušu strukturālo šūnu bojāeju apoptozes vai nekrozes, ko inducē perforīns vai granzīms B,

rezultātā (Urbanowicz *et al.*, 2010). Turklāt NK šūnas mijiedarbojas ar dendrītiskajām šūnām, veicinot pēdējo nobriešanu interferona γ (INF γ) un TNF- α sekrēcijas rezultātā (Degli-Esposti, Smyth, 2005; Brusselle *et al.*, 2011).

2.1.4.1.5. Dendrītiskās šūnas

HOPS gadījumā dendrītisko šūnu skaits plaušu parenhīmā palielinās. Imūnhistoķīmiski krāsojot, novērota selektīva Langerina⁺ mioīdo dendrītisko šūnu akumulācija sīkajos elpceļos HOPS pacientiem, kas pieaug, slimībai progresējot, un ir saistīta ar palielinātu hemokīnu (c-c tipa) ligandu (CCL) ekspresiju (Demedts *et al.*, 2007; Brusselle *et al.*, 2011).

2.1.4.2. Iedzimtās (specifiskās) imunitātes mehānismi

2.1.4.2.1. T šūnas

HOPS pacientiem gan elpceļos, gan alveolās dominējošās T šūnas ir CD8⁺ citotoksiskās T šūnas (Moldoneanu *et al.*, 2009), turklāt to skaits plaušās pieaug, gaisa plūsmas limitācijai un emfizēmas smaguma pakāpei progresējot. Aktivētas CD8⁺ šūnas atbrīvo proteolītiskus enzīmus, tādus kā perforīns un granzīms, izraisot strukturālo šūnu apoptozi vai nekrozi, TNF- α , kā arī aktivē Fas-Fas liganda apoptisko ceļu (MacNee, 2005; Cosio *et al.*, 2009; Brusselle *et al.*, 2011).

Precīzs mehānisms, kā notiek CD8⁺ T šūnu akumulācija, nav zināms. Pacientu perifērajās elpceļos T šūnas palielinātā daudzumā ekspresē CXCR3, receptoru, ko aktivē interferonu inducējošais proteīns 10, kas HOPS gadījumā bronhiālajās epitēlijšūnās ir palielinātā daudzumā, veicinot CD8⁺ šūnu akumulēšanos. Slimībai progresējot, palielinās arī CD4⁺ T limfocītu, B limfocītu un ar bronhiem saistīto limfocīdo audu (BALT) skaits (MacNee, 2005). Cits iespējamais T šūnu akumulācijas iemesls ir saistīts ar respiratoro vīrusu infekciju imūno atbildes reakciju. Pēc vīrusu infekcijas CD4⁺ un CD8⁺ atmiņas T šūnas persistē perifērajās asinīs vairākus gadus (Curtis *et al.*, 2007).

Arī CD4⁺ T šūnu (Th1 un Th17) skaits ir palielināts HOPS pacientu elpceļos un plaušās (Di Stefano *et al.*, 2009). Th1 šūnas, ekspresējot hemokīnu receptorus CCR5 un CXCR3, veido INF- γ un veicina iekaisuma šūnu akumulāciju plaušās. IL-18, kas sekmē Th1 šūnu veidošanos, tiek ekspresēts alveolārajās makrofāgos, CD8⁺ T šūnās

un bronhiālajā un alveolārajā epitēlijā pacientiem ar smagu HOPS (Brusselle *et al.*, 2011).

Th17 šūnas sekretē IL-17A un IL-17F. Tie mediē imunitāti pret ekstracelulārajiem patogēniem, kā arī ir iesaistīti autoimunitātes reakcijās (Miossec *et al.*, 2009). Th17 izdalītie citokīni inducē epiteliālās šūnas veidot antimikrobiālos peptīdus (piem., β defensīnus), hemokīnus un granulocītu augšanas faktorus G-CSF un GM-CSF, veicinot PMN akumulāciju iekaisuma vietā (Brusselle *et al.*, 2011).

2.1.4.2.2. B šūnas

B šūnu skaits ir palielināts HOPS pacientu lielajos elpceļos. Turklāt tās veido limfoīdos folikulus sīkajos elpceļos (Hogg *et al.*, 2004) un plaušu parenhīmā (van der Strate *et al.*, 2006) smagas norises slimības gadījumā. Šie limfoīdie folikuli HOPS pacientiem veidojas limfoīdās neogēnēzes procesā un pieder pie inducējamiem ar bronhiem saistītajiem limfoīdajiem audiem (iBALT), kas raksturīgi iekaisuma gadījumā. iBALT nodrošina antigēnus elpceļos, iniciē lokālu iekaisuma reakciju un uztur atmiņas šūnas plaušās (Brusselle *et al.*, 2011).

Limfoīdie folikuli ir anatomiski un funkcionāli organizēti veidojumi, kas sastāv no atmiņas un nenobriedušām B šūnām, T šūnām, dendrītiskajām šūnām (Brusselle *et al.*, 2009). Tumora nekrozes faktora saimes B šūnu aktivējošais faktors (BAFF) limfoīdajos folikulos HOPS pacientu plaušās tiek ekspresēts palielinātā daudzumā salīdzinājumā ar kontroli (Polverino *et al.*, 2010), turklāt tā ekspresija korelē ar elpceļu limitācijas un hipoksijas pakāpi (Brusselle *et al.*, 2011).

Limfoīdajos folikulos notiek antigēnu aizture, imunoglobulīnu klašu pārslēgšanās. B šūnu folikuli tiek saistīti ar antigēniem, bet nav skaidrs, vai iesaistīti mikrobiāli vai cigarešu dūmu derivātu antigēni, ekstracelulārā matricas sabrukšanas produkti vai autoantigēni (Brusselle *et al.*, 2009). Līdz ar to folikulāro B šūnu nozīme HOPS patoģenēzē ir pretrunīga; tā var būt pozitīva, ja aizsargā no mikrobiālas kolonizācijas un infekcijām apakšējos elpošanas ceļos, vai negatīva, ja darbojas pret plaušu audu antigēniem, norādot uz autoimūno HOPS komponenti, īpaši emfizēmas gadījumā (Cosio *et al.*, 2009).

Histoloģiski iedzimtās imūnās sistēmas darbību HOPS patoģenēzē pierāda limfoīdo folikulu esamība reģionālajos limfmezglos. Veselu nesmēķētāju plaušu materiālā, kas

iegūts no BALT, reti atrod minētos limfoīdos folikulus, bet veselu smēķētāju BALT histoloģiskajos paraugos šādus ieslēgumus novēro 5% gadījumā, līdzīgi arī pacientiem ar vieglu un vidēja smaguma slimības gaitu; straujš folikulu skaita pieaugums novērojams smagas un ļoti smagas norises slimībā, saistot to ar šīm HOPS stadijām raksturīgo apakšējo elpceļu infekcijām un kolonizēšanos, kas varbūtēji iniciē iegūtās imunitātes iesaistīšanos slimības iekaisuma procesā. Tomēr limfoīdo folikulu pieaugums BALT materiālā varētu būt saistīts arī ar imūno atbildi pret cigarešu dūmos esošām substancēm, mikroorganismu un svešas izcelsmes materiāla esamību apakšējos respiratorajos ceļos sakarā ar nomāktu iegūtās imunitātes reakciju, kā autoantiviēlas pret atkārtotu plaušaudu bojājumu (Curtis *et al.*, 2007).

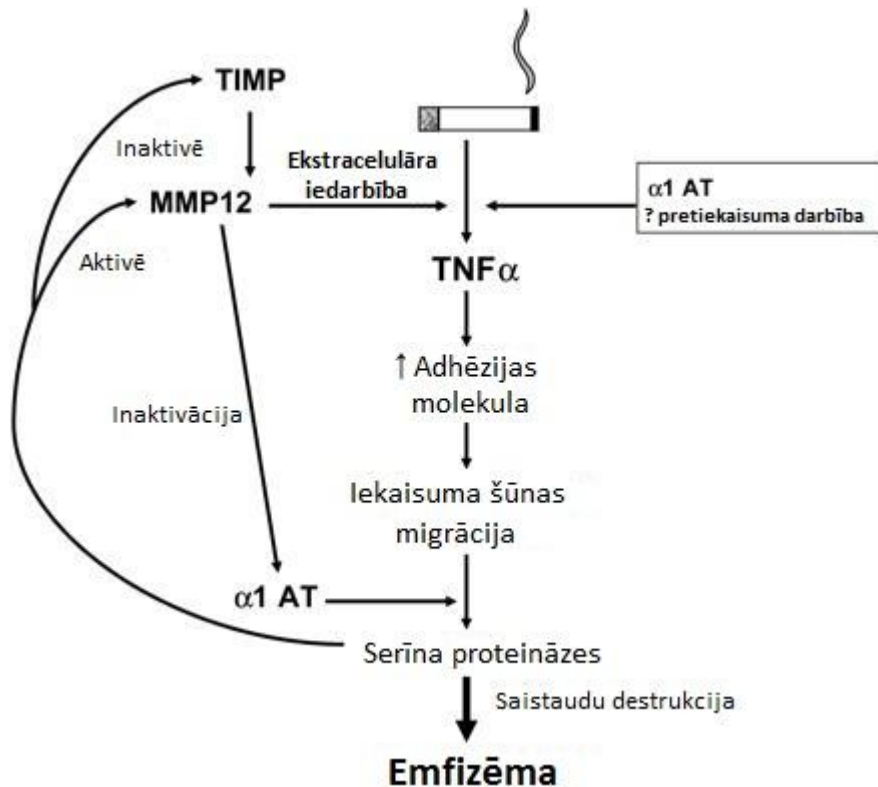
2.1.4.3. Proteāzes un antiproteāzes

Elastīna destrukcijai kopā ar antiproteāžu inaktivāciju ir galvenā nozīme proteāžu – antiproteāžu disbalansa hipotēzē. Cigarešu dūmi inaktivē α 1-AT, izraisot tā deficītu un tālāku elastāžu iedarbību uz elpceļu elastīnu (skat. 3. attēlu), (Hill *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2011). Turklāt arī nesmēķējošiem indivīdiem ar α 1-AT deficītu ir paaugstināts HOPS attīstības risks kairinošu vielu iedarbības rezultātā (Zutler *et al.*, 2011).

Tā kā smēķētāju elpceļos palielinātā skaitā ir atrodami makrofāgi un neitrofilie leukocīti, to degranulācija izsauc augstu elastāzes līmeni plaušaudos (MacNee, 2005).

Citi priekšstati uzskata, ka emfizēmas attīstība saistāma ar pārmērīgu elastīna sintēzi un atjaunošanās procesu plaušās. HOPS patogēnēzē iesaistītas arī seruma proteāzes un cisteīna proteāzes (katepsīni). Katepsīnu C inducē palielināta IFN- γ ekspresija, kas ierosina emfizēmas attīstīšanos. Savukārt katepsīna inhibitori veicina emfizēmas izsauktu palielinātu IL-13 ekspresiju plaušās. Turklāt emfizēmas gadījumā pieaug arī katepsīna L daudzums (MacNee, 2005).

HOPS pacientiem BAL paraugos ir paaugstināts MMP-1 (kolagenāze) un MMP-9 (gelatināze B) līmenis, turklāt MMP-9 aktivitāte plaušu parenhīmā emfizēmas gadījumā ir paaugstināta. Palielināts MMP-1 līmenis emfizēmas gadījumā novērots II tipa pneimocītos.



3.attēls. Citokīnu /šūnu/metaloproteināžu shematiska integrācija emfizēmas attīstībā. TIMP – metaloproteināžu audu inhibitors, MMP12 – metaloproteināze 12, $\alpha 1$ AT – $\alpha 1$ antitripsīns (Stockley *et al.*, 2009).

Cigarešu dūmi inaktivē antiproteāžu un antioksidantu darbību, tādējādi pastiprinot proteāžu un reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) iedarbību. $\alpha 1$ -AT, kas inhibē defensīnus, tiek inaktivēts cigarešu dūmu ietekmē. Neitrofilā elastāze degradē MMPs inhibitoru TIMP-1. Līdz ar to, cigarešu dūmiem inaktivējot $\alpha 1$ -AT, elpceļos pieaug elastāzes darbība, samazinot TIMP-1 līmeni, kā rezultātā MMP aktivitāte saglabājas augsta (Rennard, 2011).

2.1.4.4. Oksidatīvā stresa nozīme plaušās

Cigarešu dūmi satur daudz brīvos radikāļus un oksidantus. Tāpat ROS veidojas normālā šūnu elpošanas procesā vai ieelpojot dažādas daļiņas no apkārtējās vides. Pastāv līdzsvars starp oksidantu toksiskumu un iekšējo un ārējo antioksidantu sistēmu. Līdzvaram novirzoties uz oksidantu pusi, organismā attīstās oksidatīvais stress, kas novērojams gan smēķētājiem, gan HOPS pacientiem (MacNee, 2005).

Oksidantu iedarbību plaušās stimulē palielinātais neitrofilo leukocītu un makrofāgu skaits. Smēķētājiem alveolārie makrofāgi spontāni izdala lielu daudzumu oksidantu, piemēram, superoksīda anjonu (O_2^-) un ūdeņraža peroksīdu (H_2O_2), (MacNee, 2005).

Oksidanti bojā plaušu matricē elastīnu un kolagēnu. Turklāt cigarešu dūmi nomāc elastīna sintēzi un atjaunošanos, veicinot emfizēmas veidošanos. Oksidanti bojā plaušu epitēliju, izraisot gaisa telpu caurlaidības palielināšanos (MacNee, 2005).

Būtiska nozīme brīvajiem radikāļiem ir šūnu membrānu polinepiesātināto taukskābju pārveidošanā, veicinot lipīdu peroksidāciju, kuras rezultātā veidojas hidroperoksidāzes un aldehīdi. Oksidatīvo procesu marķieris ir brīvais dzelzs (MacNee, 2005).

Iekaisuma šūnas atbrīvo aktīvus oksidantus, veicinot oksidatīvo stresu elpceļos. HOPS pacientu apakšējos elpceļos ir novērojamas oksidatīva stresa pazīmes. Lai gan plaušās atrodami endogēni antioksidanti, domājams, to līdzsvars slimības gadījumā ir novirzīts uz oksidatīvo savienojumu pusi, neļaujot iekaisumam atrisināties (Rennard, 2011).

Oksidatīvā stresa procesā peroksinitrīta iniciēta tirozīna atlikumu nitrēšanas un fosfoinozītīda-3-kināzes- δ (PI3K- δ) aktivēšanas izraisīta fosforilēšanās histonu deacetilāzes-2 (HDAC2) aktivitāte, samazina reakciju pret kortikosteroīdu terapiju. Maza teofilīna koncentrācija atjauno HDAC2 līmeni, bloķējot PI3K- δ (Stockley *et al.*, 2009).

Hroniska oksidatīvā stresa ietekmē HOPS pacientiem novēro paātrinātu plaušu novecošanās procesu. Oksidatīvais stress samazina proteīnu deacetilāzes sirtuīna (SIRT1) līmeni, kas regulē MMP-9. HOPS pacientu plaušās un makrofāgos SIRT1 ekspresija ir būtiski samazināta, savukārt MMP-9 aktivitāte ir palielināta (Stockley *et al.*, 2009).

Nozīmīgākie antioksidanti respiratorajā sistēmā ir mucīns, reducētais glutations, urīnskābe, proteīni (tai skaitā, albumīns) un askorbīnskābe. Lai gan HOPS pacientu elpceļos reducētais glutations ir palielinātā daudzumā, tas nav pietiekami, lai kavētu brīvo radikāļu iedarbību (MacNee, 2005).

2.1.4.5. Iekaisuma persistence

HOPS arvien progresē, pat pārtraucot sākotnējā stimula iedarbību. Smēķēšanas pārtraukšana palēnina plaušu funkcijas samazināšanos, tomēr iekaisums apakšējos elpceļos saglabājas gan pašreizējiem, gan bijušajiem smēķētājiem. Asimptomātiskiem smēķētājiem smēķēšanas pārtraukšana veicina iekaisuma atrisināšanos apakšējos elpceļos tikai pēc vairākiem mēnešiem. Bet iekaisums persistē, mainoties iekaisuma šūnu relatīvajam sadalījumam, ja smēķēšanu pārtrauc HOPS pacients. Tātad HOPS gadījumā pastāv mehānismi, kas izraisa iekaisuma persistenci. Viens no šiem mehānismiem ietver ekstracelulārās matricas atvasināto peptīdu izsauktu iekaisuma šūnu hemotaktisko rekrutāciju (Rennard, 2011).

Apoptozei kopā ar oksidatīvo stresu un proteāžu – antiproteāžu disbalansu, un ģenētisko predispozīciju ir nozīme HOPS patoģenēzē (Plataki *et al.*, 2006).

In vitro pētījumu dati parāda, ka HOPS gadījumā neitrofilo leukocītu apoptoze notiek mazākā apjomā, arī fagocitoze, ko veic makrofāgi, ir samazināta salīdzinājumā ar kontroles grupu. Nikotīns pagarina neitrofilo leukocītu izdzīvošanu no devas atkarīgā veidā, nomācot to apoptozi. Vairāki iekaisuma aģenti, kā, piemēram, lipopolisaharīds (LPS), GM-CSF vai hipoksiski apstākļi inhibē neitrofilo leukocītu apoptozi. Novērojot augstāku virsmas Mac-1 ekspresiju un zemāku L-selektīna ekspresiju apoptiskos neitrofilajos leukocītos HOPS pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu, tas norāda uz augstāku šūnu aktivācijas stāvokli apoptozes procesā. Tas nozīmē, ka HOPS gadījumā neitrofilie leukocīti, pat esot apoptiskā stāvoklī, spēj negatīvi ietekmēt iekaisuma procesu elpceļos. Turklāt palielinātā virsmas Mac-1 ekspresija izmaina makrofāgu spēju atpazīt un pārveidot apoptiskos neitrofilos leukocītus. Novēlota neitrofilo leukocītu apoptoze var izsaukt to akumulēšanos elpceļos un plaušās un izraisīt hronisku iekaisumu HOPS gadījumā (Plataki *et al.*, 2006).

Būtiska nozīme HOPS patoģenēzē ir aktivētiem T limfocītiem, kuri vairojas lokāli vai elpošanas ceļos nokļūst no asinsrites. Elpceļu iekaisumā dominē CD8⁺ T šūnas, kuru daudzums elpceļos apgriezti korelē ar elpceļu limitācijas pakāpi (Plataki *et al.*, 2006).

2.1.4.6. Faktori, kas uztur iekaisuma procesu HOPS slimniekiem

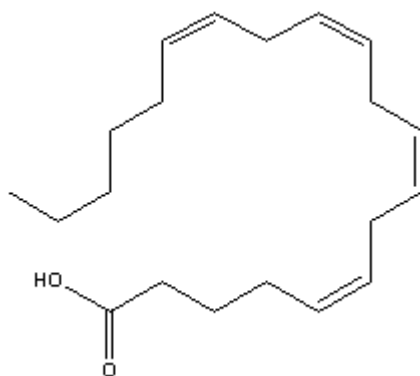
Pacientiem ar HOPS bieži novēro slimības paasinājuma stāvokļus, kas saistīti ar pastiprinātu iekaisumu elpceļos (McManus *et al.*, 2008). Paasinājumu raksturo

palielināts elpas trūkums, palielināta krēpu sekrēcija vai paaugstināta krēpu purulence (Garvey, Ortiz, 2012).

Slimības uzliesmojumi galvenokārt saistāmi ar vīrusu (*Rhinovirus spp.*, *influenza*) un bakteriālām (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas spp.*) elpceļu infekcijām (McManus *et al.*, 2008; Garvey, Ortiz, 2012). Tomēr dažreiz paasinājums var noritēt bez nosakāmas infekcijas esamības. Nemikrobiālas izcelsmes uzliesmojuma iemesli varētu būt apkārtējās vides kairinātāji un nozīmētās terapijas „neveiksme”, tāpat pieminama ir oksidatīvā stresa ietekme uz iekaisuma reakcijas pastiprināšanos (Garvey, Ortiz, 2012).

2.2. Arahidonskābe

Arahidonskābe (AA) ir prekursors daudziem bioloģiski aktīviem metabolītiem, kas iesaistīti iekaisuma reakcijās, to iniciējot, un tās atrisināšanās fāzē. AA (5,8,11,14-*cis*-eikosatetraēnskābe; skat. 4. attēlu) ir ω -6 grupas eikosanoīkskābe ar četrām dubultsaitēm. Sākotnēji tā tika izolēta no zemesriekstu (*arachis*) eļļas kopā ar linoleīnskābi; arahidonskābe ir svarīgs fosfolipīdu metabolisma komponents zīdītājiem. AA audos tiek nodrošināta tieši, uzņemot ar pārtiku, vai veidojas no neizvietojamās taukskābes linolēnskābes vai α -linolēnskābes (Kantarci, Van Dyke, 2003; Leslie, 2004).



4.attēls. Arahidonskābes molekula. Tā ir karboksilskābe ar 20 oglekļa atomiem un četrām *cis* konfigurācijas dubultsaitēm.

AA atrodas šūnu membrānu fosfolipīdos esterificēta glicerola veidā. Fosfolipīdu hidrolīzes rezultātā arahidonskābe tiek atbrīvota intracelulārajā vidē. Brīvā AA tālāk spēj reinkorporēties atpakaļ membrānu fosfolipīdos, difundēt ārpus šūnas vai var piedalīties vielmaiņas procesos. AA metabolismā ir iesaistīti trīs veidu enzīmi – ciklooksigenāzes, lipoksigenāzes un citohroms P₄₅₀.

2.3. Eikosanoīdi

Eikosanoīdi ir būtiski iekaisuma mediatori un tā regulētāji. Tie ir veidoti no 20 oglekļa atomu saturošām polinepiesātinātajām taukskābēm, galvenokārt to sintēzei tiek izmantota membrānu fosfolipīdos esošā AA. Iekaisuma mediatori eikosanoīdi – prostaglandīni, tromboksāni un leukotriēni – no AA veidojas metaboliskos procesos, iedarbojoties dažādiem enzīmiem. Leikotriēnu (Lts) sintēzi nodrošina lipoksigenāzes. Iekaisuma laikā AA metabolisms tiek pārslēgts uz iekaisumu samazinošo mediatoru – lipoksīnu (LXs) – sintēzi. Te pieminams arī PGE₂, kas nomāc 5-LO aktivitāti, samazinot Lts sintēzi, un stimulē 15-LO darbību, kas nepieciešams LXs veidošanai (Calder, 2009).

Polinepiesātinātā eikosapentaēnskābe (EPA) ir papildus substrāts 5-LO darbībai, bet to produktiem piemīt zemāka aktivitāte salīdzinājumā ar AA kā substrātu (Calder, 2009).

2.4. Leikotriēni

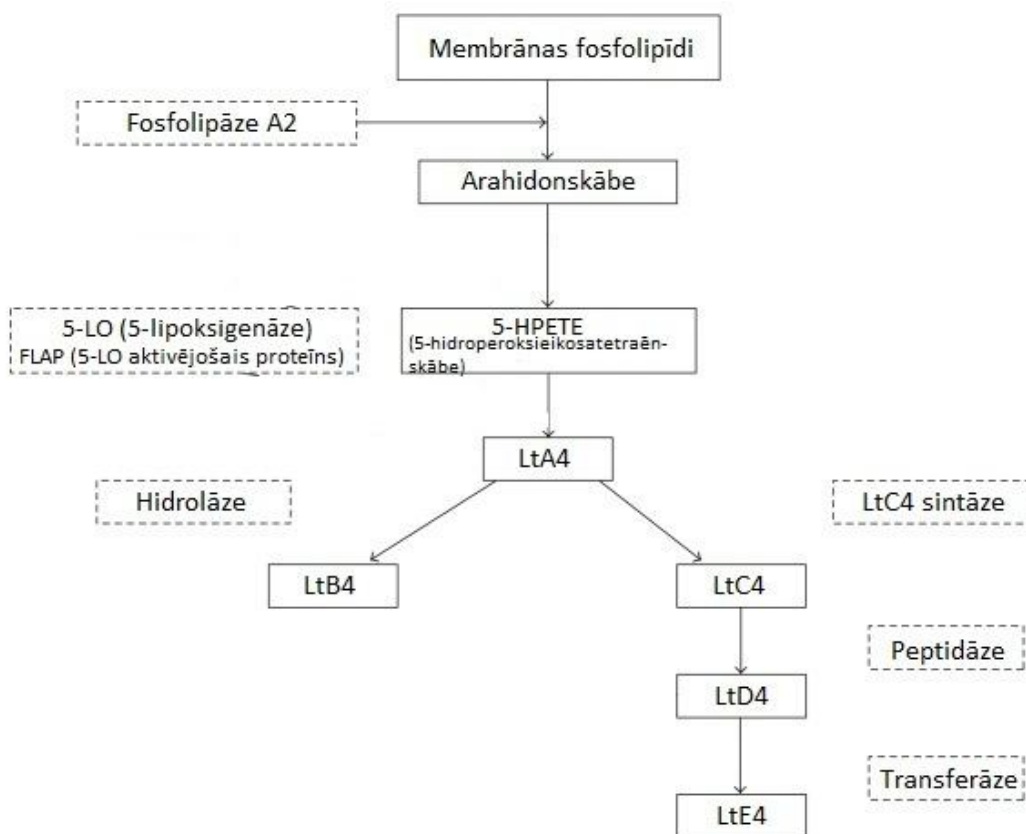
Leikotriēni („leukos” – no baltajām asins šūnām, „trienes” – trīs konjugētas dubultsaites) veido AA metabolisma 5-LO ceļā radušos produktu saimi. Tā sastāv no cisteinilleikotriēniem (cysLts) C₄, D₄ un E₄ jeb peptidoleikotriēniem, kas agrāk bija pazīstami kā anafilakses lēni darbojošās substances. Cisteinilleikotriēni ir būtiski mediatori astmas patoģenēzē (Peters-Golden, Henderson Jr., 2007); savukārt LtB₄ ir spēcīgākais neitrofilo leikocītu hemotakses aģents (Peters-Golden *et al.*, 2004), tas veicina arī eozinofilo leikocītu hemotaksi (Ogawa, Calhoun, 2006).

2.4.1. Veidošanās

Tā kā mieloīdās šūnas satur pietiekošu esterificētās AA daudzumu un ekspresē visus enzīmus, kas nepieciešami to hidrolīzei un metabolizēšanai 5-LO klātienē, tie veido

lielu daudzumu Lts *de novo* dažu sekunžu līdz minūšu laikā pēc kontakta ar aktivējošo signālu (Peters-Golden *et al.*, 2004).

No visiem fosfolipāzes A_2 fermentiem, kas atbrīvo AA no membrānu fosfolipīdiem, citosoliskā fosfolipāze A_2 (cPLA₂) ir vissvarīgākā Lts biosintēzē. Brīvā taukskābe tiek oksigenēta C-5 pozīcijā, iedarbojoties 5-LO kopā ar AA saistošo proteīnu, 5-LO aktivējošo proteīnu (FLAP), veidojot 5-hidroperoksi-8,11,14-cis-6-trans-eikosatetraēnskābi (5-HPETE), kas tālāk tiek dehidratēta par epoksīda starpproduktu – leukotriēnu A_4 (LtA₄). cPLA₂ un 5-LO enzīmu aktivēšanai nepieciešams intracelulārais kalcijs un ATF klātbūtne un tālāk to paaugstina proteīna kināžu aktivēšana, kā arī stimulē lipīdu hidroperoksīdi un fosfatidilholīns (Haeggström, Wetterholm, 2002). LtA₄ hidrolāzes ietekmē LtA₄ tiek hidrolizēts par LtB₄ vai konjugēts ar reducēto glutationu, kur LtC₄ sintāzes klātbūtnē veido LtC₄ (skat. 5. attēlu). Leikotriēni tiek sintezēti PMN, eozinofīlajos leukocītos, monocītos, ar audiem saistītajos makrofāgos, tuklajās šūnās. Lts profila sintezēšanā eksistē šūnu specifika – tuklās šūnas un eozinofīlie leukocīti galvenokārt sintezē cysLts, bet neitrofilie leukocīti un dendrītiskās šūnas – LtB₄, savukārt makrofāgi veido abus Lts profilus (Haeggström, Wetterholm, 2002; Peters-Golden *et al.*, 2004; Ogawa, Calhoun, 2006; Ohnishi *et al.*, 2008).



5.attēls. Leikotriēnu (Lts) biosintēzes shēma (Riccioni *et al.*, 2009).

Leikotriēnu sintēzes kapacitāti ietekmē gan pieejamā substrāta – AA – daudzums, gan dažādu mazu molekulu (ATF, NO un ROS) pieejamība, kas regulē Lts veidošanos (Peters-Golden, Henderson Jr., 2007). LtB₄ maksimālā sintēze novērojama, kad aktivēta 5-LO no nukleoplazmas pārvietojas uz ārējo vai iekšējo kodola membrānu (Luo *et al.*, 2003).

2.4.2. Leikotriēna B₄ inaktivācija

LtB₄ tiek inaktivēts metaboliskas degradācijas ceļā.

1. mikrosomālā ω -oksidācija, kur citohroma P450 saimes 4F3 (CYP4F3) LtB₄ hidrolāžu ietekmē LtB₄ tiek pārveidots par 20-hidroksi-LtB₄ un tālāk LtB₄ hidrolāžu neitrofilajos leukocītos vai alkohola dehidrogenāzes vai aldehīda dehidrogenāzes hepatocītos iedarbībā par 20-karboksi-LtB₄;
2. peroksisomālā vai mitohondriālā β -oksidācija, kur 12-hidroksieikosanoīdās dehidrogenāzes ietekmē LtB₄ tiek pārveidots par 12-keto-LtB₄ (Ohnishi *et al.*, 2008).

2.4.3. Leikotriēna B₄ receptori

Leikotriēni darbojas, saistoties ar specifiskiem ar G proteīnu saistītiem septiņu transmembrānu domēna receptoriem uz strukturālo un iekaisuma šūnu ārējās plazmatiskās membrānas (Peters-Golden, Henderson Jr., 2007).

43 kDa lielais LtB₄ receptors 1 (BLt1), kas galvenokārt tiek ekspresēts uz leikocītiem (granulocītiem, monocītiem/makrofāgiem, tuklajām šūnām, dendrītiskajām šūnām) un efektorajām T šūnām (Yokomizo *et al.*, 1997), ar augstu afinitāti saista LtB₄ un mediē visas šī mediatora hemotakses un iekaisumu veicinošās darbības. Otrs zemākas afinitātes LtB₄ receptors 2 (BLt2), kas vienlīdzīgi ekspresējas visos organisma audos, arī saista lipoksigenāzes produktus, tomēr tā fizioloģiskās funkcijas ir neskaidras (Peters-Golden, Henderson Jr., 2007; Riccioni *et al.*, 2009). BLt1 un BLt2 saistoties ar LtB₄, tiek stimulēta intracelulāru signālu transdukcija un celulāri notikumi iekaisuma šūnās, tādi kā intracelulārā Ca²⁺ mobilizācija, ekstracelulārā signāla regulētās kināzes 1/2, fosfoinozītīda-3 un proteīna kināzes B (Akt) aktivācija, hemotakse, degranulācija un iekaisuma proteīnu veidošanās un intracelulārā cikliskā adenozīna monofosfāta (cAMP) samazināšanās (Iizuka *et al.*, 2005; Lundeen *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2004; Ohnishi *et al.*, 2008; Peters-Golden, Henderson Jr., 2007).

Gēni, kuri kodē abus minētos LtB₄ receptorus, atrodas 14. hromosomā (Yokomizo *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2000).

Trešais receptors, ar kuru mijiedarbojas LtB₄, ir nukleārais receptors PPAR α . PPAR α mijiedarbības rezultātā ar eikosanoīdiem tiek veicināta lipīdu mediatoru degradācija. LtB₄ saista un aktivē PPAR α , aktivējot transkripcijas gēnus, kuri sekmē taukskābju degradāciju. Līdz ar to PPAR α ir būtiska nozīme organisma attīrīšanas procesā no lipīdu mediatoriem iekaisuma laikā (Ohnishi *et al.*, 2008).

2.4.4. Leikotriēna B₄ darbība

LtB₄ ir iekaisumu veicinošs mediators, kam piemīt spēcīga hemotakses iedarbība uz PMN, kā arī makrofāgu (Martin *et al.*, 1984; Monteiro *et al.*, 2011) un citu iekaisuma šūnu aktivitāti, un tas inducē hemokinēzi un šo šūnu adhēziju pie vaskulārā endotēlija. Turklāt LtB₄ caur virsmas receptoriem mediē GM-CSF atkarīgo PMN izdzīvošanu (Ogawa, Calhoun, 2006). Cits iekaisuma mediators – trombocītu aktivācijas faktors (PAF) palielina paša LtB₄ izdalīšanos no makrofāgiem (Shindo *et al.*, 1998).

Vispārīgas LtB₄ funkcijas organismā ir:

- Palielināt vaskulāro caurlaidību (Di Gennaro *et al.*, 2009);
- Uzlabot lokālo asinsplūsmu;
- Veicināt leukocītu hemotaksi;
- Inducēt lizosomālo enzīmu atbrīvošanu (Flamand *et al.*, 2004);
- Inducēt ROS atbrīvošanu no granulocītiem;
- Palielināt TNF, IL-1 un IL-6 veidošanos.

Tāpat LtB₄ inducē antimikrobiālā peptīda α -defensīna atbrīvošanu no PMN (Flamand *et al.*, 2004) un veicina PMN veiktu patogēno baktēriju fagocitozi un antivirālus mehānismus (Haworth, Levy, 2007), paaugstina alveolāro makrofāgu mikrobicidālo aktivitāti, nodrošinot proteīna kināzes C δ atkarīgo reducētās nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāta oksidāzes aktivēšanu (Serezani *et al.*, 2005).

2.5. Iekaisuma atrisināšanās

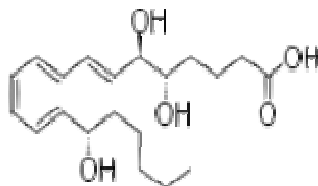
Rezolūcijas procesā tiek atjaunota organisma homeostāze pēc iekaisuma reakcijas, ierobežot plašus audu bojājumus un samazinot hroniska iekaisuma attīstīšanās iespējas; tā ir atkarīga no bioloģiskas iekaisumu samazinošo un pro-rezolūcijas mediatoru darbības, kā arī no iekaisuma šūnu apoptozes un organisma attīrīšanas spējas no tām. Ja kāds no minētajiem procesiem iztrūkst, iekaisums nespēj normāli atrisināties un var attīstīties hronisks iekaisums ar audu destrukciju, fibrozi un pat orgāna mazspēju (MADERNA, GODSON, 2009).

Iekaisuma atrisināšanās ir aktīvs process. Iekaisuma sākuma fāzē eikosanoīdiem ir būtiska nozīme kā lokāliem mediatoriem, kas attīsta iekaisuma apstākļus, veicinot leukocītu hemotaksi un stimulējot iekaisumu veicinošo citokīnu veidošanos iekaisuma vietā. Šis process ir bifāzisks, jo nākamais posms ir saistīts ar lipīdu mediatoru, kas aktīvi ierobežo iekaisumu un veicina tā atrisināšanos, biosintēzi. Prostaglandīni E₂ un D₂ (PGE₂ un PGD₂) stimulē PMN 15-LO translāciju, iekaisuma eksudātā nodrošinot eikosanoīdu sintēzes pārslēgšanos no iekaisumu veicinošiem – leukotriēniem - uz iekaisumu samazinošiem mediatoriem – lipoksīniem (LXs), (MADERNA, GODSON, 2009).

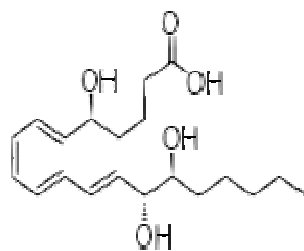
Spontānas rezolūcijas laikā PMN, kas atrodami iekaisuma vietā, saņemot iekaisuma eksudāta translētus signālus PGE₂ vai PGD₂ veidā, transkripcionāli ieslēdz 15-LO ceļu un nodrošina LXs veidošanos, kas savukārt pārtrauc PMN turpmāku iekļūvi un kontrolē iekaisuma un tā atrisināšanās procesu, stimulējot apoptisku PMN uzņemšanu un attīrīšanu audu makrofāgos (Serhan, 2005).

2.6. Lipoksīni

Lipoksīni (LXs) ir galvenie endogēnie iekaisumu samazinošie un pro-rezolūcijas mediatori. LXs ir trihidroksitetraēnu saturoši eikosanoīdi ar stereospecifisku un selektīvu darbību. Tie veidojas *in vivo* un tiem piemīt būtiska loma iekaisuma atrisināšanās procesā. LXs tiek uzskatīti par akūtas iekaisuma reakcijas atrisināšanās fāzes signālu (Serhan, 2005). Pašlaik ir zināmi trīs lipoksīni - A₄ (LXA₄ vai 5*S*,6*R*,15*S*-trihidroksi-7,9,13-*trans*-11-*cis*-eikosatetraēnskābe; skat. 6. attēlu) un tā pozicionālais izomērs B₄ (LXB₄ vai 5*S*,14*R*,15*S*-trihidroksi-6,10,12-*trans*-8-*cis*-eikosatetraēnskābe; skat. 7. attēlu), (Decker *et al.*, 2009), kā arī aspirīna ietekmē veidotais lipoksīns 15-*epi*-LX (ATL).



6.attēls. Lipoksīna A₄ strukturālā formula.



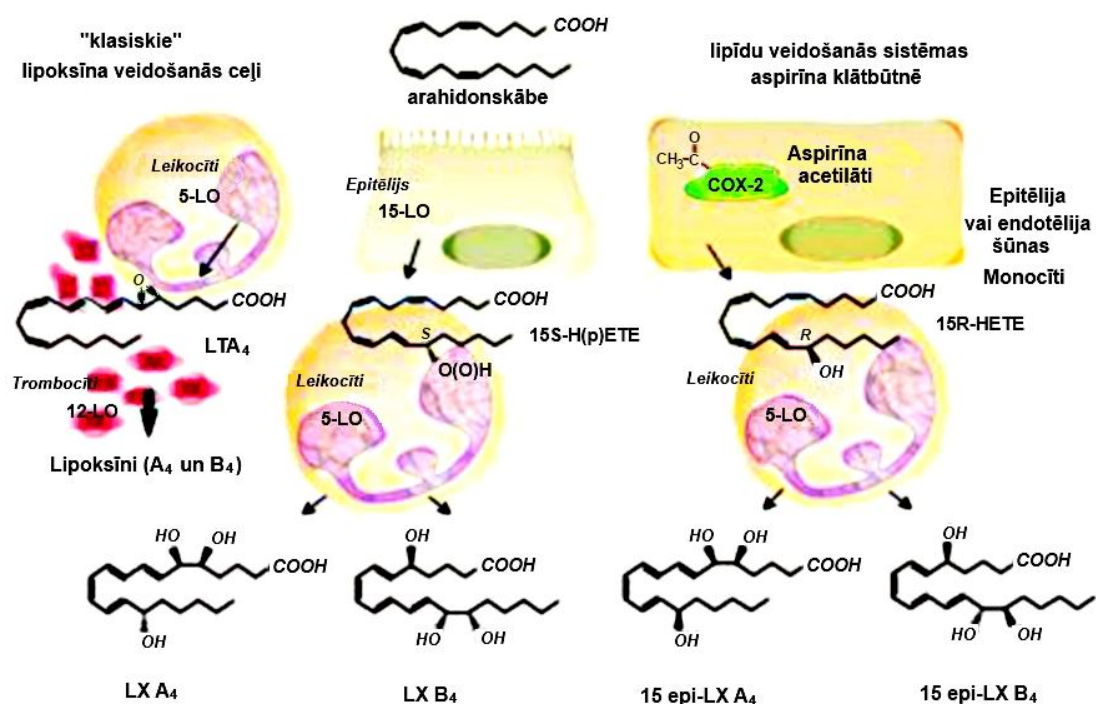
7.attēls. Lipoksīna B₄ strukturālā formula.

2.6.1. Lipoksīnu biosintēze

Pirmo reizi LXs tika izolēti 1984. gadā Zviedrijā no cilvēka leukocītu suspensijas, kas inkubēta ar eksogēniem substrātiem (Serhan *et al.*, 1984).

LXs biosintēzi veicina multicelulāras organisma reakcijas pret infekcijām, ievainojumiem vai iekaisuma stimuliem. Tie veidojas šūnu mijiedarbības rezultātā vairākos biosintētiskos ceļos, kas darbojas neatkarīgi viens no otra vai kopā, organisma audos (skat. 8. attēlu), (Serhan, 2005; Maderna, Godson, 2009).

LXs tiek sintezēti dažādās šūnās, ieskaitot PMN, bazofilos un eozinofilos leukocītus, monocītus un makrofāģus (Serhan, 2005).

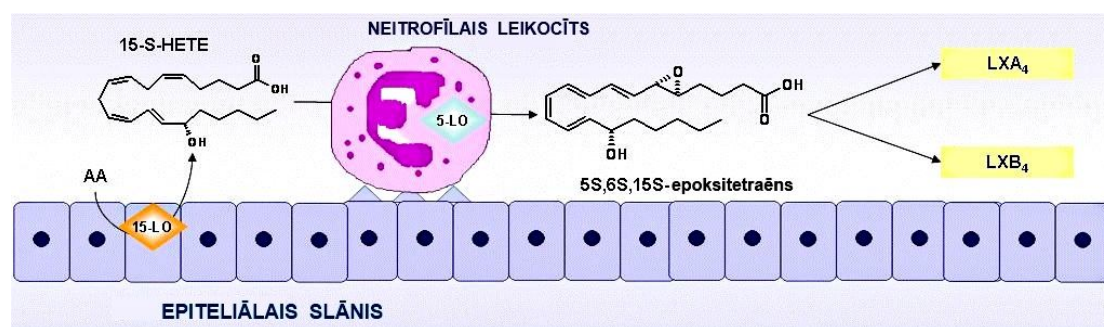


8.attēls. *De novo* un aspirīna ietekmē veidoto lipoksīnu sintēzes ceļi. Divi galvenie lipoksīnu veidošanās ceļi lipoksigenāžu klātienē cilvēka šūnās un audos (kreisajā pusē). Aspirīna ietekmē LXs veidojas, kad organismā ciklooksigenāze-2 (COX-2) ir palielinātā daudzumā un aspirīna klātbūtnē tiek neatgriezeniski acetilēta. Acetilētā COX-2 ir katalītiski aktīva, bet enzīma aktivitāte pārslēdzas no prostaglandīnu starpproduktu veidošanās uz 15R-HETE (15-epi-LXs ATL prekursora) sintēzi (labajā pusē), (Chiang *et al.*, 2006).

LXs veidošanās laikā LO klātbūtnē molekulārais skābeklis tiek ievietots divās pozīcijās AA molekulā. Viens no iespējamajiem veidiem ir molekulārā skābekļa ievietošana AA oglekļa-15 pozīcijā, galvenokārt *S* konfigurācijā, reakciju katalizējot 15-LO. 15-LO eikosanoīdu produkti elpceļu epiteliālajās šūnās vai monocītos – 15*S*-hidroperoksieikosatetraēnskābe (15*S*-H(p)ETE) vai reducētā alkohola forma 15*S*-hidroksieikosatetraēnskābe (15*S*-HETE) – kalpo par substrātiem PMN 5-LO un nodrošina trihidroksitetraēnu veidošanos (Serhan, 2005).

2.6.1.1. Lipoksīnu sintēze šūnu mijiedarbības rezultātā 15-LO un 12-LO ietekmē

Sākotnēji noris AA lipoksigenācija oglekļa-15 pozīcijā, iedarbojoties 15-LO epiteliālajās šūnās, monocītos un eozinofilajos leukocītos, veidojot 15-HpETE, kas tālāk kalpo par substrātu 5-LO monocītos un PMN (skat. 9. attēlu), (Maderna, Godson, 2009). Produkts, kas veidojas, 5-LO iedarbojoties uz 15-HpETE, ir 5*S*-hidroperoksi,15*S*-hidro(peroksi)-DiH(p)ETE, kas tālāk ātri tiek pārveidots par 5(6)-epoksitetraēnu. 5-LO darbību regulē GM-CSF un IL-3. 5(6)-epoksitetraēns hidrolāžu ietekmē ātri tiek pārvērsts par 5*S*,6*R*,15*S*-trihidroksi-7,9,13-*trans*-11-*cis*-eikosatetraēnskābi (LXA₄) vai 5*S*,14*R*,15*S*-trihidroksi-6,10,12-*trans*-8-*cis*-eikosatetraēnskābi (LXB₄), (Chiang *et al.*, 2005; Serhan, 2005; Chiang *et al.*, 2006).



9.attēls. LXA₄ un LXB₄ veidošanās, iedarbojoties divām lipoksigenāzēm. 15-LO darbības ietekmē šūnas membrānās tiek lipoksigenizēta AA, veidojot 15*S*-HETE, kas tālāk neutrofilajos leukocītos tiek izmantota par substrātu lipoksīnu veidošanai 5-LO ietekmē (Romano *et al.*, 2007).

15-LO iniciētais LXs sintēzes ceļš bloķē Lts sintēzi 5-LO līmenī, līdz ar to pastāv apgriezta saistība starp Lts un LXs biosintēzi leukocītos. Kad LXs PMN tiek sintezēti, pārveidojot 15-HETE, Lts veidošanās ir būtiski samazināta (Serhan, 2005; Chiang *et al.*, 2006). Wu ar līdzautoriem akūta post-streptokoku glomerulonefrīta pētījumā parādījis, ka 15-LO un tam sekojošs LXs biosintēzes pieaugums pat apsteidz iekaisumu veicinošā LtB₄ veidošanos (Wu *et al.*, 2009).

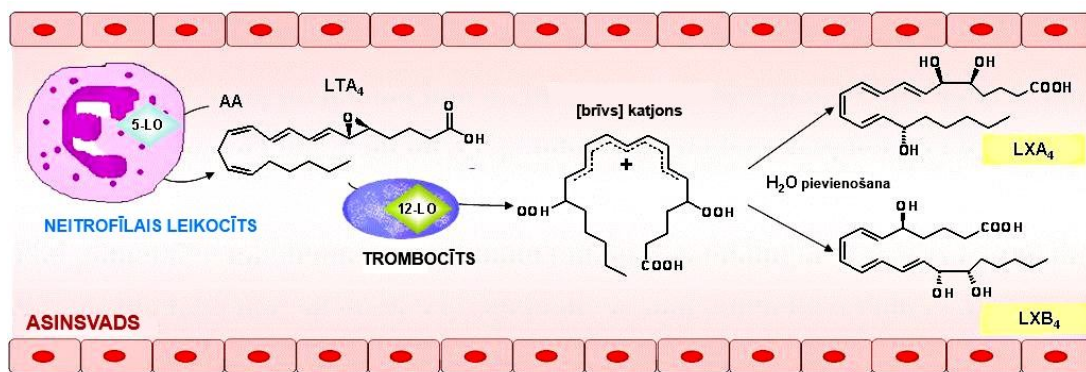
Iekaisuma un imūno reakciju negatīvie regulētāji IL-4 un IL-13 veicina transcelulāru LXs veidošanos, palielinot 15-LO ekspresiju monocītos un epiteliālajās šūnās; savukārt GM-CSF un IL-3 palielina 5-LO transkriptus (Maderna, Godson, 2009).

2.6.1.2. 5-LO iniciēta lipoksīnu veidošanās

Trombocītu / leukocītu vai trombocītu / leukocītu mikroagregātu mijiedarbība veicina LXs veidošanos transcelulārā 5-LO epoksīda produkta LtA₄ pārveidošanā par LXA₄ vai LXB₄ lipoksīnu sintēzes 12-LO klātbūtnē trombocītos. Lai gan trombocīti vieni paši nespēj sintezēt LXs, šis tiek uzskatīts par galveno LXs veidošanās ceļu vaskulatūrā (Maderna, Godson, 2009).

Molekulārais skābeklis tiek ievietots AA molekulas oglekļa-5 pozīcijā un tad LtA₄ molekulas oglekļa-15 pozīcijā; šīs reakcijas stimulē 5-LO neitrofilajos leukocītos un 12-LO trombocītos. Trombocīti, pieķeroties PMN, uzņem atbrīvoto AA un 12-LO klātbūtnē ātri to pārveido par oglekļa katjonu starpproduktu LtA₄, kas gala rezultātā izveido LXA₄ un LXB₄ attiecībā ~1:1. Trombocītu 12-LO atdala ūdeņradi molekulas oglekļa-13 pozīcijā un ievieto molekulāro skābekli oglekļa-15 pozīcijā LtA₄ *cis*-pentadiēna vienībā, pārveidojot to par katjona starpproduktu, kas tālāk nodrošina LXB₄ sintēzi, ja ūdens tiek piesaistīts oglekļa-14 pozīcijā, vai LXA₄ veidošanos, ja ūdens tiek piesaistīts oglekļa-6 pozīcijā (skat. 10. attēlu), (Chiang *et al.*, 2005; Serhan, 2005; Chiang *et al.*, 2006).

Šajā LXs sintēzes ceļā 5-LO aktivitāti inducē 5-LO aktivējošā proteīna (FLAP) ekspresija (Machado, Aliberti, 2000).



10.attēls. 5-lipoksigenāzes (5-LO) iniciēta lipoksīnu veidošanās. Sākotnēji no arahidonskābes (AA) 5-LO ietekmē neitrofilajos leikocītos tiek sintezēts leukotriēns A₄ (LtA₄), kas tālāk trombocītos 12-LO ietekmē tiek pārveidots par lipoksīniem – LXA₄ vai LXB₄ (Romano *et al.*, 2007).

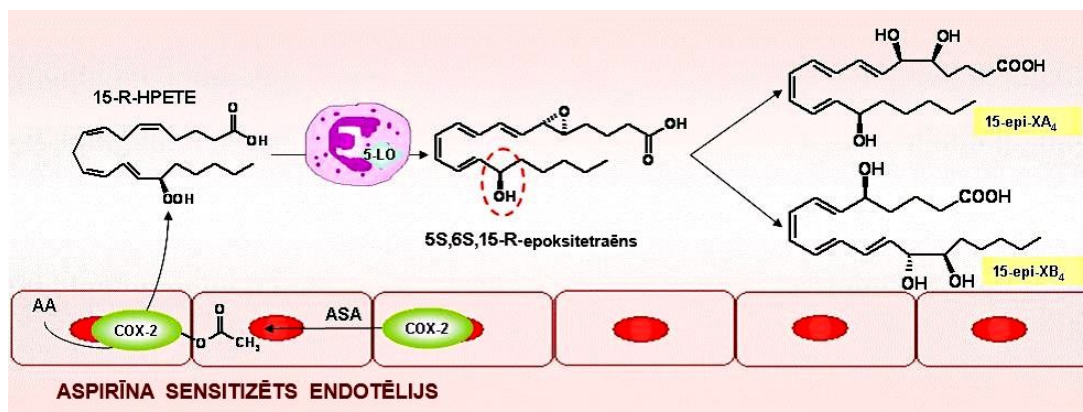
2.6.1.3. Lipoksīnu sintēze no iekšējiem lipīdu avotiem

15-HETE esterificēšana šūnu membrānu fosfolipīdos, īpaši inozitolu saturošos fosfolipīdos neitrofilo leikocītu membrānās. Šūnas ātri uzņem un esterificē 15-HETE savos inozitolu saturošajos lipīdos, veidojot LXs. Šis sintēzes ceļš norāda, ka slimības vai organisma aizsardzības laikā LXs biosintēzes prekursori var tikt glabāti iekaisuma šūnu membrānās un atbrīvoti, aktivējot PLA₂ (Serhan, 2005).

2.6.1.4. Aspirīna ietekmē izveidojušies lipoksīni - ATL

ATL ir iekaisumu pārtraucošie signāli un aktīvi piedalās organisma reakciju samazināšanā, veicinot rezolūcijas procesu (Chiang *et al.*, 2005).

Iekaisuma stimuli (TNF- α , LPS u.c.) inducē COX-2 veidot 15R-HPETE aspirīna klātbūtnē. Aspirīns neatgriezeniski acetilē COX-2 un pārslēdz PG un TX sintēzi uz 15R-HPETE veidošanu. Neitrofilajos leikocītos 5-LO tālāk pārveido 15R-HPETE par ATL (skat. 11. attēlu), (Chiang *et al.*, 2005).



11.attēls. Lipoksīnu veidošanās aspirīna ietekmē. Iekaisuma apstākļos aspirīna klātbūtnē ciklooksigenāze-2 (COX-2) veido 15R-hidroksiperoksieikosatetraēnskābi (15R-HPETE), kura tālāk neitrofilajos leukocītos 5-lipoksigenāzes (5-LO) ietekmē tiek pārveidota par t.s. epi-lipoksīniem (ATL) - 15-epi-LXA₄ un 15-epi-LXB₄ -, kas veidojas aspirīna ietekmē (Romano *et al.*, 2007).

15R-HPETE var veidot arī citohroms P450 bez aspirīna klātbūtnes (Haworth, Levy, 2007).

2.6.2. Lipoksīnu inaktivācija

Līdzīgi citiem autokoīdiem LXs tiek ātri veidoti dažādu stimulu ietekmē, darbojas lokāli un tad tiek ātri enzimatiski inaktivēti.

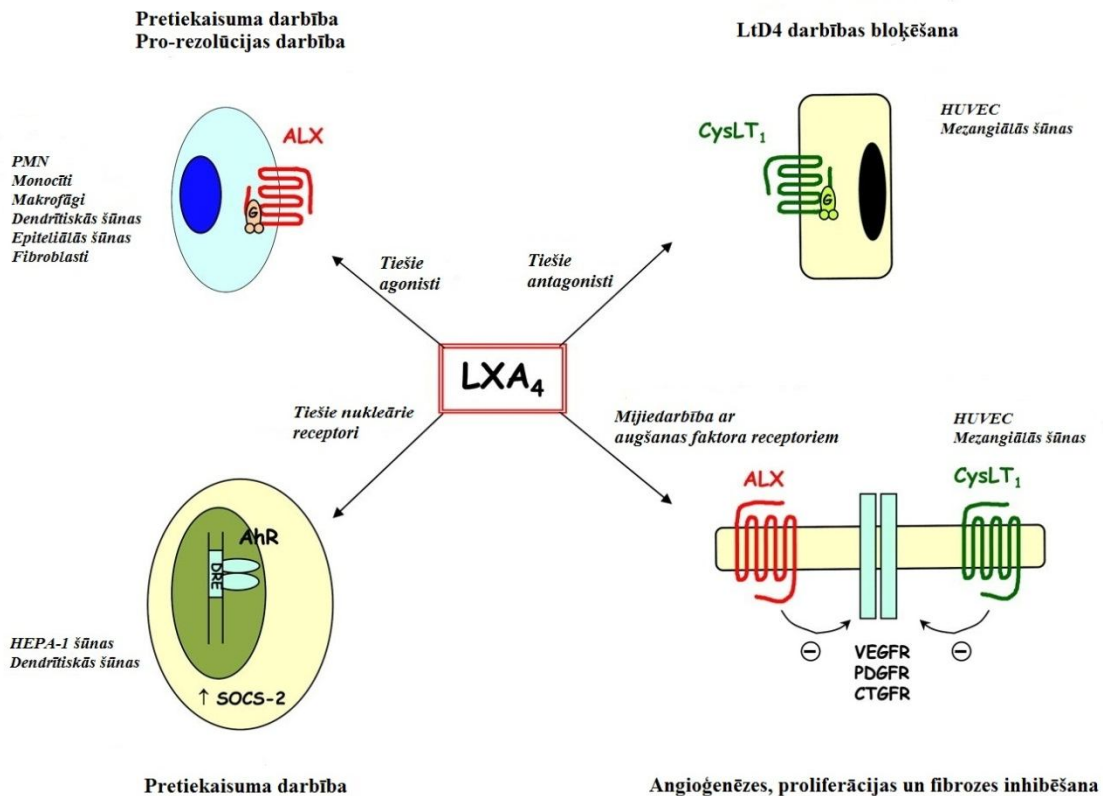
Galvenais LXs inaktivācijas veids iekaisuma vietā ir dehidrogenācija monocītos, kad LXA₄ tiek pārvērsts par 15-okso-LXA₄, kam seko specifiska dubulto saišu redukcija. Šo reakciju katalizē 15-hidroksi/okso-eikosanoīdā oksireduktāze (15-PGDH). Izveidotais 15-okso-LXA₄ ir bioloģiski neaktīvs un tālāk, iedarbojoties okso-eikosanoīdu reduktāzei (OER, tiek apzīmēta arī kā LXA₄/PGE 13,14-reduktāze/LtB₄ 12-hidroksidehidrogenāze PGR/LtB₄DH), tiek pārveidots par 13,14-dihidro-15-okso-LXA₄ (Clish *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2005).

Otrs, retāk sastopamais LXA₄ degradācijas veids ir ω-oksidācija (Maderna, Godson, 2009).

2.6.3. Lipoksīnu darbība

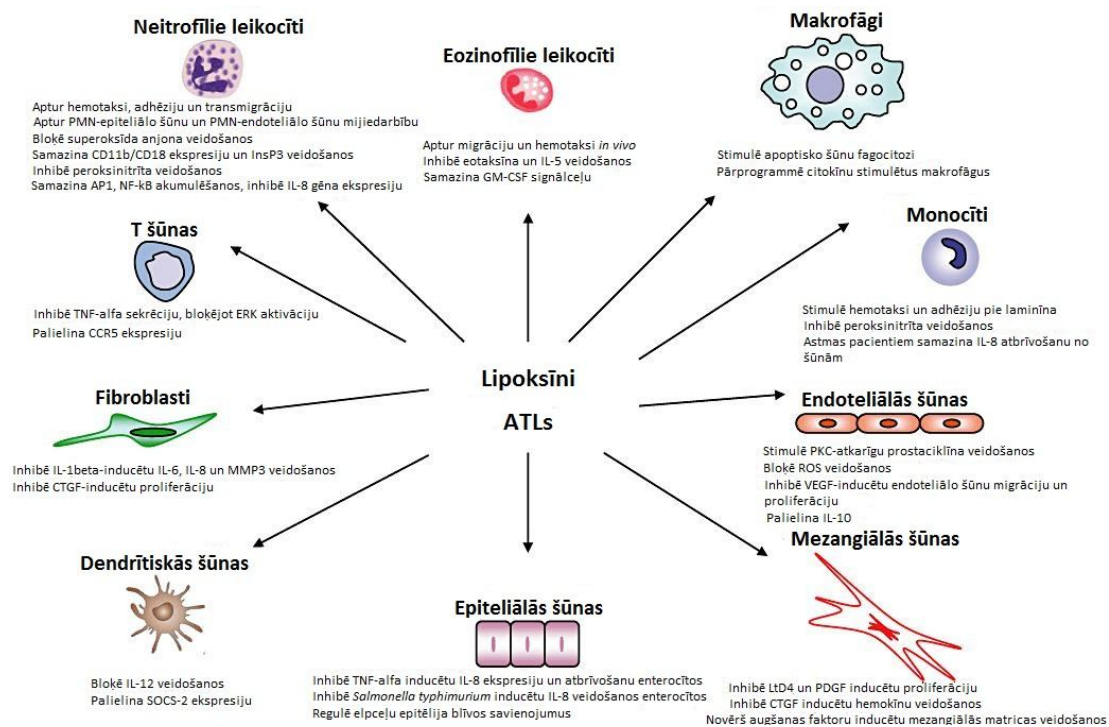
LXs darbība ir šūnu specifiska, tā ir mērķēta uz akūta iekaisuma samazināšanu un tā paātrinātu atrisināšanos. LXs darbojas vairākos veidos:

1. Stereoselektīvi to specifiskos šūnas virsmas receptoros – LXA_4 receptoriem (ALXR) stimulējot iekaisumu samazinošās reakcijas;
2. Mijiedarbojas ar Lts receptoriem, piem., BLt1 vai cysLt1 un cysLt2, bloķējot iekaisumu uzturošās reakcijas;
3. Mijiedarbojas ar intracelulāriem mērķobjektiem izcelsmes šūnā, regulējot to darbību, piem., proteīnkināzi C (PKC), (skat. 12. attēlu).



12.attēls. Lipoksīna A₄ (LXA₄) iekaisumu samazinošo darbību mediē vairāki receptori in vivo: 1) tieša lipoksīna A₄ receptora (ALXR) aktivācija kā receptora agonistam; 2) tieša *cis*leikotriēnu receptora cysLT₁ inhibīcija kā receptora antagonistam; 3) tieša nukleārā ariloglūdeņraža receptora (AhR) aktivācija; 4) mijiedarbība ar augšanas faktora receptoriem. HUVEC – cilvēka nabassaites vēnas endotēlija šūnas; SOCS-2 – citokīnu signālsistēmas supresors 2; VEGFR – vaskulārais endoteliālās augšanas faktora receptors; PDGFR – trombocītu atvasinātais augšanas faktora receptors; CTGFR – saistaudu augšanas faktora receptors (Chiang *et al.*, 2006).

LXs ir iekaisumu samazinoši mediatori, kas tiek veidoti iekaisuma laikā, veicinot PMN mediēta iekaisuma atrisināšanos (Starosta *et al.*, 2006). Tie modulē specifiskas darbības, kas iesaistītas imūnajās iekaisuma reakcijās, darbojoties kā PMN stop signāli, ierobežot to ieplūdi iekaisuma vietā (citas LXs izauktas darbības šūnās un audos skat. 13. attēlā un 1. tabulā), inhibējot PMN un arī eozinofilo leukocītu rekrutāciju un aktivāciju (Maderna, Godson, 2009). Turklāt LXs funkcionāli bloķē LtB₄ un peptidoleikotriēna LtD₄ darbību (Serhan, 2005).



13.attēls. Lipoksīna A₄ un no aspirīna atvasinātā lipoksīna (ATL) iedarbība uz šūnām (Maderna, Godson, 2009).

LXA₄ un LXB₄ ir vazoaktīvi, galvenokārt vazodilatējoši, mediatori. LXs nanomolārās koncentrācijās regulē imunoloģiskās iekaisuma reakcijas (Romano *et al.*, 2007), veicinot to atrisināšanos. Nepieciešamais mediators daudzums, lai nomāktu leukocītu reakcijas ir ~10-100 reizes mazāks salīdzinājumā ar to, kāds ir vajadzīgs vazoregulācijai (Serhan, 2005).

LXs ne tikai ierobežo iekaisuma procesu, bet arī veicina tā atrisināšanos. LXs pārprogrammē makrofāgus no to klasiskā iekaisumu uzturošā (M1) fenotipa uz alternatīvi aktivētu fenotipu, palielinot apoptisko šūnu fagocītisko kapacitāti (Maderna, Godson, 2009). LXs stimulē monocītu hemotaksi un adhēziju, neizsaucot to degranulāciju vai ROS atbrīvošanu. LXs stimulē *in vitro* apoptisko šūnu attīrīšanu, ko veic makrofāgi nefloģiskā veidā, t.i., aktivē monocītus kā iespējamus hemotakses aģentus, bet nestimulē tam sekojošus notikumus, piem., superoksīda anjona veidošanos (Spite, Serhan, 2010). LX-stimulēta fagocitoze ir saistīta ar palielinātu transformējošā augšanas faktora-β1 (TGF-β1) atbrīvošanu no makrofāgiem un

samazinātu IL-8 un MCP-1 atbrīvošanu. Iepriekš minētos procesus nodrošina proteīna kināze C un PI-3 kināze (MADERNA, GODSON, 2009).

LXs tieši stimulē gēnu ekspresiju, kas iesaistīti endogēnā iekaisumu samazinošā un rezolūcijas procesā, un ierobežo NF-κB aktivāciju (MADERNA, GODSON, 2009).

LXA₄ kavē PDGF inducēto, ar fibrozi saistīto gēnu ekspresiju nieru mezangiālajās šūnās, norādot, ka LXA₄ ir antifibrotisks aģents, kas novērš augšanas faktora inducēto mezangiālās matricas veidošanos un nieru slimību attīstīšanos. Turklāt LXA₄ modulē TNF-α inducētu proliferāciju un citokīnu atbrīvošanu, kā arī saistaudu augšanas faktora (CTGF) mediētu fraktalkīna, MCP-1 un RANTES sekrēciju žurkas mezangiālajās šūnās (MADERNA, GODSON, 2009). Papildus LXA₄ spējai uzturēt nieru epitēlija integritāti, tas arī stimulē ZO-1, kladīnu un okludīna ekspresiju un transepitēliālās rezistences nodrošināšanu bronhiālajās epitēliālajās šūnās (GRUMBACH *et al.*, 2009).

LXA₄ un ATL stimulē gēnu ekspresiju nieru mezangiālajās šūnās, fibroblastos un endoteliālajās šūnās, kā arī regulē intracelulāro starpnieku proteīnu (piem., LSP-1) fosforilāciju, kas nosaka tādas funkcionālās reakcijas, kā šūnu kustīgumu, ROS veidošanos un citoskeleta pārmaiņas. Tāpat LXA₄-ALXR mijiedarbība regulē augšanas faktoru receptorus. LXA₄ un ATL bloķē cysLt1 receptorus tiešā receptoru konkurences veidā. Lai gan LXs regulē LtB₄ darbību, tie nekonkurē BLt1 vai BLt2 receptoros par LtB₄ specifisko saistīšanos. LXs arī tieši iedarbojas uz intracelulāriem signāla mērķproteīniem, piem., regulējot transkripcijas faktorus (SERHAN, 2005).

LXA₄ ir iesaistīts organisma antimikrobiālās aktivitātēs, stimulējot gļotādas epitēliālās šūnas transkribēt antibakteriocīdo proteīnu ziņojumus (SERHAN, 2005).

LXs regulē patogēnu izraisītu iekaisumu un veicina gļotādas bakteriālo degradāciju, ekspresējot bakteriālu/caurlaidību inducējošu proteīnu (BPI) epitēliālajās šūnās (CANNY *et al.*, 2002; HAWORTH, LEVY, 2007).

1.tabula. LXA₄ un ATL darbība šūnās un audos.

Šūnas veids/audi	Darbība	Reference
Asinis	Samazina CD11b/CD18, novērš L-selektīna šķelšanos, samazina peroksinitrīta veidošanos PMN, monocītos un limfocītos;	Filep <i>et al.</i> , 1999
	Samazina monocītu, eozino fīlo leukocītu, dabīgo galētājšūnu, dendrītisko šūnu un mieloīdo progenitoru reakcijas	Kühn, O'Donnell, 2006
Neitrofilie leukocīti	Samazina hemotaksi, adhēziju un transmigrāciju;	Hachicha <i>et al.</i> , 1999; Kühn, O'Donnell, 2006; Maderna, Godson, 2009; Haworth, Levy, 2007
	Samazina mijiedarbību starp PMN un epiteliālajām šūnām un starp PMN un endoteliālajām šūnām;	Colgan <i>et al.</i> , 1993; Fierro <i>et al.</i> , 2003
	Bloķē TNF- α inducētu superoksīda anjona veidošanos;	Hachicha <i>et al.</i> , 1999; Kühn, O'Donnell, 2006; Haworth, Levy, 2007
	Samazina CD11b/CD18 ekspresiju un inozitola trifosfāta veidošanos;	Börgeson <i>et al.</i> , 2011
Inhibē peroksinitrīta veidošanos;	Serhan <i>et al.</i> , 2008	
Samazina AP-1 un NF- κ B akumulēšanos un inhibē IL-8 gēna ekspresiju;	Jozsef <i>et al.</i> , 2002	

	Inhibē IL-1 β atbrīvošanu un ekspresiju;	Hachicha <i>et al.</i> , 1999
	Inhibē azurofīlu degranulāciju;	Gewirtz <i>et al.</i> , 1999; Haworth, Levy, 2007
	Stimulē AA atbrīvošanu un aktivē fosfolipāzi D;	Romano <i>et al.</i> , 2007
	Inhibē MAC1 ekspresiju;	
	Inhibē IP3 veidošanos;	Kühn, O'Donnell, 2006
	Supresē elastāzes sekrēciju	Kühn, O'Donnell, 2006
Monocīti un makrofāgi	Stimulē hemotaksi un adhēziju pie laminīna, nepaaugstinot citotoksicitāti;	Maddox, Serhan, 1996
	Inhibē LPS stimulētu peroksinitrīta veidošanos;	Romano <i>et al.</i> , 2007
	Samazina NF- κ B aktivāciju;	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
	Inhibē IL-8 atbrīvošanu no šūnām astmas pacientiem;	Serhan <i>et al.</i> , 2008
	Stimulē nefloģisku apoptisko PMN fagocitozi;	Godson <i>et al.</i> , 2000; Serhan, 2005
	Stimulē kalcija mobilizāciju	Romano <i>et al.</i> , 2007
Dendritiskās šūnas	Bloķē IL-12 veidošanos;	Romano <i>et al.</i> , 2007
	Regulē SOCS-2 ekspresiju	Romano <i>et al.</i> , 2007
Eozinofīlie leukocīti	Regulē migrāciju/hemotaksi un degranulāciju;	Romano <i>et al.</i> , 2007; Maderna, Godson, 2009
	Inhibē eotaksīna un IL-5 veidošanos;	Levy <i>et al.</i> , 2002
	Inhibē alergēnu inducēto eozinofīlo leukocītu infiltrāciju in vivo	Bandeira-Melo <i>et al.</i> , 2000

Aktivētas T šūnas	Nomāc TNF- α sekrēciju, bloķējot ERK aktivāciju	Ariel <i>et al.</i> , 2003; Haworth, Levy, 2007
NK šūnas	Bloķē citotoksicitāti	Haworth, Levy, 2007; Romano <i>et al.</i> , 2007
Mieloīdie progenitori	Stimulē mieloīdos, no kaulu smadzenēm atvasinātos progenitorus	Stenke <i>et al.</i> , 1991
Enterocīti	Inhibē TNF- α inducētu IL-8, MCP-1 un RANTES ekspresiju un atbrīvošanos; Inhibē <i>S. typhimurium</i> inducētu IL-8 veidošanos	Goh <i>et al.</i> , 2001 Gewirtz <i>et al.</i> , 1998
Fibroblasti	Nomāc IL-1 β inducētu IL-6, IL-8 un MMP-3 veidošanos; Paaugstina metaloproteināzes audu inhibitoru (TIMP)-1 un 2 ekspresiju	Sodin-Semrl <i>et al.</i> , 2000 Sodin-Semrl <i>et al.</i> , 2000
Endotēlijs (HUVECs)	Samazina IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-8 sekrēciju un palielina IL-10 veidošanos; Bloķē P-selektīna ekspresiju	Baker <i>et al.</i> , 2009 Romano <i>et al.</i> , 2007
Mezangiālās šūnas	Inhibē LtD ₄ inducētas darbības	Badr <i>et al.</i> , 1989
Elpceļu epiteliālās šūnas	antagonizē <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vai TNF- α inducētu IL-8 sekrēciju	Romano <i>et al.</i> , 2007
Hepatocīti	Samazina peroksisomu proliferatora aktivētu receptora- α un CINC-1 ekspresijas līmeni	Planaguma <i>et al.</i> , 2002

Bronhi	Veicina relaksāciju pēc prekontrakcijas, bloķējot peptidoleikotriēnus cilvēka elpceļos	Christie <i>et al.</i> , 1992
Plaušu fibroblasti	samazina ERK un PI3K/Akt aktivāciju	Romano <i>et al.</i> , 2007
Adipozie audi	Nomāc iekaisumu, samazinot IL-6 un palielinot IL-10 ekspresiju	Börgeson <i>et al.</i> , 2012
Acs radzene	Palielina hēma oksigenāzes-1 ekspresiju epiteliālajās šūnās	Biteman <i>et al.</i> , 2007

2.6.4. Lipoksīnus saistošie receptori

LXs savu bioloģisko aktivitāti veic, izmantojot vairākus receptorus:

1. LXA₄ receptors ALXR (aprakstu skat. tālāk);
2. Cits potenciāls LXA₄ receptors ir ariloglūdeņraža receptors (AhR). Dendritiskās šūnās LXA₄, mijiedarbojoties ar AhR vai ALXR, modulē iedzimtās un iegūtās imūnreakcijas. Lai LXA₄ veicinātā reakcija, saistoties ar AhR, būtu adekvāta, mediatoram jābūt mikromolārā līmenī, savukārt mijiedarbībai ar ALXR vai cysLt – maksimālas ir nanomolāras koncentrācijas (MADERNA, Godson, 2009).
3. Trešais receptors, ar kuru iespējama LXs saistība, ir cysLt receptors.

2.6.5. Lipoksīna A₄ receptors

Cilvēka ALXR ir hemotakses tipa receptors ar iekaisumu samazinošām īpašībām, kas pārraida stop signālu, samazinot iekaisumu veicinošos signālus liganda atkarīgā veidā (Chiang *et al.*, 2005).

ALXR gēns atrodas 19. hromosomā 19q13.3-q13.4 pozīcijā. Tas aizņem 9,60 kb uz tiešā vījuma. ALXR pieder ar G proteīnu saistīto receptoru (GPCR) saimei un formil peptīda receptoru (FPR) gēnu klasterim (Romano *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2006).

ALXR saista LXA₄ ar augstu afinitāti ($K_D = 1,7$ nM), (Haworth, Levy, 2007). LXA₄ un ALXR saistīšanās ir augsti stereoselektīva; saistībai un aktivitātei ir nepieciešama 15-hidroksil grupa, tetraēna struktūra, 11,12-*cis* un 13,14 dubultsaite tetraēna molekulā (Romano *et al.*, 2007). Savukārt LXB₄ ar šo receptoru nesaistās (Chiang *et al.*, 2005; Maderna, Godson, 2009).

Specifiska LXA₄ atpazīšanas vieta vispirms tika identificēta uz neitrofīlo leukocītu virsmas (Fiore *et al.*, 1992). Pašlaik zināms, ALXR tiek ekspresēts dažādās šūnās – PMN, monocītos (Maddox *et al.*, 1997), bazofīlajos leukocītos (de Paulis *et al.*, 2004), dendrītiskajās šūnās (Yang *et al.*, 2001) un T limfocītos (Ariel *et al.*, 2003), endoteliālajās šūnās (Fiore *et al.*, 1993) un vaskulārajās gludo muskuļu šūnās, intestinālajās epiteliālajās šūnās, astrocītos un nieru mezangiālajās šūnās, enterocītos (Gronert *et al.*, 1998). ALXR izteikti ekspresējas liesā un plaušās (sinoviālajos fibroblastos, bronhiālajās epiteliālajās šūnās), mazākā mērā sirdī, aknās un placentā (Romano *et al.*, 2007). ALXR ekspresiju elpceļu epiteliālajās šūnās regulē vairāki citokīni IL-13, INF- γ , IL-1 β , PGE₂. Interesanti, ka ALXR ekspresija ir novērota arī astrocitomas, neiroblastomas, resnās zarnas vēža šūnās, kā arī krūts, prostatas un olnīcu audzēja šūnās, kas liek domāt, ka ALXR ir iesaistīts vēža proliferācijas un invāzijas procesā (Romano *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2005; Maderna, Godson, 2009). IL-10 palielina ALXR ekspresiju uz dabiskajām galētājšūnām, norādot uz ALXR lomu vēža imūnās reakcijas regulēšanā (Mocellin *et al.*, 2004).

ALXR saista ne tikai LXA₄, bet arī citus ligandus – virālas/bakteriālas izcelsmes vai endogēni veidotos peptīdus. Atšķirībā no LXA₄ lai ALXR atpazītu peptīdu ligandus, nepieciešama N-glikozilācija. LXA₄ saistīšanai ir vajadzīga trešā ekstracelulārā cilpa, septītais transmembrānu domēns un ALXR COOH gals, bet peptīdu – vēl citi reģioni. Vairumam ALXR peptīdu agonistiem piemīt iekaisumu veicinoša darbība, ieskaitot, urokināzes plazminogēna aktivatoru (**uPA**), kas veicina iekaisuma šūnu hemotaksi; seruma amiloīdu A (**SAA**), stimulējot mononukleāro fagocītu un PMN hemotaksi, NF- κ B veicinātu IL-8 sekrēciju, ekstracelulārās signālu regulētās kināzes (ERK) 1/2 un p38 MAPK aktivāciju; amiloīdā prekursora proteīna fragmentu **A β ₄₂**, veicinot ROS veidošanos mononukleārajos fagocītos; priona proteīna fragmentu **PrP₁₀₆₋₁₂₆**, veidojot fibrilas *in vitro* un stimulējot iekaisuma veicinošo citokīnu atbrīvošanu no monocītiem un mikroglijas; **MHC saistošo proteīnu**, kas inducē nekrozi un stimulē PMN hemotaksi un makrofāgu mediētu PMN fagocitozi; β hemokīna fragmentu **CK β 8-1**;

antimikrobiālo **temporīnu A**, kas veicina PMN un monocītu / makrofāgu rekrutāciju. Izņēmums ir aneksīns 1 (**ANXA1**), kam piemīt iekaisumu samazinoša darbība, ierobežojot PMN infiltrāciju *in vivo* (Romano *et al.*, 2007; Kebir *et al.*, 2008).

Signalizācija. ALXR signalizācija ir specifiska šūnām un agonistiem, jo GPCRs saista G-proteīnus un aktivē sekundāros mediatorus, kā arī vājina signālceļus. ALXR ir receptors, kas pārslēdz iekaisumu samazinošās reakcijas uz iekaisumu veicinošām saistībā ar aktivējošo aģentu. Tomēr LXA₄ un ATL ir spēcīgākie ALXR agonisti (skat. 14. attēlu), tie darbojas nanomolārā koncentrācijā, kamēr iekaisumu veicinošie ligandi tikai mikromolārā diapozonā (Romano *et al.*, 2007).

Neitrofilajos leukocītos ALXR signalizācija daļēji notiek, pārveidojot polizoprenilfosfātu (PIPP) un inhibējot leukocītu specifiskā proteīna-1 fosforilāciju, kas samazina p38-mitogēna aktivētu proteīna kināzes kaskādi (Haworth, Levy, 2007).

ALXR transkripciju būtiski palielina citokīni entrocītos – IL-13 un INF- γ , kā arī IL-4, IL-6, IL-1 β , LPS (Chiang *et al.*, 2005).

ALXR aktivācija dažu sekunžu līdz minūšu laikā aptur PMN reakcijas no receptora atkarīgas intracelulāras fosforilācijas regulēšanas ceļā. LXs un ALXR tieši stimulē gēnu ekspresiju PMN, aktivējot agrīnas gēnu reakcijas, kas iesaistītas iekaisuma kavēšanas un tā atrisināšanās procesā (Serhan, 2005).

ALXR aktivācija nomāc LtB₄ iniciētu poliizoprenilfosfāta pārveidošanu, izraisot preskalēna difosfātu (PSDP), kas ir PMN negatīvais intracelulārais signāls, kurš inhibē rekombinantā PLD un superoksīda anjona veidošanos, akumulāciju. Turklāt LXA₄ samazina peroksinitrīta veidošanos un nepieļauj peroksinitrīta signalizāciju leukocītos (Jozsef *et al.*, 2002). LXs inducē citoskeleta restrukturizāciju un ar membrānām saistītās RhoA GTFāzes pieaugumu, kā arī Rho aktivitāti monocītos un makrofāgos, inhibējot cAMP; kas kopā norāda uz LXs nozīmi iekaisuma rezolūcijas veicināšanā (Maderna *et al.*, 2002). LXA₄ bloķē LtB₄ vai fMLP stimulētu PMN transmigrāciju vai adhēziju, regulējot β 2 integrīna atkarīgo PMN adhēziju (Chiang *et al.*, 2005).

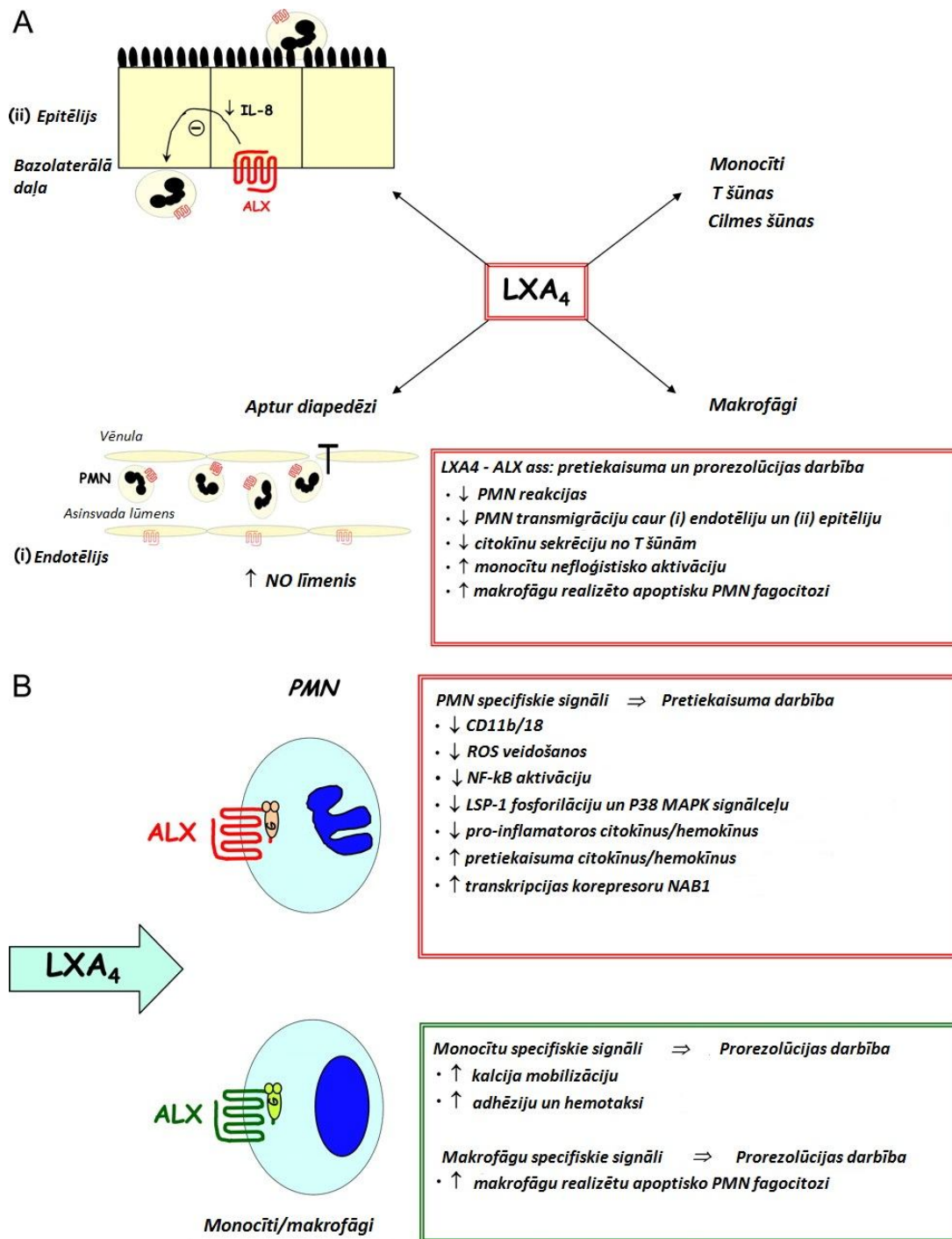
ALXR gēna un šūnas virsmas ekspresija ir būtiski samazināta perifērajos asins leukocītos astmas pacientiem salīdzinājumā ar veseliem indivīdiem (Planaguma *et al.*, 2008).

Glikokortikoīdi inducē ALXR ekspresijas pieaugumu leukocītos un *in vivo* dermatīta modeļos (MADERNA, Godson, 2009).

ALXR N-glikozilācijai ir būtiska nozīme ligandu specifiskumā un receptora funkciju pārslēgšanā lokālās organisma aizsardzības vietās (MADERNA, Godson, 2009).

LXs inhibē proliferāciju, ko inducē augšanas faktori, piem., PDGF, epidermālais augšanas faktors (EGF) un CTGF, mijiedarbojies ALXR un receptora tirozīna kināzēm. ALXR ligands aneksīns-1 arī regulē EGF un PDGF receptoru proteīna fosforilāciju (MADERNA, Godson, 2009).

LXs stimulēta apoptisko leukocītu fagocitoze ir atkarīga no miozīna IIA defosforilācijas. LXA₄ regulē eozinofīlo leukocītu reakcijas pret GM-CSF, inhibējot proteīna tirozīna fosforilāciju. Tāpat tas saistībā ar ALXR regulē vaskulārā endoteliālās augšanas faktora (VEGF) receptora-2 fosforilāciju endoteliālajās šūnās (MADERNA, Godson, 2009).



14.attēls. Lipoksīna A₄ – lipoksīna A₄ receptora (LXA₄ – ALXR) ass iekaisuma laikā: šūnu specifiska iedarbība. A, audu līmenī, iekaisumu samazinošā un pro-rezolūcijas LXA₄ iedarbību visticamāk veido LXA₄ – ALXR dažādu šūnu, kas iesaistītas iekaisuma procesā, mijiedarbības summēšanās. B, šūnu līmenī, LXA₄ iesaistīts ALXR iniciētos signālceļos neitrofilajos leukocītos (PMN) un monocītos/makrofāgos. NO – slāpekļa oksīds; CD11b/18 – CD11b/18 T šūnas; ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi; NF-κB – nukleārais faktors kappa B; LSP-1 – limfocītu specifiskais proteīns 1; P38 MAPK – P38 mitogēnaktivētā proteīnkināze; NAB1 – RNS saistošais proteīns (Chiang *et al.*, 2006).

2.7. Lipoksigenāzes atvasinātie mediatori respiratoro slimību gadījumā

Starosta ar līdzautoriem (*Starosta et al.*, 2006) pētīja LXA₄ daudzumu bronhoalveolārajā skalojumā (BAL) cistiskās fibrozes (CF) pacientiem. Pētnieki nekonstatēja LXA₄ koncentrācijas deficītu CF pacientu BAL materiālā. Tomēr viņi ieguva samazinātu LXA₄/PMN attiecību tiem CF pacientiem, kuriem BAL materiālā bija palielināts PMN skaits. Tāpat tika novērota pozitīva korelācija starp BAL LXA₄ līmeni un PMN skaitu, kas kopā ar iepriekšminēto norāda, ka relatīvs LXA₄ koncentrācijas samazinājums varētu būt iespējams tikai CF pacientiem ar pastiprinātu iekaisumu. Papildus pētījuma dati parādīja negatīvu korelāciju starp LXA₄ un FEV₁ (*Starosta et al.*, 2006).

Astmas pētījumā tika novērots, ka gan LtB₄, gan LXA₄ bazālā veidošanās bija samazināta smagas astmas pacientu kultivētos alveolārajos makrofāgos (AM) salīdzinājumā ar neastmātiķiem, kamēr LXA₄ līmenis bija mazāks smagas astmas pacientiem salīdzinājumā ar vieglu slimību. LPS inducētā LtB₄ sintēze bija paaugstināta pacientiem ar smagas gaitas astmu salīdzinājumā ar vieglu astmu un kontroles grupu, savukārt LPS stimulētā LXA₄ veidošanās smagiem astmātiķiem bija līdzīgā apmērā salīdzinājumā ar vieglas pakāpes slimību. Pētījuma ietvaros LPS inducēto eikosanoīdu veidošanās samazināta kortikosteroīdu terapija (CS) - LtB₄ sintēze daļēji tika nomākta ar deksametazonu smagas astmas pacientiem, bet LXA₄ veidošanos CS terapija nomāca gan vieglas, gan smagas gaitas astmas gadījumā. Izsakot LtB₄/LXA₄ attiecību, novēroja tās novirzi uz iekaisumu veicinošo pusi, un netika novērota attiecības samazināšanās pēc deksametazona lietošanas (*Bhavsar et al.*, 2010).

2.7.1. LtB₄ un LXA₄ hroniskas obstruktīvas plaušu slimības gadījumā

Literatūrā pieejami diezgan daudz datu par iekaisuma veicinošā mediatora LtB₄ nozīmi hroniskas obstruktīvas plaušu slimības patoģenēzē, tomēr vairumā pētījumu slimnieku grupā tikuši iesaistīti pacienti ar stabilu slimības gaitu. Savukārt pētījumu par LtB₄ antagonista iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ ietekmi un šo mediatoru savstarpējo saistību HOPS gadījumā ir krietni mazāk.

Pētījumā, kur tika noteikta LtB₄ koncentrācija HOPS pacientiem, novēroja, ka LtB₄ līmenis inducēto krēpu supernatantā HOPS pacientiem ir palielināts salīdzinājumā ar kontroles grupu, un tas korelēja ar PMN skaitu krēpās. Turklāt perifērajos asins monocītos novēroja acetilholīna inducētu LtB₄ sintēzi, ko samazināja ekstracelulārā signāla regulētās kināzes (ERK) inhibīcija (Profita *et al.*, 2005).

Četrus gadus ilgā pētījumā tika novēroti HOPS pacienti ar emfizēmu, kas bija atmetuši smēķēšanu. Gan sākuma, gan pētījuma beigu posmā pacientiem persistēja elpceļu iekaisums, neskatoties uz smēķēšanas pārtraukšanu, un turpinājās plaušu struktūras sabrukšana, kas bija novērojama datortomogrāfijā. Vienlaicīgi novēroja palielinātu LtB₄, IL-8 un MPO daudzumu krēpās, turklāt LtB₄ un IL-8 koncentrācija HOPS pacientiem četrus gadus pēc smēķēšanas pārtraukšanas bija pieaugusi salīdzinājumā ar sākotnējo koncentrāciju (Miller *et al.*, 2011).

Izmeklējot HOPS pacientus stabilā slimības fāzē un paasinājuma laikā, tika konstatēts, ka slimībai saasinoties pieaug krēpu eozinofilo leukocītu, limfocītu un neitrofilo leukocītu skaits. Pēdējos pavada arī to hemotakses aģentu – LtB₄ un IL-8 - palielinājums krēpās, īpaši bakteriāla uzliesmojuma laikā. Tāpat novērojama sistēmiskā iekaisuma pastiprināšanās paasinājuma laikā, ko raksturo C reaktīvā proteīna (CRO) pieaugums asinīs īpaši bakteriāla paasinājuma gadījumā (Bathoorn *et al.*, 2009).

Salīdzinot stabilas gaitas HOPS pacientus ar α 1-antitripsīna deficītu un bez tā, augstāka LtB₄ koncentrācija krēpās tika novērota pirmajai pacientu grupai. Saliekot abas grupas kopā, vidējā LtB₄ koncentrācija krēpās bija lielāka par cita PMN hemotakses aģenta IL-8 līmeni, un to neietekmēja α 1-AT fenotips. Turklāt LtB₄, bet ne IL-8, koncentrācija korelēja ar krēpu hemotakses aģentu aktivitāti (Woolhouse *et al.*, 2002).

Seggev ar līdzautoriem (Seggev *et al.*, 1991) pētīja seruma LtB₄ koncentrāciju veseliem cilvēkiem, astmas pacientiem un HOPS pacientiem, kuri saņēma orālo kortikosteroīdu (CS) terapiju un kuri nesaņēma. Pētījuma dati vislielāko LtB₄ koncentrāciju uzrādīja HOPS pacientu grupā salīdzinājumā ar pārējām pētījuma grupām. Salīdzinot HOPS pacientu grupas, kas saņēma CS un kas nesaņēma, augstāka LtB₄ koncentrācija tika novērota HOPS pacientiem ar CS terapiju salīdzinājumā ar

pacientiem bez CS terapijas. Līdz ar to pētnieki secināja, ka orālie CS neietekmē LtB₄ līmeni asins serumā un to darbībai ir cits mehānisms (Seggev *et al.*, 1991).

Hoffmeyer ar līdzautoriem (Hoffmeyer *et al.*, 2009) pētījumā noteica LtB₄ koncentrāciju izelpas gaisa kondensātā (EBC) asimptomātiskiem smēķētājiem un veseliem nesmēķētājiem. Smēķētājiem vidējais LtB₄ līmenis EBC bija 22,8 pg/ml, kamēr nesmēķētājiem tikai 14,1 pg/ml; tomēr šī atšķirība nebija būtiska. Jāpiemin, ka pētījumā tika noteikts arī lipīdu peroksidācijas produkts 8-izo-prostaglandīns F_{2α} (8-izo-PGF_{2α}), kas veidojas brīvajiem radikāļiem peroksidējot AA. EBC LtB₄ koncentrācija korelēja ar EBC 8-izo-PGF_{2α} daudzumu (Hoffmeyer *et al.*, 2009).

Sērijveida pētījumā, kad LtB₄ tika noteikts EBC materiālā 5., 14., 30. un 60. dienā pēc paasinājuma sākuma HOPS pacientiem, kuri terapijā saņēma inhalējamus CS (ICS), netika novērotas būtiskas atšķirības iekaisumu veicinošā mediatora koncentrācijā; turklāt tas ievērojami neatšķīrās arī no LtB₄ līmeņa EBC stabilas gaitas HOPS pacientiem un kontroles grupas indivīdiem (Ko *et al.*, 2009).

Tā kā HOPS galvenokārt raksturo neitrofilu iekaisums un zināms, ka neitrofilo leukocītu spēcīgākais hemotakses aģents ir LtB₄, ir jādama par tā nozīmi šī hroniskā iekaisuma patoģenēzē, saistot to ar iekaisuma nespēju atrisināties, ko, iespējams, izsauc arahidonskābes (AA) metabolisma nespēja pārslēgties no iekaisumu veicinošā LtB₄ sintēzes uz iekaisumu samazinošā un pro-rezolūcijas mediatora LXA₄ veidošanos, sekmējot iekaisuma pastāvīgu attīstību un persistenci.

2.8. Lipoksīni iekaisuma un slimības apstākļos

Traucēta LXs biosintēze korelē ar akūtas iekaisuma reakcijas nespēju atrisināties, tālāk attīstoties hroniskam iekaisumam (Maderna, Godson, 2009).

LXs veidošanās ir identificēta dažādos audos un to samazināta sintēze saistāma ar daudzām slimībām. Visos šajos stāvokļos vienojošais ir: (1) LXs atrodami dažādā bioloģiskā materiālā – asinīs, BAL, urīnā un specifiskos audos; (2) to īslaicīga saistība ar citiem lipīdu mediatoriem; (3) slimības progresijas pakāpe (Serhan, 2005).

Uz LXs nozīmi hronisku slimību gadījumā norāda Th2 šūnu sintezētā 15-LO, regulējot IL-4 un IL-13, kas konstatējami audos iekaisuma vai slimības laikā. Tāpat T šūnas ietekmē LX receptoru aktivitāti (Ariel *et al.*, 2003). Vēl citos pētījumos ir

pierādīta LXA₄ un tā analogu aizsargājošā ietekme pret transplantāta atgrūšanu (Serhan, 2005).

Miyahara ar līdzautoriem (Miyahara *et al.*, 2005) elpceļu hiperreaktivitātes (AHR) pētījumā, izmantojot BLt1^{-/-} un BLt1^{+/+} peles konstatēja, ka pilnas alergēna inducētas hiperreaktivitātes attīstībā nozīme ir LtB₄ un tā receptora BLt1 ekspresijai elpceļos. Mehānisms, kādā minētais receptors izraisa bronhospazmu līdz galam nav skaidrs, tomēr, domājams, to veicina LtB₄/BLt1 kompleksa mediēta agrīna T šūnu rekrutācija elpceļos un tai sekojošu IL-13 sekretēšanu, kas izraisa dziedzeršūnu hiperplāziju un AHR. Savukārt IL-13 atbrīvošana sekmē LtB₄ veidošanos, kas pastiprina T šūnu akumulāciju elpceļos (Miyahara *et al.*, 2005).

LXs veidošanās ir samazināta vai izmainīta hronisku aknu slimību un hroniskas mielogēnas leukēmijas gadījumā.

Elpceļu iekaisuma, cistiskās fibrozes, arī glomerulonefrīta gadījumā LXs veidošanās ir samazināta. Turklāt LXA₄ koncentrācija elpceļu izdalījumos pacientiem ar cistisko fibrozi ir būtiski samazināta salīdzinājumā ar citiem iekaisīgiem plaušu stāvokļiem (Chiang *et al.*, 2005).

Citu iekaisīgu slimību gadījumos LXA₄ sintēze ir palielināta, tas novērots pacientiem ar juvenilu periodontītu un vieglu astmu (Bonnans *et al.*, 2002), kā arī nazālo polipu gadījumā un pēc aterosklerotiskās pangas plīsuma (Chiang *et al.*, 2005).

Tomēr vairumā hronisku iekaisīgu slimību gadījumos *in vivo* novērojams daudz vairāk iekaisumu veicinošo mediatoru, piem., Lts, salīdzinājumā ar LXA₄ daudzumu. Nav zināms, vai starp hronisku iekaisumu un LXs neveidošanos un no tās izrietošas rezolūcijas pastāv cēloņa-un-efekta princips un vai ģenētiskā slimības predispozīcija daļēji saistāma ar LXs biosintēzes defektiem, signālceļiem vai to darbību (Serhan, 2005).

LXA₄ samazina iekaisumu daudzu ādas slimību gadījumā, pie tām pieskaitāmas psoriāze, atopiskais dermatīts un alergiskais kontaktdermatīts (Maderna, Godson, 2009).

LXs iekaisumu samazinošā ietekme konstatēta arī *in vivo* glomerulonefrīta un akūtas nieru mazspējas modeļos, kā arī *in vitro* modeļos (Maderna, Godson, 2009).

LXA₄ regulē transepiteliālo rezistenci bronhiālajā epitēlijā, palielinot kaudīna ekspresiju. Bojāta LXs biosintēze cistiskās fibrozes vai astmas gadījumā izraisa epiteliālās barjeras funkcijas traucējumus (Maderna, Godson, 2009).

LXA₄ tiek saistīts ar neirogēnas izcelsmes iekaisumu, tam piemīt iekaisumu samazinoša darbība uz astrocitomas šūnām, darbojoties NF-κB atkarīgā veidā. LXA₄ samazina IL-1β inducēto IL-8 proteīna līmeņa ekspresiju smadzenēs un inhibē IκBα sabrukšanu (Decker *et al.*, 2009).

2.tabula. LXA₄ un ATL darbība dzīvnieku slimības modeļos.

Slimības modelis	Biodarbība
Dermāls iekaisums	Inhibē PMN rekrutēšanu auss ādā; novērš vaskulāro caurlaidību
Išēmijas / reperfūzijas izraisīts bojājums	Samazina išēmijas/reperfūzijas inducētu plaušu bojājumu; atdala tuvējos leukocītus mezentēriskas išēmijas/referzūcijas gadījumā; samazina miokardiāla infarkta apjomu un laukumu miokardiālas išēmijas/reperfūzijas riska gadījumā
Peritonīts	Mazina PMN iesaistīšanos un eksudāta veidošanos; sekmē makrofāgu veiktu PMN fagocitozi
Kolīts	Samazina iekaisumu veicinošo gēnu ekspresiju, iekaisumu, imūno disfunkciju un kolīta smaguma pakāpi; mazina svara zudumu
Glomerulonefrīts	Samazina leukocītu adhēziju un PMN iesaistīšanos
Astma	Mazina elpceļu hiperreaktivitāti un iekaisumu
Cistiskā fibroze	Samazina neitrofilo iekaisumu, plaušu bakteriālo noslodzi un slimības smaguma

	pakāpi
Angioģenēze	Samazina endoteliālo šūnu proliferāciju un migrāciju
Periodontīts	Samazina mikrobu ierosināto, PMN mediēto audu bojājumu un kaulu sairšanu
Acs ievainojums	Paātrina radzenes re-epitelializāciju, ierobežo termāla bojājuma izsauktos efektus (neovaskularizāciju, redzes miglošanos) un veicina organisma aizsardzību
Kaulu smadzeņu transplantāts	Aizsargā pret transplantāta atgrūšanu

Kopumā literatūrā pieejamā informācija ir pretrunīga un nepilnīga par arahidonskābes derivātu, kas veidoti lipoksigenāžu ietekmē, lomu akūta iekaisuma patoģenēzē, veicinot tā atrisināšanos vai - gluži pretēji – sekmējot tā persistenci un veicinot hronisku iekaisumu. Ir diezgan plaša informācija par LtB_4 daudzumu hroniskas obstruktīvas plaušu slimības gadījumā, tomēr vairumā gadījumu ir pētīti pacienti stabilā slimības fāzē. Savukārt LXA_4 plaši apskatīts bronhiālās astmas patoģenēzes sakarā, savukārt par HOPS atrodamas vien dažas publikācijas. Savukārt par šo mediatoru līmeni konkrētu akūtu plaušu slimību kontekstā informāciju iegūt nav iespējams. Ņemot vērā visu iepriekš minēto, mēs par pētījuma galveno uzdevumu izvirzījām noteikt LtB_4 un LXA_4 lomu un to savstarpējo saistību tieši HOPS paasinājuma fāzē, kas, iespējams, ļautu izprast slimības hronisko gaitu un norādītu uz jaunām terapijas iespējām, lai nepieļautu HOPS uzliesmojumus, tādējādi samazinot pacientu dzīves kvalitātes pasliktināšanos un mirstību. HOPS pacientus saasinājuma fāzē salīdzinājām ar pneimonijas pacientiem, kuriem iekaisums atrisinās ar rekonvalescenci. Par kontroles grupu izvēlējāmies veselus cilvēkus bez plaušu un elpceļu patoloģijām.

3. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

Mērķis: noskaidrot arahidonskābes derivātu – leukotriēna B₄ (LtB₄) un lipoksīna A₄ (LXA₄) – lomu hroniskas obstruktīvas plaušu slimības paasinājuma fāzes un pneimonijas patoģenēzē.

Darba uzdevumi:

1. Izvērtēt, vai LXA₄ un LtB₄ saturu var noteikt izelpas gaisa kondensāta alveolārajā un bronhiālajā frakcijā un kā tas korelē ar šo savienojumu koncentrācijām inducētajās krēpās;
2. Noteikt krēpu šūnu spektru HOPS un pneimonijas pacientiem un to salīdzināt ar veselu cilvēku krēpu šūnu sastāvu;
3. Salīdzināt LXA₄ un LtB₄ satura pārmaiņas HOPS un pneimonijas pacientu inducētajās krēpās, salīdzinot tās ar veseliem cilvēkiem;
4. Noteikt lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresijas izmaiņas HOPS un pneimonijas pacientu inducēto krēpu leukocītos;
5. Noteikt ALXR ekspresiju HOPS pacientu plaušu audu paraugos, izmantojot imūnhistoķīmisko identifikāciju.

4. PACIENTI UN IZMANTOTĀS METODES

4.1. Pētījuma norise un iesaistītās pacientu un veselo cilvēku grupas

Pētījums doktora disertācijas izstrādei ilga no 2008. – 2012. gadam, un tas norisinājās Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedrā un Latvijas Universitātes Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūtā. Pētījuma izstrādei 31.03.2010. tika saņemta Latvijas Universitātes Kardioloģijas zinātniskā institūta klīniski-fizioloģisko pētījumu, zāļu un farmaceitisko produktu klīniskās izpētes ētikas komitejas atļauja.

Darba ietvaros tika izveidotas trīs pētījuma personu grupas – HOPS pacienti paasinājuma stadijā, kas raksturoja akūtu persistējošu plaušu iekaisumu, pneimonijas pacienti ar akūta iekaisuma iezīmēm, kas atrisinās, un kontroles grupa, kurā ietilpa praktiski veseli cilvēki, kuri nesmēķēja vai bija atmetuši smēķēšanu, vidējam pakgadu skaitam nepārsniedzot 5 pakgadus. HOPS grupā tika iekļauti 34 pacienti ar vidēji smagu vai smagu slimības norisi (GOLD II un GOLD III) paasinājuma stadijā, kas bija pašreizējie smēķētāji vai bijušie smēķētāji, no pētījuma tika izslēgti pacienti ar nopietnām kardioloģiskām saslimšanām, kā arī tie, kam papildus HOPS tika pierādīta onkoloģiska saslimšana. Pneimonijas grupā tika iekļautas 22 personas, kas ārstējās stacionārā sakarā ar vidējas un smagas gaitas norises slimību. Abas pacientu grupas stacionārā saņēma specifisku antibakteriālu terapiju. Papildus HOPS pacientu grupā septiņas personas saņēma inhalējamo glikokortikosteroīdu terapiju.

Kontroles grupā tika iekļautas 29 personas, kam izmeklējumu brīdī un divas nedēļas iepriekš nebija bijuši respiratori simptomi.

Visu trīs pētījuma grupu personas pirms pētījuma tika iepazīstinātas ar tā norisi, iespējamiem riskiem un blakusparādībām un saņēma atbildes uz sev interesējošiem jautājumiem, kā arī parakstīja piekrišanas veidlapu par dalību pētījumā.

Visām personām bija paredzēta viena vizīte pie pētniecības personāla, kuras laikā tika aizpildīta anketa par personas demogrāfiskajiem un antropometriskajiem datiem, noskaidrota iepriekšējo saslimšanu anamnēze; veikta izelpas gaisa kondensāta savākšana, bronhodilatācijas tests, lai novērtētu cilvēka elpceļu un plaušu funkcionālo stāvokli, un krēpu indukcija.

4.2. Izelpas gaisa kondensāta ieguve

Izelpas gaisa kondensāts tika savākts, izmantojot *EcoScreen2 Jaeger* (Vācija) aparāturu. Pacienti tika uzlikts deguna klipsis un lūgts mierīgi elpot iemutī, kas bija savienots ar izelpas gaisa savācējaparātu. Aparātā tika iestādīts -19°C temperatūras režīms, kā rezultātā izelpotais gaiss tika pārveidots kondensātā un uzkrāts divos aparātā ievietotos vienreizējas lietošanas polistirēna maisos. Vienā maisā tika uzkrāts izelpotais gaiss no bronhiem, otrā – no alveolām. Gaisa nodalīšana tika veikta ar speciālu aparātā iebūvētu vārstu palīdzību. Izelpas gaisa kondensāta savākšanai tika izmantotas divas iepriekš iestatītas programmas, kas atšķīrās ar pretestību, kāda radās, elpojot aparātā. Pacientu grupām tika izmantota programma ar zemāku pretestību, kontroles grupai – veselajiem indivīdiem – ar lielāku pretestību. Šis izmeklējums tika veikts tik ilgi līdz abos maisos tika uzkrāts 80 L izelpotā gaisa kondensāts. Ja izmeklējamā persona nogura, izmeklējuma laikā ik pa laikam tā drīkstēja vienu līdz trīs minūtes atpūsties un tad turpināt elpošanu.

Kad tika savākts nepieciešamais izelpotā gaisa kondensāta daudzums, tas tika sadalīts kriostobriņos, katrā pa 0,5 ml, un uzglabāts ledusskapī -80°C temperatūrā līdz turpmākai materiāla analīzei.

4.3. Bronhodilatācijas tests

Vispirms visiem pacientiem un kontroles grupas personām tika veikts ārējās elpošanas funkcijas izmeklējums (Miller *et al.*, 2005), izmantojot *MasterScreen* spirogrāfu *Jaeger MS Pneumo* (Vācija). Pirms izmeklējuma pacienti netika lietojuši bronholītiskos preparātus vismaz astoņas stundas un smēķējuši vismaz vienu stundu. Pacienti veica forsētas izelpas un ieelpas manevrus vismaz trīs reizes, līdz tika iegūtas līdzīgas līknes un iegūtie grafiki tika uzskatīti par adekvātiem, un tika aprēķināti šādi raksturlielumi – FEV_1 (forsētās izelpas plūsmas ātrums pirmajā sekundē), Tifno indekss (FEV_1 daļa no forsētās vitālās kapacitātes FEV_1/FVC), FVC (forsētā vitālā kapacitāte), MEF_{75} , MEF_{50} , MEF_{25} (maksimālās plūsmas ātrums forsētas izelpas pirmās, otrās un trešās ceturtdaļas beigu punktos), PEF (izelpas maksimālplūsma), FEF (forsētās izelpas plūsmas vidējais ātrums) un tika noteiktas to procentuālās vērtības no individuālās normas. Tad pacientam tika inhalēti 200 μg salbutamola (īslaicīgas darbības beta-2 agonists), izmantojot krājtelpu *BECLOMET* (Somija). Pēc

piecpadsmit minūtēm trīs reizes tika atkārtota spirometrija, aprēķinot iepriekš minēto raksturlielumu vērtības pēc medikamenta iedarbības un to reversibilitāti.

4.4. Krēpu indukcija

Krēpu indukcija tika veikta pēc Eiropas Respiratorās biedrības izstrādātajām vadlīnijām (Pin *et al.*, 1992; Paggiaro *et al.*, 2002; Pizzichini *et al.*, 2002). Vispirms tika veikts bronhodilatācijas tests, kas aprakstīts iepriekš. Spirometrija tika veikta arī pēc katras hipertonskā sāls šķīduma inhalācijas, lai kontrolētu plaušu ventilācijas funkciju izmeklējuma laikā. Maksimāli tika veiktas trīs piecu minūšu ilgas hipertonska 4% sāls šķīduma inhalācijas. Inhalācijas tika veiktas ar ultraskaņas inhalatoru (*Omron NE-U17 (NE-U17-E). OMRON MATSUSAKA Co, Japāna*). Inhalatora jauda bija 1 ml/min. Pēc katras inhalācijas reizes pacientam tika lūgts kārtīgi izskalot muti un rīkli ar ūdeni un mēģināt atklepot krēpas tam speciāli paredzētā trauciņā. Tad tika veikta iepriekš minētā kontroles spirometrija. Ja FEV₁ nebija pazeminājies par 20% pēc bronhodilatācijas mērījuma, krēpu indukcija tika turpināta līdz tika iegūti 5 ml krēpu materiāla vai vēl divas reizes (protokolu skat. 3. tabulā). Ja plaušu rādītāji bija samazinājušies par 20% pēc bronhodilatācijas mērījuma, izmeklējums tika pārtraukts un pacientam tika inhalēts bronhus paplašinošs līdzeklis – 200 µg salbutamola.

3.tabula. Krēpu indukcijas protokols.

Nr. p.k.	Manipulācija	Inhalētās vielas koncentrācija	Inhalācijas laiks
1.	Sniedz pacientam informāciju un instrukcijas par procedure	-	-
2.	Pārbauda aparāturu (iestāda ultraskaņas inhalatora ražību 1 ml/min), ievada pacienta datus spirometrā	-	-
3.	Spirometrija (FEV ₁ %)	-	-
4.	Inhalē salbutamolu ar dozējamo inhalatoru	200µg	-
5.	Gaida	-	15 min
6.	Spirometrija (FEV ₁ %)	-	-
7.	Inhalē NaCl	4%	5 min
8.	Lūdz izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
9.	Lūdz klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
10.	Spirometrija (FEV ₁ %)	-	-
11.	Inhalē NaCl	4%	5 min
12.	Lūdz izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
13.	Lūdz klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
14.	Spirometrija (FEV ₁ %)	-	-
15.	Inhalē NaCl	4%	5 min
16.	Lūdz izskalot muti un rīkli ar ūdeni	0%	-
17.	Lūdz klepot, atkrēpot un iesplaut trauciņā	-	-
18.	Spirometrija (FEV ₁ %)	-	-

FEV₁ – forsētas izelpas tilpums pirmajā sekundē pēc pilnas ieelpas; NaCl – nātrija hlorīds.

4.5. Inducēto krēpu pirmapstrāde

Pēc krēpu materiāla iegūšanas tas tika uzglabāts ledusskapī +4⁰C temperatūrā un divu stundu laikā apstrādāts. Lai sašķeltu disulfīdu saites krēpās, tām tika pievienots pēc masas ekvivalents daudzums 0,1% ditiotreitola (*Sigma-Aldrich*, ASV) šķīdums Henksa buferētā fizioloģiskā šķīdumā (*Sigma-Aldrich*, ASV) un tad samaisīts, un vēlāk inkubēts uz ledus termostatējošā ūdens kratāmajā vannā (*Grant GLS400*, *Grant*

Instruments, Lielbritānija) piecpadsmit minūtes +37⁰C temperatūrā. Pēc inkubēšanas kratāmajā vannā paraugs tika filtrēts caur neilona sietu, kur acu izmērs bija četrdesmit astoņi mikrometri. Divdesmit mikrolitriem filtrāta pievienoja divdesmit mikrolitru tripānzilo krāsu (*Sigma-Aldrich Company*, Lielbritānija) un sakratīja aptuveni piecas sekundes, izmantojot *vortex* mikseri (*Biosan*, ASV). Tad tika skaitīts kopējais šūnu skaits Neubauera hemocitometrā (*Carl Zeiss Jena*, Vācija). Atsevišķi tika skaitīts plakanā epitēlija šūnu daudzums paraugā un dzīvo un beigto šūnu skaits. Tad aprēķināja kopējo šūnu skaitu mililitrā krēpu parauga.

Pārējais filtrāts tika centrifugēts (izmantojot centrifūgu *Hettich Zentrifugen, Universal 320R*, Vācija) desmit minūtes +4⁰C temperatūrā ar 1000 x g lielu paātrinājumu, ar pipeti tika nosūkts supernatants un sadalīts sešos kriostobriņos. Kriostobriņus ar supernatantu uzglabāja ledusskapī -80⁰C temperatūrā līdz materiāla turpmākai apstrādei. Šūnu sediments tika resuspendēts ar Henksa buferēto fizioloģisko šķīdumu. Šūnu suspensija tika iepildīta citocentrifūgas (*Cellspin II, Hettich Zentrifugen*, Vācija) piltuvēs pa 75 un 100 μL katrā. Citocentrifugēšana tika veikta sešas minūtes. Tad tika izņemti stikliņi, uz kuriem bija uzņests šūnu sediments citocentrifugēšanas laikā, un tika ļauts tiem nožūt.

4.5.1. Krēpu šūnu krāsošana pēc Meja-Grīnvalda-Gimzes metodes

Sākumā šūnas tika fiksētas pie stikliņiem, tos iemērcot metanolā uz desmit minūtēm. Vispirms stikliņi sešas minūtes tika krāsoti ar 0,25% Meja-Grīnvalda krāsu (*Reagentia*, Somija). Tad krāsu noskaloja ar buferētu destilētu ūdeni, kura pH bija 6,9. Otrajā krāsošanas etapā tika izmantota Gimzes krāsa (*Sigma-Aldrich Company*, Lielbritānija), kurā stikliņus turēja desmit minūtes. Pēc minētā laika stikliņi tika skaloti ar buferētu destilētu ūdeni un tika atstāti nožūt velkmes skapī.

Nokrāsotajos stikliņos tika veikta šūnu diferenciālskaitīšana līdz četriem simtiem kodolainām plaušu izcelsmes šūnām (tās bija leikocīti un bronhu epitēlijšūnas). Paraugs tika uzskatīts par derīgu, ja tajā tika konstatēts mazāk par 30% plakanā epitēlija šūnām. Pretējā gadījumā tas norādītu, ka paraugs satur palielinātu siekalu piejaukumu.

4.6. Lipoksīna A₄ receptora imūncitoķīmiska identifikācija krēpu šūnās

Ar šo izmeklēšanas metodi tika pārbaudīta LXA₄ receptora (ALXR) ekspresiju uz šūnām, kas tika iegūtas, inducējot krēpas.

- Nožuvušie stikliņi desmit minūtes tika fiksēti acetona-etanola šķīdumā, kura proporcija bija 3:1. Šāda fiksēšana saglabā šūnas uztriepes kvalitāti un strukturālās īpatnības;
- Tad stikliņi trīs reizes tika skaloti fosfāta buferšķīdumā (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstāti uz piecām minūtēm;

Tālākā krāsošana notika, izmantojot polimēru metodi. Visas reakcijas tika veiktas Shandon mitrajā kamerā istabas temperatūrā.

- Vispirms preparāti tika inkubēti desmit minūtes peroksidāzes bloķētājaģenta (*Dako*, Dānija) klātbūtnē, kas saturēja 3% ūdeņraža peroksīdu;
- Tad stikliņi trīs reizes tika skaloti fosfāta buferšķīdumā (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstāti uz piecām minūtēm;
- Pēc tam preparāti +4⁰C temperatūrā divpadsmit stundas tika inkubēti ar primāro antivielu FPRL-1 / ALXR (*abcam*, Lielbritānija), kas pagatavota attiecībā 1:300, pievienojot antivielas atšķaidītāju (*Dako*, Dānija);
- Pēc inkubācijas stikliņi trīs reizes tika skaloti fosfāta buferšķīdumā (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstājot uz piecām minūtēm;
- Tad vienu stundu tika veikta inkubācija ar sekundāro antivielu, kas bija ar IgG iezīmēta un ar mārrotku peroksidāzi konjugēta polimēra dekstrāna molekula (*Dako*, Dānija);
- Pēc tam preparāts trīs reizes tika skalots fosfāta buferšķīdumā (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstājot uz piecām minūtēm;
- Nobeigumā septiņas minūtes tika veikta vizualizācijas reakcija ar hromogēnu – 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB), kas veidoja brūnu reakcijas gala produktu. To pagatavoja, ņemot 1 ml DAB substrāta (*Dako*, Dānija) un pievienojot 20 µl DAB hromogēnu (*Dako*, Dānija);
- Pēc vizualizācijas lai pārtrauktu šo reakciju, preparāts trīs reizes tika skalots krāna ūdenī, ceturtajā – atstājot uz piecām minūtēm;

- Beigās stikliņiem tika uzpilināta ksilola ūdens bāzes līme un tika uzlikti segstikliņi, un tika veikta mikroskopija.

Katrā paraugā tika skaitītas 20 redzeslaukos atrodamās pozitīvās (t.i., iekrāsotās) FPRL-1 / ALXR šūnas, veicot diferenciālskaitīšanu polimorfonukleārajām un mononukleārajām FPRL-1 / ALXR, un to skaits tika pārrēķināts uz visiem krēpu leukocītiem.

4.7. Bioķīmiskās analīzes

4.7.1. Izelpas gaisa kondensāta paraugu koncentrēšana

Pirms eikosanoīdu noteikšanas izelpas gaisa kondensāta paraugos tie tika koncentrēti.

Vispirms 100 µL parauga tika atšķaidīts ar 200 µL metanola un tad kopējam tilpumam tika pievienots 1,5 mL dejonizēta ūdens. 1 mL iegūtā šķidruma tika paskābināts līdz pH 3,5, tam pievienojot 1 N HCl un samaisīts. Tad tika sagatavotas C₁₈ Sep-Pak® gaismas kolonnas, mazgājot tās ar 2 mL metanola un tad 2 mL dejonizēta ūdens. Sagatavotajās kolonnās tika ievadīts paraugs un tika iestādīts plūsmas ātrums 1 mL minūtē. Kad paraugs bija izgājis cauri kolonnai, tā tika mazgāta ar 5 mL ūdens un tad 5 mL heksāna. Eikosanoīdi tika izvadīti no kolonnas, izmantojot 2 mL metilformāta. Metilformāts savukārt tika iztvaicēts ar slāpekļa gāzes straumi. Atlikums tika resuspendēts ar 1 mL atšķaidītu ekstrakcijas buferi, iegūtais šķīdums tika izmantots tālākai eikosanoīdu daudzuma noteikšanai paraugā.

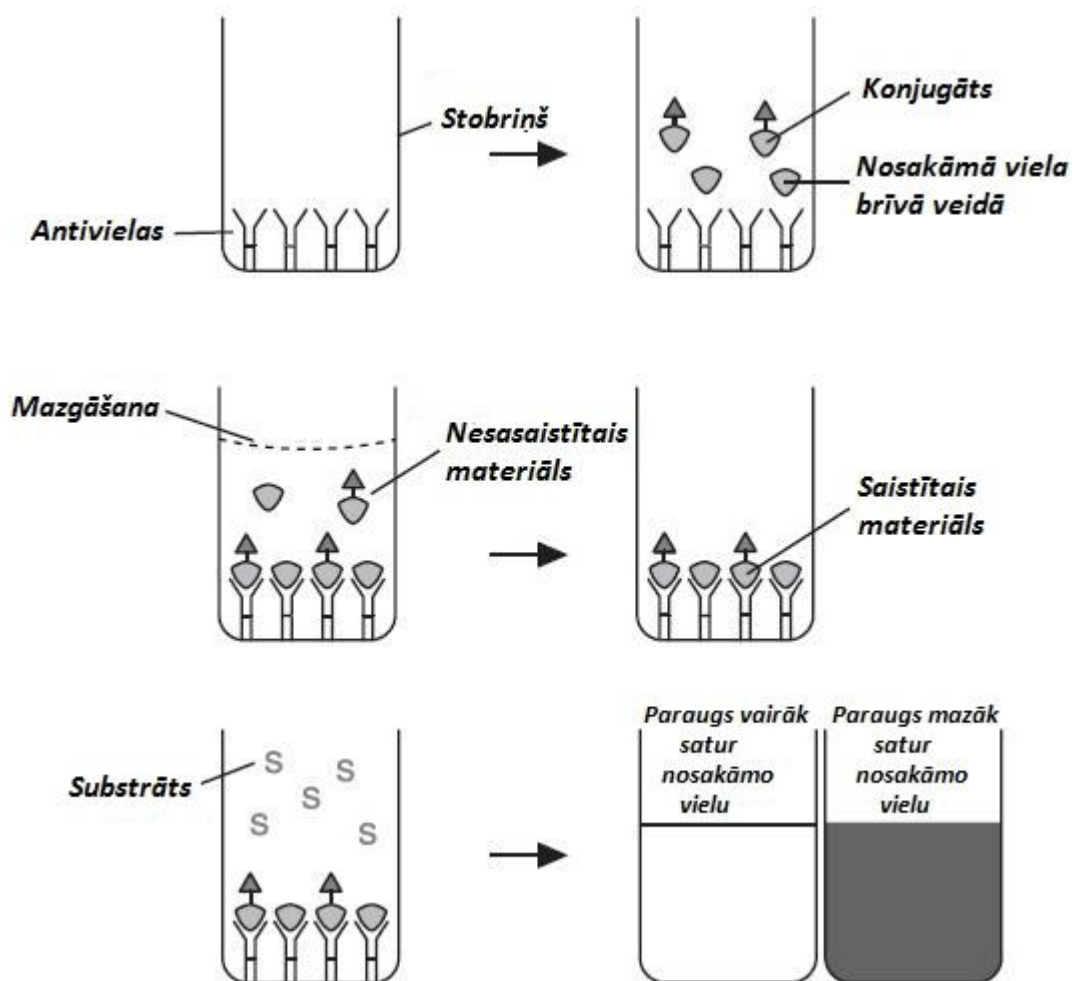
4.7.2. Krēpu supernatanta sagatavošana ELISA analīzei

Pirms eikosanoīdu daudzuma noteikšanas inducēto krēpu supernatantā minētie paraugi tika vēlreiz centrifugēti 1,5 stundu ilgi 37000 x g lielā paātrinājumā, izmantojot *Beckman* ultracitocentrifūgu (*GMI, Inc., ASV*). Tas tika darīts, lai paraugā iespējami samazinātu nogulsņu daudzumu, kas varētu ietekmēt tālāko analīžu rezultātu.

4.7.3. Leikotriēna B₄ noteikšana

LtB₄ inducēto krēpu un izelpas gaisa kondensāta paraugos tika noteikts, izmantojot komerciāli pieejamos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) komplektus, ko piedāvāja firma „*Cayman Chemical Company*” (*ASV*).

Analīzes pamatā ir konkurējoša darbība starp LtB₄ un LtB₄-acetilholinesterāzes (AChE) konjugātu (LtB₄ treiseri) par ierobežoto LtB₄ antiseruma daudzumu. Tā kā LtB₄ treisera koncentrācija ir konstanta, kamēr LtB₄ līmenis mainās, LtB₄ treisera daudzums, kas spēj saistīt LtB₄ antiserumu, ir apgriezti proporcionāls LtB₄ koncentrācijai katrā analīzes plates stobriņā. Antivielas – LtB₄ komplekss saistās ar peles monoklonālo anti-truša IgG, kas jau iepriekš bijis ieklāts plates stobriņos. Plate tiek mazgāta, lai aizvadītu nesaistītos reaģentus un pēc tam stobriņos tiek pievienots Elmana reaģents (kas satur AChE substrātu). Enzimātiskās reakcijas produktam ir dzeltena krāsa, un tas tiek absorbēts pie 412 nm viļņa garuma. Spektrofotometriski noteiktā krāsas intensitāte ir proporcionāla LtB₄ treisera daudzumam, kas ir saistīts pie stobriņa, kas savukārt ir apgriezti proporcionāls brīvajam LtB₄ daudzumam stobriņā (skat. 15. attēlu).



15.attēls. Leikotriēna B₄ noteikšanas shēma analīzes paraugos (*Cayman Chemical Company*).

Vispirms pēc instrukcijas tika pagatavoti standartšķīdumi, LtB₄ treiseris (LtB₄-acetilholinesterāzes (AChE) konjugāts), kas analīzes ietvaros konkurē ar LtB₄, lai saistītos ar ierobežoto LtB₄ antiseruma daudzumu, un LtB₄ antiserums. Tad pēc instrukcijas plates stobriņos iepilināja ELISA buferi, pagatavotos LtB₄ standartus, nosakāmos paraugus (krēpu supernatantu vai izelpas gaisa kondensātu), LtB₄ AChE treiseri un LtB₄ antiserumu. Tad plate tika pārklāta ar pārsegu un inkubēta divpadsmit stundas +4°C temperatūrā. Pēc minētā laika pēc instrukcijas tika pagatavots Elmana reaģents. Tad plates stobriņi tika iztukšoti un piecas reizes mazgāti ar mazgāšanas buferi. Tad katrā stobriņā tika iepilināti 200 μL Elmana reaģenta un plates kopējās aktivitātes stobriņos papildus pievienoja 5 μL treisera. Plate tika pārklāta ar pārsegu un ievietota plašu kratītājā uz divām stundām, ļaujot attīstīties reakcijas krāsai. Pēc

minētā laika tika noņemts plates pārsegs un plate ielikta mikroplašu lasītājā *Biotek ELx808* (ASV), kurā iepriekš tika uzstādīta programma LtB₄ daudzuma nolasīšanai pie 412 nm viļņa garuma.

LtB₄ noteikšanas robežas pētījumā izmantotajam ELISA komplektam, kā arī starpanalīžu un iekšanalīzes variācijas parādītas 4. tabulā. Variācijas tika aprēķinātas, izmantojot vairākus parauga atkārtojumus vienas analīzes ietvaros, kā arī starp vairākām analīžu platēm.

4.tabula. Starpanalīžu un iekšanalīzes variācijas (*Cayman Chemical Company*).

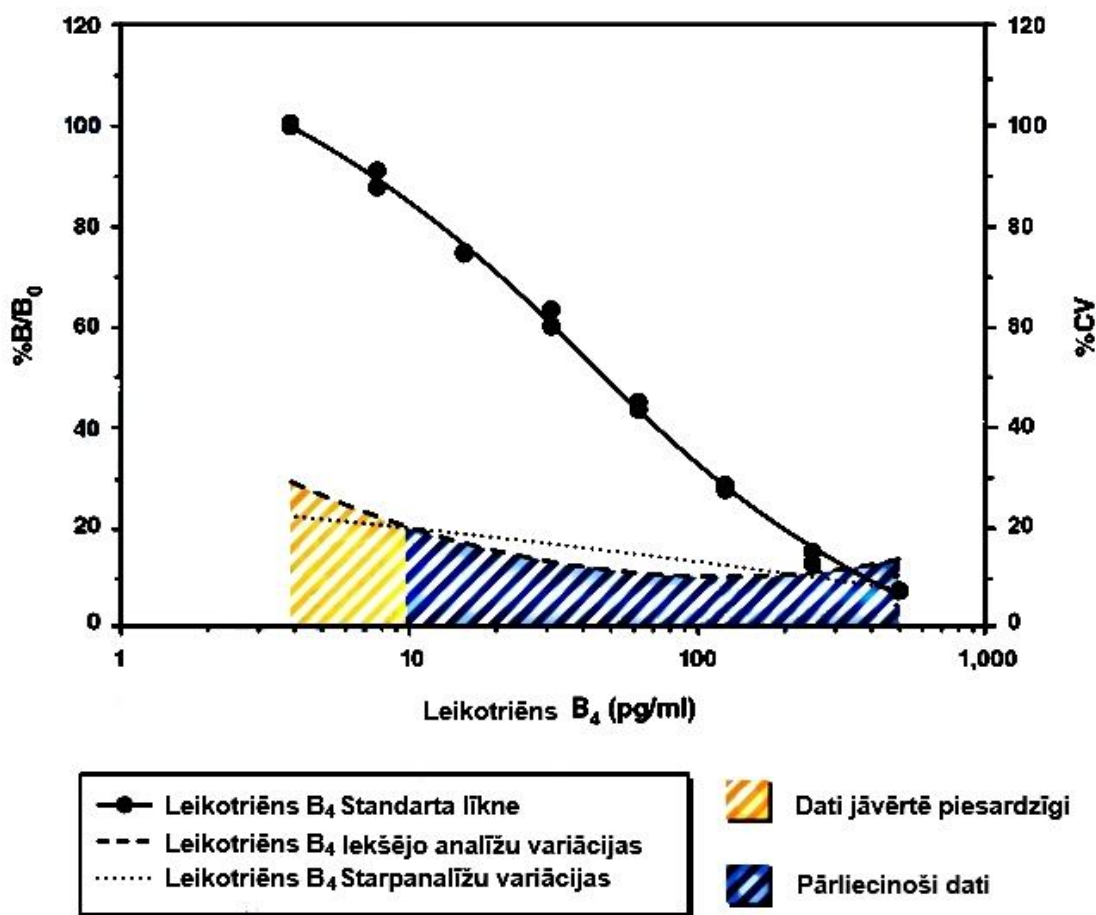
Daudzums (pg/ml)	%CV	
	Starpanalīzes variācija	Iekšanalīzes variācija
500	14,87	11,84
250	10,47	7,78
125	8,37	9,70
62,5	12,49	9,80
31,3	17,64	21,68
15,6	14,95	24,41
7,8	19,26	19,45
3,9	31,45	20,18

%CV (variācijas koeficients) parāda koncentrācijas (nevis absorbcijas) variācijas, kā atskaites punktu izmantojot standartlīkni.

ELISA analīzes LtB₄ iespējamā krusteniskā reakcija parādīta 5. tabulā un analīzes LtB₄ koncentrācijas standartlīkne 16. attēlā.

5.tabula. LtB₄ krusteniskās reakcijas un to iespējamība ELISA analīzē (*Cayman Chemical Company*).

Savienojums	Procentuālā iespējamība
LtB ₄	100%
5(S)-HETE	6,6%
5(R)-HETE	3,7%
20-hidroksi-LtB ₄	2,7%
15(R)-HETE	0,98%
15(S)-HETE	0,4%
6- <i>trans</i> -12- <i>epi</i> -LtB ₄	0,31%
6- <i>trans</i> -LtB ₄	0,11%
5,6-DiHETE	0,07%
Glutations	<0,01%
20-karboksi-LtB ₄	<0,01%
LtC ₄	<0,01%
LtD ₄	<0,01%
LtE ₄	<0,01%
19(R)-hidroksi-PGB ₂	<0,01%



16.attēls. Leikotriēna B₄ koncentrācijas standartlīkne ELISA analīzei. 50% B/B₀ – 50 pg/ml; noteikšanas robeža (80% B/B₀) – 13 pg/ml. %B/B₀ – maksimālā substrāta-parauga saistīšanās (Cayman Chemical Company).

4.7.4. Lipoksīna A₄ noteikšana

LXA₄ inducēto krēpu un izelpas gaisa kondensāta paraugos tika noteikts, izmantojot komerciāli pieejamos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) komplektus, ko piedāvāja firma „Oxford Biomedical Research” (ASV).

Vispirms pēc instrukcijas tika pagatavoti standartšķīdumi un LXA₄ enzīma konjugāts (LXA₄ konjugāts ar mārrotku peroksidāzi). 110 μl atšķaidītam LXA₄ enzīma konjugātam pievienoja 5,5 ml ELISA buferi un samaisīja, izvairoties no šķīduma putošanās. Analīzes mikroplates stobriņos, kuros jau ražotāji bija ieklājuši anti-LXA₄ truša IgG, tika iepilināti 50 μl standartšķīduma vai analizējamā materiāla (inducētās krēpas vai izelpas gaisa kondensāts) katrā pēc instrukcijā pievienotās shēmas. Tad katrā stobriņā tika iepilināti 50 μl LXA₄ enzīma konjugāta un ELISA bufera

maisījuma, un mikroplates stobriņos esošais saturs samaisīts, plati viegli sakratot. Pēc tam plate tika pārklāta ar parafilmu un inkubēta vienu stundu istabas temperatūrā. Pa to laiku tika sagatavots mazgāšanas buferis (paredzēts nesasaistītā enzīma konjugāta, paraugu un standartu izmazgāšanai no plates), 20 µl bufera pievienojot 180 µl dejonizēta ūdens un samaisot. Pēc inkubēšanas plates saturs uzmanīgi tika izliets ārā uz tīrās salvetes, un plate piecas reizes tika mazgāta ar pagatavoto mazgāšanas buferi, izmantojot automātisko mazgātāju *Atlantis* (Asys, Austrija). Tad katrā stobriņā iepilināja 150 µl *K-Blue* substrāta (3,3',5,5'-tetrametilbenzidīns ar ūdeņraža peroksīdu), kas nodrošināja reakcijas vizualizāciju, un plate tika inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā. Pēc inkubēšanas plate tika viegli sakratīta, lai nodrošinātu vienmērīgu krāsojumu visos stobriņos, un, pievienojot katram stobriņam 50 µl 1 N HCl, reakcija tika pārtraukta. Plati ievietoja mikroplašu lasītājā *Biotek Elx808* (ASV) un pie 450 nm viļņa garuma tika nolasīts LXA₄ absorbcijas spektrs katrā stobriņā un tālāk aprēķināts mediators daudzums katrā supernatanta paraugā.

LXA₄ noteikšanas robežas pētījumā izmantotajam ELISA komplektam, kā arī starpanalīžu un iekšanalīzes variācijas parādītas 6. tabulā. Variācijas tika aprēķinātas, izmantojot vairākus parauga atkārtojumus vienas analīzes ietvaros, kā arī starp vairākām analīžu platēm.

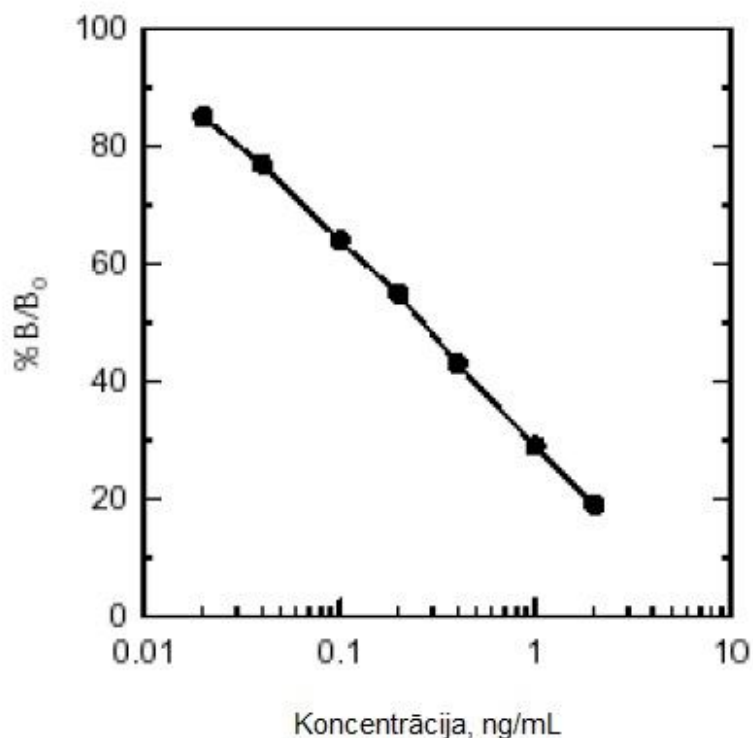
6.tabula. Starpanalīžu un iekšanalīzes variācijas (*Oxford Biomedical Research*).

Detekcijas diapozons	Instrukcijā norādītā analīzes variācija		Aprēķinātā analīzes variācija	
	Iekšanalīzes	Starpanalīžu	Iekšanalīzes	Starpanalīžu
0,02 - 2 ng/ml	<=10%	<=10%	16.15%	17.87%

ELISA analīzes LXA₄ iespējamā krusteniskā reakcija parādīta 7. tabulā un analīzes LXA₄ koncentrācijas standartlīkne – 17. attēlā.

7.tabula. LXA₄ krusteniskās reakcijas un to iespējamība ELISA analīzē
(Oxford Biomedical Research).

Savienojums	Procentuālā iespējamība
LXA ₄	100%
15-epi-LXA ₄	24%
5(S), 6(R)-DiHETE	5%
LXB ₄	1%
15-HETE	0,10%
5-HETE	<0,10%
12-HETE	<0,10%
LtB ₄	<0,01%
LtC ₄	<0,01%
LtD ₄	<0,01%
LtE ₄	<0,01%



17. attēls. Lipoksīna A₄ koncentrācijas standartlīkne ELISA analīzei. %B/B₀ – maksimālā substrāta-parauga saistīšanās (*Oxford Biomedical Research*).

4.8. Plaušu audu parauga iegūšana operācijas laikā un tā apstrāde

Plaušu audu paraugi no lobektomijas vai pneimonektomijas operācijas materiāla tika ņemti distāli no audzēja audiem, tuvu rezekcijas līnijām, kur makroskopiski audzējs netika konstatēts.

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai operācijas laikā iegūtie plaušu audi tika fiksēti 10% formalīnā 48 stundas ilgi, tad tie tika atūdeņoti un ielikti parafīnā. Vēlāk no parafīna blokiem tika pagatavoti 4 μm biezi griezumumi, kas tika uzlikti uz priekšmetstikliņiem un izmantoti imūnhistoloģiskai izmeklēšanai.

4.9. Lipoksīna A₄ receptora imunoloģiska identifikācija plaušu audu paraugā

- Stikliņus ar plaušu audu materiālu uz 15 minūtem iemērcā ksilolā;
- Tad uz sešām minūtēm lika 96% spirtā;

- Sešas minūtes stikliņus turēja 70% spirtā;
- Pēc tam stikliņus trīs reizes skaloja destilētā ūdenī un ceturtajā reizē atstāja uz piecām minūtēm;
- Pagatavoja citrāta buferi, ņemot 40 ml citrāta un pievienojot ūdeni līdz 400 ml. Stikliņus lika pagatavotā citrāta bufera vannā, uzlika vāku tā, ka palika neliela sprauga, un ievietoja mikroviļņu krāsnī 600 W jaudā un turēja līdz citrāta buferis uzvārās;
- Tad bufera vannu pilnīgi pārklāja ar vāku un uz 15 minūtēm atstāja mikroviļņu krāsnī 300 W jaudā;
- Pēc tam paraugus dzesēja istabas temperatūrā 20 minūtes ilgi;
- Stikliņus trīs reizes skaloja 10 reizes atšķaidītā ar destilētu ūdeni fosfāta buferī (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstāja uz desmit minūtēm.

Tālākā krāsošana notika, izmantojot polimēru metodi.

- Uz stikliņiem uzpilināja 150 µl peroksidāzi (saturēja 3% ūdeņraža peroksīdu; *Dako*, Dānija), kas nomāc parauga endogēnos pigmentus, un inkubēja desmit minūtes ūdens vannā istabas temperatūrā;
- Tad skaloja fosfāta buferī (*Sigma Aldrich*, ASV) trīs reizes, ceturtajā – atstāja uz piecām minūtēm;
- Pagatavoja primāro antivielu FPRL-1 / ALXR attiecībā 1:300. Ņēma 10 µl FPRL-1 (*abcam*, Lielbritānija) un pievienoja 3 ml antivielas atšķaidītāja (*Dako*, Dānija). Paraugam uzlika 150 µl primāro antivielu un turēja vienu stundu ūdens vannā istabas temperatūrā;
- Skaloja fosfāta buferī (*Sigma Aldrich*, ASV) trīs reizes, ceturtajā – atstāja uz piecām minūtēm;
- Pievienoja 150 µl Anvision reaģentu (sekundāro antivielu, kas bija ar IgG iezīmēta un ar mārrotku peroksidāzi konjugēta polimēra dekstrāna molekula; *Dako*, Dānija) un uz pusstundu lika ūdens vannā istabas temperatūrā;
- Stikliņus trīs reizes skaloja fosfāta buferī (*Sigma Aldrich*, ASV), ceturtajā – atstāja uz piecām minūtēm;
- Pagatavoja krāsas reaģentu DAB (3,3'-diaminobenzidīnu), kas veidoja brūnu reakcijas gala produktu, – ņemot 1 ml DAB substrāta bufera (*Dako*, Dānija) un pievienojot 20 µl DAB hromogēna (*Dako*, Dānija) un visu nocentrifugējot. Uz

stikliņiem uzpilināja 150 µl pagatavoto DAB šķīdumu un septiņas minūtes turēja ūdens vannā istabas temperatūrā;

- Lai pārtrauktu iepriekšējā soļa reakciju, stikliņus trīs reizes skaloja krāna ūdenī, ceturtajā – atstāja uz piecām minūtēm;
- Uz priekšmetstikliņiem, izmantojot ksilola ūdens bāzes līmi, piestiprināja segstikliņus.

Ar mikroskopijas metodi, izmantojot mikroskopu *Motic BA400* (ASV) katrā paraugā 20 redzes laukos skaitīja ALXR pozitīvās (t.i., iekrāsotās) šūnas. Pēc tam ALXR pozitīvās šūnas tika izteiktas uz laukuma vienību, kā šūnas/mm² pēc shēmas:

$S = \pi * r^2$; kur r – mikroskopa objektīva rādiuss 0,3 mm

$S = 0,28 \text{ mm}^2$ vienā redzeslaukā => $S = 5,6 \text{ mm}^2$ divdesmit redzeslaukos

Saskaitītais pozitīvo ALXR šūnu skaits paraugā.....5,6 mm²

X1 mm²

4.10. Datu statistiskā analīze

Datu statistiskai analīzei tika izmantota datorprogrammas „Statistica 7.0” apakšnodaļas „Vispārējais lineārais modelis GLM” un „Vispārējais linearizējamais modelis GLZ”.

Lai pārbaudītu dzimumu proporciju atšķirību starp grupām, tā kā minētie dati (vīrieši/sievietes) atbilst binomiālajam sadalījumam, tika izmantota GLZ moduļa vienfaktora dispersijas analīze ar logit funkciju (loģiskā regresija).

Gadījumos, kad neatkarīgais faktors bija kategorisks, bet atkarīgais – nepārtraukts, tika izmantota GLM moduļa vienfaktora dispersijas analīze (ANOVA). Savukārt, ja bija divi kategoriski neatkarīgie faktori, tika izmantota divfaktoru dispersijas analīze (ANOVA). Ja faktora ietekme bija būtiska ($p < 0,05$) vai tas izrādīja ietekmes tendenci ($p < 0,1$), tad tika veikta apakšgrupu vidējo aritmētisko salīdzināšana, izmantojot Fišera LSD testu. Atšķirība starp apakšgrupu vidējiem aritmētiskajiem tika uzskatīta par būtisku, ja $p < 0,05$, un par atšķirības tendenci, ja $p < 0,1$. Apakšgrupu dati tika attēloti kā apakšgrupas vidējais aritmētiskais $\pm 95\%$ vidējā aritmētiskā konfidences (ticamības) intervāls.

Pēc analīzes pārbaudīja datu atlikumu (mērījuma nobīdi no apakšgrupas vidējā aritmētiskā; *residuals*) atbilstību normālajam sadalījumam gan vizuāli pēc histogrammas, gan pēc χ^2 un Kolmogorova – Smirnova testa. Atšķirība no normālā sadalījuma tika uzskatīta par būtisku, ja $p < 0,05$. Ja atšķirība bija būtiska, tika pārbaudīta atbilstība log normālajam sadalījumam un veikta atkarīgā faktora logaritmiskā transformācija:

$$y' = \lg y \text{ (Liepa, 1974; Zar, 1999).}$$

Ja y vērtības bija mazi skaitļi un īpaši, ja kaut viena vērtība bija vienāda ar nulli, tika lietota Bārtleta 1947.g. ieteiktā sakarība:

$$y' = \lg (y+1), \text{ (Zar, 1999).}$$

Pēc tam transformētajiem datiem tika veikta atkārtota faktora dispersijas analīze un Fišera LSD tests. Iegūtajiem vidējiem aritmētiskajiem, kā arī augšējām un apakšējām 95% vidējā aritmētiskā konfidences (ticamības) intervāla robežām veica pretēju transformāciju, attiecīgi:

$$y = 10^{y'} \text{ vai } y = 10^{y'} - 1.$$

Divu nepārtraukto faktoru salīdzināšanai tika izmantota GLM moduļa vienkāršā regresija. Tika iegūts taisnes vienādojums

$$y = b_0 + b_1 * x,$$

kur y – atkarīgais faktors, x – neatkarīgais faktors, b_0 – brīvais loceklis, b_1 – taisnes virziena koeficients;

kā arī tika noteikts korelācijas koeficients r un determinācijas koeficients r^2 , kas raksturo proporciju, kādu daļu no kopējās datu izkliedes izskaidro iegūtais regresijas vienādojums. Regresija tika uzskatīta par būtisku, ja $p < 0,05$, bet par ticamības tendenci, ja $p < 0,1$.

Tika pārbaudīta gan neatkarīgā, gan atkarīgā faktora datu atbilstība normālajam sadalījumam gan vizuāli pēc histogrammas, gan χ^2 , gan Kolmogorova – Smirnova testa. Ja $p < 0,05$, tika uzskatīts, ka sadalījums neatbilst normālajam (Gausa) sadalījumam. Tālāk tika veikta tā faktora (atkarīgā, neatkarīgā vai abu) datu transformācija.

Ja logaritmiski bija ticis transformēts tikai atkarīgais faktors (y) par y' , tad sakarība atbilda eksponentregresijai

$$y = b_0 * b_1^x,$$

kuru varēja pārveidot taisnes vienādojumā, to logoritmējot $\lg y = \lg b_0 + x * \lg b_1$, kur veicot substitūcijas $y' = \lg y$, $b_0' = \lg b_0$, $b_1' = \lg b_1$, ieguva taisnes vienādojumu

$$y' = b_0' + b_1' * x,$$

kuru tālāk apstrādāja kā vienkāršu lineāro regresiju. Iegūtajiem b_0' un b_1' koeficientiem tika veikta pretēja transformācija, kur $b_0 = 10^{b_0'}$ un $b_1 = 10^{b_1'}$.

Ievietojot koeficientus $y = b_0 * b_1^x$ vienādojumā, ieguva eksponentregresijas vienādojumu.

Ja y vērtības bija mazi skaitļi un īpaši, ja kaut viena vērtība bija vienāda ar nulli, y tika transformēts par y' , izmantojot vienādojumu $y' = \lg (y + 1)$ un attiecīgi eksponentregresijas vienādojums bija

$$y = b_0 * b_1^x - 1.$$

Ja logoritmiski bija ticis transformēts gan atkarīgais (y), gan neatkarīgais (x) faktors attiecīgi par y' un x' , tad regresija atbilda pakāpes regresijas vienādojumam

$$y = b_0 * x^{b_1} \text{ (Liepa, 1974).}$$

Šo vienādojumu logoritmējot ieguva $\lg y = \lg b_0 + b_1 \lg x$. Ja apzīmēja $y' = \lg y$, $b_0' = \lg b_0$ un $x' = \lg x$, tika iegūts taisnes vienādojums

$$y' = b_0' + b_1 * x',$$

kuru analizēja kā vienkāršu lineāru regresiju.

Iegūtajam b_0' tika veikta pretēja transformācija $b_0 = 10^{b_0'}$ un, ievietojot koeficientus vienādojumā

$$y = b_0 * x^{b_1},$$

tika iegūts pakāpes regresijas vienādojums.

Ja atkarīgais faktors y bija mazi skaitļi un īpaši, ja kaut viena vērtība bija vienāda ar nulli, tad tika izmantota transformācija $y' = \lg (y + 1)$, (Liepa, 1974; Zar, 1999) un attiecīgi ieguva pakāpes regresijas vienādojumu

$$y = b_0 * x^{b_1} - 1.$$

Ja gan atkarīgais, gan neatkarīgais faktors bija mazi skaitļi (<1) vai īpaši, ja kaut viena vērtība bija vienāda ar nulli, tad tika izmantota transformācija $y' = \lg (y + 1)$ un $x' = \lg (x + 1)$ un attiecīgi tika iegūts regresijas vienādojums

$$y = b_0 * (x + 1)^{b_1} - 1.$$

Visus regresijas vienādojumus attēloja grafiski kā regresijas vienādojuma līkni ar 95% reprezentācijas zonu.

5. REZULTĀTI

5.1. Pētījumā iesaistīto personu raksturojums

Ņemot vērā GOLD vadlīnijas, pētījumā tika iekļauti HOPS slimnieki ar vidēju vai smagu slimības norisi – GOLD 2 un GOLD 3 stadija (skat. 8. tabulu). Pneimonijas pacientiem novēroja vieglas pakāpes obstruktīva tipa ventilācijas nepietiekamību. Abām pacientu grupām netika novērota FEV₁ reversibilitāte, respektīvi minētā vērtība nebija lielāka par 12%.

Lai gan visās trīs pētījuma grupās iekļautie indivīdi bija smēķētāji vai bijušie smēķētāji, kā sagaidāms, visilgāk bija smēķējuši tieši HOPS pacienti, un šo pacientu smēķēšanas stāžs būtiski atšķīrās no pneimonijas pacientu un kontroles grupas smēķēšanas stāža (skat. 8. tabulu).

Starp visām trim pacientu grupām netika novērotas būtiskas atšķirības antropometriskajos rādītājos, t.i., augums, svars un ķermeņa masas indekss (ĶMI), (skat. 8. tabulu).

HOPS pacientu grupā bija vislielākais vīriešu īpatsvars – 91,18%, kamēr pneimonijas grupā – 59,09%, bet kontroles grupā tikai 44,83% vīriešu. Visvecākie cilvēki bija HOPS pacientu grupā, vidēji $62,09 \pm 4,93$ gadus veci, pneimonijas slimnieku grupā – $47,5 \pm 6,13$ gadus veci, savukārt kontroles grupas vidējais vecums bija $41,45 \pm 5,34$ gadi.

8. tabula. Pētījumu grupu personu vispārīgs raksturojums.

	Kontroles grupa	Pneimonijas pacienti	HOPS pacienti
Svars (kg)	75,72 ± 7,68	81,05 ± 8,92	82,07 ± 7,17
Augums (cm)	174,18 ± 2,77	173,80 ± 3,28	172,29 ± 2,63
ĶMI (kg/m²)	24,44 (22,47 – 26,59)	26,04 (23,61 – 28,71)	26,83 (24,81 – 29,02)
Smēķēšana (pakgadi)	4,90 ± 5,70	12,95 ± 6,86	38,91 ± 5,80 *
FEV₁ (%)	101,22 ± 8,03 *	77,96 ± 9,33 *	55,06 ± 7,16 *
FEV₁ reversibilitāte (%)	4,04 ± 2,78	5,63 ± 2,85	3,24 ± 2,19
FVC (%)	99,18 ± 8,01 *	84,12 ± 9,48 *	71,84 ± 7,38 *
FEV₁/FVC (%)	89,18 ± 4,91 *	78,03 ± 5,81 *	59,44 ± 4,45 *
PEF (%)	95,40 ± 8,28 *	72,99 ± 9,62 *	52,22 ± 7,49 *

Dati norādīti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls vai vidējais (95% ticamības intervāls); * p < 0,05. ĶMI – ķermeņa masas indekss; FEV₁ – forsētas izelpas tilpums 1.sekundē pēc pilnas ieelpas; FVC – forsētā vitālā kapacitāte; PEF – izelpas maksimāļplūsma.

5.2. Eikosanoīdu daudzums izelpas gaisa kondensātā

Primārais uzdevums saistībā ar izelpas gaisa kondensātu šajā pētījumā mums bija novērtēt, vai arahidonskābes derivātus, kas veidojušies lipoksigenāžu iedarbībā, iespējams noteikt atsevišķi EBC alveolārajā un bronhiālajā frakcijā. LXA₄ un LtB₄ daudzumu izelpas gaisa kondensātā mēs noteicām vairākas reizes. Vispirms analīzes tika veiktas neapstrādātā iegūtajā bioloģiskajā materiālā pēc ELISA komplektiem pievienotās instrukcijas. Rezultātā varējām noteikt tikai LtB₄ koncentrāciju izelpas gaisa kondensātā, bet LXA₄ noteikt neizdevās, jo izmantotajiem komplektiem bija dažāds mediators detekcijas diapozons. Kamēr LtB₄ noteikšanas komplektam tas bija robežās no 3,9 – 500 pg/mL, LXA₄ – bija daudz mazāk jutīgs, robežās no 0,02 – 2 ng/mL. Līdz ar to pirms nākamās mediatoru analīzes EBC paraugos, bioloģisko materiālu, kas bija paredzēts LXA₄ noteikšanai, sākumā piecas reizes koncentrējām, tādējādi mēģinot iegūt LXA₄ līmeni komplekta detekcijas robežās. Tomēr arī pēc

koncentrēšanas EBC alveolārajā frakcijā LXA₄ koncentrācija 35 paraugos bija zem detekcijas robežas, bet bronhiālajā frakcijā – 38 paraugos. Iegūtie LXA₄ koncentrācijas dati tad tika pārrēķināti, ņemot vērā parauga koncentrēšanas pakāpi, uz reālo EBC materiālā. Tomēr, tā kā liela daļa analīzes nesanāca, bija jāveic vēl vairākas reizes lielāka koncentrēšana (mēs veicām desmit reizes) EBC paraugam, lai varētu iegūt LXA₄ koncentrācijas vērtības šajā materiālā, tomēr lielāka koncentrēšanas pakāpe prasa arī vairāk bioloģiskā materiāla, ko diemžēl iegūt ir diezgan sarežģīti, jo, lai gan šī metode ir neinvazīva salīdzinājumā ar par daļēji invazīvo uzskatāmo krēpu indukciju, pacienti labāk izturēja krēpu materiāla iegūšanu, nevis EBC savākšanu, un daļa no tās pat atteicās, jo procedūra ilga pat 40 – 60 minūtes. Tomēr līdz pētījuma beigām mums izdevās iegūt pietiekami daudz datu, lai salīdzinātu mediatoru līmeni EBC materiālā.

Nosakāmo mediatoru līmenis alveolārajā un bronhiālajā EBC frakcijā bija gandrīz vienāds un savā starpā būtiski neatšķīrās. Turklāt novērojām pozitīvas korelācijas starp LtB₄ koncentrāciju alveolārajā un bronhiālajā EBC frakcijā, kā arī starp LtB₄/LXA₄ attiecību alveolārajā un bronhiālajā EBC frakcijā. LXA₄ līmeņa saistība starp abām EBC frakcijām netika novērota. Salīdzinot eikosanoīdu līmeni izelpas gaisa kondensāta un krēpu materiālā, arahidonskābes derivāti daudz augstākā koncentrācijā (vismaz desmit līdz trīsdemīt reižu) novērojami krēpu paraugā visām pētījuma grupām; LXA₄ koncentrācijas atšķirības starp abiem minētajiem bioloģiskajiem materiāliem bija mazākas salīdzinājumā ar LtB₄ līmeņa atšķirībām. Tā kā arahidonskābes derivātu, īpaši LXA₄, noteikšana izelpas gaisa kondensātā radīja šaubas par to koncentrācijas ticamību, par pamatu izvēlējāmies minēto eikosanoīdu koncentrācijas salīdzināt inducēto krēpu materiālā.

5.2.1. Alveolārā izelpas gaisa kondensāta frakcija

Paaugstināts LXA₄ līmenis tika konstatēts HOPS pacientu (0,035 ng/mL (0,016 – 0,053 ng/mL)) alveolārajā izelpas gaisa kondensāta (EBC) frakcijā salīdzinājumā ar kontroles grupu (0,021 ng/mL (0,002 – 0,040 ng/mL)) un pneimonijas pacientiem (0,015 ng/mL (0 – 0,037 ng/mL)), tomēr būtiski tā koncentrācija starp pētījuma grupām neatšķīrās.

LtB₄ koncentrācija alveolārajā EBC frakcijā starp grupām būtiski neatšķīrās, vidēji tā bija 0,17 ng/mL (0,10 – 0,24 ng/mL) HOPS grupā, 0,15 ng/mL (0,07 – 0,24 ng/mL) pneimonijas grupā un 0,21 ng/mL (0,14 – 0,28 ng/mL) kontroles grupā.

Vismazākā LtB₄/LXA₄ attiecība tika konstatēta HOPS pacientu (9,21 (3,00 – 19,88)) alveolārajā EBC frakcijā, bet pneimonijas grupā tā vidēji bija 19,41 (7,22 – 49,67) un kontroles grupā 15,61 (7,13 – 32,97), starp visām trim grupām būtiskas atšķirības netika novērotas.

5.2.2. Bronhiālā izelpas gaisa kondensāta frakcija

Palielināta LXA₄ koncentrācija tika novērots HOPS pacientu (0,033 ng/mL (0,017 – 0,049 ng/mL)) bronhiālajā EBC frakcijā salīdzinājumā ar kontroles grupu (0,022 ng/mL (0,004 – 0,041 ng/mL)) un pneimonijas pacientiem (0,010 ng/mL (0 – 0,033 ng/mL)). Būtiskas minētā iekaisumu samazinošā mediatora līmeņa atšķirības starp grupām netika konstatētas.

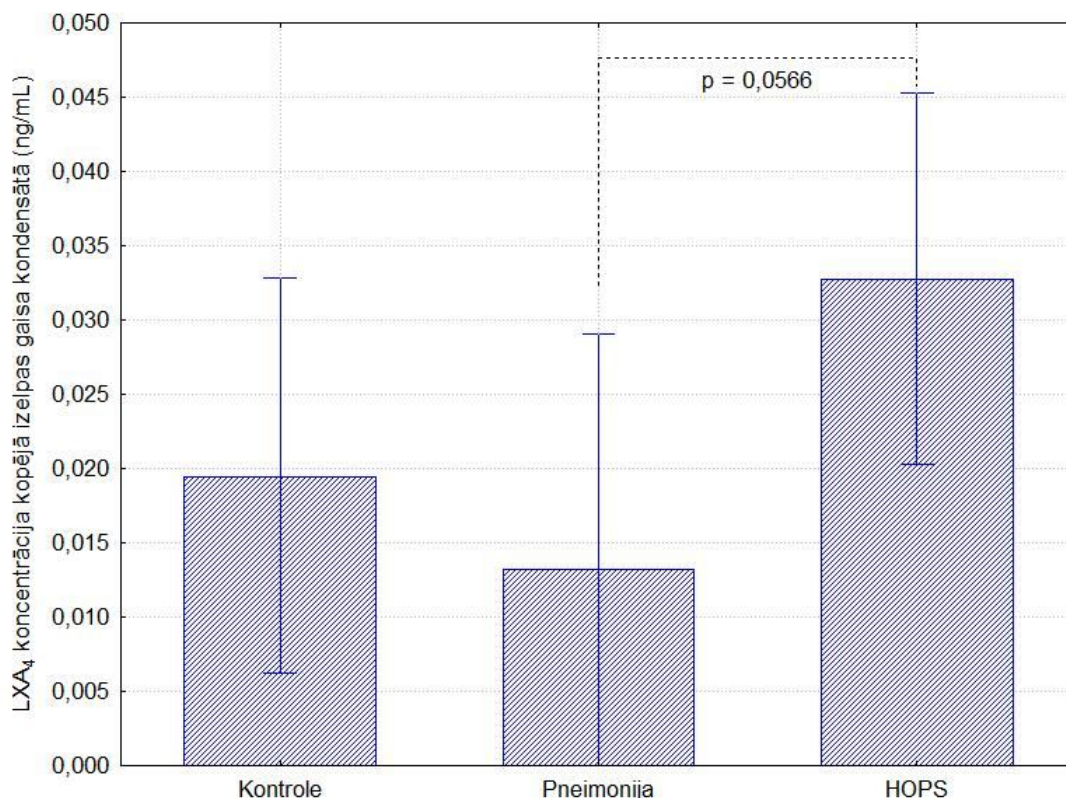
Arī LtB₄ palielinātā daudzumā tika konstatēts HOPS pacientu (0,16 ng/mL (0,08 – 0,26 ng/mL)) bronhiālajā EBC salīdzinājumā ar kontroles grupu (0,14 ng/mL (0,05 – 0,23 ng/mL)) un pneimonijas pacientiem (0,13 ng/mL (0,02 – 0,25 ng/mL)). Būtiskas atšķirības starp grupām netika novērotas.

HOPS pacientu grupā tika novērota pazemināta LtB₄/LXA₄ attiecība salīdzinājumā ar kontroles grupu un pneimonijas pacientiem (respektīvi, 3,51 (0,98 – 9,24) HOPS grupā, 6,98 (2,32 – 18,19) kontroles grupā un 11,73 (2,33 – 47,63) pneimonijas grupā). Būtiskas atšķirības starp grupām netika noteiktas.

5.2.3. Kopējais izelpas gaisa kondensāts (alveolārā + bronhiālā frakcija)

Pētījuma ietvaros, apstrādājot iegūtos rezultātus, mēs arī apvienojām mediatoru koncentrācijas, ko noteicām atsevišķi alveolārajā un bronhiālajā frakcijā, iegūstot eikosanoīdu līmeni kopējā izelpas gaisa kondensātā.

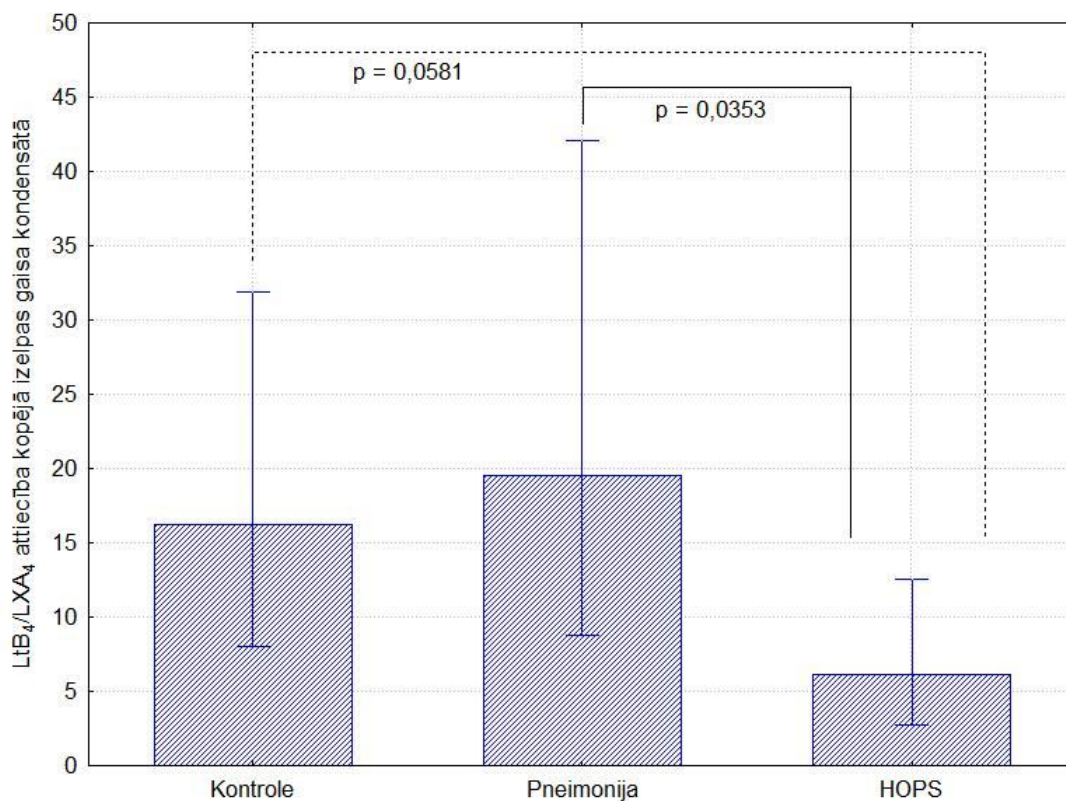
Paugstināta LXA₄ koncentrācija kopējā EBC tika iegūta HOPS pacientu grupā (0,033 ng/mL (0,020 – 0,045 ng/mL)) salīdzinājumā ar kontroles grupu (0,019 ng/mL (0,006 – 0,033 ng/mL)) un pneimonijas pacientiem (0,013 ng/mL (0 – 0,029 ng/mL)); skat. 19. attēlu), turklāt starp HOPS un pneimonijas pacientu grupām mediatora līmenim EBC tika novērota tendence būtiskai atšķirībai.



19. attēls. Arahidonskābes derivāta lipoksīna A₄ (LXA₄) koncentrācija kopējā izelpas gaisa kondensātā kontroles grupas indivīdiem, pneimonijas un HOPS pacientiem. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

LtB₄ daudzums kopējā izelpas gaisa kondensātā starp pētījuma grupām būtiski neatšķīrās, vidēji tas bija 0,16 ng/mL (0,10 – 0,23 ng/mL) HOPS grupā, 0,155 ng/mL (0,087 – 0,23 ng/mL) pneimonijas grupā un 0,18 ng/mL (0,12 – 0,25 ng/mL) kontroles grupā.

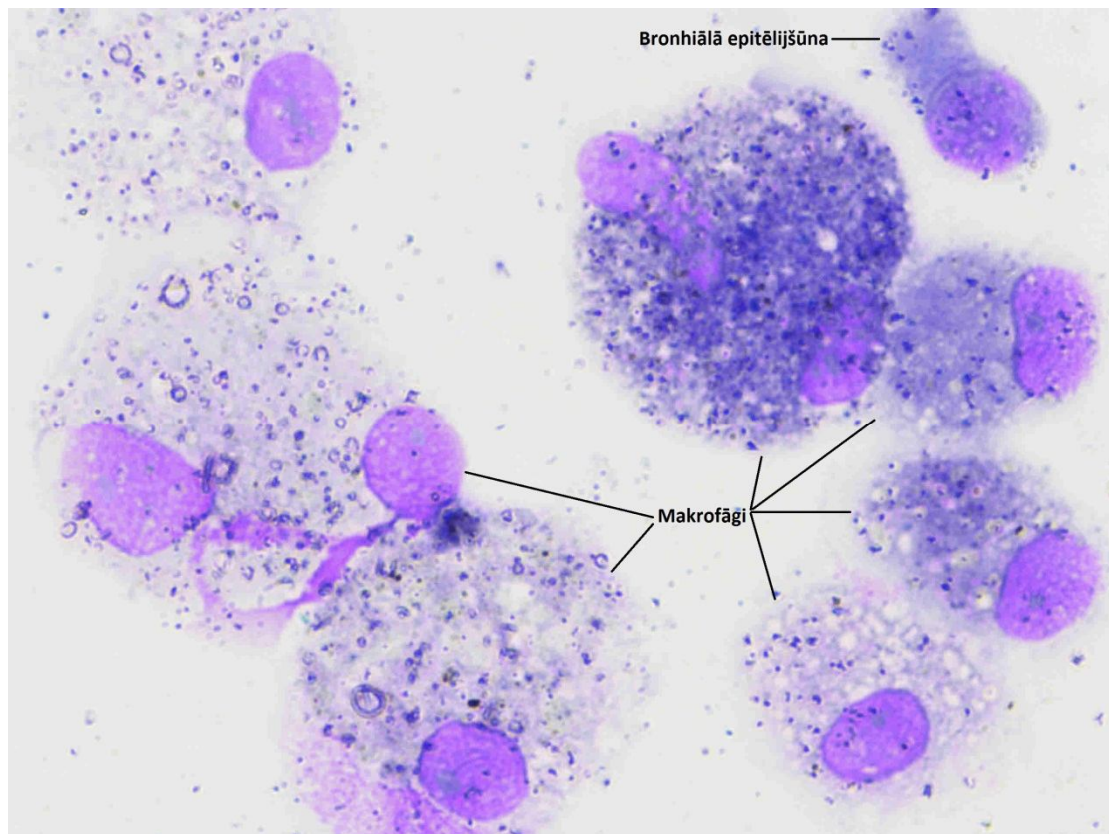
Apskatot eikosanoīdu attiecību LtB₄/LXA₄ kopējā izelpas gaisa kondensātā, zemākā proporcija tika noteikta HOPS pacientu grupā (6,11 (2,72 – 12,58)); un tai bija tendence būt samazinātai salīdzinājumā ar kontroles grupu (16,21 (8,01 – 31,90)), turklāt salīdzinājumā ar pneimonijas pacientiem (19,53 (8,78 – 42,12)) HOPS pacientiem LtB₄/LXA₄ attiecība kopējā izelpas gaisa kondensātā bija būtiski samazināta (skat. 20. attēlu).



20. attēls. Leikotriēna B₄/ lipoksīna A₄ LtB₄/LXA₄ attiecība kopējā izelpas gaisa kondensātā kontroles grupas indivīdiem, pneimonijas un HOPS pacientiem. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

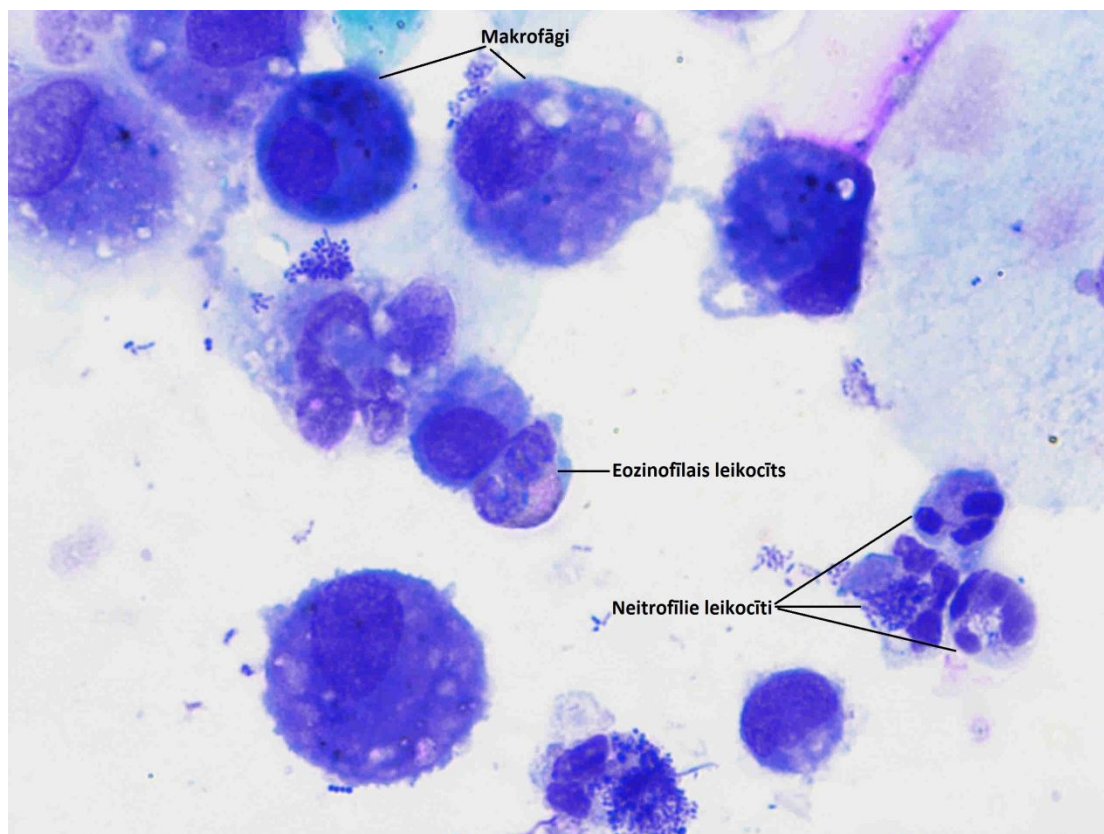
5.3. Šūnu spektrs inducētajās krēpās

Makrofāgu (skat. 21. attēlu) relatīvais skaits pacientu – HOPS un pneimonijas – grupā bija būtiski samazināts salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem (abās grupās $p < 0,0001$; skat. 9. tabulu), savukārt absolūtajos skaitļos statistiski ticama atšķirība šūnu skaitā starp grupām netika novērota.



21. attēls. Makrofāgi un bronhiālā epitēlijšūna inducēto krēpu materiālā, kas krāsots pēc Meja-Grīnvalda-Gimzes metodes. Attēls fotogrāfēts 100X palielinājumā.

Inducēto krēpu neitrofilo leikocītu (skat. 22. attēlu) skaits gan absolūtajos, gan relatīvajos skaitļos būtiski palielināts bija pacientu – HOPS un pneimonijas – grupās salīdzinājumā ar kontroles grupu (t.i., absolūtais PMN skaits $p < 0,0001$ HOPS pret kontroli, $p = 0,0003$ pneimonija pret kontroli; relatīvais PMN skaits abās grupās $p < 0,0001$; skat. 9. tabulu).



22. attēls. Makrofāgi, neitrofilie leikocīti un eozinofīlais leikocīts inducēto krēpu materiālā, kas krāsots pēc Meja-Grīnvalda-Gimzes metodes. Attēls fotogrāfēts 100X palielinājumā.

Eozinofilo leikocītu (skat. 22. attēlu) relatīvais skaits inducētajās krēpās pacientu grupās bija palielināts salīdzinājumā ar kontroles grupas personām (skat. 9. tabulu), bet būtiska atšķirība tika novērota tikai starp HOPS grupu un veseliem cilvēkiem ($p = 0,045$). Absolūtos skaitļos eozinofilo leikocītu skaits HOPS un pneimonijas grupā bija lielāks salīdzinājumā ar kontroli (skat. 9. tabulu), turklāt pacientiem tas bija būtiski paaugstināts salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem (respektīvi, $p = 0,0045$ HOPS pret kontroli un $p = 0,027$ pneimonija pret kontroli).

9. tabula. Inducēto krēpu šūnu skaits.

	Kontroles grupa	Pneimonijas pacienti	HOPS pacienti
Makrofāgi (%)	37,06 ± 5,46	19,14 ± 6,16 *	18,78 ± 4,95 *
Makrofāgi (šūnas*10 ⁴ /mL)	29,77 (18,76 – 46,90)	35,69 (21,08 – 59,97)	36,25 (23,86 – 54,80)
Neitrofile leukocīti (%)	24,88 ± 7,45	51,44 ± 8,41 *	59,49 ± 6,76 *
Neitrofile leukocīti (šūnas*10 ⁴ /mL)	21,43 (12,72 – 35,69)	92,22 (52,03 – 162,90) *	125,78 (79,91 – 197,63) *
Eozinofīle leukocīti (%)	0,19 (0 – 0,43)	0,49 (0,21 – 0,85)	0,54 (0,30 – 0,83) *
Eozinofīle leukocīti (šūnas*10 ⁴ /mL)	0,18 (0 – 0,63)	1,07 (0,42 – 2,01) *	1,25 (0,67 – 2,03) *
Limfocīti (%)	0,44 (0,18 – 0,77)	0,17 (0 – 0,48)	0,17 (0 – 0,41)
Limfocīti (šūnas*10 ⁴ /mL)	0,50 (0,09 – 1,07)	0,33 (0 – 0,91)	0,35 (0,009 – 0,80)
Bronhiālais epitēlijs (%)	36,69 ± 6,02	28,31 ± 6,79	20,43 ± 5,46 *
Bronhiālais epitēlijs (šūnas*10 ⁴ /mL)	30,99 (21,02 – 45,68)	43,43 (27,83 – 67,78)	39,47 (27,69 – 56,24)
Plakanā epitēlija šūnas (%)	7,71 (5,81 – 10,14)	5,01 (3,53 – 6,97)	5,59 (4,25 – 7,27)

Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls vai vidējais (95% ticamības intervāls); * p < 0,05 salīdzinājumā ar kontroles grupu.

Būtiskas atšķirības krēpu limfocītu skaitā starp visām trim pētījuma grupām netika novērotas (skat. 9. tabulu).

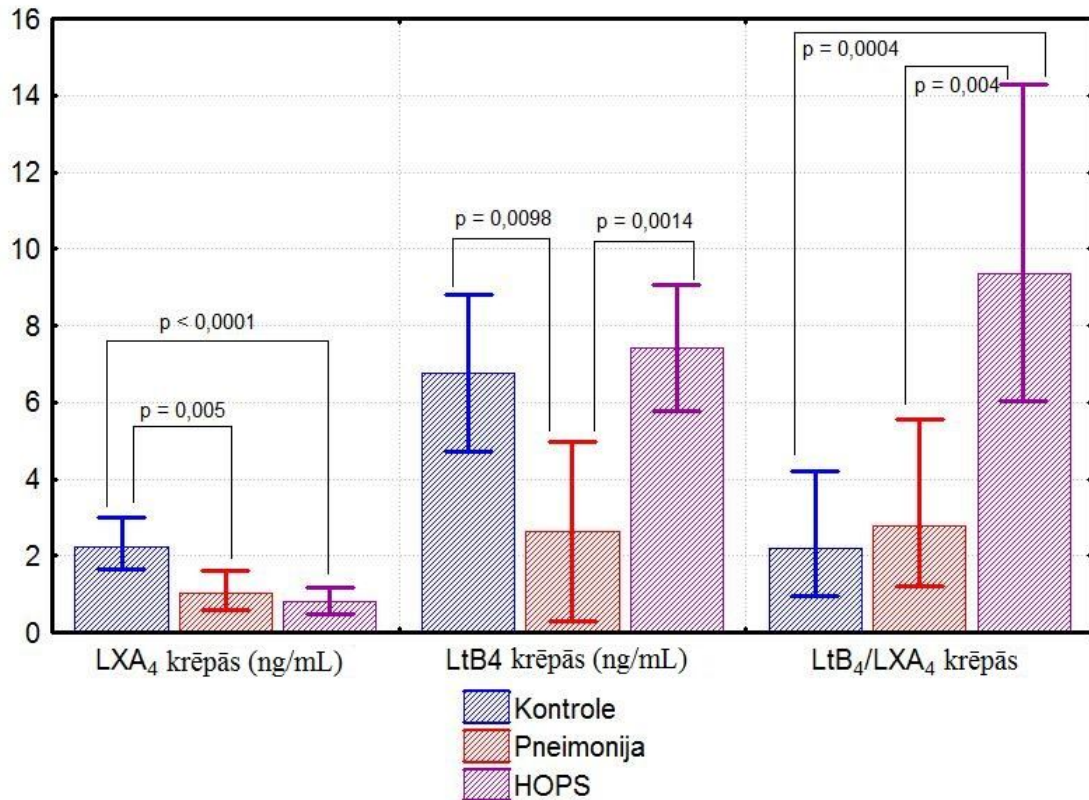
Krēpās bija atrodamas arī bronhiālā epitēlija šūnas (skat. 21. attēlu), kas relatīvos skaitļos HOPS pacientiem bija būtiski mazākā skaitā salīdzinājumā ar kontroles

grupas personām ($p = 0,0001$; skat. 9. tabulu). Absolūtos skaitļos būtiskas bronhiālā epitēlija skaita atšķirības starp grupām netika novērotas (skat. 9. tabulu). Mazais bronhiālā epitēlija šūnu skaits HOPS pacientiem izskaidrojams ar to, ka smēķēšanas vai citu kairinošu aģentu rezultātā pastāvīgi darbojas elpceļu dziedzeršūnas, izdalot sekrētu, un līdz ar to šiem pacientiem salīdzinājumā ar veseliem indivīdiem ir vieglāk un īsākā laikā iegūstams krēpu materiāls.

Siekalu piejaukuma rādītājs krēpās – plakanā epitēlija šūnu skaits starp pētījuma grupām būtiski neatšķīrās (skat. 9. tabulu), un tas nepārsniedza robežu (~30%), kad tiek uzskatīts, ka minētais krēpu paraugs nav izmantojams tālākai analīzei, jo satur palielinātu siekalu piejaukumu.

5.4. Eikosanoīdi inducētajās krēpās

LXA₄ koncentrācija gan HOPS (0,79 ng/mL (0,49 – 1,16 ng/mL)), gan pneimonijas pacientiem (1,04 ng/mL (0,60 – 1,60 ng/mL)) bija ievērojami samazināta salīdzinājumā ar kontroles grupu (2,25 ng/mL (1,64 – 3,0 ng/mL); skat. 23. attēlu).



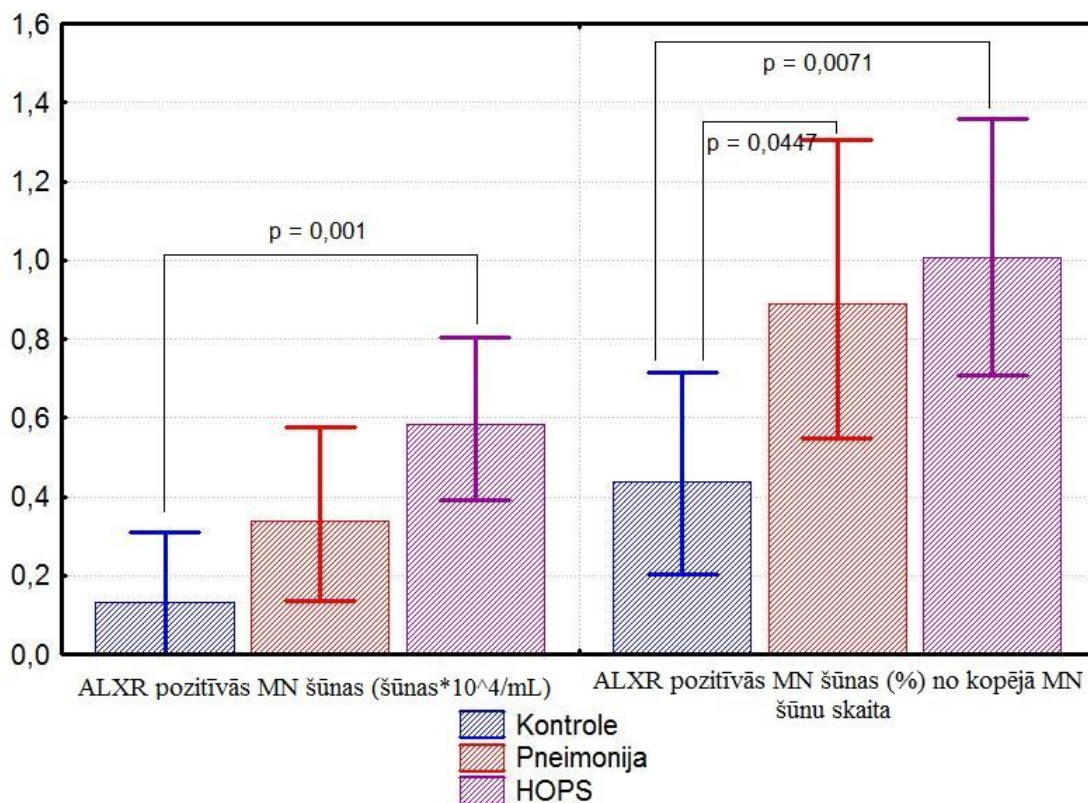
23. attēls. Arahidonskābes derivātu – lipoksīna A₄ (LXA₄) un leukotriēna B₄ (LtB₄) koncentrācija un LtB₄/LXA₄ attiecība inducētajās krēpās kontroles grupas indivīdiem, pneimonijas un HOPS pacientiem. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

Paaugstināta iekaisuma mediatora LtB₄ koncentrācija krēpās tika novērota HOPS pacientiem ($7,43 \pm 1,65$ ng/mL; skat. 23. attēlu) starp visām pētījuma grupām, un tā būtiski atšķīrās no pneimonijas grupas LtB₄ līmeņa ($2,62 \pm 2,33$ ng/mL), turklāt pneimonijas pacientu krēpu LtB₄ koncentrācija bija būtiski samazināta arī salīdzinājumā ar kontroles grupu ($6,76 \pm 2,04$ ng/mL). Starp HOPS pacientu un kontroles grupas LtB₄ koncentrāciju krēpās netika novērota būtiska atšķirība.

Iekaisumu veicinošā mediatora / iekaisumu samazinošā mediatora LtB₄/LXA₄ attiecība HOPS pacientiem bija palielināta ($9,37$ ($6,04 - 14,27$)), turklāt tā būtiski atšķīrās no kontroles ($2,18$ ($0,94 - 4,21$)) un pneimonijas pacientu grupas ($2,79$ ($1,19 - 5,55$); skat. 23. attēlu).

5.5. Lipoksīna A₄ receptora ekspresija krēpu šūnās

Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija tika noteikta atsevišķi mononukleārajās (MN) un polimorfonukleārajās (PMN) krēpu šūnās. Palielināta receptora ekspresija MN šūnās absolūtajos skaitļos tika konstatēta HOPS pacientiem (0,58 šūnas*10⁴/mL (0,39 – 0,81 šūnas*10⁴/mL)), turklāt tā būtiski atšķīrās no receptora ekspresijas kontroles grupas personām (0,13 šūnas*10⁴/mL (0 – 0,31 šūnas*10⁴/mL)). Pneimonijas pacientu krēpu MN šūnās vidējā receptora ekspresija bija 0,34 šūnas*10⁴/mL (0,14 – 0,58 cells*10⁴/mL), (skat. 24. attēlu).

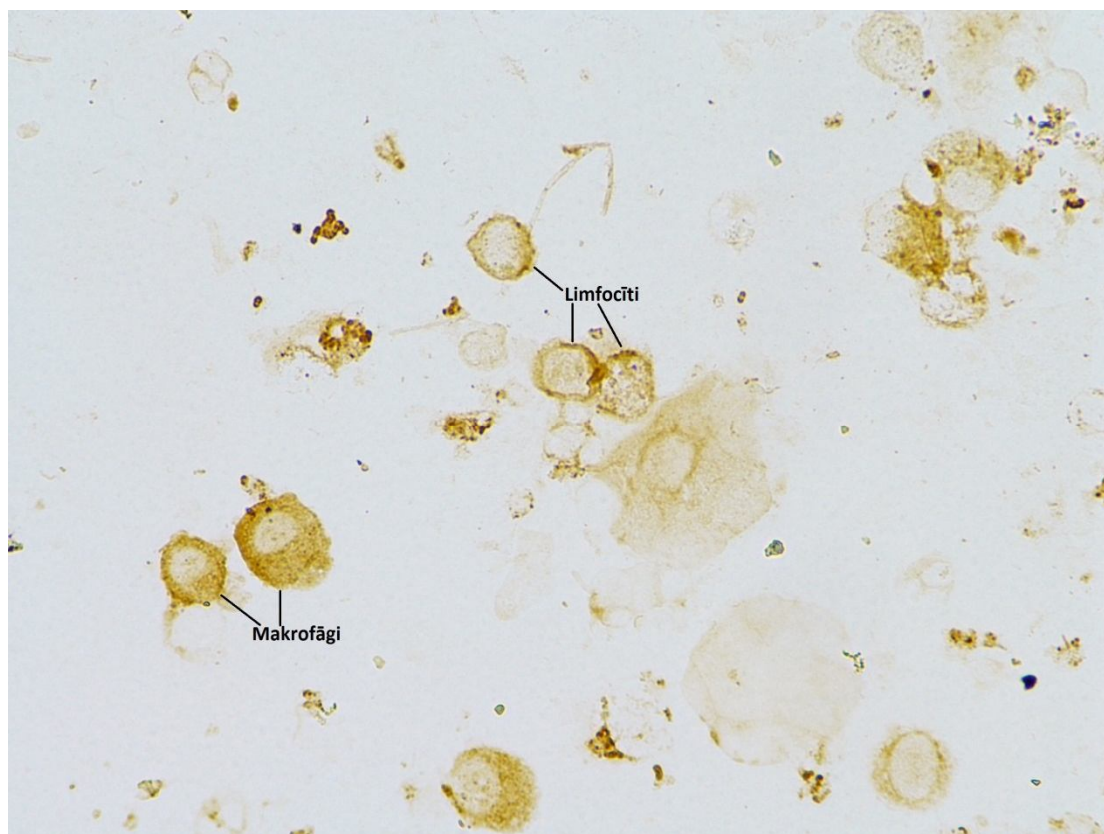


24. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija inducēto krēpu mononukleārajās (MN) šūnās absolūtajos un relatīvajos skaitļos kontroles grupas indivīdiem, pneimonijas un HOPS pacientiem. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

Relatīvajos skaitļos ALXR receptora ekspresija krēpu MN šūnās HOPS pacientu grupā (1,01% (0,71 – 1,36%)) bija ievērojami palielināta salīdzinājumā ar kontroles

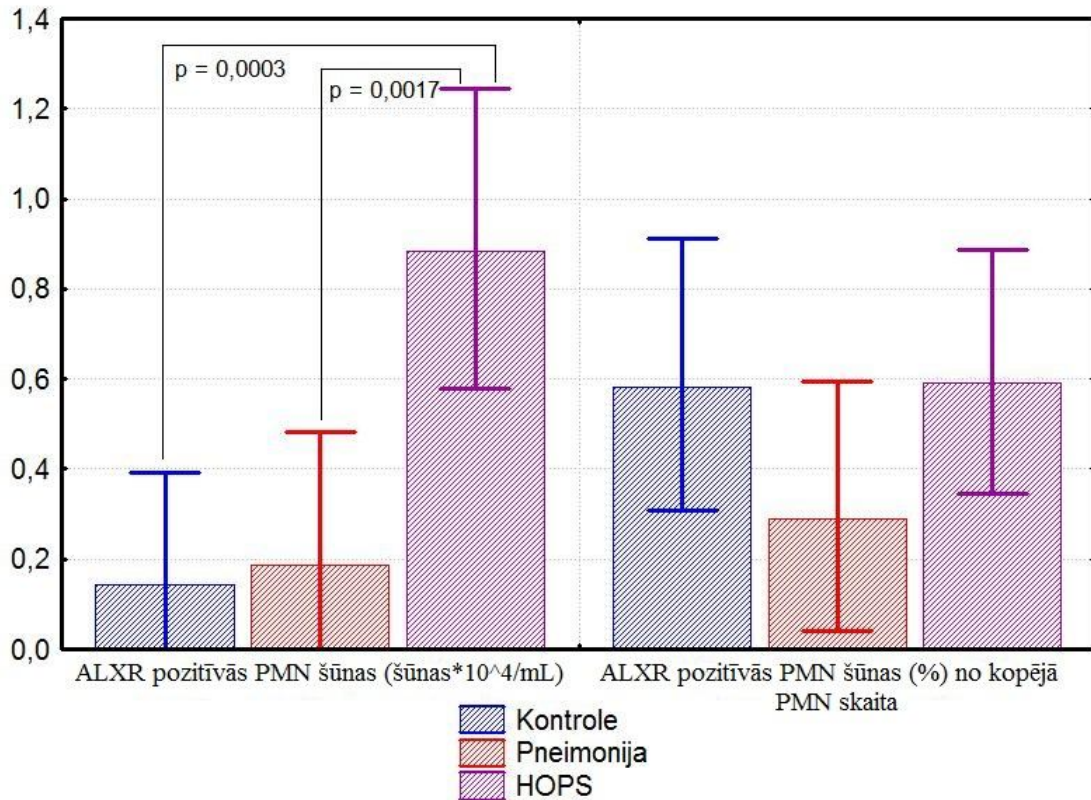
grupu (0,44% (0,20 – 0,72%)). Turklāt arī pneimonijas pacientu grupā (0,89% (0,55 – 1,31%)) ALXR ekspresija MN šūnās relatīvajos skaitļos bija būtiski paaugstināta salīdzinājumā ar kontroles grupu (skat. 24. attēlu).

Lipoksīna A₄ receptora ekspresija MN un PM šūnās redzama 25. un 27. attēlā. Tā novērojama brūna krāsojuma šūnās.



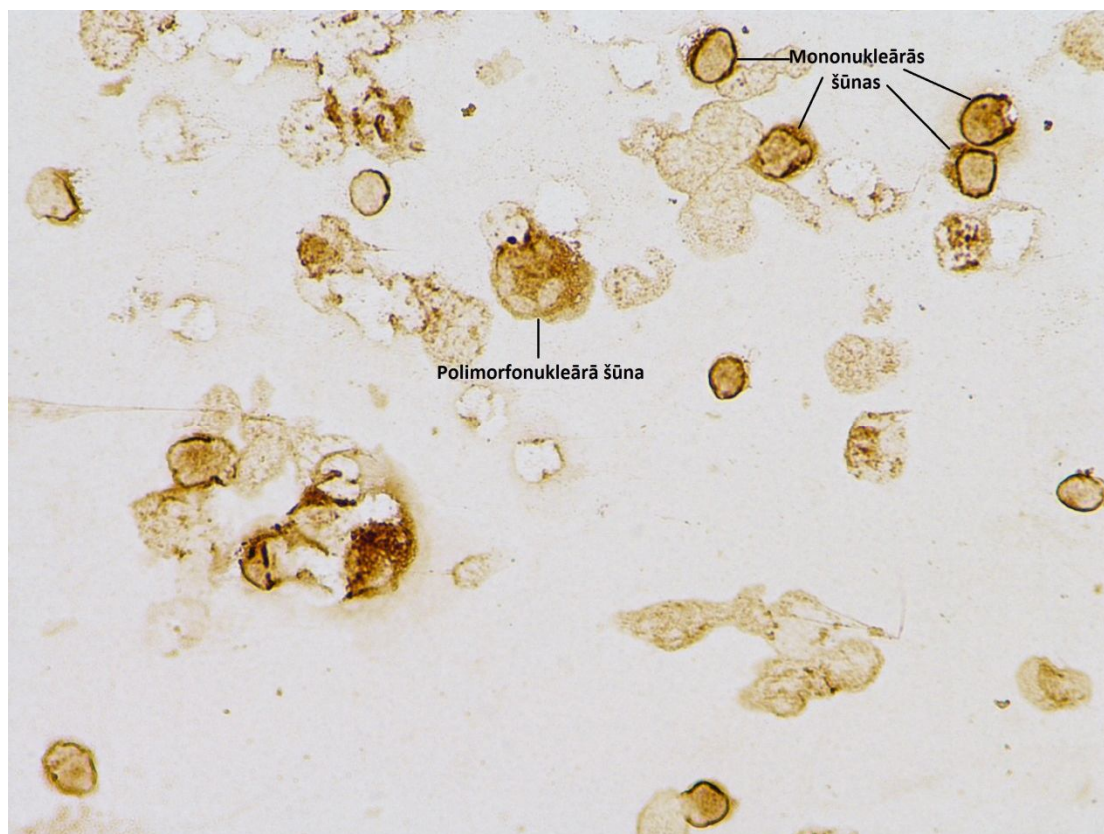
25. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija inducēto krēpu šūnās. Ekspresija iekrāsojusi šūnas citoplazmu brūnā krāsā. Attēlā redzamas receptora pozitīvas mononukleārās šūnas – limfocīti un makrofāgi - 40X palielinājumā.

ALXR receptora ekspresija krēpu PMN šūnās absolūtajos skaitļos HOPS pacientiem (0,88 šūnas*10⁴/mL (0,58 – 1,25 šūnas*10⁴/mL)) bija būtiski palielināta salīdzinājumā ar kontroles (0,14 šūnas*10⁴/mL (0 – 0,39 šūnas*10⁴/mL)) un pneimonijas grupu (0,19 šūnas*10⁴/mL (0 – 0,48 šūnas*10⁴/mL); skat. 26. attēlu).



26. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija inducēto krēpu polimorfonukleārajās (PMN) šūnās absolūtajos un relatīvajos skaitļos kontroles grupas indivīdiem, pneimonijas un HOPS pacientiem. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

Relatīvajos skaitļos LXA₄ receptora ekspresija krēpu PMN šūnās starp pētījuma grupām būtiski neatšķīrās, un bija 0,59% no kopējā šūnu skaita (0,34 – 0,89%) HOPS pacientu grupā, 0,58% (0,31 – 0,91%) kontroles grupā un 0,29% (0,04 – 0,60%) pneimonijas pacientu grupā (skat. 26. attēlu).



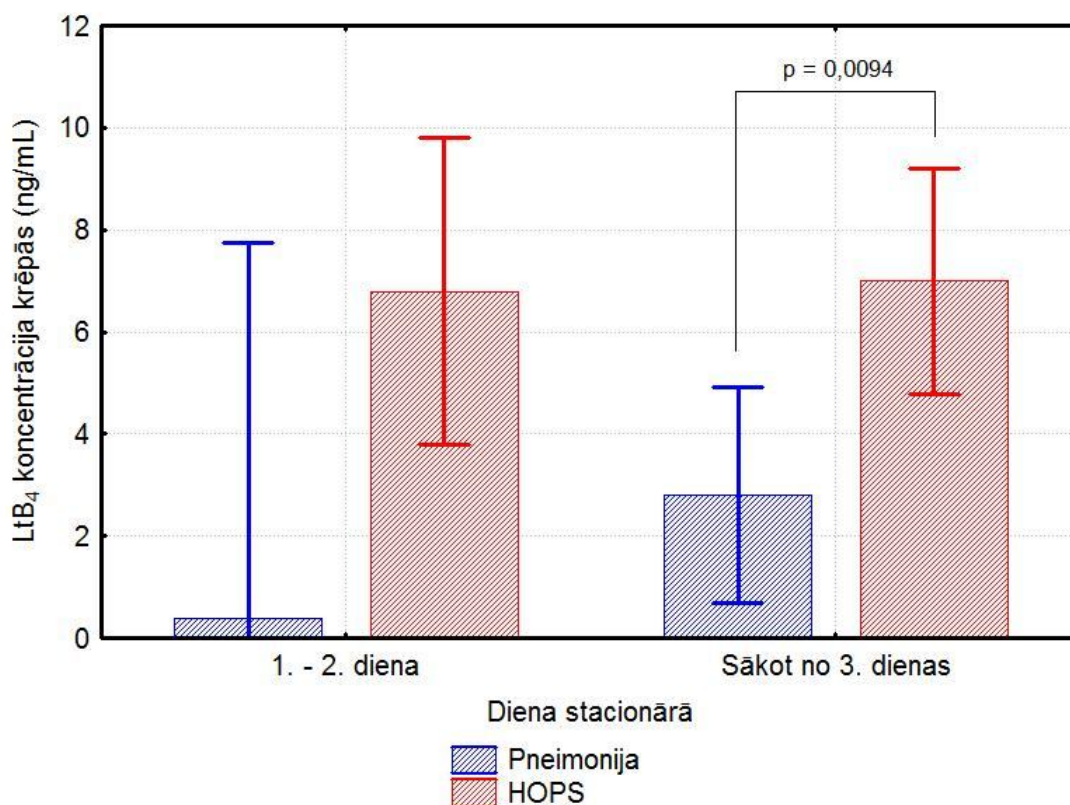
27. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija inducēto krēpu šūnās. Ekspresija iekrājosi šūnas citoplazmu brūnā krāsā. Attēlā redzamas receptora pozitīvas mononukleārās (limfocīti) un polimorfonukleārās šūnas (neitrofilie leukocīti) 40X palielinājumā.

5.6. Eikosanoīdu koncentrācijas un LXA₄ receptora ekspresijas krēpās atkarība no atrašanās dienas stacionārā

Lai noteiktu krēpu LtB₄ un LXA₄ koncentrācijas pārmaiņas un ALXR ekspresijas izmaiņas nosacītā dinamikā pa grupām, pacientus atsevišķi pa diagnozēm – HOPS un pneimonija – sadalījām divās grupās, t.i., agrīnās atrašanās dienas stacionārā (1.-2. diena atrašanās slimnīcā) un vēlīnās dienas stacionārā (sākot no 3. dienas). Tomēr salīdzināšanai derīgs bija tikai vēlīnās atrašanās dienas stacionārā, jo diemžēl pneimonijas pacienti, kas tikko bija iestājušies slimnīcā, bija vien daži, līdz ar to nevarējām veikt objektīvu datu salīdzināšanu šajā stacionēšanas posmā.

Salīdzinot iekaisumu veicinošā mediatora koncentrācijas starp pacientu grupām, LtB₄ koncentrācija HOPS pacientu grupā bija palielināta salīdzinājumā ar pneimonijas pacientiem. Vēlīnākā ārstēšanās posmā, sākot no trešās dienas, tika iegūta būtiska

atšķirība LtB₄ koncentrācijā starp HOPS (6,9905 ± 2,2152 ng/mL) un pneimonijas pacientiem (2,8085 ± 2,1209 ng/mL), abās grupās LtB₄ līmenim pieaugot vēlākās stacionēšanās dienās (skat. 27. attēlu).

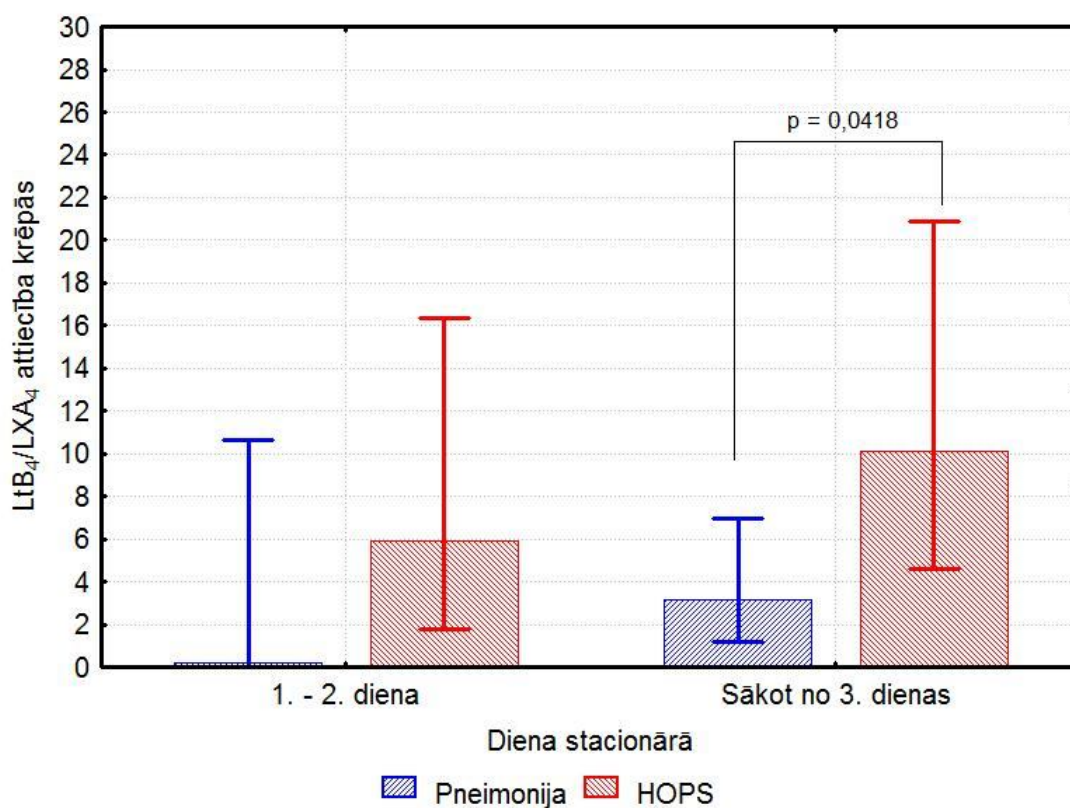


27. attēls. Leikotriēna B₄ (LtB₄) koncentrācijas krēpās atkarība no atrašanās dienas stacionārā, atsevišķi ņemot pneimonijas un HOPS pacientus. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

HOPS pacientiem visu ārstēšanās laiku tika novērots samazināts LXA₄ līmenis krēpās salīdzinājumā ar pneimonijas pacientiem. Tomēr apskatot iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ koncentrācijas pārmaiņas atkarībā no pacientu atrašanās dienas slimnīcā, nenovērojām būtiskas atšķirības.

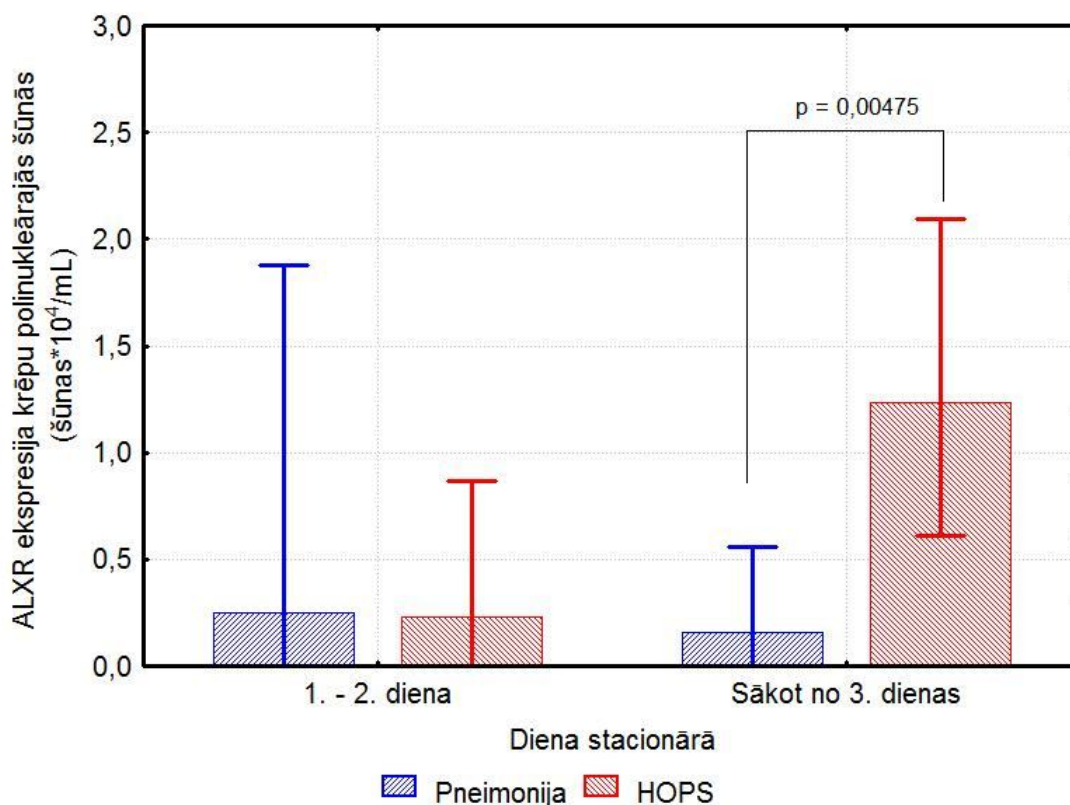
Paaugstināta LtB₄/LXA₄ attiecība krēpās visu atrašanās laiku slimnīcā tika novērota HOPS pacientiem salīdzinājumā ar pneimonijas grupu (skat. 28. attēlu). Turklāt būtiskas minētās iekaisumu raksturojošās attiecības atšķirības starp pacientu grupām

tika novērotas stacionēšanas vēlākā posmā, sākot ar 3. dienu, tas ir, HOPS pacientiem 10,0956 (4,6222 – 20,8975) un pneimonijas pacientiem 3,1623 (1,1710 – 6,9801).



28. attēls. Leikotriēna B₄/lipoksīna A₄ (LtB₄/LXA₄) attiecības krēpās atkarība no atrašanās dienas stacionārā, atsevišķi ņemot pneimonijas un HOPS pacientus. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

Straujš lipoksīna A₄ receptora ekspresijas pieaugums polimorfonukleārajās krēpu šūnās stacionēšanas laikā tika novērots HOPS pacientu grupā, kamēr pneimonijas pacientiem, jādodomā, ekspresijas līmenis nemainījās vai pat nedaudz samazinājās vēlākās ārstēšanās dienās salīdzinājumā ar terapijas sākumposmu. Būtisku ALXR ekspresijas atšķirību krēpu polimorfonukleārajās šūnās novērojām starp pacientu grupām (HOPS pacientiem 1,2325 šūnas*10⁴/mL (0,6101 – 2,0956 šūnas*10⁴/mL) un pneimonijas pacientiem 0,1611 šūnas*10⁴/mL (0 – 0,5589 šūnas*10⁴/mL)) vēlīnā hospitalizācijas posmā, sākot no 3. dienas (skat. 29. attēlu).



29. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresijas krēpu polimorfonukleārajās šūnās atkarība no atrašanās dienas stacionārā, atsevišķi ņemot pneimonijas un HOPS pacientus. Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

Līdzīgas tendences tika novērotas arī ALXR ekspresijā krēpu mononukleārajās šūnās, tomēr šajās šūnās receptora ekspresijas līmenis starp HOPS un pneimonijas pacientu grupām atkarībā no stacionēšanas dienas neuzrādīja būtiskas atšķirības.

5.7. Rezultātu savstarpējās saistības

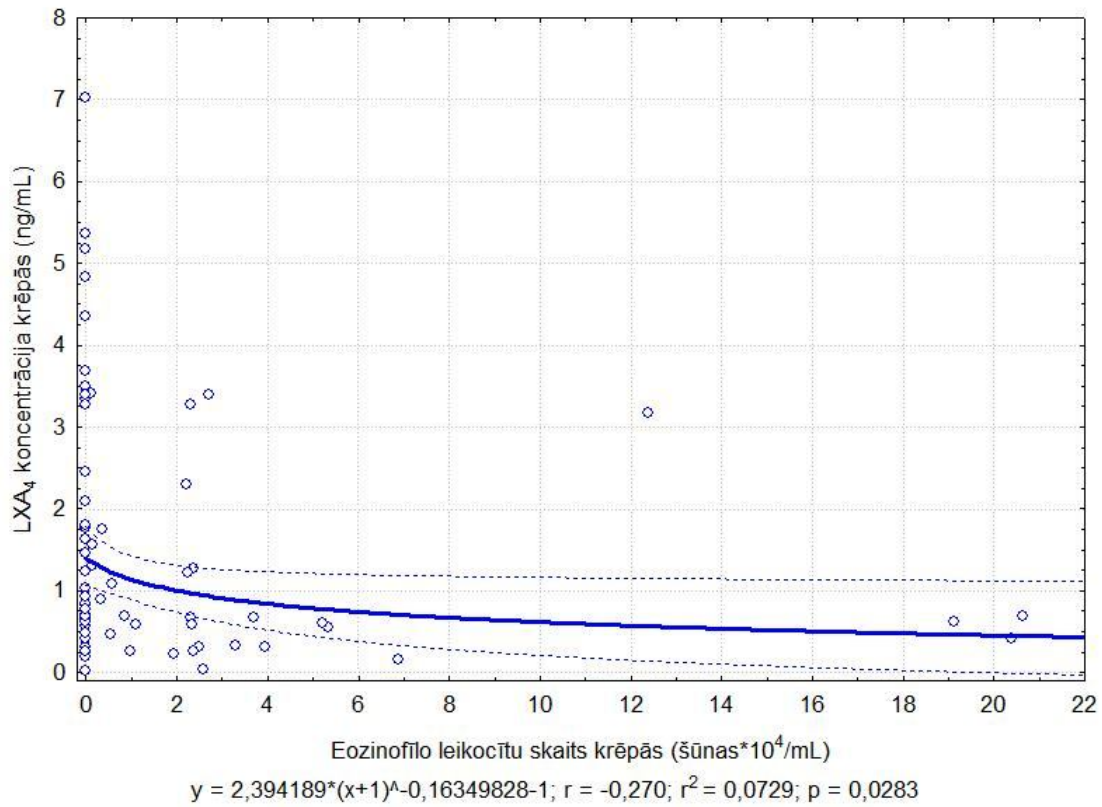
5.7.1. LXA₄ koncentrācija inducētajās krēpās

Tika noteikta LXA₄ koncentrācijas krēpās pozitīva saistība ar plaušu funkcionālo rādītāju FEV₁ (skat. 10. tabulu), savukārt LXA₄ līmenis krēpās negatīvi korelēja ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu krēpās (skat. 30. attēlu), neitrofilo leukocītu absolūto (skat. 31. attēlu) un relatīvo skaitu (skat. 32. attēlu) krēpās, kā arī ar krēpu indukcijas ātrumu (skat. 10. tabulu).

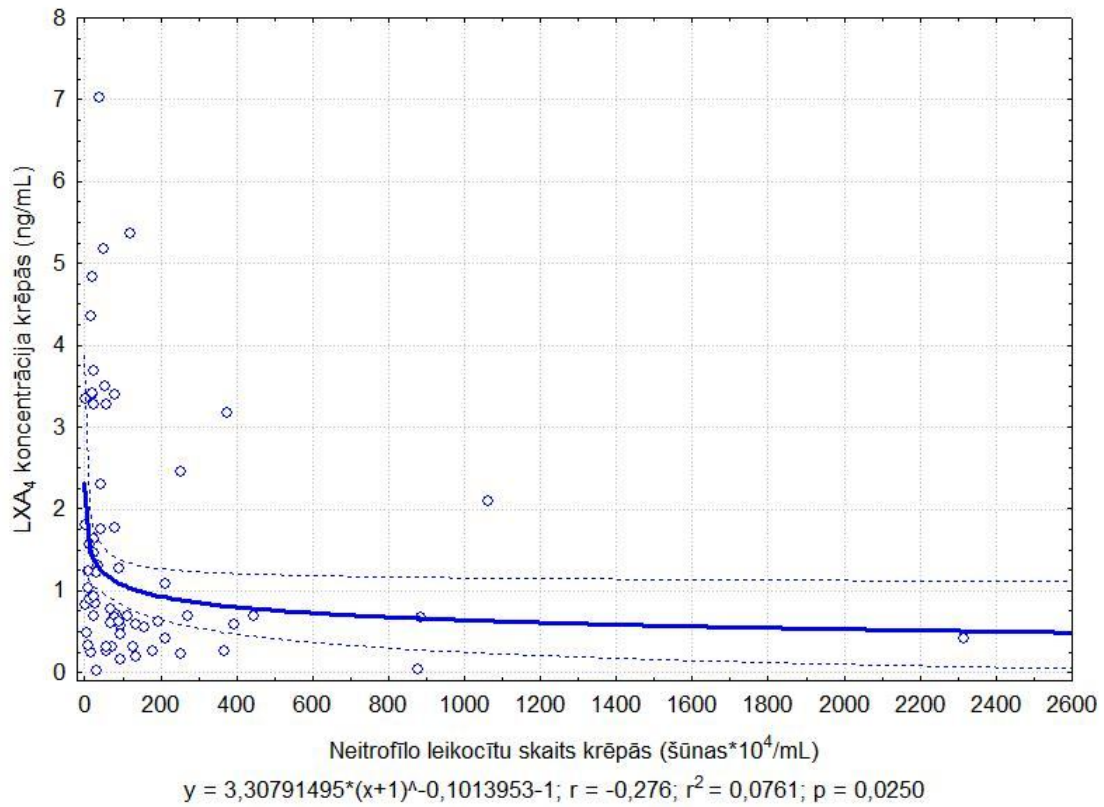
10. tabula. Lipoksīna A₄ (LXA₄) krēpās korelācijas.

<i>LXA₄ koncentrācija krēpās (ng/mL)</i>								
	Ticamība (p) – ticama / tendence	Ciešums (r) – vāja*/ vidēja**/ cieša***	Korelācijas analīzes metode	X transf	Y transf	r	P	r²
Pozitīva korelācija								
<i>FEV₁ (%)</i>	Ticama	**	Fišera		lg	0,424	0,0004	0,180
Negatīvas korelācijas								
<i>Eozinofīlie leikocīti (šūnas*10⁴/mL)</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	-0,27	0,028	0,073
<i>Neitrofilie leikocīti (šūnas*10⁴/mL)</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	-0,28	0,025	0,076
<i>Neitrofilie leikocīti (%)</i>	Ticama	*	Fišera		lg	-0,25	0,042	0,060
<i>Krēpu indukcijas ātrums (mL/min)</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	-0,36	0,009	0,132

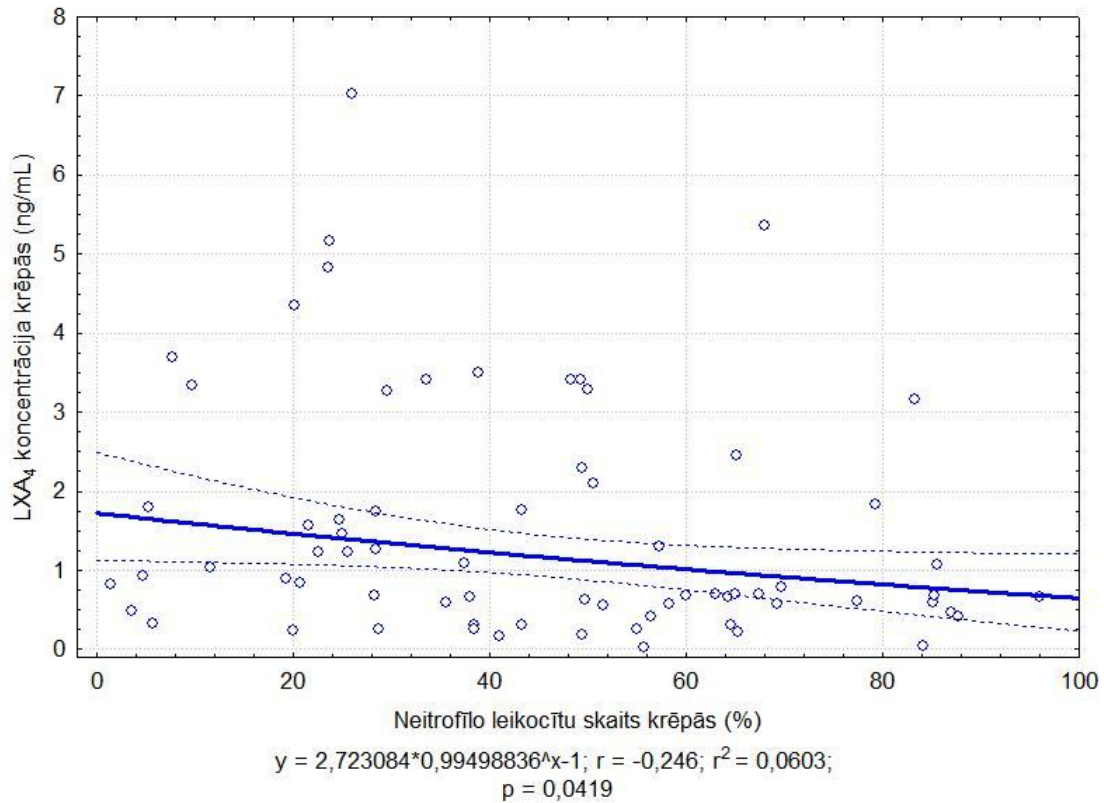
LXA₄ – lipoksīns A₄; FEV₁ – forsētas izelpas tilpums 1. sekundē pēc pilnas ieelpas; p – statistiskā ticamība; r – korelācijas koeficients, r² – determinācijas koeficients.



30. attēls. Iekaisumu samazinošā mediatora lipoksīna A₄ (LXA₄) koncentrācijas saistība ar eozinofīlo leikocītu absolūto skaitu krēpās, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimonija un kontrole – ņemot kopā.



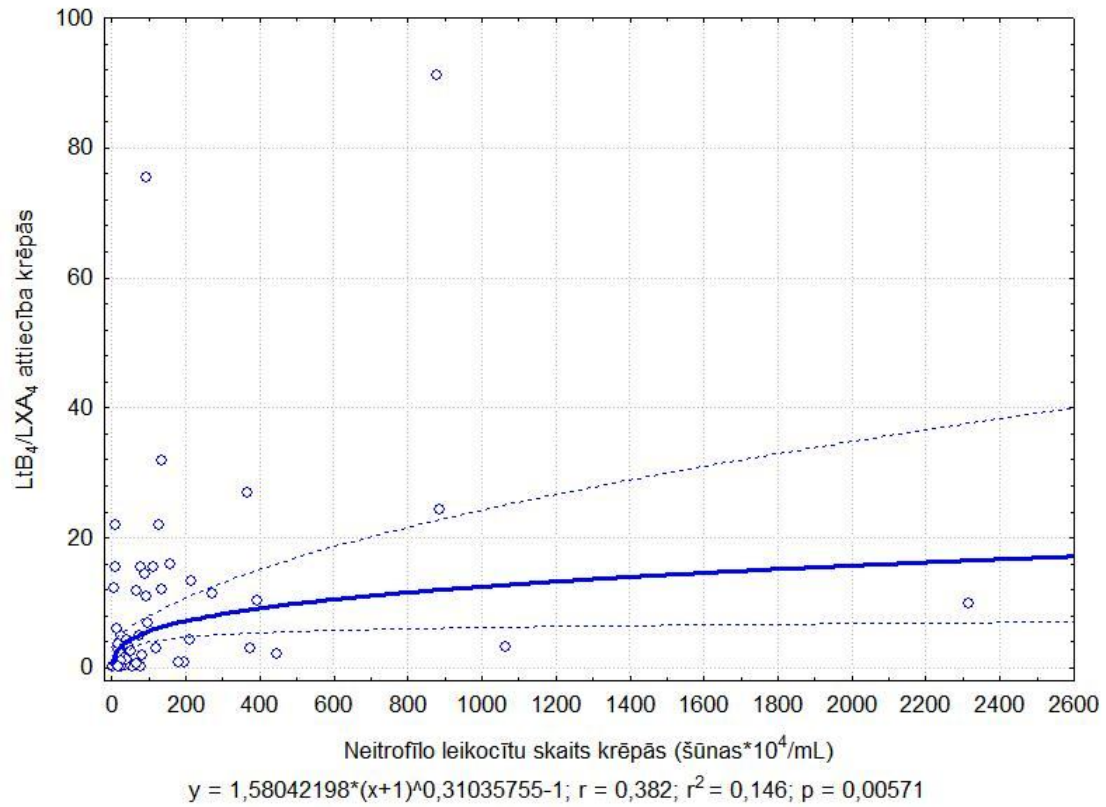
31. attēls. Iekaisumu samazinošā mediatora lipoksīna A₄ (LXA₄) koncentrācijas saistība ar neitrofīlo leikocītu absolūto skaitu krēpās, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimoniya un kontrole – ņemot kopā.



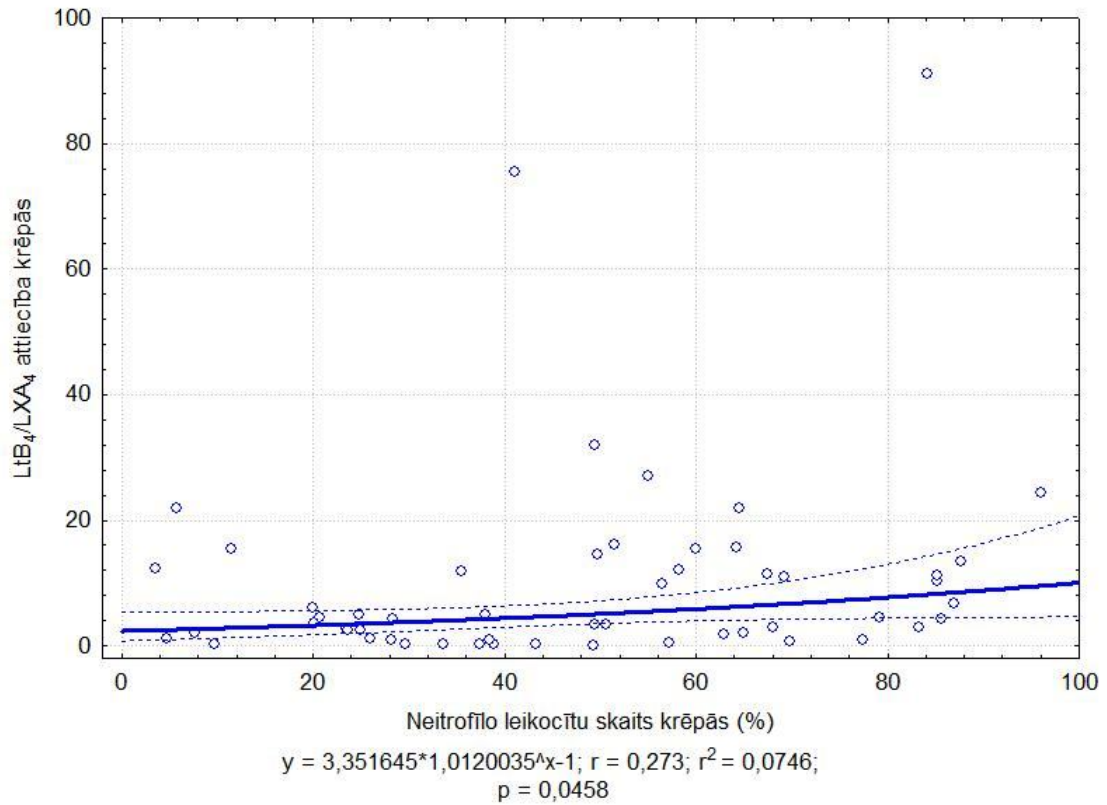
32. attēls. Iekaisumu samazinošā mediatora lipoksīna A₄ (LXA₄) koncentrācijas saistība ar neitrofilo leikocītu relatīvo skaitu krēpās, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimonija un kontrole – ņemot kopā.

5.7.2. LtB₄/LXA₄ attiecība krēpās

Apskatot iekaisuma smagumu raksturojošās attiecības LtB₄/LXA₄ proporciju krēpās, tika novērota tās pozitīva saistība ar neitrofilo leikocītu absolūto (skat. 33. attēlu) un relatīvo skaitu (skat. 34. attēlu) krēpās un krēpu indukcijas ātrumu un apgriezta saistība ar FEV₁ (skat. 11. tabulu). Tāpat tika konstatēta korelācijas tendence starp LtB₄/LXA₄ krēpās un bronhiālā epitēlija relatīvo skaitu krēpās, kā arī starp minēto attiecību un LXA₄ receptora pozitīvo mononukleāro šūnu skaitu krēpās (skat. 11. tabulu). Korelācijas starp LXA₄, LtB₄ vai LtB₄/LXA₄ attiecību krēpās un inhalējamo glikokortikosteroīdu terapiju HOPS pacientu grupā netika novērotas.



33. attēls. Leikotriēna B₄ / lipoksīna A₄ (LtB₄/LXA₄) attiecības krēpās saistība ar neitrofilo leukocītu absolūto skaitu krēpās, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimonija un kontrole – ņemot kopā.



34. attēls. Leikotriēna B₄ / lipoksīna A₄ (LtB₄/LXA₄) attiecības krēpās saistība ar neitrofīlo leikocītu relatīvo skaitu krēpās, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimonijs un kontrole – ņemot kopā.

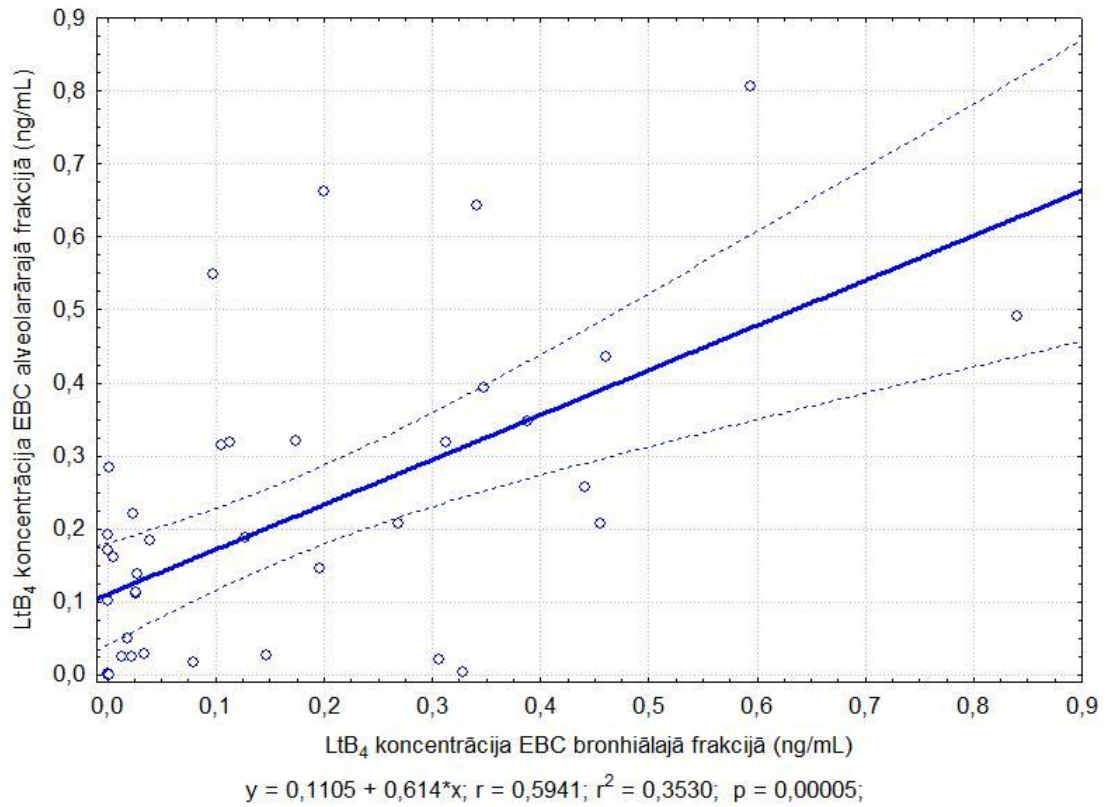
11. tabula. LtB₄/LXA₄ attiecības krēpās korelācijas.

<i>LtB₄/LXA₄ krēpās</i>								
	Ticamība (p) – ticama / tendence	Ciešums (r) – vāja*/ vidēja**/ cieša***	Korelācijas analīzes metode	X transf	Y transf	r	p	r²
Pozitīvas korelācijas								
<i>Neitrofīlie leikocīti (šūnas*10⁴/mL)</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	0,38	0,006	0,146
<i>Neitrofīlie leikocīti (%)</i>	Ticama	**	Fišera		lg	0,27	0,045	0,07
<i>Krēpu indukcijas ātrums (mL/min)</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	0,42	0,006	0,173
<i>ALXR pozitīvās MN šūnas (šūnas*10⁴/mL)</i>	Tendence	**	Fišera		lg	0,26	0,061	0,070
Negatīvas korelācijas tendence								
<i>FEV₁ (%)</i>	Ticama	**	Fišera		lg	-0,34	0,012	0,117
<i>Bronhiālālais epitēlijs (%)</i>	Tendence	*	Fišera		lg	-0,24	0,081	0,058

LtB₄ – leikotriēns B₄; LXA₄ – lipoksīns A₄; ALXR – lipoksīna A₄ receptors; MN šūnas – mononukleārās šūnas; FEV₁ – forsētas izelpas tilpums 1. sekundē pēc pilnas ieelpas; lg – logaritmiskā transformācija; p – statistiskā ticamība; r – korelācijas koeficients, r² – determinācijas koeficients.

5.7.3. LtB₄ alveolārajā izelpas gaisa kondensāta frakcijā

Tika novērota pozitīva saistība starp LtB₄ koncentrāciju alveolārajā EBC frakcijā un LtB₄ koncentrāciju bronhiālajā EBC frakcijā (skat. 35. attēlu); kā arī apgriezta korelācijas tendence starp LtB₄ līmeni alveolārajā EBC frakcijā un eozinofilo leikocītu absolūto skaitu krēpās (skat. 12. tabulu).



35. attēls. Saistība starp iekaisumu veicinošā mediatora leukotriēna B₄ (LTB₄) koncentrāciju izelpas gaisa kondensāta (EBC) alveolārajā un bronhiālajā frakcijā, visas pētījuma grupas – HOPS, pneimonija un kontrole – ņemot kopā.

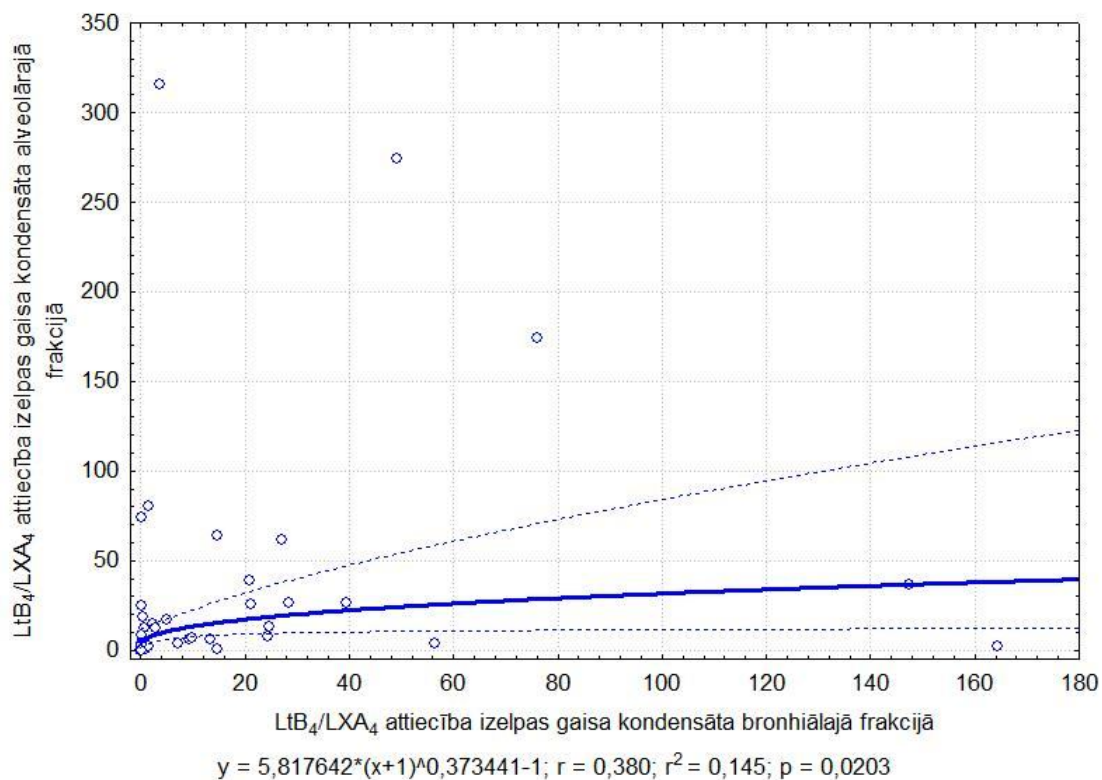
12. tabula. LtB₄ alveolārajā EBC frakcijā korelācijas.

<i>LtB₄ koncentrācija (ng/mL) alveolārajā EBC frakcijā</i>								
	Ticamība (p) – ticama / tendence	Ciešums (r) – vāja*/ vidēja**/ cieša***	Korelācijas analīzes metode	X transf	Y transf	r	p	r²
Pozitīva korelācija								
<i>LtB₄ koncentrācija bronhiālajā EBC frakcijā (ng/mL)</i>	Ticama	**	Fišera			0,59	0,00005	0,353
Negatīvas korelācijas tendence								
<i>Eozinofīlie leikocīti (šūnas*10⁴/mL)</i>	Tendence	**	Fišera	Lg	lg	-0,27	0,062	0,071

LtB₄ – leikotriēns B₄; EBC – izelpas gaisa kondensāts; lg –logaritmiskā transformācija; p – statistiskā ticamība; r – korelācijas koeficients, r² – determinācijas koeficients.

5.7.4. LtB₄/LXA₄ attiecība alveolārajā izelpas gaisa kondensāta frakcijā

Tika novērota LtB₄/LXA₄ proporcijas alveolārajā EBC frakcijā pozitīva saistība ar LtB₄/LXA₄ attiecību bronhiālajā EBC frakcijā (skat. 36. attēlu) un negatīva korelācijas tendence ar eozinofīlo leikocītu absolūto skaitu krēpās (skat. 13. tabulu).



36. attēls. Saistība starp leikotriēna B₄ / lipoksīna A₄ LtB₄/LXA₄ attiecību izelpas gaisa kondensāta alveolārajā un bronhiālajā frakcijā, ņemot visas pētījuma grupas – HOPS, pneimoniya un kontrole – kopā.

13. tabula. LtB₄/LXA₄ attiecības alveolārajā EBC frakcijā korelācijas.

<i>LtB₄/LXA₄ alveolārajā EBC frakcijā</i>								
	Ticamība (p) – ticama / tendence	Ciešums (r) – vāja* / vidēja** / cieša***	Korelācijas analīzes metode	X transf	Y transf	r	p	r²
Pozitīva korelācija								
<i>LtB₄/LXA₄ bronhiālajā EBC frakcijā</i>	Ticama	**	Fišera	Lg	lg	0,38	0,020	0,145
Negatīvas korelācijas tendence								
<i>Eozinofīlie leikocīti (šūnas*10⁴/mL)</i>	Tendence	**	Fišera	Lg	lg	-0,28	0,052	0,078

LtB₄ – leukotriēns B₄; LXA₄ – lipoksīns A₄; EBC – izelpas gaisa kondensāts; lg – logaritmiskā transformācija; p – statistiskā ticamība; r – korelācijas koeficients, r² – determinācijas koeficients.

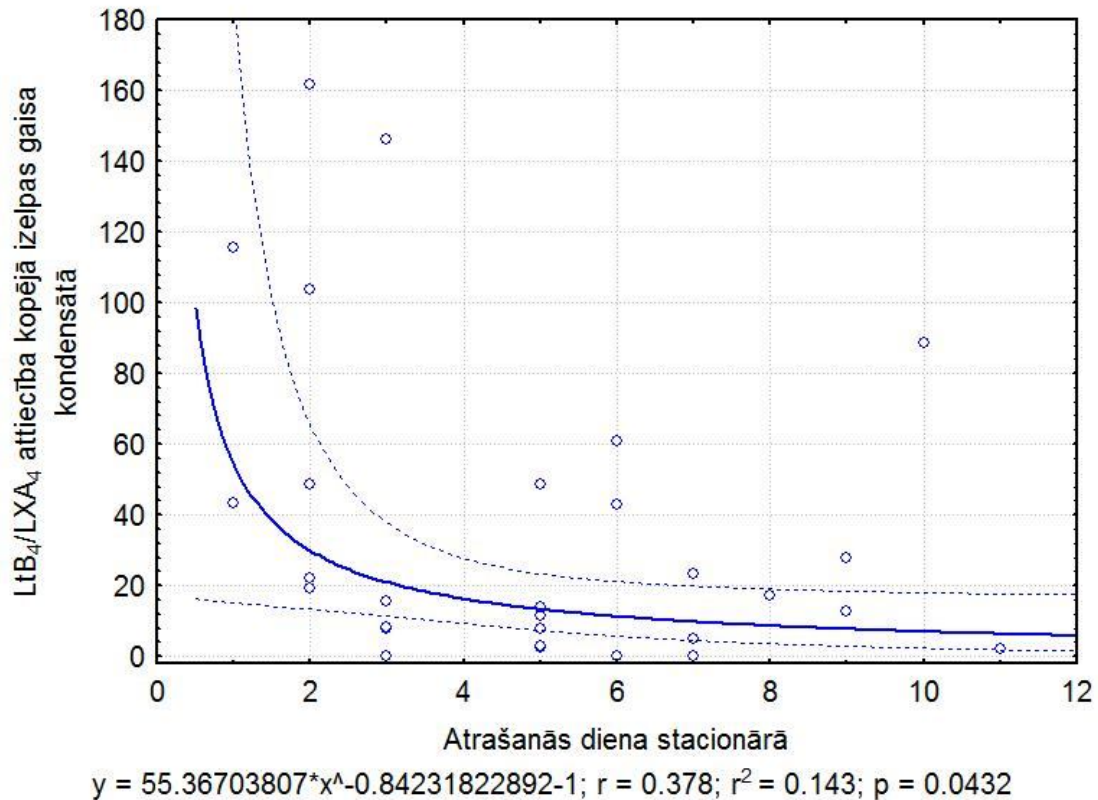
5.7.5. LtB₄/LXA₄ attiecība kopējā (alveolārā + bronhiālā frakcija) izelpas gaisa kondensātā

Tika konstatētas LtB₄/LXA₄ proporcijas kopējā izelpas gaisa kondensātā negatīvas korelāciju tendences ar neitrofilo leikocītu relatīvo skaitu krēpās un LXA₄ receptora ekspresiju polimorfonukleārajās krēpu šūnās (skat. 14. tabulu). Turklāt novērojām negatīvu saistību starp LtB₄/LXA₄ attiecību kopējā EBC un pacientu atrašanās dienu stacionārā (skat. 37. attēlu).

14. tabula. LtB₄/LXA₄ attiecības kopējā izelpas gaisa kondensātā korelācijas.

<i>LtB₄/LXA₄ kopējā izelpas gaisa kondensātā (ng/mL)</i>								
	Ticamība (p) – ticama / tendence	Ciešums (r) – vāja*/ vidēja**/ cieša***	Korelācijas analīzes metode	X transf	Y transf	r	p	r²
Negatīvu korelāciju tendences								
<i>Neitrofilie leikocīti (%)</i>	Tendence	*	Fišera		lg	-0,24	0,065	0,059
<i>ALXR pozitīvās PMN šūnās (šūnas*10⁴/mL)</i>	Tendence	*	Fišera	Lg	lg	-0,24	0,090	0,056

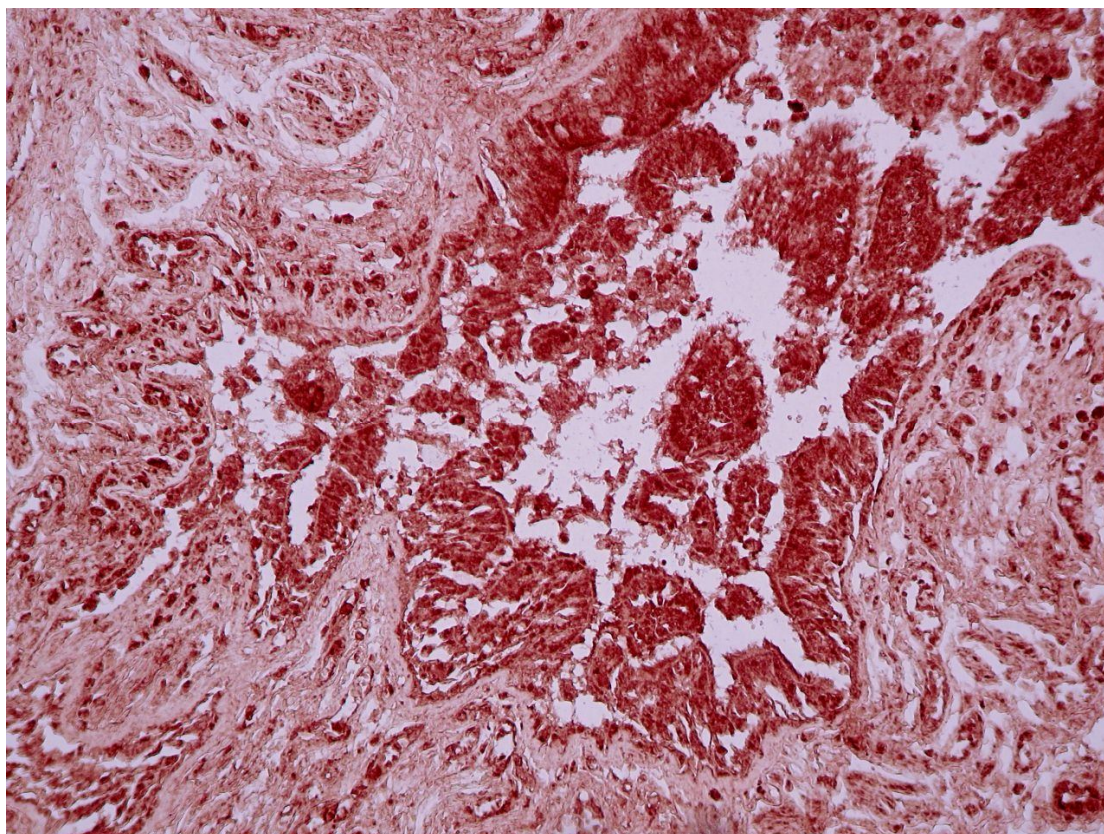
LtB₄ – leikotriēns B₄; LXA₄ – lipoksīns A₄; ALXR – lipoksīna A₄ receptors; PMN šūnas – polimorfonukleārās šūnas; lg – logaritmiskā transformācija; p – statistiskā ticamība; r – korelācijas koeficients, r² – determinācijas koeficients.



37. attēls. Saistība starp leukotriēna B₄ / lipoksīna A₄ LtB₄/LXA₄ attiecību kopējā izelpas gaisa kondensātā un pneimonijas un HOPS pacientu atrašanās dienu stacionārā.

5.8. Lipoksīna A₄ receptora ekspresija plaušu audos

Lai noskaidrotu lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresiju plaušu audos (skat. 38. attēlu), minētais receptors tika identificēts audu materiālā, kas iegūts plaušu vēža rezekcijas operācijas laikā HOPS pacientiem, nesmēķējošiem cilvēkiem un asimptomātiskiem smēķētājiem; pēdējie nozīmē, ka šīm personām plaušu funkcionālie rādītāji bija individuālās normas robežās un tiem nebija HOPS pacientiem raksturīgo simptomu.



38. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija plaušu audos.

15. tabulā parādīti HOPS pacientu, asimptomātisko smēķētāju un nesmēķējošo indivīdu plaušu funkcionālo rādītāji un smēķēšanas stāžs.

15. tabula. Pētījuma grupu personu smēķēšanas anamnēze un plaušu funkcionālie rādītāji.

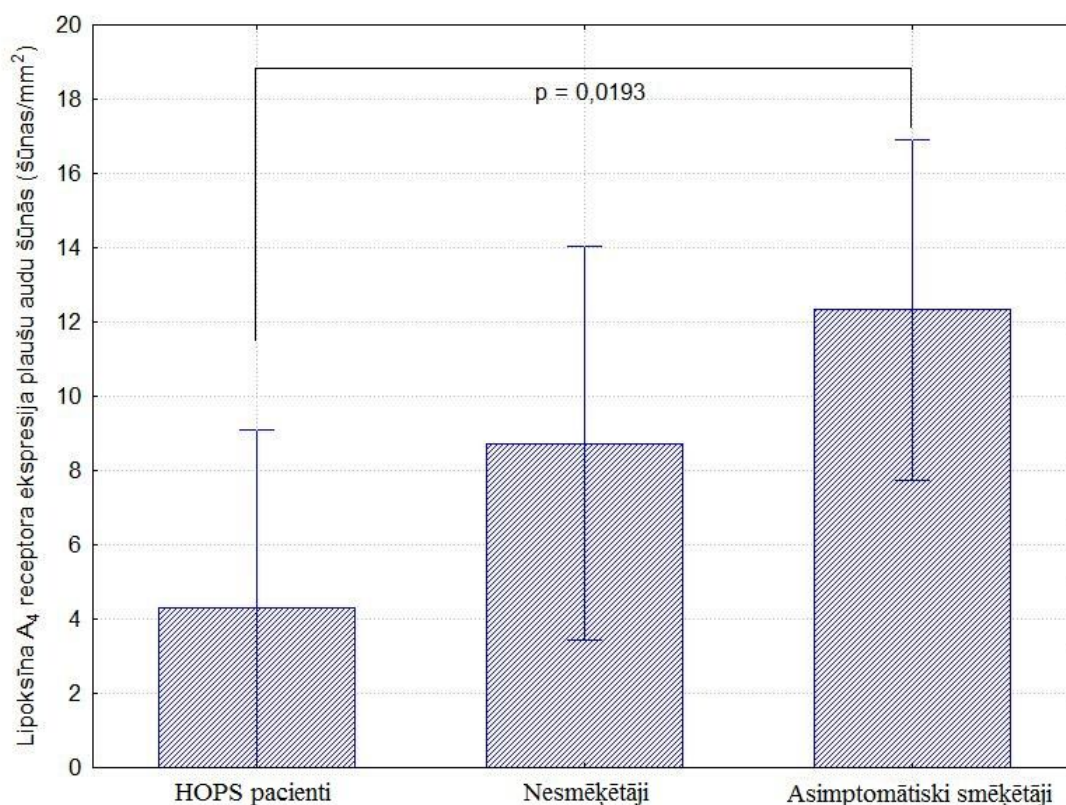
	HOPS pacienti	Asimptomātiski smēķētāji	Nesmēķētāji
Smēķēšana, pakgadi	24,09 ± 6,818	25,0 ± 6,528	0,0 ± 0,0
FEV₁, %	60,34 ± 6,538 *	81,683 ± 5,968 *	100,9 ± 6,891 *
FEV₁ / FVC, %	58,822 ± 4,596	75,875 ± 4,196 *	77,941 ± 4,845 *

Dati attēloti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls; * p < 0,05; FEV₁ – forsētas izelpas tilpums pirmajā sekundē, kas veikta pēc pilnas ieelpas; FEV₁ / FVC – Tifno indekss, matemātiski aprēķināts lielums.

HOPS pacientu un asimptomātisko smēķētāju smēķēšanas stāžs būtiski neatšķīrās, vidēji tas HOPS pacientiem pat bija par vienu pakgrādu mazāks nekā asimptomātiskiem smēķētājiem (skat. 15. tabulu).

Būtiski atšķīrās plaušu funkcionālie rādītāji visām pētījuma grupām. FEV₁ bija būtiski samazināts HOPS pacientiem un asimptomātiskiem smēķētājiem salīdzinājumā ar nesmēķējošām personām (respektīvi, $p < 0,0001$ un $p = 0,00018$), turklāt minētais rādītājs būtiski atšķīrās arī starp HOPS pacientiem un asimptomātiskiem smēķētājiem ($p < 0,001$), pirmajā grupā esot būtiski samazināts (skat. 15. tabulu).

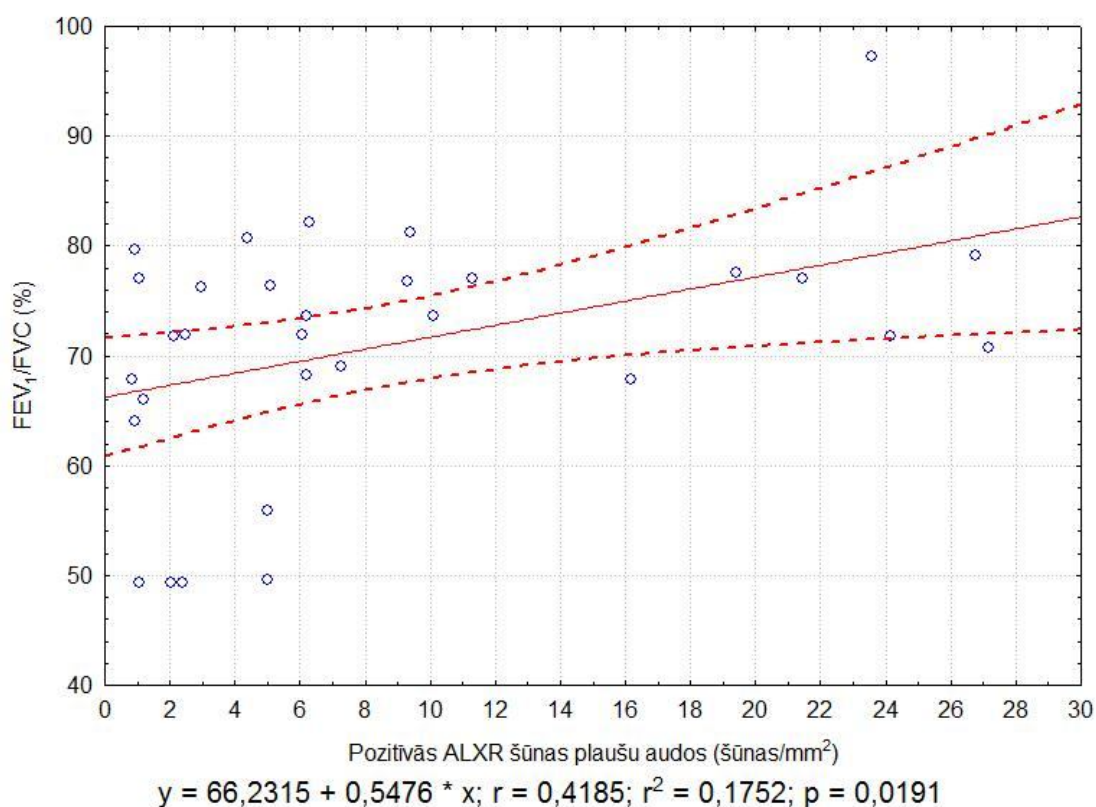
Papildus FEV₁/FVC bija būtiski samazināts HOPS pacientiem salīdzinājumā ar asimptomātisko smēķētāju ($p < 0,0001$) un nesmēķētāju grupu ($p < 0,0001$; skat. 15. tabulu).



39. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresija plaušu audu šūnās HOPS pacientiem, nesmēķējošiem indivīdiem un asimptomātiskiem smēķētājiem. Dati norādīti kā vidējais ± 95% ticamības intervāls.

ALXR ekspresija HOPS pacientu ($4,297 \pm 4,789$ pozitīvas šūnas/mm²) plaušu audos bija būtiski samazināta salīdzinājumā ar asimptomātiskiem smēķētājiem ($12,331 \pm 4,585$ pozitīvas šūnas/mm²). Nesmēķējošu indivīdu plaušu audos vidēji ekspresējās 8,730 pozitīvas šūnas/mm² (skat. 39. attēlu).

Saliekot visas trīs grupas kopā, tika novērota pozitīva korelācija starp ALXR ekspresiju plaušu audos un FEV₁/FVC (skat. 40. attēlu), kā arī korelācijas tendence starp receptora ekspresiju un FEV₁. Savukārt korelācija starp ALXR ekspresiju audos un smēķēšanas ilgumu netika novērota.



40. attēls. Lipoksīna A₄ receptora (ALXR) ekspresijas plaušu audu šūnās saistība ar FEV₁/FVC attiecības (TIFNO indeksa), ņemot visas pētījuma grupas – HOPS pacientus, asimptomātiskus smēķētājus un nesmēķējošas personas – kopā.

6. DISKUSIJA

6.1. LtB₄ un LXA₄ izelpas gaisa kondensātā

Izelpas gaisa kondensāts (EBC) ir samērā jauna, neinvazīva metode, lai noteiktu iekaisuma pakāpi izelpojamajā gaisa kondensāta materiālā. Pacientiem tā ieguve neizraisa nepatīkamas sajūtas, kā tas nereti ir veicot krēpu indukciju, un EBC ir pielietojams arī bērnu izmeklēšanai, tomēr atšķirībā no citām metodēm – bronhoskopijas, krēpu indukcijas – izelpas gaisa kondensāts nav validēta metode un to izmanto tikai pētniecībā. Tomēr šis materiāls var sniegt vērtīgu informāciju par elpceļu stāvokli. Atšķirībā no krēpām, ar kuru palīdzību tiek noteikts iekaisuma process centrālajos elpceļos, EBC – plašāk sniedz informāciju par perifērajiem elpceļiem, kuros dominē iekaisums HOPS gadījumā, līdz ar to, iespējams, EBC būtu noderīgāks materiāls par krēpām, lai monitorētu šīs hroniskās slimības gaitu. EBC satur tīru izelpas ūdens tvaiku, aerosola daļiņas, kas veidojušās no pulmonāro virsmu izklājošajiem sekrētiem (Biernacki *et al.*, 2003) un gaistošus organiskos savienojumus, ko satur izelpas gaiss (Hunt, 2007).

Izelpas gaisa kondensāts mūsu izmantojamajā EBC savākšanas aparātā ar speciāli iebūvētu vārstu palīdzību tika sadalīts divās frakcijās – bronhiālajā un alveolārajā. Pirmajā gadījumā EBC atspoguļo centrālo elpceļu stāvokli, savukārt otrajā – perifēros elpceļus, sniedzot nozīmīgu informāciju par iekaisuma lokalizāciju pulmonārajā sistēmā.

Mūsu pētījums atklāja grūtības LXA₄ koncentrācijas noteikšanā izelpas gaisa kondensātā, jo šis mediators EBC ir ļoti mazā koncentrācijā un prasa šī materiāla īpašu sagatavošanu pirms analīzes, tas ir bioloģiskā materiāla koncentrēšanu. Tomēr nav iespējams pateikt, kādā pakāpē ir jāveic šī procedūra. Piemēram, koncentrējot EBC paraugu piecas vienā paraugā LXA₄ nevarēja noteikt, kamēr citā tā koncentrācija bija pie izmantojamās analīzes mediatora detekcijas augšējās robežas. Pētījumā izmantojām pašlaik pieejamos jutīgākos LXA₄ noteikšanas ELISA komplektus, kuru detekcijas robeža ir daudz mazāka par LtB₄ noteikšanas ELISA komplektiem. Protams, jāpiemin, ka, tā kā LXA₄ noteikšanas kitu sensitivitāte ir zemāka par pieejamiem LtB₄ noteikšanas komplektiem, pirmo mediatoru noteikšana ir daudz vieglāka un aizņem mazāk laika. Lai iegūtu pārlicinošus datus par LXA₄ un arī LtB₄

līmeni izelpas gaisa kondensātā, kamēr nav izstrādāti jutīgāki mediatoru noteikšanas ELISA komplekti, ir jāveic rūpīga izpēte par paraugu koncentrēšanas pakāpi, tomēr, jāatceras, jo tā ir augstāka, jo vairāk materiāla ir nepieciešams, ko mūsu gadījumā – savācot dalīto (alveolāro un bronhiālo frakciju) izelpas gaisa kondensātu – bija grūti izdarīt, jo tas ir laikietilpīgs process (aptuveni 1,5 mL parauga var savākt tikai 40 – 60 minūšu laikā) un, lai gan neinvazīvs, tomēr mūsu pacientiem bija grūti izturams process, kura laikā kā nevēlamas blakusparādības pacienti minēja hiperventilāciju un arī ekstremitāšu tirpšanu. Vēl viens iemesls, kāpēc varētu būt grūti vai pat neiespējami noteikt mediatora līmeni EBC, ir tā gaistošā konsistence, tāpat jāpiemin, ka eikosanoīdi pazūd arī tos ilgstoši glabājot pat -70°C temperatūrā, ko skaidro ar šo mediatoru spēju saistīties ar materiālu, kurā to uzglabā (Kostikas *et al.*, 2005).

Literatūrā pieejamie dati par LtB_4 un citu mediatoru koncentrāciju izelpas kondensātā ir ļoti izkliedēti un nevienmērīgi, tas saistāms ar iepriekš minēto par metodes validācijas trūkumu, tai nav vienotu vadlīniju, kā pareizi savākt un analizēt materiālu dalītajā – t.i., atsevišķi alveolārajā un bronhiālajā frakcijā – izelpas gaisa kondensātā; pašlaik ir tikai Eiropas Respiratorās biedrības un citas rekomendācijas par kopējo izelpas gaisa kondensātu (Horváth *et al.*, 2005; Grob *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012). Ir autori, kas pacientiem kondensāta savākšanas laikā izmanto deguna klipsi, citi savukārt to neizmanto, daži ļauj vajadzības gadījumā, piemēram, uzņākot klepus lēkmei, uz brīdi pārtraukt elpošanu kondensāta savākšanas ierīcē, citi to neakceptē; tāpat var atrast informāciju par smēķēšanas un kafijas dzeršanas ietekmi uz EBC saturu.

Borrill ar līdzautoriem (Borrill *et al.*, 2007) veicis pētījumu par LtB_4 koncentrācijas mainību izelpas gaisa kondensātā HOPS pacientiem stabilā slimības fāzē. Iegūtie dati parādīja, ka grupas ietvaros dienas laikā nebija būtiskas mediatora koncentrācijas izmaiņas, tomēr, skatoties individuāli atsevišķus pacientus, varēja novērot LtB_4 līmeņa svārstības dienas gaitā. Šo mainību varētu ietekmēt elpceļus izklājošā sekrēta sastāva izmaiņas, ko izmaina, piemēram, smēķēšana, jo smēķētājiem Borrill ar līdzautoriem novēroja lielākas LtB_4 koncentrācijas izmaiņas salīdzinājumā ar nesmēķējošiem HOPS pacientiem (Borrill *et al.*, 2007). Turpretim citā pētījumā LtB_4 koncentrācijas atšķirības starp smēķējošiem un nesmēķējošiem indivīdiem netika novērotas (Hoffmeyer *et al.*, 2009). Tāpat koncentrācijas izmaiņu varētu saistīt ar atšķirīgajiem parauga ieguves metodoloģiskajiem aspektiem, kas īsumā jau pieminēti,

un visbeidzot ietekme ir arī tālāk analizē izmantojamajiem imunoloģiskajiem komplektiem, ar ko nosaka mediatoru koncentrāciju. Visu minēto apstiprina dažādu pētnieku pētījumu dati, kas ir pretrunīgi un ko ir grūti salīdzināt savā starpā. Svarīgi būtu veikt EBC ieguves un analizēšanas validāciju, lai datus varētu interpretēt kopumā, nevis atsevišķi katru pētījumu. Tāpat jāpiemin, ka literatūrā diemžēl neizdevās atrast datus par pētījumiem, kur izelpas gaisa kondensāts ticis analizēts atsevišķi – alveolārajā un bronhiālajā frakcijā -, kā to centāmies darīt mēs.

Mūsu dati parādīja, ka izelpas gaisa kondensātā ir novērojama mazāka eikosanoīdu koncentrācija salīdzinājumā ar krēpu materiālu, kas būtu izskaidrojams ar EBC atšķaidīto vidi, ko nodrošina ūdens tvaiki šajā materiālā (Hunt, 2007). Tomēr ir publikācijas, kurās norādīts, ka tieši EBC materiālā ir augstāka LtB₄ koncentrācija salīdzinājumā ar krēpu paraugiem (Kostikas *et al.*, 2005), to skaidrojot ar mediatora fizikālajām īpašībām, kas to padara vieglāk nosakāmu EBC vidē, kā arī ar krēpu apstrādes protokolu, kas prasa to atšķaidīšanu. Mēs apšaubām pēdējo skaidrojumu, jo arī mēs apstrādes laikā krēpas divas reizes atšķaidījām ar Henksa buferēto fizioloģisko šķīdumu.

Literatūrā atrodami atšķirīgi dati par LtB₄ korelāciju izelpas gaisa kondensāta un krēpu materiālā, daļa autoru atzīmē uz šādu korelāciju (Kostikas *et al.*, 2005), norādot, ka šī iekaisumu veicinošā mediatora līmenis minētajos bioloģiskajos materiālos ir salīdzināms savā starpā, neskatoties uz tā atšķirīgo izcelsmi, kamēr citi pētnieki šādu saistību starp minētajiem diviem materiāliem nav ieguvuši (Corhay *et al.*, 2009). Mūsu dati neuzrādīja korelācijas starp LXA₄ vai LtB₄ koncentrāciju izelpas gaisa kondensātā un krēpās. Bet, salīdzinot abas – alveolāro un bronhiālo – EBC frakcijas savā starpā, mēs ieguvām pozitīvu korelāciju starp iekaisuma intensitāti raksturojošo LtB₄/LXA₄ attiecību alveolārajā un bronhiālajā EBC frakcijā, norādot uz mediatoru saistību abās EBC frakcijās, līdz ar to mūsu izmantojamā dalītā kondensāta tehnika nenorāda uz būtiskām mediatoru koncentrācijas atšķirībām perifērajos un centrālajos elpceļos un tās vietā var izmantot vienu pašu – kopējo – izelpas gaisa kondensātu.

Mūsu iegūtie dati par LtB₄ koncentrāciju EBC neuzrādīja būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām – HOPS un pneimonijas pacientiem un veseliem kontroles grupas indivīdiem -, jāmin, ka iegūtie rezultāti vienas grupas ietvaros bija diezgan izklaidēti

salīdzinājumā ar tiem, kādus novērojām, analizējot krēpu paraugus. Bronhiālajā frakcijā paaugstināts LtB₄ līmenis tika novērots HOPS pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu, kas sakrīt ar literatūrā pieejamo informāciju, vismazākā koncentrācija bija pneimonijas gadījumā. Savukārt alveolārajā frakcijā novērotais bija pretējs – HOPS pacientu EBC LtB₄ koncentrācija bija zemāka salīdzinājumā ar kontroles grupas indivīdiem, kamēr vismazākā saglabājās pneimonijas pacientu grupā. Apvienojot rezultātus no abām EBC frakcijām, kopējā EBC LtB₄ koncentrācija abās pacientu grupās bija zemāka salīdzinājumā ar kontroles grupu.

Biernacki ar līdzautoriem (*Biernacki et al.*, 2003) veica pētījumu par LtB₄ koncentrāciju izelpas gaisa kondensātā HOPS pacientiem paasinājuma fāzē. Visi šie pacienti izmeklējuma brīdī saņēma inhalējamo kortikosteroīdu terapiju, bet antibakteriālā terapija vēl nebija uzsākta. LtB₄ līmenis EBC HOPS pacientiem bija palielināts salīdzinājumā ar kontroles grupu, bet šī iekaisumu veicinošā mediatora koncentrācija kritās, uzsākot specifisku antibiotiku terapiju, sasniedzot kontroles grupas LtB₄ līmeni. Autori to skaidro ar neitrofilo leukocītu skaita samazināšanos HOPS pacientiem medikamentu lietošanas laikā, jo zināms, LtB₄ veidojas makrofāgos, epiteliālajās šūnās un aktivētos neitrofilajos leukocītos. Mūsu iegūtie dati ir pretrunā ar šo pētījumu, jo, lai gan mūsu HOPS pacientiem kopējā EBC LtB₄ koncentrācija izmeklējuma brīdī bija pat nedaudz zemāka salīdzinājumā ar kontroles grupu, skatoties atsevišķi – alveolārajā EBC frakcijā tā bija nebūtiski palielināta salīdzinājumā ar kontroli, bet bronhiālajā – mazliet paaugstināta. Šos pretējos datus mēs varētu skaidrot ar antibakteriālo terapiju, ko mūsu pacienti uzsāka jau pirms izmeklējuma. Tomēr mūsu gadījumā neitrofilo leukocītu skaits krēpās HOPS pacientiem saglabājās augsts medikamentu lietošanas laikā salīdzinājumā ar *Biernacki* un līdzautoru novēroto šūnu skaita samazināšanos (*Biernacki et al.*, 2003), līdz ar to pilnīgi mūsu datus nevarētu izskaidrot tikai ar terapijas ietekmi.

Corhay ar līdzautoriem (*Corhay et al.*, 2009) izmeklēja stabilas slimības gaitas HOPS pacientus, kas nesaņēma inhalējamo kortikosteroīdu terapiju. Autori novēroja paaugstinātu LtB₄ koncentrāciju EBC HOPS pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu; turklāt interesanti, ka inducētajās krēpās pētņieki nenovēroja iekaisumu veicinošā mediatora līmeņa atšķirības starp abām grupām. Šos datus viņi skaidroja ar siekalu piejaukumu krēpu paraugam, kas to atšķaidījis, bet EBC siekalas nevarētu būt atrodamas. Mūsu dati atšķiras no šī pētījuma datiem, neatrodot ticamas atšķirības

LtB₄ koncentrācijā starp grupām. *Corhay* ieguva korelāciju starp LtB₄ koncentrāciju EBC un krēpās (*Corhay et al.*, 2009). Mūsu iegūtie rezultāti neuzrādīja korelāciju starp mediatora koncentrāciju EBC un krēpās.

Līdzīgi mūsu pētījumam, kur izmeklējamie HOPS pacienti paasinājuma fāzē analīzes dienā jau saņēma gan antibakteriālo terapiju, gan inhalējamus kortikosteroīdus, *Ko* ar līdzautoriem (*Ko et al.*, 2009) savā pētījumā iekļāva pacientus paasinājuma fāzē, kas saņēma antibiotikas un orālos glikokortikosteroīdus, un izmeklējums tika veikts sērijveidā, sākot ar piekto terapijas dienu. *Ko* nenovēroja būtiskas LtB₄ koncentrācijas atšķirības terapijas ietekmē, turklāt mediatora līmenis EBC būtiski neatšķīrās HOPS paasinājuma fāzē, stabilas gaitas HOPS pacientiem un veseliem indivīdiem. Iegūtie dati tika skaidroti ar specifisko HOPS terapiju. Mūsu dati ir līdzīgi minētā pētījuma datiem, nenovērojot būtiskas atšķirības ne tikai starp HOPS paasinājuma fāzē un kontroles grupu, bet arī akūta iekaisuma gadījumā – pneimonijas pacientiem – LtB₄ līmenis EBC bija līdzīgs abām iepriekš minētajām grupām. Mūsu gadījumā arī abas pacientu grupas izmeklējuma laikā saņēma antibakteriālus medikamentus iekaisuma mazināšanai.

Ir veikts pētījums, kas parāda LtB₄ līmeni kortikosteroīdu lietošanas gadījumā. *Montuschi* ar līdzautoriem (*Montuschi et al.*, 2003) EBC mērīja LtB₄ koncentrāciju HOPS pacientiem, kas saņēma steroīdus terapijā un pacientiem, kas tos nesaņēma, kā arī kontroles grupai. Iegūtie rezultāti parādīja, ka slimniekiem ir palielināta LtB₄ koncentrācija EBC salīdzinājumā ar kontroles grupu, bet mediatora līmenis starp abām pacientu grupām ar atšķirīgo terapiju neatšķīrās, norādot uz relatīvu inhalējamo kortikosteroīdu terapijas rezistenci HOPS gadījumā. Minētais liek domāt, ka mūsu pētījumā nebūstiskās LtB₄ koncentrācijas atšķirības starp HOPS pacientiem un kontroles grupu, kā arī, domājams, pneimonijas pacientiem, visticamāk ir saistīta ar specifisko antibakteriālo terapiju, nevis inhalējamo glikokortikosteroīdu lietošanu.

Paaugstinātu iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ koncentrāciju alveolārajā EBC frakcijā novērojām HOPS pacientiem, samazinātu – pneimonijas pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu, līdzīga aina tika konstatēta arī bronhiālajā EBC frakcijā. Arī šī mediatora koncentrācija, tāpat kā LtB₄, bija ar augstu datu izkliedi grupas ietvaros un būtiskas atšķirības starp tām nenovērojām. Bet, saliekot abas EBC frakcijas kopā, saglabājoties lielai datu izkļiedei, novērojām LXA₄ koncentrācijas

atšķirības tendenci starp pacientu grupām – pneimonijas gadījumā mediators līmenis EBC bija samazināts, bet HOPS pacientiem – paaugstināts.

Samazināto LXA₄ līmeni EBC pneimonijas pacientiem varētu skaidrot ar slimības akūto stāvokli, kad dominē nukleāro faktoru, piemēram, NF-κB darbība, kas uztur iekaisumu. Tomēr jādomā, ka LXA₄ koncentrāciju varētu būt ietekmējuši antibakteriālie medikamenti, kas tiek lietoti stacionārā, bet nav skaidrs, kāpēc HOPS pacientiem šis mediators ir paaugstināts, jo arī HOPS paasinājuma gadījumā tika nozīmēta antibakteriāla terapija, iespējams, glikortikosteroīdie medikamenti palielina LXA₄ sintēzi iekaisuma apvidū.

Jāsaka, ka literatūrā pieejamā informācija par līdzīgiem pētījumiem, kad LXA₄ koncentrācija mērīta izelpas gaisa kondensātā HOPS pacientiem ir skopa, lai neteiktu, ka šādi dati vispār nav pieejami. Pētījumā, kurā LXA₄ koncentrācija EBC noteikta dažāda smaguma pakāpes HOPS slimniekiem, parādīja, ka augstāks mediators līmenis atrodams smagas slimības gadījumā salīdzinājumā ar vidējas smaguma pakāpes HOPS pacientiem (Fritscher *et al.*, 2009).

Aprēķinot iekaisumu veicinošā / iekaisumu samazinošā mediatoru LtB₄/LXA₄ attiecību kopējā EBC, iegūtie rezultāti pārsteidza, jo, salīdzinājumā ar minēto attiecību krēpās, EBC materiālā mazākā proporcija tika novērota HOPS pacientiem, kas būtiski atšķīrās no pneimonijas grupas, kurai bija paaugstināta mediatoru attiecība salīdzinājumā ar pārējām pētījuma grupām, un HOPS pacientiem tika novērota tendence būt samazinātai attiecībai salīdzinājumā ar kontroles grupai raksturīgo proporciju. Ir grūti saprast šādu atšķirību un to interpretēt. Mēs tiecamies domāt, ka šie rezultāti neuzrāda patieso iekaisuma procesu, skaidrojot to ar EBC ieguves un apstrādes īpatnībām, mediatoru sarežģīto noteikšanu šajā materiālā, jo bieži tā bija zem analīzes noteikšanas robežas, kas prasīja materiāla koncentrēšanu, kas ir gana sarežģīts process, un nebija iespējams precīzi noteikt koncentrēšanas pakāpi un citām analīzes nepilnībām.

Tomēr ieguvām negatīvu korelāciju starp LtB₄/LXA₄ koncentrāciju kopējā EBC un pacientu – pneimonijas un HOPS – atrašanās dienu stacionārā, līdz ar to – specifiskās terapijas dienu, kas norāda, ka minētā ārstēšanas metodika samazina iekaisumu plaušās un elpceļos, veicinot slimības stabilizēšanos vai atrisināšanos.

Ņemot vērā augstāk minēto, tas ir, izelpas gaisa kondensāta analizēšanas sarežģītos apstākļus un eikosanoīdu izkliedēto koncentrāciju arī vienas grupas robežās, par pamatu pētījumam ņēmām inducēto krēpu materiālu un iegūtās iekaisumu veicinošā LtB_4 un iekaisumu samazinošā LXA_4 koncentrācijas tajā.

6.2. Eikosanoīdi inducētajās krēpās

LXA_4 ir iekaisumu samazinošs mediators, kas darbojas kā stop signāls neitrofilo (Louis *et al.*, 2005) un eozinofilo leukocītu rekrutācijai un akumulācijai iekaisuma vietā, tāpat LXA_4 veicina monocītu hemotaksi un apoptisko šūnu fagocitozi nefloģiskā veidā (Bannenberg, Serhan, 2010). Vispārīgi LXA_4 darbojas kā iekaisuma mediatora LtB_4 antagonists, un tā sintēze sākas gandrīz vienlaicīgi ar LtB_4 veidošanos iekaisuma procesa sākumā, jo abiem mediatoriem ir kopīgs sintēzes substrāts, tādējādi LXA_4 jau akūta iekaisuma sākumstadijā nodrošina tā atrisināšanos. Iekaisumam persistējot, attīstās hronisks iekaisums, kura nespēja atrisināties varētu būt saistāma ar LXA_4 samazinātu sintēzi audos.

Iekaisumu veicinošā mediatora LtB_4 koncentrācija inducētajās krēpās HOPS pacientiem būtiski neatšķīrās no kontroles grupas, nedaudz samazināta tā bija pneimonijas pacientu grupā. HOPS pacientu LtB_4 līmenis krēpās bija būtiski paaugstināts salīdzinājumā ar akūtu iekaisumu raksturojošo – pneimonijas pacientu – grupu. Šis fakts ir interesants, jo minētajam mediatoram akūtā iekaisumā vajadzētu būt palielinātam, kalpojot kā iekaisuma marķierim, arī hroniskā iekaisumā tam vajadzētu būt palielinātā koncentrācijā salīdzinājumā ar veseliem, nesmēķējošiem cilvēkiem, bet mūsu gadījumā nenovērojām būtiskas mediatora koncentrācijas atšķirības starp HOPS pacientiem un kontroles grupu.

Lai noskaidrotu eikosanoīdu relatīvu dinamiku slimības norisē, HOPS un pneimonijas pacientus sadalījām divās grupās – agrīnās atrašanās dienās stacionārā (1.-2. hospitalizācijas diena) un vēlīnās (sākot no 3. dienas slimnīcā). Iegūtie dati uzrādīja LtB_4 koncentrācijas atšķirības starp pacientu grupām, sākot no 3. atrašanās dienas stacionārā, HOPS pacientiem šis iekaisumu veicinošais mediators bija palielinātā koncentrācijā salīdzinājumā ar pneimonijas pacientiem. Līdzīga aina tika novērota, arī apskatot LtB_4/LXA_4 attiecību krēpās. Šīs LtB_4 koncentrācijas atšķirības norāda uz HOPS raksturojošo iekaisuma stāvokli, kas turpinās arī pēc specifiskās terapijas

uzsākšanas, kamēr pneimonijas gadījumā arahidonskābes derivātu sintēze no iekaisumu veicinošo mediatoru sintēzes pārslēdzas uz iekaisumu samazinošā mediatora veidošanos jau terapijas sākumposmā un iezīmē pro-rezolūcijas stāvokli pneimonijas pacientiem. Tomēr jāpiemin, ka nenovērojām LXA₄ līmeņa būtiskas atšķirības starp pacientu grupām atkarībā no stacionēšanas dienas, tomēr tas varētu būt saistīts ar arahidonskābes mediatoru metabolisma īpatnībām, kad LXA₄ sintēzei nepieciešams ilgāks laiks pēc pro-inflamatorā stāvokļa nomākšanas.

Kā bija sagaidāms, pazemināta iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ koncentrācija tika novērota HOPS pacientu krēpās. Turpretim bija domājams, ka paaugstināta šīs vielas koncentrācija varētu būt akūta iekaisuma gadījumā, ko mūsu pētījumā raksturoja pneimonijas pacientu grupa, tomēr rezultāti uzrādīja, ka šai pacientu grupai LXA₄ līmenis ir samazināts salīdzinājumā ar kontroles grupu, tomēr tas bija augstāks salīdzinājumā ar HOPS pacientiem.

Literatūrā par LtB₄ koncentrāciju krēpās pārsvarā atrodami pretēji dati mūsu iegūtajiem, t.i., LtB₄ līmenis HOPS pacientiem ir paaugstināts salīdzinājumā ar kontroles grupu (Crooks *et al.*, 2000; Silkoff *et al.*, 2001; Kostikas *et al.*, 2005). Viens no skaidrojumiem varētu būt saistāms ar vairumā šajos pētījumos iesaistītajām personām – HOPS pacientiem stabilā slimības fāzē.

Līdzīgu LtB₄ koncentrācijas proporciju HOPS pacientu un kontroles grupas krēpās salīdzinājumā ar mūsu datiem ieguva Corhay ar līdzautoriem savā pētījumā, izmeklējot stabilas fāzes HOPS pacientus (Corhay *et al.*, 2009). Vienādo LtB₄ līmeni krēpās abām iepriekš minētajām grupām viņš skaidroja ar siekalu piejaukumu krēpu paraugā. Tomēr mēs centāmies izvairīties no siekalu piejaukuma krēpām, pacientiem pirms atkrēpošanas lūdzot kārtīgi izskalot muti un rīkli ar tīru ūdeni, kā arī krēpu apstrādes laikā noteicām plakanšūnu skaitu paraugā, kas norāda uz siekalu piejaukumu. Līdz ar to diez vai šis skaidrojums varētu būt attiecināms uz mūsu pētījuma grupām.

Samazināto LtB₄ daudzumu pneimonijas slimniekiem, iespējams, varētu skaidrot ar slimības smago gaitu, kas prasījusi hospitalizāciju; līdzīgi kā Bhavsar ar līdzautoriem novērojis samazinātu LtB₄ daudzumu smagas astmas pacientu krēpās salīdzinājumā ar kontroli (Bhavsar *et al.*, 2010).

LtB₄ salīdzinoši zemā koncentrācija pacientu krēpās varētu būt skaidrojama arī ar specifisko terapiju, ko pacienti saņem, atrodoties stacionārā. To apstiprina arī *Crooks* un līdzautoru pētījums, kurā viņi pētīja HOPS pacientus paasinājuma stadijā (*Crooks et al.*, 2000). Viņu pacienti pastāvīgi saņēma gan inhalējamo, gan orālo glikokortikosteroīdu terapiju. *Crooks* ar līdzautoriem pirmajā dienā, kad pacienti nokļuva stacionārā sakarā ar bakteriālu paasinājumu, pirms specifiskas antibakteriālās terapijas sākuma ieguva inducēto krēpu paraugu un tālāk šo materiālu ievāca periodiski visu terapijas laiku, līdz pacienti atlaba. Pirmajā stacionēšanas dienā HOPS pacientu krēpās tika konstatēta paaugstināta LtB₄ koncentrācija, kas ievērojami kritās, uzsākot antibakteriālo terapiju. Jau trešajā dienā pēc medikamentu lietošanas sākuma mediatora koncentrācija bija samazinājusies vairāk par pusi no sākotnējā daudzuma, bet piektajā terapijas dienā un vēlāk līdz pat terapijas pārtraukšanai tā bija pat zemāka nekā vēlāk konstatēja stabilā slimības fāzē. LtB₄ līmenis krēpās samazinājās ar katru terapijas dienu, bet, pārtraucot lietot medikamentus, tas pakāpeniski atkal pieauga. Tiek uzskatīts, ka LtB₄ avots elpceļos ir alveolārie makrofāgi, epiteliālās šūnas (*Fels et al.*, 1982; *Bigby et al.*, 1989), kā arī aktivētie neitrofilie leukocīti (*Borgeat et al.*, 1997). Būtiski, LtB₄ iekaisuma šūnu hemotakses aktivitāte novērojama gan paasinājuma, gan stabilas slimības gaitā, kas nosaka LtB₄ koncentrācijas svārstības. Mūsu gadījumā pacienti izmeklējuma dienā stacionārā atradās vidēji jau četras dienas un saņēma specifisku HOPS terapiju, tāpēc LtB₄ vienlīdzīgo koncentrāciju ar kontroles grupu varētu skaidrot tieši ar antibakteriālo medikamentu ietekmi. Tomēr LtB₄/LXA₄ proporcija krēpās mūsu HOPS pacientiem saglabājās augsta, kas izskaidro neitrofilo leukocītu persistenci iekaisuma apvidū. Līdzīgi varētu domāt par pneimonijas pacientiem, kam LtB₄ koncentrācija krēpās izmeklējuma dienā bija vēl zemāka. Citā pētījumā parādīts, ka glikokortikosteroīdu terapija astmas gadījumā samazina gan LtB₄, gan LXA₄ daudzumu plaušu audu materiālā (*Bhavsar et al.*, 2010). Tomēr mūsu gadījumā nenovērojām glikokortikosteroīdu terapijas būtisku ietekmi uz LtB₄ un LXA₄ koncentrāciju elpceļos un plaušās.

Svarīgi ir uzsvērt, ka mūsu pētījumā iesaistītie pacienti, kas paasinājuma stadijā atradās stacionārā, terapijā saņēma ne tikai specifisko antibakteriālo terapiju, kuras ietekme uz iekaisuma mediatora līmeni ir aprakstīta augstāk, bet daļa pacientu slimības smaguma dēļ turpināja lietot rutīnas terapiju, ietverot inhalējamus glikokortikosteroīdus, lai kontrolētu iekaisuma procesu. Iekaisuma gēnu darbības

regulēšanā būtiska nozīme ir histonu acetilēšanai, ko regulē histonu acetiltransferāzes (HAT) un histonu deacetilāzes (HDAC). HOPS gadījumā sekundāri oksidatīvajam stresam un iekaisuma smaguma pakāpei samazinās HDAC2 aktivitāte (Tamimi *et al.*, 2012). Kortikosteroīdi samazina iekaisuma gēnu darbību, inhibējot HAT aktivitāti un aktivētam transkripcijas kompleksam piesaistot HDAC2 (Mroz *et al.*, 2007). Praksē HOPS gadījumā bieži novēro rezistenci pret kortikosteroīdu terapiju. Tas tiek saistīts ar samazinātu HDAC aktivitāti alveolārajos makrofāgos smēķējošiem cilvēkiem salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (Thiagalingam *et al.*, 2003). Citā pētījumā HOPS pacientu plaušu audu materiālā, bronhiālajā biopsijā un alveolārajos makrofāgos tika novērota samazināta HDAC aktivitāte, un tā korelēja ar slimības smaguma pakāpi (Barnes, 2006). Arī pētījumā ar astmas pacientiem smēķējošiem indivīdiem tika novērota HDAC aktivitātes samazināšanās salīdzinājumā ar nesmēķējošiem astmas pacientiem (Thomson *et al.*, 2003). Tāpat arī oksidatīvo stresu saista ar HOPS pacientu rezistenci pret kortikosteroīdu terapiju (Mroz *et al.*, 2007). Minētais izskaidro HOPS pacientu slimības paasinājuma epizodes, glikokortikosteroīdiem nespējot kontrolēt iekaisumu, un līdz ar to šie medikamenti varētu nebūstiski ietekmēt iekaisuma mediatoru līmeni pacientu plaušās un elpceļos, ko novērtējām arī mūsu pētījumu pacientu grupām, iegūstot nebūstisku glikokortikosteroīdu ietekmi uz arahidonskābes derivātu līmeni.

LtB₄ koncentrācijas samazināšanos iekaisuma laikā varētu skaidrot ar ātru mediatora inaktivāciju. LtB₄ *in vivo* tiek ātri metabolizēts. Viens no galvenajiem veidiem ir ω-oksidācija. Neitrofilie leukocīti un citas šūnas ekspresē citohromu P-450, kas veicina LtB₄ ω-oksidēšanos, veidojot 20-hidroksi-LtB₄ un tālāk – 20-karboksi-LtB₄ (Pettipher *et al.*, 1993; Hankin, Murphy, 2000). Cits LtB₄ inaktivācijas veids LtB₄ redukcija un tai sekojoša ω-hidroksilācija (Brom *et al.*, 1988). HOPS un pneimonijas pacientu inducētajās krēpās iekaisuma šūnu, arī neitrofilo leukocītu ir palielinātā daudzumā salīdzinājumā ar kontroles grupu, līdz ar to neitrofilo leukocītu ierosinātā LtB₄ pārveidošana noris daudz ātrāk. Ar šo faktu varētu izskaidrot samazinātu LtB₄ koncentrāciju pneimonijas pacientu krēpās salīdzinājumā ar kontroles grupu un gandrīz vienādo mediatora līmeni HOPS un kontroles grupas krēpu paraugos.

Tāpat LtB₄ koncentrāciju, kas ir gandrīz vienādā līmenī HOPS pacientiem un veseliem indivīdiem, varētu skaidrot ar krēpu inducēšanas metodi. Lai gan šī metode tiek izmantota iekaisuma izvērtēšanai plaušās, tā pati arī var radīt nelielu kairinājumu

un jutīgākiem cilvēkiem arī iekaisuma procesu, jo inducēšanai tiek izmantots kairinošs aģents – 4% sāls šķīdums. Zināms, ka arahidonskābes derivāti veidojas lokāli īsā laikā kopš saskarsmes ar kairinošu aģentu. Krēpu inducēšana notiek aptuveni 15 minūtes, šis laiks ir pietiekošs, lai iekaisumu veicinošais LtB_4 tiktu sintezēts plaušās un, iespējams, tas nosaka šī mediatora koncentrāciju veselu cilvēku krēpu materiālā.

Daudz mazāk ir pētīts LXA_4 daudzums krēpās vai bronhoalveolārajā skalojumā HOPS slimības gadījumā, plašāka informācija pieejama par šo eikosanoīdu līmeni bronhiālās astmas gadījumā (Chavis *et al.*, 2000; Bonnans *et al.*, 2002; Vachier *et al.*, 2005).

Lipoksīni paātrina iekaisuma atrisināšanos, un LXA_4 veidošanās korelē ar iekaisuma limitācijas sākumu, kas izpaužas ar neitrofilo leukocītu skaita samazināšanos iekaisuma eksudātos (Devchand *et al.*, 2003). Mūsu pētījumā HOPS pacientiem novērojām samazinātu LXA_4 koncentrāciju krēpās, bet neitrofilo leukocītu skaits bija salīdzinoši liels, kas izskaidro to, kāpēc iekaisums šiem pacientiem nespēj atrisināties.

Vachier ar līdzautoriem (Vachier *et al.*, 2005) pētīja arahidonskābes derivātu koncentrāciju inducēto krēpu supernatantā HOPS pacientiem. Šīs grupas iegūtie rezultāti ir pretēji mūsu datiem. Pētnieku iegūtie dati neuzrādīja būtiskas atšķirības LXA_4 līmenī HOPS pacientu un kontroles grupas inducēto krēpu supernatantos, kas ir pretrunā ar mūsu iegūtajiem datiem. LtB_4 līmenis krēpās mūsu pētījuma HOPS pacientiem un kontroles grupas indivīdiem bija līdzīgs, turpretim Vachier ar līdzautoriem parādīja, ka LtB_4 koncentrācija krēpu supernatantā HOPS pacientiem ir būtiski paaugstināta salīdzinājumā ar kontroles grupu (Vachier *et al.*, 2005), norādot uz iekaisuma stāvokli HOPS pacientu plaušās.

Lai novērtētu iekaisuma intensitāti, mēs aprēķinājām iekaisumu veicinošā mediatora – LtB_4 – un iekaisumu samazinošā mediatora – LXA_4 – attiecību. Lai gan, kā iepriekš minēts, krēpu materiālā HOPS pacientiem LtB_4 koncentrācija bija nebūtiski palielināta salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem, tomēr, izsakot iekaisuma intensitāti raksturojošo proporciju, ieguvām būtiskas atšķirības - LtB_4/LXA_4 bija trīs reizes augstāka HOPS pacientu grupā salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem. Līdzīga situācija bija novērojama, salīdzinot hronisku un akūtu iekaisumu, pneimonijas gadījumā šī attiecība bija ievērojami samazināta salīdzinājumā ar HOPS grupu, bet tikai mazliet

lielāka salīdzinājumā ar kontroles grupu. Pēdējo sakarību varētu skaidrot ar pētījumā iesaistīto pneimonijas pacientu slimības stadiju, norādot uz atveseļošanos, kad eikosanoīdu līmenis plaušās pietuvojies veselu cilvēku līmenim.

Ieguvām negatīvu saistību starp LXA₄ krēpās un krēpu neitrofilo leukocītu skaitu absolūtajos un relatīvajos skaitļos, kā arī eozinofilo leukocītu absolūto skaitu. Dažādi dati ir pieejami literatūrā. *Vachier* ar līdzautoriem (*Vachier et al.*, 2005) jau iepriekš minētajā pētījumā neieguva korelācijas starp LXA₄ daudzumu krēpu supernatantā un krēpu neitrofilo leukocītu vai eozinofilo leukocītu skaitu. Citā pētījumā *Kostikas* ar līdzautoriem (*Kostikas et al.*, 2005) novēroja pozitīvu saistību starp iekaisuma mediatora LtB₄ koncentrāciju krēpu supernatantā un neitrofilo leukocītu skaitu krēpās. Savukārt mēs šādu korelāciju neieguvām. Tomēr, ņemot vērā visas minētās saistības, tās norāda uz neitrofilā iekaisuma dominanci HOPS gadījumā. Papildus apstiprinājumu neitrofilā iekaisuma prevalencei parāda mūsu iegūtās pozitīvās korelācijas starp attiecību LtB₄/LXA₄ un absolūto un relatīvo neitrofilo leukocītu skaitu inducētajās krēpās. Bet korelācija starp LXA₄ un eozinofilo leukocītu skaitu mūsu pētījumā norāda arī uz pēdējo šūnu ietekmi slimības patoģenēzē.

Literatūras avotos plaši aprakstīts neitrofilais iekaisums HOPS patoģenēzē, bet maz ir runāts par eozinofilo leukocītu ietekmi HOPS attīstībā, turklāt bieži aprakstītajos pētījumos pacientiem krēpās eozinofīlie leukocīti vispār nav saskaitīti (*O'Donnell et al.*, 2006). Mūsu HOPS pacientu krēpās bija atrodami arī eozinofīlie leukocīti, turklāt šo šūnu relatīvais skaits negatīvi korelēja ar LXA₄ līmeni krēpās, norādot, ka LXA₄ ierobežo ne tikai neitrofilo leukocītu, bet arī eozinofilo leukocītu akumulāciju un aktivāciju HOPS pacientu plaušās. Šī sakarība varētu iezīmēt jaunu HOPS fenotipu, ko raksturo eozinofīls iekaisums.

6.3. Lipoksīna A₄ receptora ekspresija krēpu šūnās

Pētījuma dati parādīja, ka LXA₄ receptors (ALXR) tiek ekspresēts gan polimorfonukleārās, gan mononukleārās krēpu šūnās. Palielinātu ALXR ekspresiju novērojām HOPS pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu. Arī pneimonijas pacientiem receptora ekspresija bija paaugstināta, tomēr tā nerasniedza ticamības sliekšni. Pneimonijas gadījumā augstāka absolūtā ALXR ekspresija novērojama mononukleārajās šūnās, savukārt HOPS gadījumā – polimorfonukleārajās krēpu

šūnās. Tomēr jāmin, ka ALXR ekspresija krēpu šūnās visās grupās bija ļoti zema, relatīvos skaitļos sasniedzot tikai 1% no kopējā konkrētā inducēto krēpu šūnu skaita. Zemā ekspresija varētu būt saistīta ar ALXR ekspresijas identificēšanā izmantotās metodikas nepilnībām, jo tās noteikšanā izmantojama intracelulāra anti-ALXR (abcam, Lielbritānija), kura netiek iekšā šūnā un līdz ar to nevar novērot ALXR ekspresiju.

ALXR ir ar G proteīnu saistītais receptors (GPCR), kam piemīt iekaisuma atrisināšanas modulējošas īpašības. GPCR kontrolē iekaisuma reakcijas pret to izraisošo aģentu, veicinot atbildes reakciju un ierobežojot tās intensitāti un ilgumu. Pirmais ALXR identificētais ligands bija LXA₄ (Fiore *et al.*, 1994; Rabiet *et al.*, 2007). LXA₄ aktivē ALXR, mijiedarbojoties ar receptora 3. intracelulāro cilpu un ar to saistīto transmembrānu reģionu (Bena *et al.*, 2012). Lai saprastu receptora lomu iekaisuma atrisināšanās stadijā, svarīgi zināt mehānismus, kas regulē ALXR ekspresiju, kā arī tā mijiedarbību ar iekaisumu samazinošo mediatoru LXA₄. Pēc ALXR saistīšanās ar specifiskajiem ligandiem receptorā notiek strukturālas pārmaiņas, kas ļauj funkcionāli mijiedarboties ar G proteīna apakšvienībām G α_{i1} , G α_{i2} un G α_{i3} un saistīties ar G_O, G_Z un G α_{16} . Šajā procesā tiek aktivēti daudzi signālceļi, ieskaitot intracelulārā Ca²⁺ plūsmu, fosfolipāzes A₂, C un D, kā arī PI3K un MAPK aktivāciju. Receptora aktivēšana arī izraisa ātru fosforilēšanos, izraisot fosfolipāzes C mediētu receptora desentizāciju un internalizāciju. ALXR samazina MAPK ceļa aktivācijas, galvenokārt ERK_{1/2}, regulētu šūnu hemokinēzi. Ca²⁺ plūsma un ERK fosforilācija mijiedarbojas ar receptora 1. un 2. ekstracelulāro cilpu, bet N gals un 3. ekstracelulārā cilpas domēni ir pieļaujami Ca²⁺ reakcijām (Bena *et al.*, 2012).

ALXR ir galvenā loma iekaisuma reakcijas ilguma un intensitātes regulēšanā, modulējot leukocītu adhēziju un hemotaksi, tādējādi nodrošinot endogēnu iekaisuma „stop” signālu veidošanos (Serhan *et al.*, 2000). ALXR aktivēšana ir šūnu un agonistu specifiska, aktivējot dažādus sekundāros mediatorus un nomācot signālceļus. ALXR fosforilācijai un signalizācijai nepieciešami serīna un tirozīna atlikumi. LXA₄ analogi samazina intestinālā epitēlija iekaisumu veicinošo gēnu ekspresiju, inhibējot NF- κ B ceļu (Chiang *et al.*, 2003). ALXR galvenokārt ekspresējas uz fagocītšūnām. Bazālā stāvoklī ALXR sadalījums uz šūnas membrānas ir difūzs. LXA₄ klātienē receptors pārvietojas no plazmas membrānas uz intracelulāro telpu – citoplazmā. Internalizācija ir svarīga šūnas signalizācijas, receptora atgriezenības regulēšanā un tā izraisītās reakcijas intensitātē un ilgumā. Apoptisko šūnu fagocitozei, ko veic makrofāgi,

nepieciešama receptora internalizācija. Tāpat būtiska loma ALXR funkcionēšanā ir proteīna kināzei C (MADERNA *et al.*, 2010).

ALXR stimulācija, receptoram saistoties ar LXA₄, antagonizē trombocītu atvasinātā augšanas faktora receptora β (PDGFRβ) aktivētā receptora tirozīna fosforilāciju, rekrutējot proteīnu tirozīna fosfatāzes SHP-2 (SH2 domēnu saturoša tirozīna fosfatāze 2), kas piedalās defosforilācijas procesos, galvenokārt PI-3 kināzi saistītājvietās (MITCHELL *et al.*, 2007).

Pētot literatūras avotus, mums neizdevās atrast ziņojumus par ALXR ekspresiju HOPS pacientu elpceļos un plaušās. Planaguma ar līdzstrādniekiem (Planaguma *et al.*, 2008) receptora ekspresiju ir pētījusi astmas pacientiem. Autori ALXR ekspresiju noteica uz perifēro asiņu leukocītiem, izmantojot plūsmas citometriju, un novēroja samazinātu receptora ekspresiju astmas pacientiem uz neitrofilajiem un eozinofilajiem leukocītiem salīdzinājumā ar kontroles grupu. ALXR RNS noteikšana asinīs apstiprināja samazinātu ekspresiju astmas pacientiem. Līdz ar to šie dati ir pretēji mūsu iegūtajiem, kad slimības laikā ir paaugstināta receptora ekspresija salīdzinājumā ar kontroli.

Bonnans ar līdzstrādniekiem (Bonnans *et al.*, 2006) pētīja ALXR ekspresiju kultivētās bronhiālajās epitēlijšūnās sālsskābes ievainojuma modelī. Autori novēroja ALXR ekspresiju epitēliālajās šūnās, ko daļēji mediēja prostaglandīns E₂.

Pētījumā par cīpslas ievainojumu parādīta ALXR palielināta ekspresija tenocītos subakūta ievainojuma stāvoklī, ko, iespējams, mediē iekaisuma veicinošo mediatoru veidošanās tenocītos vai infiltrētajos makrofāgos, mazāku receptora ekspresijas līmeni hroniskā stāvoklī, bet normas apstākļos ALXR ekspresija nemaz netika novērota (Dakin *et al.*, 2012). ALXR transkripciju cilvēka enterocītos palielina IL-13, IL-4, IL-6 un IL-1β (Gronert *et al.*, 1998). Veselu cīpslu eksplantu stimulācija ar IL-1β vai PGE₂ inducēja maksimālu LXA₄ atbrīvošanu pēc 24 un 72 stundām salīdzinājumā ar nestimulētu kontroli. Tas varētu būt attiecināms uz atšķirīgu receptora iesaistīšanu un tam sekojošu samazinošu signalizāciju starp IL-1β un PGE₂, vai arahidonskābes atvasināto eikosanoīdu grupu pārslēgšanās no leukotriēnu un prostaglandīnu uz LXA₄ sintēzi. Arī makrofāgi sintezē iepriekš minētos iekaisumu veicinošos mediatorus, un tādējādi šīs šūnas ir iesaistītas ALXR palielinātā ekspresijā cīpslas ievainojuma agrīnā stadijā. ALXR darbojas kā endogēns aizsargājošs aģents, ierobežojot bojājuma

pakāpi; bet ALXR ekspresijas samazināšanās cīpslas ievainojuma vēlinā subakūtā stadijā norāda, ka ALXR ekspresijas ilgums un intensitāte nav pietiekama, lai nodrošinātu pilnīgu iekaisuma atrisināšanos un var izsaukt hroniska iekaisuma attīstīšanos un fibrotisku atjaunošanos (Dakin *et al.*, 2010).

Līdzīgi mūsu dati akūta iekaisuma – pneimonijas – gadījumā augstāku ALXR ekspresiju parādīja mononukleārajās šūnās, arī makrofāgos.

Pētījumā ar transgēnām pelēm (Devchand *et al.*, 2003), kurām ievadīts cilvēka ALXR (hALXR), sepses modeļa gadījumā, kas tika inducēts ar zimožānu A peritoneālajā dobumā, hALXR pelēm novēroja samazinātu leikocītu infiltrācijas absolūto līmeni. No peritoneālā dobuma iegūtā supernatantā netransgēnām pelēm novēroja paaugstinātu NF- κ B, transkripcijas faktoru, kam ir galvenā nozīme iekaisuma un iedzimtās imunitātes iniciēšanā un iekaisumu veicinošo mediatoru sintēzē, aktivitāti; savukārt transgēnās pelēs tā darbība bija nomākta. Tā kā ALXR ir ligandu atkarīgs receptors, pētnieki supernatantā noteica arī receptora ligandus. Netransgēnām pelēm supernatantā LXA₄ līmenis bija zem detekcijas robežas, bet transgēnām pelēm supernatantā nevarēja noteikt LtB₄ koncentrāciju pēc vienāda laika intervāla. Papildus transgēno peļu supernatantā tika noteikts 15S-HETE un 5S,15S-diHETE, turpretim netransgēno peļu supernatantā dominēja 12S-HETE. Iegūtie rezultāti norādīja, ka 1) hALXR ietekmē *in situ* endogēnā eksudāta LXA₄ līmenis; 2) cilvēka transgēnā receptora klātie izmaina eksudāta lipīdu mediatoru profilu (Devchand *et al.*, 2003).

Arī mūsu dati parādīja, ka akūta iekaisuma gadījumā, ko reprezentēja pneimonijas pacientu grupa, pie palielināta PMN skaita krēpās, ALXR ekspresija šajās šūnās ir zema, turklāt novērojams arī zems iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ līmenis, norādot uz klasisku akūtu iekaisuma procesu plaušās. Savukārt HOPS gadījumā pie augsta PMN skaita krēpās ir palielināta ALXR ekspresija, bet LXA₄ līmenis ir zems. Mūsu dati parādīja strauju ALXR ekspresijas pieaugumu tieši terapijas laikā HOPS pacientiem. Iespējams, paaugstinātā receptora ekspresija darbojas kā kompensējošs mehānisms pie zema iekaisumu samazinošā mediatora LXA₄ līmeņa, cenšoties ierobežot iekaisumu. Tomēr zināms, ka ALXR saistās arī ar citiem ligandiem, no kuriem vairumam piemīt iekaisumu veicinošas īpašības, tādi kā seruma amiloīds A vai MHC saistošais proteīns (Romano *et al.*, 2007; Kebir *et al.*, 2008). Līdz ar to paaugstinātā receptora ekspresija un zemā LXA₄ kopā veicina tieši iekaisumu

uzturošo receptora ligandu saistīšanu, stimulējot PMN hemotaksi iekaisuma apvidū, tādējādi neļaujot iekaisumam atrisināties.

Literatūrā pieejama informācija, ka palielinātu ALXR ekspresiju var veicināt glikokortikosteroīdu terapija (Hashimoto *et al.*, 2007), tomēr mūsu pētījumā nenovērojām šādu saistību.

6.4. Lipoksīna A₄ receptora ekspresija plaušu audos

Salīdzinājumā ar krēpu šūnām, ALXR ekspresija plaušu audu šūnās ir ievērojami lielāka, norādot uz receptora lokalizāciju kompaktā šūnu organizācijā, nevis atsevišķās šūnās.

Palielinātā ALXR ekspresija asimptomātisku smēķētāju plaušu audos salīdzinājumā ar HOPS pacientiem varētu būt skaidrojama kā lokāla aizsargreakcija pret cigarešu dūmu izraisītajiem efektiem plaušās un elpceļos, cenšoties nepieļaut to kaitīgo iedarbību; savukārt HOPS pacientiem šāds aizsardzības mehānisms varētu būt nomākts, neļaujot ALXR ekspresēties. ALXR saistoties ar LXA₄, bloķē neitrofilo leukocītu aktivāciju un rekrutāciju, ierobežot iekaisuma tālāku izplatīšanos un sekmējot tā atrisināšanos (Bozinovski *et al.*, 2012).

7. SECINĀJUMI

1. Nosakot LtB₄ un LXA₄ daudzumu izelpas gaisa kondensātā ar ELISA metodi, konstatējām, ka iegūtās koncentrācijas ir uz metodes detekcijas sliekšņa, ar augstu variācijas koeficientu. Līdz ar to šī metode nav pielietojama eikosanoīdu metabolisma raksturošanai plaušās, kā arī neļauj novērtēt savienojumu atšķirības izelpas gaisa kondensāta alveolārajā un bronhiālajā frakcijā.
2. HOPS pacientiem paasinājuma stadijā un pneimonijas pacientiem ir palielināts neitrofilo un eozinofilo leukocītu skaits krēpās.
3. Slimības saasinājuma atrisināšanās fāzē HOPS atšķirībā no pneimonijas pacientiem saglabājas pro-inflamatora vide inducētajās krēpās, ko apstiprina paaugstināta LtB₄/LXA₄ proporcija.
4. HOPS pacientiem bez paasinājuma LXA₄ receptora ekspresija plaušu audos ir nomākta, kas ir viens no iekaisuma persistenci uzturošiem faktoriem. Savukārt asimptomātiskiem smēķētājiem ir palielināta LXA₄ receptora ekspresija plaušās, kas varētu darboties kā plaušu audu aizsargmehānisms pret cigarešu dūmu komponentēm.

8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. What we know and what we don't know (but should). *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007; 42007; 4: 522-525

Alam S, Li Z, Janciauskiene S, Mahadeva R. Oxidation of Z α 1-antitrypsin by cigarette smoke induces polymerization. A novel mechanism of early-onset emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2011; 45: 261-269

Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Lofdahl CG, Erjefalt JS. Alterations in lung mast cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 181: 206-217

Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxin A₄ and B₄ analogs block extracellular signal-regulated kinase dependent TNF- α secretion from human T cells. *The Journal of Immunology* 2003; 170:6266-6272

Ayo DS, Aughenbaugh GL, Yi ES, Hand JL, Ryu JH. Cystic lung disease in Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Chest* 2007; 132: 679-684

Badr KF, DeBoer DK, Schwartzberg M, Serhan CN. Lipoxin A₄ antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D₄ in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86(9): 3438-3442

Baker N, O'Meara SJ, Scannell M, Maderna P, Godson C. Lipoxin A₄: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3819-3826

Bakke PS, Baste V, Hanao R, Gulsvik A. Prevalence of obstructive lung disease in a general population: relation to occupational title and exposure to some airborne agents. *Thorax* 1991; 46: 863-870

Bandeira-Melo C, Bozza PT, Diaz BT, Cordeiro RSB, Jose PJ, Marins MA, Serhan CN. Cutting edge: lipoxin (LX) A₄ and aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ block

allergen-induced eosinophil trafficking. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 2267-2271

Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1801: 1260-1273

Barnes PJ. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implication. *Chest* 2006; 129: 151-155

Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal* 2009; 33: 1165-1185

Bathoorn E, Liesker JJW, Postma DS, Koëter GH, van der Toorn M, van der Heide S, Ross HA, van Oosterhout AJM, Kerstjens HAM. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *International Journal of COPD* 2009; 4: 101-109

Bena S, Brancaleone V, Wang JM, Perretti M, Flower RJ. Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor. Identification of distinct domains and downstream associated signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(29): 24690-24697

Bense L, Eklund G, Lewander R. Hereditary pulmonary emphysema. *Chest* 2002; 121: 297-300

Bhavsar PK, Levy BD, Hew MJ, Pfeffer MA, Kazani S, Israel E, Chung KF. Corticosteroid suppression of lipoxin A₄ and leukotriene B₄ from alveolar macrophages in severe asthma. *Respiratory Research* 2010; 11: 71

Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294-298

Bigby TD, Lee DM, Meslier N, Gruenert DC. Leukotriene A₄ hydrolase activity of human airway epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 164: 1-7

Bischoff EWMA, Schermer TRJ, Bor H, Brown P, van Weel C, van den Bosch WJHM. Trends in COPD prevalence and exacerbation rates in Dutch primary care. *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners* 2009; 59(569): 927-933

Biteman B, Hassan IR, Walker E, Leedom AJ, Dunn M, Seta F, Laniado-Schwartzman M, Gronert K. Interdependence of lipoxin A₄ and heme-oxygenase counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB Journal* 2007; 21(9): 2257-2266

Bonnans C, Vachier I, Chavis C, Godart P, Bousquet J, Chanez P. Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 165: 1531-1535

Bonnans C, Fukunaga K, Levy MA, Levy BD. Lipoxin A₄ regulates bronchial epithelial cell responses to acid injury. *American Journal of Pathology* 2006; 168: 1064-1072

Borgeat P, Krump E, Palmantier R, et al. The synthesis of leukotrienes by the human neutrophil. In: Holgate S, Dahlen S-E, eds. SRS-A to Leukotrienes. Oxford, Blackwell. 1997; pp. 69-84

Börgeson E, Lönn J, Bergström I, Brodin VP, Ramström S, Nayeri F, Särndahl E, Bengtsson T. Lipoxin A₄ inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced aggregation and reactive oxygen species production by modulating neutrophil-platelet interaction and CD11b expression. *Infection and Immunity* 2011; 79: 1489-1497

Börgeson E, McGillicuddy FC, Harford KA, Corrigan N, Higgins DF, Maderna P, Roche HM, Godson C. Lipoxin A₄ attenuates adipose inflammation. *The FASEB Journal* 2012; doi:10.1096/fj.12-208249

Borrill ZL, Starkey RC, Singh SD. Variability of exhaled breath condensate leukotriene B₄ and 8-isoprostane in COPD patients. *International Journal of COPD* 2007; 2(1): 71-76

Bozinovski S, Uddin M, Vlahos R, Thompson M, McQualter JL, Merritt A-S, Wark PAB, Hutchinson A, Irving LB, Levy BD, Anderson GP. Serum amyloid A opposes lipoxin A₄ to mediate glucocorticoid refractory lung inflammation in chronic

obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2012; 109: 935-940

Brom J, Schönfeld W, König W. Metabolism of leukotriene B₄ by activated human polymorphonuclear granulocytes. *Immunology* 1988; 64(3): 509-518

Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma CA, Timens W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *European Respiratory Journal* 2009; 34: 219-230

Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1015-1026

Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks KB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E. International variation of COPD (the BOLD study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741-750

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in and old tale. *Biochimie* 2009; 91: 791-795

Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, Colgan SP. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2002; 99: 3902-3907

Carlson CL, Cushman M, Enright PL, Cauley JA, Newman AB. Hormone replacement therapy is associated with higher FEV₁ in elderly women. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001; 163(2): 423-428

Cazolla M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiratory Medicine* 2007; 101: 1049-1065

Chavis C, Vachier I, Godart P, Bousquet J, Chanez P. Lipoxins and other arachidonate derived mediators in bronchial asthma. *Thorax* 2000; 55(suppl 2): S38-S41

Chiang N, Takano T, Arita M, Watanabe S, Serhan CN. A novel rat lipoxins A₄ receptor that is conserved in structure and function. *British Journal of Pharmacology* 2003; 139: 89-98

Chiang N, Arita M, Serhan CN. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 163-177

Chiang N, Serhan CN, Dahlen S-E, Drazen JM, Hay DWP, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T, Brink C. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 463-487

Chilosi M, Poletti V, Rossi A. The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil? *Respiratory Research* 2012; 13: 3

Christie PE, Spur BW, Lee TH. The effects of lipoxin A₄ on airway responses in asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1992; 145: 1281-1284

Clish CB, Levy BD, Chiang N, Tai H-H, Serhan CN. Oxidoreductases in lipoxin A₄ metabolic inactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 25372-25380

Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, Delp-Archer C, Madara JL. Lipoxin A₄ modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 75-82

Corhay J-L, Henket M, Nguyen D, Duysinx B, Sele J, Louis R. Leukotriene B₄ contributes to exhaled breath condensate and sputum neutrophil chemotaxis in COPD. *Chest* 2009; 136: 1047-1054

Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360: 2445-2454

Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B₄. *European Respiratory Journal* 2000; 15: 274-280

Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007; 4: 512-521

daCosta DiBonaventura M, Paulose-Ram R, Su J, McDonald M, Zou KH, Wagner J-S, Shah H. The burden of chronic obstructive pulmonary disease among employed adults. *International Journal of COPD* 2012; 7: 211-219

Daheshia M. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2005; 5: 339-351

Dakin SG, Werling D, Hibbert A, Abayasekara DRE, Young NJ, Smith RKW, Dudhia J. Macrophage sub-populations and the lipoxin A₄ receptor implicate active inflammation during equine tendon repair. *PLoS One* 2012; 7: e32333

Decker Y, McBean G, Godson C. Lipoxin A₄ inhibits IL-1 β -induced IL-8 and ICAM-1 expression in 1321N1 human astrocytoma cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2009; 296: C1420-C1427

Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 112-124

Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 175: 998-1005

de Paulis A, Montuori N, Prevede N, Fiorentino I, Rossi FW, Visconte V, Rossi G, Marone G, Ragno P. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2. *The Journal of Immunology* 2004; 173(9): 5739-5748

Devchand PR, Arita M, Hong S, Bannenberg G, Moussignac R-L, Gronert K, Serhan CN. Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice: roles of inflammation and host defense. *FASEB Journal* 2003; 17: 652-659

Di Gennaro A, Kenne E, Wan M, Soehnlein O, Lindbom L, Haeggström JZ. Leukotriene B₄-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *The FASEB Journal* 2009; 23: 1750-1757

Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Bruno B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clinical & Experimental Immunology* 2009; 157: 316-324

Dominguez R, Weisgrau RA, Santamaria M. Pulmonary hyperinflation and emphysema in infants with Marfan syndrome. *Pediatric Radiology* 1987; 17: 365-369

Dowton SB, Pincott S, Demmer L. Respiratory complications of Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Clinical Genetics*. 1996; 50: 510-514

Eagan TML, Ueland T, Wagner PD, Hardie JA, Mollnes TE, Damås JK, Aukrust P, Bakke PS. Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *European Respiratory Journal* 2010; 35: 540-548

Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR. An official American Thoracic society public policy statement: novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 182: 693-718

Fabricius P, Løkke A, Marott JL, Vestbo J, Lange P. Prevalence of COPD in Copenhagen. *Respiratory Medicine* 2011; 105: 410-417

Fels AOS, Pawlowski NA, Cramer EB, King TCK, Cohn ZA, Scott WA. Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 1982; 79: 7866-7870

Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, Serhan CN. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 2688-2694

Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M, Serhan CN. Anti-inflammatory actions of lipoxin A₄ stable analogs are demonstrable in human whole blood:

modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood* 1999; 94: 4132-4142

Fiore S, Ryeom SW, Weller PF, Serhan CN. Lipoxin recognition sites. Specific binding of labeled lipoxin A₄ with human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 16168-16176

Fiore S, Romano M, Reardon EM, Serhan CN. Induction of functional lipoxin A₄ receptors in HL-60 cells. *Blood* 1993; 81: 3395-3403

Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A₄ receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 1994; 180: 253-260

Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189: 2001-2009

Fritscher LG, Rodrigues MT, Sporn H, Balter M, Post M, Zamel N, Chapman KR. Profile of eicosanoids in breath condensate in asthma and COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; 179: A5713

Garvey C, Ortiz G. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The Open Nursing Journal* 2012; 6: 13-19

Gewirtz AT, Fokin VV, Petasis NA, Serhan CN, Madara JL. LXA₄, aspirin-triggered 15-epi-LXA₄, and their analogs selectively downregulate PMN azurophilic degranulation. *American Journal of Physiology* 1999; 276: C988-C994

Gewirtz AT, McCormick B, Neish AS, Petasis NA, Gronert K, Serhan CN, Madara JL. Pathogen-induced chemokine secretion from model intestinal epithelium is inhibited by lipoxin A₄ analogs. *The Journal of Clinical Investigation* 1998; 101(9): 1860-1869

Ghobain MA. The prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Saudi Arabia: where do we stand. *Annals of Thoracic Medicine* 2011; 6(4): 185-186

Ghobain MA, Al-Hajjaj MS, Wali SO. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease among smokers attending primary healthcare clinics in Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine* 2011; 31(2): 129-133

Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 1663-1667

Goh J, Baird AW, O'Keane C, Watson RW, Cottell D, Bernasconi G, Petasis NA, Godson C, Brady HR, MacMathuna P. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ antagonize TNF- α stimulated neutrophil-enterocyte interactions in vitro and attenuate TNF- α -induced chemokine release and colonocyte apoptosis in human intestinal mucosa ex-vivo. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 2772-2780

Grob NM, Aytakin M, Dweik RA. Biomarkers in exhaled breath condensate: a review of collection, processing and analysis. *Journal of Breath Research* 2008; 2(3): 037004. doi:10.1088/1752-7155/2/3/037004

Gronert K, Gewirtz A, Madara JL, Serhan CN. Identification of a human enterocyte lipoxin A₄ receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 187: 1285-1294

Grumbach Y, Quynh NV, Chiron R, Urbach V. LXA₄ stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells. *American Journal of Physiology* 2009; 296: L101-L108

Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA, Serhan CN. Lipoxin (LX)A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 1923-1930

Haeggström JZ, Wetterholm A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59: 742-753

Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systemic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2006; 28: 523-532

Hankin JA, Murphy RC. The metabolism of leukotriene B₄ in Lewis lung carcinoma porcine kidney cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161: S81-S87

Hashimoto A, Murakami Y, Kitasato H, Hayashi I, Endo H. Glucocorticoids co-interact with lipoxin A₄ via lipoxin A₄ receptor (ALX) up-regulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007; 61: 81-85

Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *European Respiratory Journal* 2007; 30: 980-992

Hersh CP, Dahl M, Ly NP, Berkey CS, Nordestgaard BG, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 843-849

Hill AT, Bayley DL, Campbell EJ, Hill SL, Stockley RA. Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and α 1-antitrypsin deficiency. *European Respiratory Journal* 2000; 15: 886-890

Hoffmeyer F, Harth V, Bunger J, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. Leukotriene B₄, 8-iso-prostaglandin F_{2 α} and pH in exhaled breath condensate from asymptomatic smokers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009; 60(5): 57-60

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350: 2645-2653

Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *European Respiratory Journal* 2005; 26: 523-548

Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J. Leukotriene B₄ strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004; 24: 1783-1788

Hunt J. Exhaled breath condensate - an overview. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2007; 27(4): 587-v. doi: 10.1016/j.iac.2007.09.001

Iizuka Y, Yokomizo T, Terawaki K, Komine M, Tamaki K, Shimizu T. Characterization of a mouse second leukotriene B₄ receptor, mBLT2: BLT2-dependent ERK activation and cell migration of primary mouse keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24816-24823

Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2002; 99: 13266-13271

Kantarci A, Van Dyke TE. Lipoxins in chronic inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003; 14(1): 4-12

Kaplan A, Cosentino L. Alpha1-antitrypsin deficiency: forgotten etiology. *Canadian Family Physician* 2010; 56(1): 19-24

Kardos P, Keenan J. Tackling COPD: a multicomponent disease driven by inflammation. *Medscape General Medicine* 2006; 8(3): 54

Karp CL, Flick LM, Yang R, Uddin J, Petasis NA. Cystic fibrosis and lipoxins. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 263-270

Kebir DE, József L, Filep JG. Opposing regulation of neutrophil apoptosis through the formyl peptide receptor-like 1/lipoxin A₄ receptor: implications for resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 2008; 84: 600-606

Ko FWS, Leung T-F, Wong GWK, Ngai J, To KW, Ng S, Hui DSC. Measurement of tumor necrosis factor- α , leukotriene B₄, and interleukin 8 in the exhaled breath condensate in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD* 2009; 4: 79-86

Kostikas K, Gaga M, Papatheodorou G, Karamanis T, Orphanidou D, Luokides S. Leukotriene B₄ in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest* 2005; 127: 1553-1559

Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research* 2006; 45: 334-356

Leslie CC. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochemistry and Cell Biology* 2004; 82: 1-17

Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR, Kim E, Ackerman K, Schmidt BA, Szczeklik W, Drazen JM, Serhan CN. Multi-pronged inhibition of airway hyperresponsiveness and inflammation by lipoxin A₄. *Nature Medicine* 2002; 8: 1018-1023

Liang Y, Yeligar SM, Brown LAS. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *The Scientific World Journal* 2012; doi:10.1100/2012/217518

Liepa I. Biometrija. 1974, Rīga, Zvaigzne, 339

Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935-939

Louis NA, Hamilton KE, Colgan SP. Lipid mediator networks and leukocyte transmigration. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 197-202

Luisetti M, Seersholm N. A1-antitrypsin deficiency. 1:epidemiology of α1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004; 59(2): 164-169

Lundeen KA, Sun B, Karlsson L, Fourie AM. Leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 3439-3447

Luo M, Jones SM, Peters-Golden M, Brock TG. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B₄ synthetic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(21): 12165-12170

Machado FS, Aliberti J. Lipoxins as an immune-escape mechanism. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-*

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005; 2: 258-266

Maddox JF, Serhan CN. Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *The Journal of Experimental Medicine* 1996; 183: 137-146

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A₄ stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A₄ receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 6972-6978

Maderna P, Cottell DC, Berlasconi G, Petasis NA, Brady HR, Godson C. Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophages but not in neutrophils: differential involvement of rho GTPases. *American Journal of Pathology* 2002; 160: 2275-2283

Maderna P, Godson C. Lipoxins: resolutionary road. *British Journal of Pharmacology* 2009; 158: 947-959

Maderna P, Cottell DC, Toivonen T, Dufton N, Dalli J, Perretti M, Godson C. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A₄ and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB Journal* 2010; 24: 4240-4249

Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765-773

Martin TR, Altman LC, Albert RK, Henderson WR. Leukotriene B₄ production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 129: 106-111

McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 2004; 286: F189-201

McManus TE, Marley A-M, Baxter N, Christie SN, O'Neill HJ, Elborn JS, Coyle PV, Kidney JC. Respiratory viral infection in exacerbation of COPD. *Respiratory Medicine* 2008; 102: 1575-1580

Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366: 1875-1881

Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, Macintyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. General considerations for lung function testing. *European Respiratory Journal* 2005; 26: 153-161

Miller M, Cho JY, Pham A, Friedman PJ, Ramsdell J, Broide DH. Persistent airway inflammation and emphysema progression on CT scan in ex-smokers observed for 4 years. *Chest* 2011; 139(6): 1380-1387

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361: 888-898

Mitchell D, O'Meara SJ, Gaffney A, Crean JKG, Kinsella BT, Godson C. The lipoxin A₄ receptor is coupled to SHP-2 activation. Implications for regulation of receptor tykinase kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 15606-15618

Miyahara N, Takeda K, Miyahara S, Matsubara S, Koya T, Joetham A, Krishnan E, Dakhama A, Haribabu B, Gelfand EW. Requirement for leukotriene B₄ receptor 1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 172: 161-167

Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Lise M, Marincola FM. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes and Immunity* 2004; 5: 621-630

Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, Saad M, Yu J. Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of Inflammation Research* 2009; 2: 1-11

Monteiro AP, Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, Barja-Fidalgo C, Benjamin CF, Peters-Golden M, Bandeira-Melo C,

Bozza MT, Canetti C. Leukotriene B₄ mediates neutrophil migration induced by heme. *The Journal of Immunology* 2011; 186: 6562-6567

Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58: 585-588

Mroz RM, Noparlik J, Chyczewska E, Braszko JJ, Holownia A. Molecular basis of chronic inflammation in lung diseases: new therapeutic approach. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 58(suppl 5): 453-460

Nilsson NE, Tryselius Y, Owman C. Genomic organization of the leukotriene B₄ receptor locus of human chromosome 14. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 274: 383-388

O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61: 448-454

Ogawa Y, Calhoun W. The role of leukotrienes in airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 118: 789-798

Ohar J, Fromer L, Donohue JF. Reconsidering sex-based stereotypes of COPD. *Primary Care Respiratory Journal* 2011; 20(4): 370-378

Ohnishi H, Miyahara N, Dakhama A, Takeda K, Mathis S, Haribabu B, Gelfand EW. Corticosteroids enhance CD8⁺ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and allergic inflammation by upregulating leukotriene B₄ receptor 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 121: 864-871

Ohnishi H, Miyahara N, Gelfand EW. The role of leukotriene B₄ in allergic diseases. *Allergology International* 2008; 57: 291-298

Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukonović R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. *European Respiratory Journal* 2002; 20: 3s-8s

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune response. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 589-594

Peters-Golden M, Henderson Jr. WR. Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine* 2007; 357: 1841-1854

Pettipher ER, Salter ED, Breslow R, Raycroft L, Showell HJ. Specific inhibition of leukotriene B₄ (LtB₄)-induced neutrophil emigration by 20-hydroxy LtB₄: implications for the regulation of inflammatory responses. *British Journal of Pharmacology* 1993; 110(1): 423-427

Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29

Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, Dew R, Kenney L, Celli BR. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131: 37-43

Pizzichini MMM, Leigh R, Djukanović R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *European Respiratory Journal* 2002; 20: 9s-18s

Planaguma A, Kazani S, Marigowda G, Haworth O, Mariani TJ, Israel E, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Gaston B, Jarjour NN, Busse WW, Wenzel SE, Levy BD. Airway lipoxin A₄ generation and lipoxin A₄ receptor expression are decreased in severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; 178: 574-582

Planaguma A, Titos E, López-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, Clària J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A₄ (LXA₄) and ASA-triggered 15-epi-LXA₄. *The FASEB Journal* 2002; 16(14): 1937-1939

Plataki M, Tzortzaki E, Ryttila P, Demosthenes M, Kontopoulus A, Siafakas NM. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2006; 1(2): 161-171

Polverino F, Baraldo S, Bazzan E, Agostini S, Turato G, Lunardi F, Balestro E, Damin M, Papi A, Maestrelli P, Calabrese F, Sietta M. A novel insight into adaptive immunity in chronic obstructive pulmonary disease: B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 182: 1011-1019

Profita M, Di Giorgi R, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. Muscarinic receptors, leukotriene B₄ production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* 2005; 60: 1361-1369

Provinciali M, Cardelli M, Marchegiani F. Inflammation, chronic obstructive pulmonary disease and aging. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2011; 17(suppl 1): S3-S10

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176: 532-555

Rabiet M-J, Huet E, Bouley F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* 2007; 89: 1089-1106

Rennard SI. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonologia i Alergologia Polska* 2011; 79, 2: 132-138

Riccioni G, Zanasi A, Vitulano N, Mancini B, D'Orazio N. Leukotrienes in atherosclerosis: new target insights and future therapy perspectives. *Mediators of Inflammation* 2009; doi:10.1155/2009/737282

Rodgers K, McMahon B, Mitchell D, Sadlier D, Godson C. Lipoxin A₄ modifies platelet-derived growth factor-induced pro-fibrotic gene expression in human renal mesangial cells. *American Journal of Pathology* 2005; 167: 683-694

Rodriguez-Reventa L, Iranzo P, Badenas C, Puig S, Carrio A, Mila M. A novel elastin gene mutation resulting in an autosomal dominant form of cutis laxa. *Archives of Dermatology* 2004; 140: 1135-1139

Romano M, Recchia I, Recchiuti A. Lipoxin receptors. *The Scientific World Journal* 2007; 7: 1393-1412

Roth M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2008; 12(4): 375-380

Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10: 166-172

Schirnhofner L, Lamprecht B, Vollmer WM, Allison MJ, Studnicka M, Jensen RL, Buist AS. COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* 2007; 131: 29-36

Schwab JM, Serhan CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* 2006; 6: 414-420

Seggev JS, Thornton WH, Edes TE. Serum leukotriene B₄ levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest* 1991; 99: 289-291

Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 2005; 106: 1067-1075

Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 1984; 81: 5335-5339

Serhan CN, Takano T, Chiang N, Gronert K, Clish CB. Formation of „antiinflammatory” lipid mediators by transcellular biosynthesis. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins inhibit neutrophil recruitment and vascular permeability. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161: S95-S101

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2002; 68-69: 433-455

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 141-162

Serhan CN. Resolution phases of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology.* 2007; 25: 101-137

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 349-361

Sevenoaks MJ, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation and co-morbidity – a common inflammatory phenotype? *Respiratory Research* 2006; 7: 70

Shindo K, Koide K, Fukumura M. Platelet-activating factor increases leukotriene B₄ release in stimulated alveolar macrophages from asthmatic patients. *European Respiratory Journal* 1998; 11: 1098-1104

Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, Rees J. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 1995; 8: 1398-1420

Silkoff PE, Martin D, Pak J, Westcott JY, Martin RJ. Exhaled nitric oxide correlated with induced sputum findings in COPD. *Chest* 2001; 119: 1049-1055

Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A₄ inhibits IL-1 β -induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 2660-2666

Soriano JB, Ancochea J, Miravittles M, García-Río F, Duran-Tauleria E, Munoz L, Jiménez-Ruiz CA, Masa JF, Viejo JL, Villasante C, Fernández-Fau L, Sánchez G, Sobradillo-Pena V. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007. *European Respiratory Journal* 2010; 36: 758-765

Spite M, Serhan CN. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation. *Circulation Research* 2010; 107: 1170-1184

Starosta V, Ratjen F, Rietschel E, Paul K, Griese M. Anti-inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal* 2006; 28: 581-587

Stenke L, Mansour M, Edenius C, Reizenstein P, Lindgren JA. Formation and proliferative effects of lipoxins in human bone marrow. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 180: 255-261

Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of American Thoracic Society* 2009; 6: 524-526

Stoller JK, Aboussouan LS. A review of α 1-antitrypsin deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012; 185(3): 246-259

Sutherland ER, Martin RJ. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: comparisons with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112(5): 819-827

Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *The Journal of Experimental Medicine* 2007; 204: 245-252

Tamimi A, Serdarevic D, Hanania NA. The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications. *Respiratory Medicine* 2012; 106: 319-328

Tan WC, Ng TP. COPD in Asia. Where East meets West. *Chest* 2008; 133: 517-527

Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 983: 84-100

Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Active cigarette smoking and asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 2003; 33: 1471-1475

Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respiratory Research* 2010; 11:76

Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godart P, Bousquet J, Chanez P. Severe asthma is associated with a loss of LXA₄, an endogenous anti-inflammatory compound. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115: 55-60

van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HAM. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 173: 751-758

Viegi G. Epidemiology of COPD: a European perspective. *European Respiratory Journal* 2003; 22(suppl): 1S-44S

Waked M, Khayat G, Salameh P. Chronic obstructive pulmonary disease prevalence in Lebanon: a cross-sectional descriptive study. *Clinical Epidemiology* 2011; 3: 315-323

Walter RE, Wilk JB, Larson MG, Vasan RS, Keaney, Jr, JF, Lipinska I, O'Connor GT, Benjamin EJ. Systemic inflammation and COPD: The Framingham heart study. *Chest* 2008; 133: 19-25

Widegren H, Andersson M, Borgeat P, Flamand L, Johnston S, Greiff L. LtB₄ increases nasal neutrophil activity and conditions neutrophils to exert antiviral effects. *Respiratory Medicine* 2011; 105(7): 997-1006

Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of α 1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B₄ and interleukin 8. *Thorax* 2002; 57: 709-714

Wu SH, Liao PY, Yin PL, Zhang YM, Dong L. Elevated expressions of 15-lipoxygenase and lipoxin A₄ in children with acute poststreptococcal glomerulonephritis. *American Journal of Pathology* 2009; 174: 115-122

Yang D, Chen Q, Le Y, Wang JM, Oppenheim JJ. Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *The Journal of Immunology* 2001; 166(6): 4092-4098

Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997; 387: 620-624

Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT2. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 12454-12459

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

Zutler M, Quinlan PJ, Blanc PD. Alpha-1-antitrypsin deficient man presenting with lung function decline associated with dust exposure: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2011; 5: 154

http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf; skat.
05.07.2012

9. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTUS ATSPUGUĻOJOŠO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Līga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Darja Isajeva, Sergejs Isajevs, Agnese Kislina, Maris Bukovskis, Uldis Kopeika, Jevgenija Aprinceva, Immanuels Taivans. Lipoxin A₄ and its receptor expression in exacerbation phase of chronic obstructive pulmonary disease. Publikācija iesniegta žurnālā *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*.

Līga Balode, Darja Isajeva, Gunta Strazda, Sergejs Isajevs, Agnese Kislina, Normunds Jurka, Māris Bukovskis, Uldis Kopeika, Valentīna Gordjušina, Immanuels Taivans. Leikotriēna B₄, lipoksīna A₄ un FPRL-1 receptora ekspresija hroniskas obstruktīvas plaušu slimības paasinājuma stadijā. *LU Zinātniskie Raksti, 788. sējums, Medicīna 2012; 76-86.*

Līga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Uldis Kopeika, Agnese Kislina, Maris Bukovskis, Marina Beinare, Valentina Gordjusina, Immanuels Taivans. Lipoxygenase derived arachidonic acid metabolites in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas) 2012; 48(6): 292-298.*

10. PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTU PREZENTĀCIJAS KONFERENCĒS

Latvijas Universitātes 71. Zinātniskā konference, 15.februāris 2013 – Līga Balode, Darja Isajeva, Sergejs Isajevs, Agnese Kislina, Zane Sinkeviča, Gunta Strazda, Immanuels Taivans. Lipoksīna A₄ receptora ekspresija krēpu šūnās plaušu iekaisuma slimību gadījumā.

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

Latvijas Universitātes 70. Zinātniskā konference, 2.februāris 2012 – L.Balode, A.Kislina, D.Isajeva, N.Jurka, S.Isajevs, G.Strazda, I.Taivans. Hroniska obstruktīva plaušu slimība raksturojas ar nomāktu lipoksīna A₄ un pastiprinātu lipoksīnu receptora ekspresiju plaušās. – Latvijas Universitātes 70. Zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas Tēžu apkopojums 2012: 34.

European Respiratory Society Annual congress 2011 in Amsterdam, Netherlands, September 24-28, 2011 – Līga Balode, Sergejs Isajevs, Darja Svirina, Uldis Kopeika, Gunta Strazda, Immanuels Taivans. Lipoxin A₄ receptor expression in smokers with and without COPD. (P3900).

European Respiratory Society Annual congress 2011 in Amsterdam, Netherlands, September 24-28, 2011 – Līga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Agnese Kislina, Uldis Kopeika, Marina Beinare, Maris Bukovskis, Immanuels Taivans. The role of lipoxin A₄ in the chronic obstructive pulmonary disease. (P414).

International Health Science Conference. Kaunas, Lithuania, May 26-28, 2011 – Līga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Agnese Kislina, Uldis Kopeika, Marina Beinare, Immanuels Taivans. Decreased concentrations of eicosanoids in

the exacerbation phase of chronic obstructive pulmonary disease. (sertifikāts par otru labāko posteru stenda referātu sekcijā).

European Respiratory Society Lung Science Conference. Estoril, Portugal, April 1-3, 2011 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Agnese Kislina, Uldis Kopeika, Marina Beinare, Immanuel Taivans**. The role of lipoxin A₄ in the chronic obstructive pulmonary disease. Poster presentation (PP138).

European Respiratory Society Annual congress 2010 in Barcelona, Spain, September 18-22, 2010 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Sergejs Isajevs, Maris Bukovskis, Immanuel Taivans**. The role of lipoxin A₄ and its receptor in pathogenesis of inflammatory lung diseases. – Abstract Book, pp 323s

III World Asthma and COPD Forum. Dubai, UAE, April 24-27, 2010 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Sergejs Isajevs, Immanuel Taivans**. The role of lipoxin A₄ and its receptor in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. – International Journal of Immunorehabilitation 2010; 12(1): 52

European Respiratory Society Annual congress Vienne, Austria, September 12 – 16, 2009 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Immanuel Taivans**. Urea relative concentration in induced sputum – a character of airways epithelial permeability. (680s: P3829)

The Annual Meeting of the Scandinavian Physiological Society. Uppsala, Sweden, August 14-16, 2009 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Immanuel Taivans**. Influence of cigarette smoking on counts of induced sputum inflammatory cells. *Acta Physiologica*, 2009, V 196 (Suppl. 671: P47).

1st International Student Medical Congress Košice 2009. Košice, Slovakia, June 22 – 25, 2009 – **Liga Balode, Gunta Strazda, Normunds Jurka, Immanuel Taivans**. Influence of cigarette smoking on induced sputum inflammatory cells. (P289).

11. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājam Dr. habil. med., prof. Immanuelam Taivanam par neizsīkstošo atbalstu, vērtīgiem norādījumiem, iedrošinājumu un ticību darba realizēšanai.

Mīļš paldies Dr. biol., doc. Guntai Strazdai par atbalstu, palīdzību analīžu veikšanā un klātbūtni darba tapšanas gaitā.

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

Liels paldies Dr. med. Mārim Bukovskim un Dr. med. Uldim Kopeikam par palīdzību pacientu iesaistīšanā pētījumā, atbalstu un uzmundrinājumu darba gaitā.

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

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

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

Paldies Gundai Grīnbergai no Biomedicīnas pētījumu centra par iespēju izmantot ultracentrifūgu krēpu paraugu centrifugēšanai.