

**LATVIJAS UNIVERSITĀTE**  
**BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE**



Indra Miķelsone

**Vazodilatācijas intensitātes un insulīna rezistences rādītāju saistība  
ar endoteliālo (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijām  
hroniskiem smēķētājiem**

Promocijas darbs

Doktora grāda iegūšanai Bioloģijas nozarē  
Apakšnozare: Cilvēka un dzīvnieku fizioloģija

Rīga, 2013

## **Vazodilatācijas intensitātes un insulīna rezistences rādītāju saistība ar endoteliālo (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijām hroniskiem smēķētājiem**

Darba autore: Indra Miķelsone

Darba vadītājs: Asoc.prof., Dr.biol. Pēteris Tretjakovs

Darba zinātniskais konsultants: Prof., Dr.hab.biol. Juris I.Aivars

Recenzenti:

- 1) Prof., Dr.hab.med. Līga Aberberga-Augškalne, RSU, Medicīnas fakultāte;
- 2) Docente, Dr.biol. Gunta Strazda, LU, Medicīnas fakultāte;
- 3) Docente, Dr.med. Baiba Jansone, LU, Medicīnas fakultāte.



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».

## ANOTĀCIJA

Pētījuma mērķis ir noskaidrot smēķēšanas ierosināta sistēmiskā iekaisuma ietekmi uz insulīna rezistences un endotēlija disfunkcijas attīstību un to savstarpējo sakarību. Pētījumā piedalījās 128 dalībnieki (starp kuriem 52 personām konstatējām dislipidēmiju), kuriem tika noteiktas ar endotēlija funkcijām saistītu signālmolekulu seruma koncentrācijas, vazodilatācijas intensitāte ādas mikrocirkulācijā un insulīna rezistenci raksturojoši rādītāji. Rezultāti parādīja, ka smēķēšanas kumulatīvais efekts būtiski sekmē insulīna rezistences attīstību personām ar dislipidēmiju, bet smēķēšanas akūtais efekts caur iekaisuma signālmolekulām īslaicīgi samazina šūnu insulīna jutību neatkarīgi no dislipidēmijas.

Atslēgas vārdi: endotēlija disfunkcija, iekaisuma signālmolekulas, insulīna rezistence, smēķēšana, vazodilatācijas intensitāte

## ANNOTATION

The aim of this study was to determine the effect of cigarette smoking induced inflammation on development of insulin resistance, endothelial dysfunction and the correlation with each other. Vasodilatory responsiveness of cutaneous microcirculation and biomarkers of endothelial (dys)function and insulin resistance were examined in 128 volunteers (52 of them had dyslipidemia). The results showed that cigarette smoking cumulative effect significantly promotes the development of insulin resistance in dyslipidemic individuals. Smoking induced increase in the biomarkers of inflammation temporarily can reduce the insulin sensitivity independently of dyslipidemia

Keywords: biomarkers of inflammation, cigarette smoking, endothelial dysfunction, insulin resistance, vasodilatory responsiveness.

## Saīsinājumi

8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozīns	<i>8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i>
AA	arahidonskābe	<i>arachidonic acid</i>
ABCA1	ATF saistošās kasetes transportieris A1	<i>ATP binding cassette transporter A1</i>
ABL	augsta blīvuma lipoproteīns	<i>high-density lipoprotein</i>
ACC	acetil-CoA karboksilāze	<i>acetyl-CoA carboxylase</i>
Ach	acetilholīns	<i>acetylcholine</i>
ADF	adenozīna difosfāts	<i>adenosine diphosphate</i>
AGEs	dziļās glikēšanas galaprodukti	<i>advanced glycosilation endproducts</i>
Akt	proteīnkināze B	<i>protein kinase B</i>
AMPK	5' AMF-aktivētā proteīnkināze	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
ASS	arginīna-sukcināta sintāze	<i>Argininosuccinate synthase</i>
ATF	adenozīna trifosfāts	<i>adenosine triphosphate</i>
BAL	bronhoalveolārais skalojums	<i>bronchoalveolar lavage</i>
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterīns	<i>tetrahydrobiopterin</i>
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulīna atkarīgā kināze	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase</i>
cAMF	cikliskais adenoziņa monofosfāts	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CRP	C reaktīvais proteīns	<i>C-reactive protein</i>
CYP450	citohroms P450	<i>cytochrome P450</i>
DNS	dezoksiribonukleīnskābe	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDHF	endotēlija izcelsmes hiperpolarizējošais faktors	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EET	epoksieikosatriēnskābe	<i>epoxyeicosatrienoic acid</i>
ET-1	endotelīns-1	<i>endothelin-1</i>
GLUT	glikozes transportieris	<i>glucose transporter</i>
GM-CSF	granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošais faktors	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMŠ	gludo muskuļu šūnas	<i>smooth muscle cells</i>
GSH	reducēts glutations	<i>reduced glutathione</i>
GSSH	oksidēts glutations jeb glutationa disulfīds	<i>oxidised glutathione</i>

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ūdeņraža peroksīds	<i>hydrogen peroxide</i>
HOCl <sup>-</sup>	hipohlorskābe	<i>hypochlorous acid.</i>
HOMA-IR	insulīna rezistences homeostāzes modelis	<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
Hsp	karstuma šoka proteīns	<i>heat shock protein</i>
ICAM-1	intercellulārā adhēzijas molekula-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN-γ	interferons gamma	<i>interferon gamma</i>
I-κB	nukleārā faktora κB inhibitors	<i>inhibitor of nuclear factor κB</i>
IL	interleikīns	<i>interleukin</i>
IP3	inozitola trifosfāts	<i>inositol triphosphate</i>
IRS-1	insulīna receptora substrāts 1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
LO <sup>•</sup> , LOO <sup>•-</sup>	lipīdu radikāļi	<i>lipid radicals</i>
LOX-1	lektīnam līdzīgais oksidēta ZBL receptors-1	<i>lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
MAPK	mitogēn-aktivētā proteīnkināze	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	monocītu hemotaktiskais proteīns-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
METK	mitohondriju elektronu transporta ķēde	<i>mitochondrial electron transport chain</i>
MMP	matriksa metalloproteināze	<i>matrix metalloproteinase</i>
MPO	mieloperoksidāze	<i>myeloperoxidase</i>
mRNS	matrices ribonukleīnskābe	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mtDNS	mitohondriālā DNS	<i>mitochondrial DNA</i>
NADPH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADPHox	NADPH oksidāze	<i>NADPH oxidase</i>
NF-κB	nukleārais faktors κB	<i>nuclear factor κB</i>
NO	slāpekļa oksīds	<i>nitric oxide</i>
NOS	slāpekļa oksīda sintāze	<i>nitric oxide synthase</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksīda radikālis	<i>superoxide radical</i>
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrīts	<i>peroxynitrite</i>
oxZBL	oksidētais zema blīvuma lipoproteīns	<i>oxidized low density lipoprotein</i>

PAI-1	plazminogēna aktivatora inhibitors-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PARP	poli-ADF-ribozes polimerāze	<i>poly-ADP-ribose-polymerase</i>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandīns I <sub>2</sub> (prostaciklīns)	<i>prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin)</i>
PKA	proteīnkināze A	<i>protein kinase A</i>
PI3K	fosfatidil-inozitola 3 kināze	<i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
RNS	reaktīvie slāpekļa savienojumi	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktīvie skābekļa savienojumi	<i>reactive oxygen species</i>
Ser	serīns	<i>serine</i>
SIRT1	sirtuīns 1, NAD <sup>+</sup> atkarīgā proteīnu deacetilāze	<i>sirtuin 1 NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase</i>
SOD	superoksīda dismutāze	<i>superoxide dismutase</i>
SREBP-1	sterolu regulējošais elementu saistošais proteīns-1	<i>sterol regulatory element-binding protein-1</i>
TF	audu faktors	<i>tissue factor</i>
TG	triglicerīdi	<i>triglyceride</i>
Thr	treonīns	<i>threonine</i>
TNF-α	tumoru nekrozes faktors-α	<i>tumour necrosis factor-α</i>
tPA	audu plazminogēna aktivators	<i>tissue plasminogen activator</i>
VCAM-1	vaskulāro šūnu adhēzijas molekula-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
vWF	von Willebranda faktors	<i>von Willebrand factor</i>
ZBL	zema blīvuma lipoproteīns	<i>low-density lipoprotein</i>

## Satura rādītājs

<b>IEVADS</b> .....	10
<b>1. LITERATŪRAS APSKATS</b> .....	12
<b>1.1. Cigarešu dūmu fizikālās un bioķīmiskās īpašības</b> .....	12
<b>1.2. Oksidatīvā stresa inducēta sistēmiskā iekaisuma veidošanās</b> .....	14
1.2.1. Lokāls elpceļu oksidatīvais stress un sistēmiskā iekaisuma veidošanās .....	14
1.2.2. Sistēmiskā iekaisuma atbildes reakcijas un endotēlija aktivācija .....	16
1.2.3. Cigarešu dūmu aktivētās NADPH oksidāzes ierosināts asinsvadu oksidatīvais- nitrozatīvais stress .....	18
1.2.4. Smēķēšanas akūtā efekta inducēts oksidatīvais stress un iekaisuma reakcijas .....	22
1.2.5. Nikotīna ietekme uz imūnšūnu aktivāciju .....	23
<b>1.3. Endoteliālās disfunkcijas izcelsmes mehānismi</b> .....	25
1.3.1. BH <sub>4</sub> oksidēšana un eNOS aktivitātes inhibīcija .....	26
1.3.2. Arginīna metabolisma izmaiņas un tā transportiera CAT1 modifikācija .....	27
1.3.3. TNF- $\alpha$ loma endoteliālās disfunkcijas un asinsvadu patoģenēzes attīstībā .....	28
1.3.4. Mieloperoksidāzes enzimatiskās aktivitātes izraisīta endoteliālā disfunkcija un lipīdu modifikācija .....	31
<b>1.4. Smēķēšanas ietekme uz taukaudu endokrīno funkciju</b> .....	36
1.4.1. Adiponektīna loma endotēlija šūnu normālas funkcijas nodrošināšanā .....	36
1.4.2. Adiponektīna inhibējošā ietekme uz lipīdu uzkrāšanos asinsvada sienā .....	37
1.4.3. Oksidatīvā stresa ietekme uz adiponektīna koncentrāciju cirkulācijā .....	38
1.4.4. Nikotīna ietekme uz taukaudu metabolismu un adiponektīna gēnu ekspresiju .....	39
<b>1.5. Smēķēšanas ietekme uz insulīna rezistences attīstību</b> .....	41
1.5.1. Nikotīna ietekme uz insulīna sekrēciju un funkciju .....	41
1.5.2. Smēķēšanas saistība ar viscerālo aptaukošanos un insulīna rezistences attīstību ..	42
1.5.3. Nikotīna ietekme uz kortizola diennakts sekēciju .....	44
1.5.4. Smēķēšanas izraisīta lipīdu akumulācija aknās .....	44
1.5.5. TNF- $\alpha$ ietekme uz lipīdu metabolismu un insulīna signālceļiem .....	46
<b>1.6. Mikrovaskulāro funkciju izpēte ar lāzerdoplerogrāfijas (LDI) metodi</b> .....	48
1.6.1. Lāzerdoplerogrāfijas metodes darbības princips. ....	48
1.6.2. Mikrovaskulāro reakciju novērtēšanai izmantotie provokatīvie testi .....	50
1.6.2.1. Siltuma hiperēmijas tests (siltuma inducētā vazodilatācija) .....	51



1.6.2.2. Acetilholīna jontoforēzes tests (Ach inducētā vazodilatācija) .....	53
<b>2. MATERIĀLI UN METODEDES</b> .....	57
2.1. Pētījumā iesaistīto personu grupas un to raksturojums. ....	57
2.2. LDI testu protokols, izmantotā aparatūra un metodes. ....	60
2.3. Signālmolekulu koncentrāciju noteikšana seruma paraugos .....	63
2.4. Datu statistiskā analīze .....	64
<b>3. REZULTĀTI</b> .....	65
<b>3.1. Smēķēšanas hroniskā ietekme</b> .....	65
3.1.1. Vazodilatācijas testu rādītāji .....	65
3.1.2. Endotēlija (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu seruma koncentrācijas.....	69
3.1.3. Korelāciju analīze .....	78
<b>3.2. Smēķēšanas akūtā ietekme</b> .....	86
<b>4. DISKUSIJA</b> .....	89
<b>4.1. Smēķēšanas hroniskā ietekme</b> .....	89
4.1.1. Smēķēšanas ietekme uz mikrocirkulācijas intensitāti perifērijā .....	90
4.1.2. Smēķēšanas ietekme uz insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem .....	91
4.1.3. Smēķēšanas ietekme uz endoteliālās (dis)funkcijas signālmolekulu seruma .....	94
koncentrācijām, to saistība ar vazodilatācijas intensitātes un insulīna rezistences rādītājiem	
<b>4.2. Smēķēšanas akūtā ietekme</b> .....	106
<b>SECINĀJUMI</b> .....	110
<b>TĒZES</b> .....	111
<b>PATEICĪBAS</b> .....	112
<b>LITERATŪRAS SARAKSTS</b> .....	113
<b>PIELIKUMS</b> .....	131
Promocijas darba rezultātus atspoguļojošās publikācijas.....	136
Promocijas darba rezultātu prezentācijas konferencēs .....	137

## IEVADS

Literatūrā tiek ziņots, ka hroniskiem smēķētājiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, ir lielāks insulīna rezistences attīstības risks, kas korelē ar dienā izsmēķēto cigarešu skaitu (Eliasson, 2003; Facchini et al. 1992; Willi et al. 2007). Eksperimentālo un klīnisko pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka cigarešu dūmu ietekmē samazinās šūnu insulīna jutība un sekojoši attīstās ar glikozes un lipīdu dismetabolismu saistītas saslimšanas, piemēram, hiperglikēmija un dislipidēmija, t.sk., samazināta ABL koncentrācija cirkulācijā (Despre, Lemieux 2006; Heine, Dekker 2002; Smith et al. 1999).

Vairāki autori uzskata, ka insulīna rezistence ir vājš posms saistībai starp smēķēšanas izraisītām iekaisuma reakcijām un kardiovaskulāro slimību attīstības risku. Saistību starp smēķēšanu un insulīna rezistenci var izskaidrot ar palielinātu kortizola koncentrāciju serumā smēķētājiem (Girod, Brotman, 2003; Reaven, Tsao, 2003), kas ilgstošā periodā izraisa viscerālo aptaukošanos un glikozes dismetabolismu (Reynolds, Walker, 2003). Viscerālā aptaukošanās, pat ja  $\text{KMI}$  ir normas robežās vai zemāks, ir saistīta ar dislipidēmijas, insulīna rezistences un kardiovaskulāro slimību attīstības risku.

Cigarešu dūmos esošās ķīmiskās komponentes pastiprina oksidatīvo stresu, kas modulē TNF- $\alpha$  signālceļus (ierosina iekaisuma citokīnu un hemokīnu gēnu ekspresiju), inhibē adiponektīna un palielina PAI-1 gēnu ekspresiju. Darvas frakcijā esošais nikotīns palielina kateholamīnu sekrēciju un  $\beta$ -adrenerģisko aktivitāti, kas var izraisīt insulīna rezistenci caur šādiem mehānismiem: 1) ierosina insulīna receptora-1 (IRS-1) serīna fosforilāciju un inhibē tirozīnkināzes aktivitāti un 2) stimulē taukaudu lipolīzi, kā rezultātā palielinās brīvo taukskābju koncentrācija cirkulācijā, kas samazina šūnu insulīna jutību (Hotamisligil et al. 1996; Morisco et al. 2005). Cigarešu dūmos esošie brīvie radikāļi aktivē neitrofilus, kuri palielinātā daudzumā sekretē MPO. Rezultātā tiek peroksidēti lipīdi un proteīni, veidojas oxZBL un nitrotirozīns, kas, savukārt, tiek fagocitēti asinsvada sienā, tādējādi izmainot matricas proteīnu struktūru un funkcijas. Rezultātā veidojas asinsvada iekaisums un endotēlija šūnu bojājumi, kas raksturojas ar samazinātu endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitāti (Schindhelm et al. 2009; van der Veen et al. 2009).

Smēķēšana būtiski ietekmē endotēlija funkcionālos parametrus – gan ar šūnu aktivāciju un iekaisumu saistīto biomarkieru seruma koncentrāciju, gan ādas mikrovaskulāro reakciju izmaiņām. Noteiktu biomarkieru – **endotēlija sintezēto signālmolekulu** (ICAM-1, E-selektīna, IL-8, MCP-1) un **endoteliocītu funkciju ietekmējošo signālmolekulu**

(adiponektīna, IL-6, TNF- $\alpha$ , MPO, PAI-1), ko sintezē citu šūnu tipi, koncentrāciju izmaiņas, kā arī **insulīna rezistenci raksturojošo rādītāju** izmaiņas smēķēšanas ietekmē varētu sniegt piekšstatu par iespējamo kardiovaskulāro un metabolo slimību attīstības risku, tajā skaitā, endoteliālo disfunkciju un insulīna rezistenci.

Vieni autori izvērza **hipotēzi**, ka hroniskiem smēķētājiem pastāv risks attīstīties insulīna rezistencei, kas sekmē dislipidēmijas un endotēlija disfunkcijas attīstību. Tomēr, citi autori uzskata, ka smēķēšanas inducēts palielināts oksidatīvais stress un iekaisuma reakcijas sākotnēji izraisa endoteliālo disfunkciju, kas var sekmēt metabolo disfunkciju un insulīna rezistences attīstību. Tādēļ, šī darba **mērķis** bija noskaidrot smēķēšanas ierosināta iekaisuma ietekmi uz endoteliālo (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijām serumā, vazodilatācijas intensitātes rādītājiem ādas mikrocirkulācijā un insulīna rezistences rādītājiem, un to savstarpējās korelācijas hroniski smēķējošām personām.

#### **Uzdevumi:**

- 1) Salīdzināt vazodilatācijas intensitātes, insulīna rezistenci raksturojošo rādītāju un iekaisuma citokīnu seruma koncentrācijas nesmēķētājiem un hroniskiem smēķētājiem.
- 2) Noskaidrot smēķēšanas kumulatīvā efekta (pakģadu skaita) korelācijas ar:
  - vazodilatācijas intensitātes rādītājiem;
  - insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem;
  - endoteliālo funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijām,
- 3) Noskaidrot korelācijas starp:
  - vazodilatācijas intensitāti un endoteliālās funkcijas signālmolekulām;
  - insulīna rezistences rādītājiem un endoteliālās funkcijas signālmolekulām;
  - vazodilatācijas intensitāti un insulīna rezistences rādītājiem.
- 4) Smēķēšanas akūto efektu uz vazodilatācijas intensitāti mikrocirkulācijā un hemodinamikas mērģjumiem.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

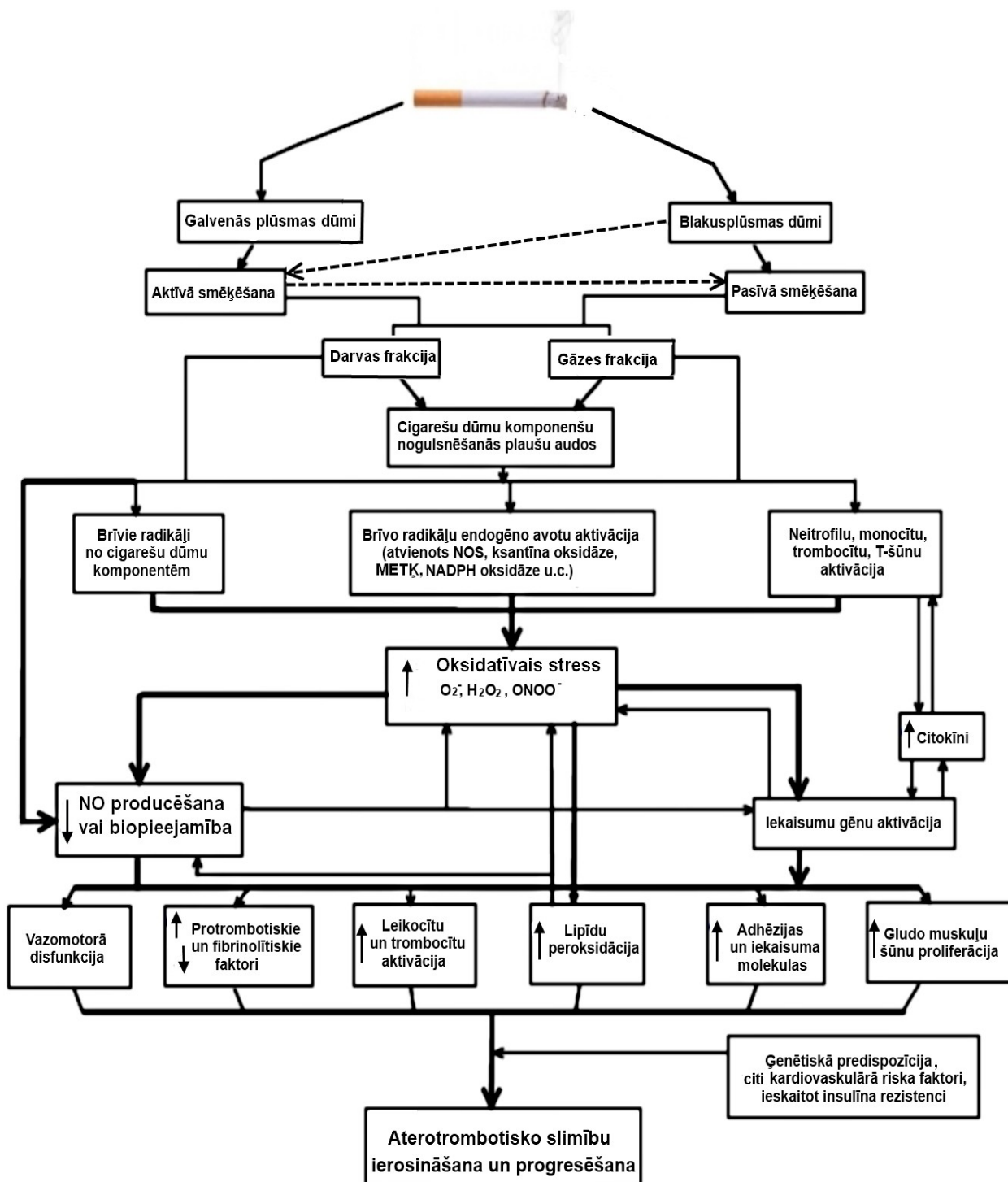
## 1.1. Cigarešu dūmu fizikālās un bioķīmiskās īpašības

Cigarešu dūmi satur vairākus tūkstošus dažādu ķīmisku savienojumu (komponenšu), kam piemīt citotoksiskas, mutagēnas un kancerogēnas īpašības. Nozīmīgākās imūnmodulējošās komponentes ir nikotīns, oglekļa monoksīds, akroleīns, ROS; kancerogēnie toksīni – policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži, N-nitrozamīni, niķelis, kadmijs, hroms, arsēns; pieradumu veidojošas vielas – nikotīns, acetaldehīds, amonjaks, un daudzas citas. Ieelpotās un caur muti ievilktais ķīmiskās substances ātri degradējas mutes dobuma un elpceļu sekretētajos šķidrums, kā arī nonāk sistēmiskajā cirkulācijā. Cigarešu dūmos esošās komponentes izmaina gan iedzimtās imūnreakcijas mutes, deguna un iekšējo elpceļu gļotādā, gan adaptīvās imūnreakcijas sistēmiskajā cirkulācijā. Cigarešu dūmu inducētas toksiskās ietekmes ir ģenētiskas vai epiģenētiskas, ko izraisa izmainītas gēnu funkcijas (piem., šūnu dzīves cikls, DNS reparācija) (Lee et al. 2012).

Cigarešu dūmi nosacīti tiek iedalīti divās frakcijās – **darvas** jeb **daļiņu frakcija** un **gāzes frakcija**. Kad cigarešu dūmu plūsma tiek laista cauri stikla šķiedru filtram, tad gāzes frakcijas materiāls iziet tam cauri, bet darvas frakcijas daļiņas, kuru izmērs ir  $>0.1 \mu\text{m}$ , tiek aizturēts filtrā. Darvas frakcija satur  $>10^{17}$  brīvos radikāļus uz gramu, un tie ir ilgdzīvojoši (stundas līdz mēneši). Gāzes frakcija satur  $>10^{15}$  brīvos radikāļus vienā dūmu izpūtienā (*puff*), un tie ir īsdzīvojoši (sekundes) (Pryor, Stone 1993).

Tos dūmus, kas caur filtra daļu nonāk smēķētāja mutē, tiek dēvēti par **galvenās plūsmas dūmiem**, bet tie dūmi, kas rodas no degošas cigaretes gala un nonāk vidē, ir **blakus plūsmas dūmi**. Galvenā plūsma sastāv no 8% darvas un 92% gāzes komponentēm (Pryor, Stone 1993). Vidē nonākušie cigarešu dūmi ir kombinācija no blakus dūmiem (85 %) un sīkās frakcijas no smēķētāja izelpotās galvenās plūsmas (15%). Pasīvās smēķēšanas kaitīgumu var izskaidrot ar to, ka cigarešu dūmu blakus plūsma satur relatīvi lielāku toksisko gāzveida komponentu koncentrāciju, nekā galvenā plūsma (Glantz, Parmley 1991).

Smēķēšanas izraisīta endoteliāla disfunkcija, iekaisuma reakcijas un lipīdu modifikācija ir integrāli jeb neatņemami komponenti aterosklerotiska procesa ierosināšanai un attīstībai. Šīs komponentes paredz acīmredzamas strukturālas un klīniski patoloģiskas aterosklerozes izpausmes (1.att.) (Ambrose, Barua 2004).



1.attēls. Cigarešu dūmu mediētie potenciālie signālceļi un mehānismi asinsvadu slimību ierosināšanā un attīstībā (Ambrose, Barua 2004)

## 1.2. Oksidatīvā stresa inducēta sistēmiskā iekaisuma veidošanās

### 1.2.1. Lokāls elpceļu oksidatīvais stress un sistēmiskā iekaisuma veidošanās

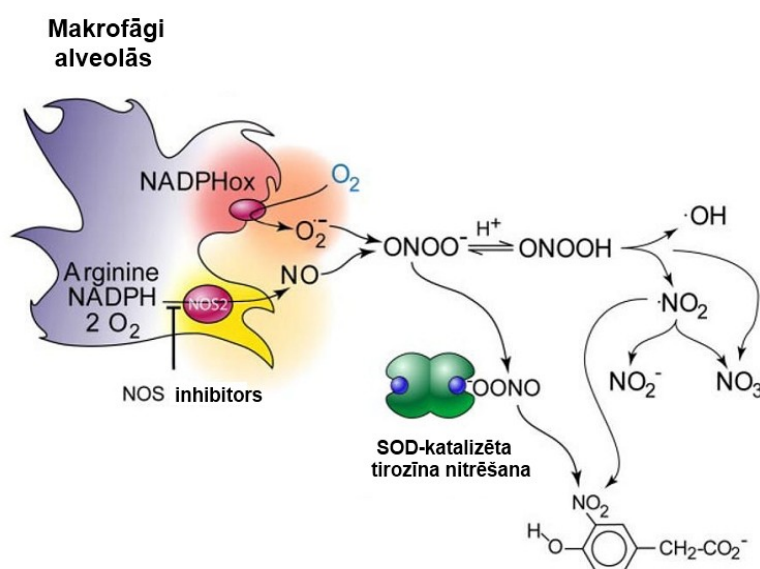
Cigarešu dūmu abas, darvas un gāzes frakcijas satur augstas reaktīvo skābekļa un slāpekļa savienojumu, un organisko savienojumu brīvo radikāļu koncentrācijas (Pryor, Stone 1993). Ar dūmiem ieelpotās vielu daļiņas pulmonālajā sistēmā aktivē imūnšūnas, lai ģenerētu endogēnos ROS un sekretētu iekaisumu veicinošos citokīnus, tādējādi izraisot iekaisuma reakcijas. Bez tam, cigarešu dūmos esošie oksidanti aktivē plaušu audos esošos neitrofilus un makrofāģus, kuri migrācijas ceļā nokļūst sistēmiskajā cirkulācijā un aktivē endotēlija šūnas un leukocītus perifērijā (1.att.). Arī asinsvadu šūnas - endoteliocīti, gludo muskuļu šūnas un fibroblasti producē plašu spektru citokīnus, tajā skaitā IL-6, TNF $\alpha$  un IL-1 $\beta$ , kuri autokrīni un parakrīni stimulē pro-aterogēnos procesus (Csiszar et al. 2007; Orosz et al. 2007; Yamaguchi et al. 2007).

Hroniska smēķēšana izraisa elpceļu un plaušu parenhīmas iekaisumu, ko raksturo neitrofilu, makrofāģu un aktivētu T limfocītu infiltrācija un iekaisuma citokīnu (TNF- $\alpha$ , IL-6 un IL-8) koncentrāciju palielināšanās (Battaglia et al. 2007). Vairumam smēķētāju novēro lokālu plaušu audu un sistēmisku iekaisumu, bet tikai dažiem var izpausties pastiprinātas imūnreakcijas un attīstīties hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS) (Løkke et al. 2006). TNF- $\alpha$  ir spēcīgs iekaisumu veicinošs citokīns, ko, galvenokārt, producē aktivēti makrofāģi. TNF- $\alpha$  pastiprina citu iekaisuma citokīnu ekspresiju un atbrīvošanu, kas izraisa audu bojājumus un strukturālas izmaiņas (Churg et al. 2002).

Cigarešu dūmu gāzes frakcijā esošie reaktīvo skābekļa un slāpekļa savienojumi (piemēram, peroksinitrīts, superoksīds, ūdeņraža peroksīds) un brīvie radikāļi inducē sistēmisku oksidatīvo un nitrozatīvo stresu (Pryor, Stone 1993; Yamaguchi et al. 2007). Tā ietekmē pastiprinās lipīdu peroksidēšana (Frei et al. 1991), proteīnu tirozīna atlikumu nitrēšana, DNS molekulas oksidatīvs bojājums un endotēlija šūnu aktivācija (Heitzer et al. 2000). Reaktīvajiem savienojumiem jāizkļūst cauri pulmonālajām barjerām vai jāaktivē alveolārie makrofāģi ģenerēt tādus oksidantus, kuri pēc tam iekļūst sistēmiskajā asinsritē un ietekmē plazmas lipoproteīnus un asinsvadu endotēlija šūnas (Yamaguchi et al. 2007). Dzīvnieku eksperimentos, pakļaujot žurkas akūtai cigarešu dūmu gāzes frakcijas ietekmei, tika novērota ātra un nepārtraukta 3-nitrotirozīna un 8-OHdG (DNS oksidatīvā bojājuma marķieris) koncentrācijas palielināšanās serumā. Nestabilo superoksīda anjonu inaktivē

superoksīda dismutāze (SOD), bet relatīvi stabilo ūdeņraža peroksīdu sadala katalāze. Savukārt, peroksinitrītam, kurš ir ļoti nestabils, nav specifiska savācēja (*scavenger*), tādēļ tas ir galvenais oksidants, kurš izklūst cauri alveolu sienīnai un, nokļūstot asinsritē, ātri reaģē ar endoteliocītu un asinsritē esošiem lipīdiem un proteīniem (Pryor, Stone 1993; Tanriverdi et al. 2006).

Aktivēti makrofāgi alveolās producē NO un  $O_2^{\cdot-}$ , un veidojas liels daudzums  $ONOO^-$ . Lielas ekstracelulārā SOD koncentrācijas būtiski nesamazina  $ONOO^-$  daudzumu, bet tā vietā katalizē tirozīna nitrēšanu. Uz makrofāgu membrānas virsmas producētais  $O_2^{\cdot-}$  un no šūnas difundējošais NO savā starpā reaģē tik ātri, ka SOD nespēj konkurēt ar  $ONOO^-$ , lai inaktivētu  $O_2^{\cdot-}$  (2.att.)( Pacher et al. 2007).



## 2.attēls. Alveolu makrofāgu producēts peroksinitrīts ( $ONOO^-$ )

(Pacher et al. 2007)

Hroniskas smēķēšanas ietekmē palielinās cirkulējošo leikocītu skaits, tajā skaitā, nenobrieduši neitrofīli ar augstu mieloperoksidāzes (MPO) saturu un  $\alpha 1$ -antitripsīnu, kas ir serīna proteāzes (atbildīga par alveolu sienīņu bojājumu) dabiskais inhibitors (van Eeden et al. 2005). Plaušu audos aktivētie neitrofīli un makrofāgi palielinātā daudzumā asinsritē atbrīvo MPO, kura katalītiskā aktivitāte palielina 3-nitrotirozīna veidošanos (Bridges et al. 1985).

### 1.2.2. Sistēmiskā iekaisuma atbildes reakcijas un endotēlija aktivācija

Cigarešu dūmi ierosina sistēmiskas iekaisuma reakcijas, kas raksturojas ar akūtas fāzes proteīnu sekrēciju, palielinātu asiņu koagulāciju, cirkulējošo iekaisuma signālmolekulu atbrīvošanu un kaulu smadzeņu stimulēšanu sekretēt leukocītus un trombocītus sistēmiskajā cirkulācijā. Ultrasīkās cigarešu dūmos esošās vielu daļiņas spēj pārvietoties no plaušu audiem asinsritē un tieši aktivēt asinsvadu šūnas, izraisot endotēlija disfunkciju, kas ir sākuma solis aterosklerotisko bojājumu attīstībai. Pētījumi ir apliecinājuši, ka infekcija vai kaitīgo daļiņu palielinātas koncentrācijas apkārtējā vidē inducē iekaisuma reakcijas plaušās, kas paātrina monocītu atbrīvošanu no kaulu smadzenēm (van Eeden et al. 2005).

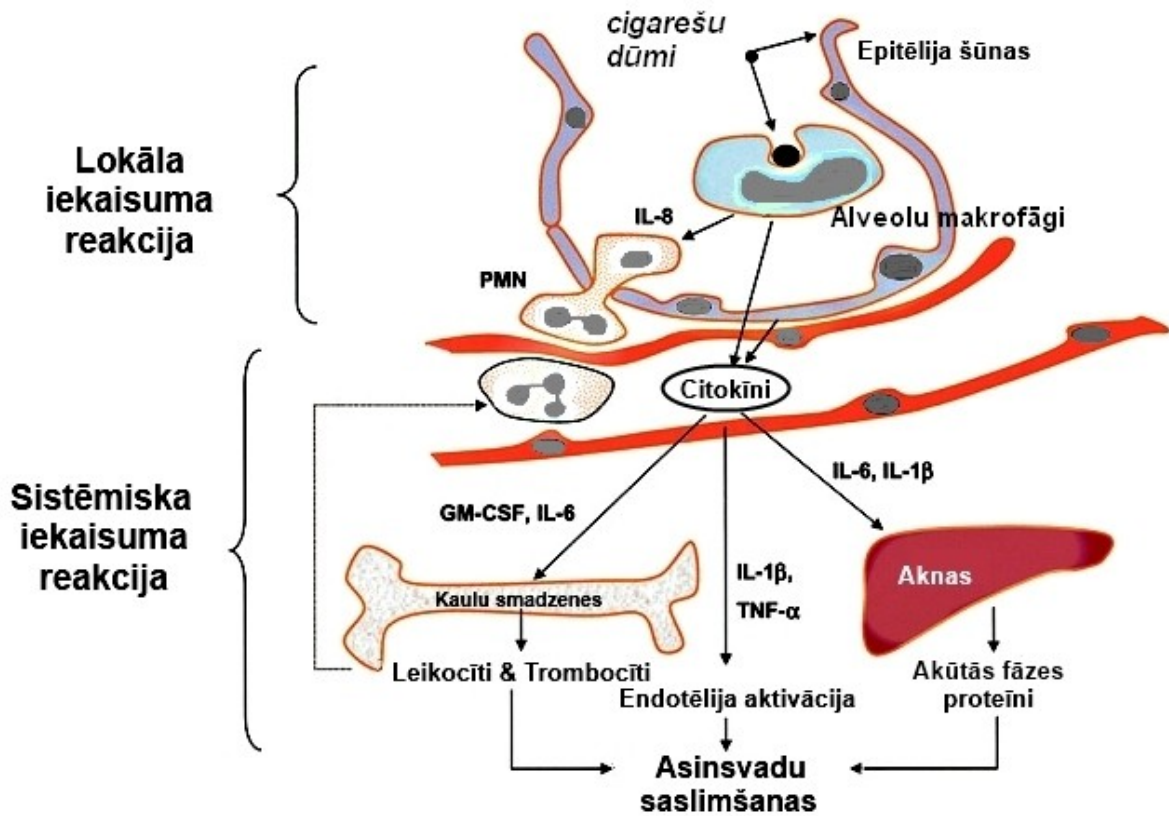
Ieelpotie un caur muti ievilkto cigarešu dūmi aktivē alveolu makrofāģus un bronhu epitēlija šūnas producēt iekaisumu veicinošos citokīnus, tajā skaitā hemoatraktantus MCP-1 un IL-8, kas veicina lokālu iekaisumu plaušu audos. Šīs iekaisumu veicinošās signālmolekulas iekļūst kopējā asinsritē un inducē sistēmiskās iekaisuma reakcijas – stimulē kaulu smadzenes atbrīvot leukocītus un trombocītus, stimulē aknas producēt akūtas fāzes proteīnus un prokoagulācijas faktorus, un aktivē endotēlija šūnas. Visi šie efekti kopā pakļauj asinsvadu bojājumam vai pastiprina esošas asinsvadu slimības, sekmējot akūtus kardiovaskulārus notikumus (3.att.) (van Eeden et al. 2005).

Klīniski veselīgiem smēķētājiem (bez HOPS) ir novērotas dažādu iekaisuma citokīnu palielinātas koncentrācijas cirkulācijā. Smēķēšanas izraisīts plaušu iekaisums raksturojas ar palielinātām IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 un GM-CSF koncentrācijām, kas stimulē kaulu smadzenes sekretēt asinsritē leukocītus (neitrofilus un monocītus) un trombocītus. Atbrīvotie leukocīti modulē iekaisuma reakcijas plaušās un asinsvados, it īpaši mikrocirkulācijā, kur tie inducē audu iekaisumu, kas ir tālu no sākotnējās iekaisuma vietas plaušās. Par leukocītu aktivāciju norāda arī palielināts TNF- $\alpha$  un tā receptoru (TNFR) daudzums cirkulācijā (Sakai et al. 2004).

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  un IL-6 aktivē akūtās fāzes atbildes reakcijas, kas ģenerē CRP, fibrinogēnu un citus koagulācijas faktorus, kā arī aktivē cirkulējošo leukocītu adhēziju pie endoteliocītiem un migrāciju subendotēlija telpā (van Eeden et al. 2005). Tātad, iekaisumu veicinošie citokīni aktivē asinsvadu endotēlija šūnas, kas pastiprina von Willebranda faktora, ICAM-1, VCAM-1 un E-selektīna ekspresiju. Šo adhēzijas molekulu koncentrācijas asinsritē korelē ar vaskulāro slimību attīstības pakāpi (Hwang et al. 1997). Laboratorisko izmeklējumu rezultāti ir parādījuši, ka daži stimuli, kas inducē plaušu iekaisumu, var arī aktivēt asinsvadu endotēlija šūnas. Adhēzijas molekulām ir nozīmīga loma leukocītu un limfocītu rekrutēšanai



aterosklerotisko bojājumu vietās. Aktivēts endotēlijs producē un atbrīvo cirkulācijā endotelīnu-1. Atbrīvotais endotelīns aktivē leukocītus un sekmē to saistīšanos pie endoteliocītiem, tādējādi nodrošinot leukocītu migrāciju asinsvada sieniņā. Tātad, lokāls iekaisums plaušās palielina endoteliālās disfunkcijas signālmolekulu koncentrācijas cirkulācijā, kas var norādīt par iespējamu saistību starp plaušu iekaisumu un aterosklerozes attīstību. Endotelīna-1 koncentrācija cirkulācijā, kas palielinās jau 2 stundu laikā pēc vielu sīko daļiņu ieelpošanas, cieši korelē ar akūta koronāra notikuma vazokonstrikcijas rādītājiem. Palielinātas IL-1 $\beta$  un IL-6 koncentrācijas aktivē endotēliju producēt arī IL-8, kas ir hemoatraktants T limfocītiem un leukocītiem, un stimulē gludo muskuļu šūnu proliferāciju un migrāciju (3.att.) (Sakai et al. 2004; van Eeden et al. 2005; Yamaguchi et al. 2007).



**3.attēls. Plaušu iekaisuma inducētas sistēmiskā iekaisuma reakcijas**

(van Eeden et al. 2005)

### 1.2.3. Cigarešu dūmu aktivētās NADPH oksidāzes ierosināts asinsvadu oksidatīvais-nitrozatīvais stress

Ūdenī šķīstošie cigarešu darvas ekstrakti satur pro-oksidējošas substances, kas pastiprina ROS producēšanu šūnās. Šie pro-oksidanti ir semikvinoni, hidrokvinoni un kvinoni, kā arī  $\alpha,\beta$ -nepiesātinātie aldehīdi (akroleīns un krotonaldehīds),  $\alpha,\beta$ -nepiesātinātie ketoni un liels daudzums piesātināto aldehīdu (Pryor, Stone 1993). Šīs cigarešu dūmu komponentes, sasniedzot sistēmisko cirkulāciju, var tieši veicināt asinsvadu oksidatīvo stresu sistēmiskajās asinsvadu gultnēs. Klīnisko pētījumu un dzīvnieku eksperimentu rezultāti ir pierādījuši, ka cigarešu dūmu ierosināts oksidatīvais stress samazina endotēlija šūnu NO bioaktivitāti un ierosina ģeneralizētu endoteliālo disfunkciju (Csiszar et al. 2009; Jaimes et al. 2004; Orosz et al. 2007). Fizioloģiski nomālos apstākļos endotēlija producētajai NO molekulai ir asinsvadus aizsargājošas īpašības, kas nodrošina koronāro un perifēro asins plūsmu, inhibē trombocītu agregāciju, iekaisuma šūnu adhēziju pie endotēlija un iekaisumu veicinošo citokīnu inducēto signālceļu nelabvēlīgo ietekmi (Jaimes et al. 2004).

Eksperimentālos un epidemioloģiskos pētījumos ir noskaidrots, ka policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži, kas ir cigarešu darvas galvenā sastāvdaļa, ierosina dažādas celulārās enzīmu sistēmas, kas iesaistītas ROS metabolismā. Zīdītāju šūnās reaktīvos skābekļa savienojumus, kas ierosina iekaisuma signālmolekulu gēnu ekspresiju, enzīmātiski producē mitohondriālā elpošana, arahidonskābes signālceļa enzīmi – lipoksigenāze un ciklooksigenāze, citohroms P450, ksantīna oksidāze, NADH/NADPH oksidāzes, atvienota eNOS, peroksidāzes un citi hemoproteīni (Cai, Harrison 2000; Csiszar et al. 2009; Sorescu, Griendling 2002).

Cigarešu dūmos esošās ūdenī šķīstošās komponentes, piemēram, akroleīns, tieši, bez aktivētu leukocītu klātbūtnes, ierosina NADPH oksidāzi un ksantīna oksidāzi pastiprināti ģenerēt  $O_2^-$  pulmonālo artēriju sienīnā. Eksperimentālos dzīvnieku modeļus pakļaujot cigarešu dūmu iedarbībai, noskaidroja, ka  $O_2^-$  ģenerē gan endotēlija šūnās, gan gludo muskuļu šūnās (Jaimes et al. 2004; Orosz et al. 2007). Gan akroleīns, gan citas ūdenī šķīstošas un stabilas komponentes sasniedz dažādas asinsvadu gultnes tālu no savas primārās iedarbības vietas un ierosina ROS producēšanu. Ir pārliecinoši pierādīts, ka NADPH oksidāze ir galvenais ROS ģenerējošais enzīms asinsvadu šūnās. Bez tam, NADPH oksidāzes aktivitāte ir atbildīga par pastiprinātu endoteliālā  $O_2^-$  producēšanu normālā novecošanās procesā un dažādu patofizioloģisko stāvokļu gadījumos, kas ir saistīti ar paātrinātu asinsvadu

novecošanos, tādi kā hiperhomocisteinēmija un hipertenzija (Ungvari et al. 2004). Cigarešu dūmi ierosina oksidatīvā stresa reakcijas arī mitohondrijos, kas producē  $O_2^-$  un  $H_2O_2$ . Pētījumi apliecina, ka cigarešu dūmu sastāvdaļas dažādos šūnu tipos izraisa mitohondriālo oksidatīvo stresu, šūnu ATF zudumu un mitohondriju membrānas potenciāla ātru depolarizāciju, kam seko šūnu apoptoze (Csiszar et al. 2009).

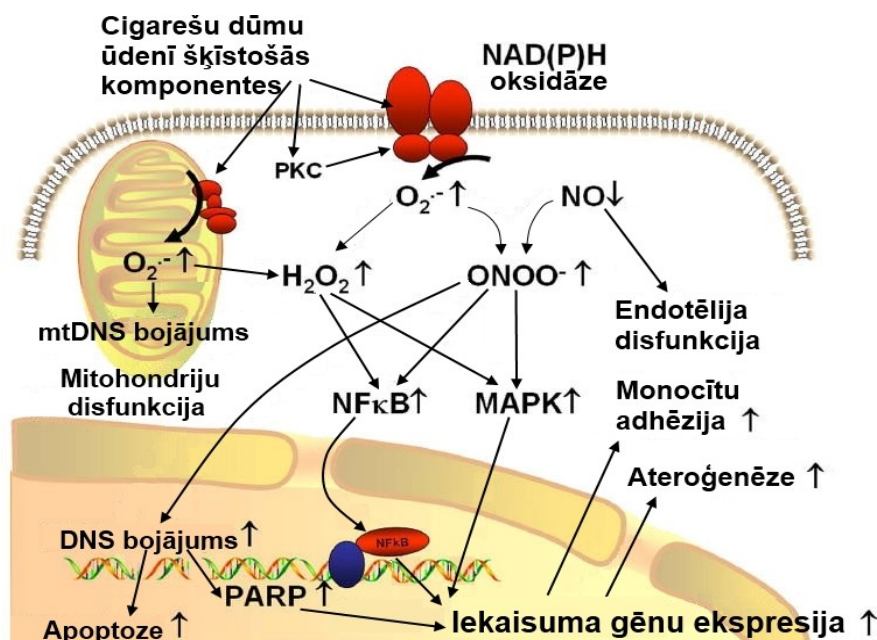
Augstas  $O_2^-$  un  $H_2O_2$  koncentrācijas šūnā aktivē redoks-jutīgos signālceļus, tajā skaitā MAP kināzes un transkripcijas faktoru NF- $\kappa$ B, kas stimulē iekaisuma signālmolekulu (citokīnu, hemokīnu un adhēzijas molekulu) gēnu transkripciju un ekspresiju asinsvadu sienīņā. Producētais  $O_2^-$  saistās ar endoteliālo NO un veido peroksinitrītu ( $ONOO^-$ ), kas būtiski bojā asinsvadu endotēlija funkcionālo integritāti (4.att.). Peroksinitrīts kā oksidējošs un nitrējošs aģents peroksidē šūnu membrānas lipīdus un degradē to struktūru, inaktivē svarīgas metabolās funkcijas mitohondrijos un oksidatīvi bojā nukleīnskābes. Pētījumos ir apstiprinājies, ka smēķētājiem ir augstāka mDNS oksidatīvā bojājuma pakāpe. Bez smēķēšanas, aterosklerozes attīstību sekmē papildus riska faktori, piemēram, hipertenzija, hiperholesterolēmija un hiperhomocisteinēmija. (Csiszar et al. 2009; Pacher et al. 2007).

Palielinātas  $ONOO^-$  koncentrācijas aktivē nukleāro enzīmu PARP-1, kas būtiski veicina NF- $\kappa$ B-atkarīgo iekaisuma gēnu transkripciju. Ekspresētās iekaisuma signālmolekulas stimulē monocītu adhēziju pie endotēlija un iefiltrēšanos šūnās (Orosz et al. 2007). Smēķētājiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, NF- $\kappa$ B aktivitāte ir būtiski palielināta mononukleārajās šūnās sistēmiskajā cirkulācijā un alveolārajos makrofāgos. Cigarešu dūmu inducēto iekaisuma citokīnu atbrīvošanu no monocītiem/ makrofāgiem regulē SIRT1 (NAD<sup>+</sup> atkarīgā proteīnu deacetilāze) un NF- $\kappa$ B savstarpēja mijiedarbība (Orosz et al. 2007). SIRT1 aizsargā endotēlija šūnas no oksidatīvā stresa izraisītas apoptozes. Cigarešu dūmu ietekmē samazinās SIRT1 daudzums un enzīmātiskā aktivitāte, kas notiek vienlaicīgi ar palielinātu NF- $\kappa$ B-atkarīgu citokīnu producēšanu (Yang et al. 2007).

### **Cigarešu dūmu inducēta PARP-1 aktivācija**

Nozīmīgs mehānisms, kas mediē endoteliālā oksidatīvā stresa kaitīgos efektus, ir poli-ADF-ribozes polimerāzes-1 (PARP-1, eikariotu šūnu kodolā esošs enzīms) aktivācija. Aktivēts PARP darbojas kā nespecifisks, oksidantu ierosināts efektors dažādos patofizioloģiskos stāvokļos, kas saistīti ar paātrinātu kardiovaskulāro novecošanos. Cigarešu dūmu komponentes inducē PARP aktivitāti arī alveolu epitēlija šūnās (Kamp et al. 2001). PARP piedalās gēnu transkripcijas regulācijā daudzos šūnu tipos, it īpaši, tam ir nozīmīga

loma NF- $\kappa$ B regulētajā iekaisuma citokīnu ekspresijā (Chiarugi, Moskowitz 2003). NF- $\kappa$ B subvienībās ir atrastas poli-ADF-ribozi saistošas domēnes. Medikamenti, kas inhibē PARP-1 aktivitāti, samazina arī NF- $\kappa$ B-atkarīgo TNF $\alpha$  transkripciju un novērš endoteliālo adhēzijas molekulu sICAM-1 un sE-selektīna gēnu ekspresiju (Sharp et al. 2001).

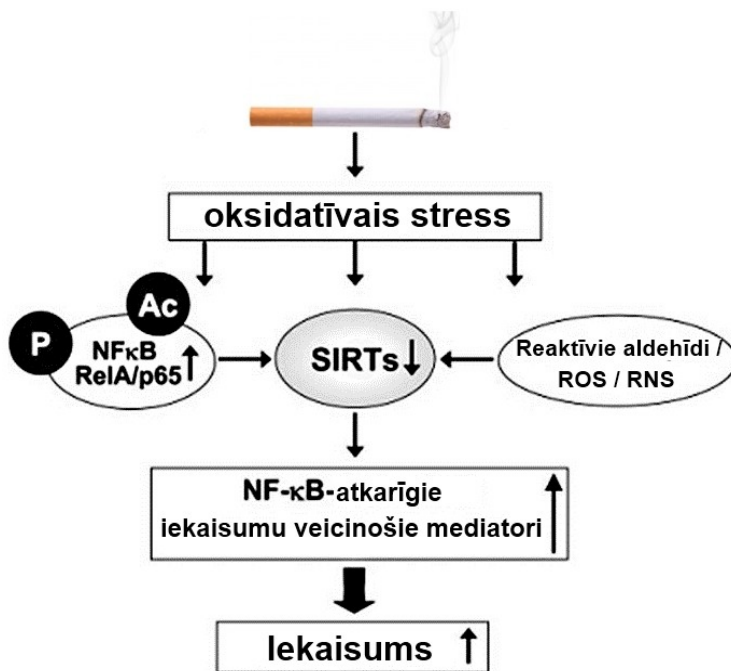


4.attēls. Cigarešu dūmu hidrofilo komponentu ierosināts iekaisuma process asinsvada sienā (Csiszar et al. 2009)

#### SIRT1 nozīme NF- $\kappa$ B inaktivācijā un iekaisumu veicinošo signālmolekulu sekrēcijā

Cigarešu dūmu vienā izpūtienā (*puff*) ir konstatēti  $10^{15-17}$  oksidanti/ brīvie radikāļi un ap 4700 dažādu ķīmisku savienojumu (skat. 1.1. un 1.2.3. nodaļas). Plaušu audu makrofāgi nodrošina cigarešu dūmu izraisītas iekaisuma reakcijas ar NF- $\kappa$ B-atkarīgām dažādu iekaisumu veicinošo signālmolekulu (GM-CSF, GCP-2, MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) palielinātu ekspresiju. Fizioloģiski normālos apstākļos SIRT1 piesaistās pie NF- $\kappa$ B subvienības RelA/p65 un deacetilē to pie lizīna 310 (Lys310) atlikuma, tādējādi inhibējot gēnu transkripciju. SIRT1 piedalās arī citu NF- $\kappa$ B-atkarīgo mediatoru (MMP-1, MMP-9, MMP-12) regulācijā, un inhibē arī citu transkripcijas faktoru (p53, FOXO3/4) acetilēšanu. Bez tam, SIRT1 enzimatiskā aktivitāte samazina cigarešu dūmu ierosinātu IL-8 and TNF- $\alpha$  atbrīvošanu no monocītiem sistēmiskajā cirkulācijā (Yang et al. 2007).

Cigarešu dūmos esošie oksidanti (reaktīvie aldehīdi, ROS un RNS) izmaina  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$  attiecību un oksidatīvi modificē SIRT1 proteīnu, un tādējādi rada tā neefektīvu mijiedarbību ar citiem signālceļa komponentiem. Oksidatīvais stress inhibē deacetilāzes aktivitāti, kas sekmē RelA/p65 acetilēšanu, fosforilēšanu un NF- $\kappa$ B aktivitāti. Acetilēts Lys310 varētu veidot platformu, kur pievienoties bromo-domēnu saturošam proteīnam, kas ir nepieciešams, lai RelA/p65 transkripcijas aktivitāte būtu pilnīga (Yeung et al. 2003). Tātad, oksidatīvā stresa ietekmē tiek izjaukts RelA/p65 un SIRT1 komplekss un NF- $\kappa$ B aktivitāte izraisa iekaisuma citokīnu producēšanu un atbrīvošanu (5.att.).



5.attēls. Cigarešu dūmu ierosināta iekaisumu veicinošo mediatoru atbrīvošana caur sirtuīna-NF- $\kappa$ B- RelA/p65 mijiedarbību (Yang et al. 2007)

#### 1.2.4. Smēķēšanas akūtā efekta inducēts oksidatīvais stress un iekaisuma reakcijas

Cigarešu dūmu akūtais efekts veicina neitrofilu un makrofāgu aktivāciju un hemotaksi. Cilvēka un dzīvnieku pētījumos ir noskaidrots, ka neitrofili tiek aktivēti jau pēc pirmajiem cigarešu dūmu ievilcieniem (*puffs*). Smēķēšana akūti ierosina alveolāro makrofāgu skaita palielināšanos plaušu audos. Vienas stundas laikā pēc cigaretes izsmēķēšanas palielinās epitēlija šūnu caurlaidība, un šūna atgriežas normālā funkcionālā stāvoklī 24 stundu laikā. Epiteliālās barjeras bojājums var potencēt nelabvēlīgo aģentu iedarbību plaušu audos. Smēķēšanas akūtā efekta rezultātā tiek inhibētas fibroblastu funkcijas, kas ir nozīmīgas atjaunošanās procesos audos. Tātad, smēķēšana akūti palielina lokālu iekaisumu, ko raksturo palielināts neitrofilu un makrofāgu skaits plaušu audos, samazina atjaunošanās mehānismus un epiteliālās barjeras aizsargfunkciju (Tardif et al. 1990).

Cigarešu dūmu komponentes pastiprina neitrofilās elastāzes aktivitāti bronhos. Arī perifērajā asinsritē neitrofilās elastāzes aktivitāte pieaug nekavējoties un vēl stundu pēc cigaretes izsmēķēšanas. Savukārt, leikotriēnu B<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> un E<sub>4</sub> koncentrācijas perifērajā asinsritē arī nekavējoties palielinās un turpinās vēl 20 min. pēc cigaretes izsmēķēšanas (Tardif et al. 1990).

Cigarešu dūmi akūti aktivē epitēlija šūnas un endotēlija šūnas sekretēt palielinātā daudzumā IL-8, kas, savukārt, aktivē neitrofilus. Vairāki autori ir ziņojuši, ka smēķēšanas akūtam efektam ir supresējoša ietekme uz eozinofilu skaitu un dažiem iekaisuma mediatoriem – TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  un IL-2 *in vitro* (Ouyang et al. 2000; Tardif et al. 1990; van der Vaart et al. 2004). Šo supresējošo ietekmi, iespējams, nodrošina cigarešu dūmos esošais vai plaušu audos hēma oksigenāzes-1 (HO-1) producēts oglekļa monoksīds (CO) (Chapman et al. 2001; Morse, Choi 2002). Tā pat arī IL-6 koncentrācijas izmaiņas plazmā netika novērotas pēc izsmēķētas cigaretes, kas rosina domāt, ka akūtai smēķēšanai ir inhibējoša ietekme bronhos tikai lokāli, un citu šūnu tipu sekretētais IL-6 nodrošina nemainīgu koncentrāciju plazmā (van der Vaart et al. 2004).

Cigarešu dūmu ierosināta ONOO<sup>-</sup> pastiprināta veidošanās sekmē lipīdu peroksidācijas produktu 8-izoprostāna koncentrācijas palielināšanos izelpas gaisa kondensātā 15 minūtes pēc cigaretes izsmēķēšanas. Savukārt, plazmā lipīdu peroksidācijas produkta F<sub>2</sub>-izoprostāna koncentrācija nemainās, iespējams tādēļ, ka hroniskiem smēķētājiem jau ir augstāka F<sub>2</sub>-izoprostāna koncentrācija cirkulācijā, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Montuschi et al. 2000). Hroniskiem smēķētājiem ir palielinātas antioksidatīvo enzīmu koncentrācijas alveolās.

Analizējot oksidatīvā stresa marķieru daudzumu, bronhoalveolārajā skalojumā (BAL) konstatē palielinātu superoksīda atbrīvošanu no leukocītiem, bet plazmā ir palielinātas tiobarbiturskābes reaktīvo substanču (TBARS) koncentrācijas (Rahman et al. 1996).

Veselos audos vairāk par 90% ir sastopama glutaciona reducētā forma, un mazāk par 10% ir glutaciona oksidētā forma. Tādēļ reducētā/oksidētā glutaciona attiecība (GSH/GSSG) audos atspoguļo oksidantu un antioksidantu līdzsvaru. Akūtas smēķēšanas ietekmē šī attiecība samazinās, jo samazinās GSH, bet palielinās GSSG koncentrācija. Palielinātas lipīdu peroksidācijas produktu koncentrācijas izelpas gaisā un plazmā (klīniskos pētījumos) (Montuschi et al. 2000; Rahman et al. 1996), BAL un plaušu audos (dzīvnieku eksperimentos) (Aoshiha et al. 2003) norāda uz šūnu membrānu taukskābju bojājumiem akūtas smēķēšanas rezultātā. Lai gan oksidatīvā stresa marķierus var noteikt BAL, plaušu audos un asins paraugos, tomēr izelpas gaiss ir pirmais analizējamais materiāls, kurā var noteikt šos marķierus. Visos izmeklējamajos materiālos novēro samazinātu GSH daudzumu, kurš palielinās pēc vairākām stundām, kas norāda, ka GSH aizsargā šūnas pret cigarešu dūmu ierosinātu oksidatīvo stresu (van der Vaart et al. 2004).

Tātad, akūtas smēķēšanas ietekmē nekavējoties palielinās oksidatīvā stresa marķieri, kas izraisa šūnu membrānu bojājumus. Līdzsvaram starp GSH un GSSG koncentrācijām ir nozīmīga loma plaušu audu akūtas aizsardzības nodrošināšanā pret cigarešu dūmos esošajiem oksidantiem. GSH/GSSG attiecība parasti tiek izmantota šūnu toksicitātes novērtēšanai (van der Vaart et al. 2004).

### **1.2.5. Nikotīna ietekme uz imūnšūnu aktivāciju**

Nikotīns ir viena no cigarešu dūmos esošajām komponentēm, kas tiek uzskatīta par aterosklerozes attīstības riska faktoru. Nikotīna-jutīgie acetilholīna (nACh) receptori, ko aktivē nikotīns, ir plaši lokalizēti centrālajā un perifērajā nervu sistēmā un ir iesaistīti signālu pārvadē skeleta neiromuskulārajās sinapsēs, veģetatīvajos ganglijos un galvas smadzeņu struktūrās. Bez tam, arī ne-neironālas izcelsmes šūnas – monocīti, dendrītiskās šūnas, endoteliocīti, epitēlija šūnas u.c. ekspresē nACh receptorus (Conti-Fine et al. 2000; Davies et al. 1982; Wang et al. 2001). Tomēr, nikotīna ietekme uz imūnšūnām ir nepilnīgi izpētīta un pretrunīga. Daži pētnieki ir pierādījuši, ka nikotīns veicina iekaisuma reakcijas (Furie et al. 2000; Totti et al. 1984), savukārt, citos pētījumos tiek ziņots, ka nikotīnam piemīt imūnsupresējoša ietekme, lai gan šāds efekts tiek sasniegts ar augstākām nikotīna

koncentrācijām, nekā ir konstatēts smēķētāju asinsritē (Matsunaga et al. 2001). Augstai nikotīna koncentrācijai piemīt citotoksiska ietekme, ko nav iespējams novērst ar nACh receptoru antagonistiem (Aicher et al. 2003). Neskatoties uz minētajām pretrunām, ir pierādījumi, ka nikotīns caur nACh receptoru aktivāciju ierosina gan nespecifiskās, gan adaptīvās imūnatbildes iesaistīšanos aterosklerotisko pangu attīstībā un destabilizācijā. Šajās imūnreakcijās nozīmīgu lomu spēlē asinsvada sienīnā esošās antigēnu prezentējošās dendrītiskās šūnas. Monocīti un dendrītiskās šūnas ekspresē virsmas molekulas, stimulē T-šūnu proliferāciju un citokīnu producēšanu. Nikotīna aktivētā adaptīvā imūnreakcija stimulē dendrītisko šūnu iemājošanu aterosklerotisko bojājumu vietās (Aicher et al. 2003; Hansson 2001).

Aicher et al. (2003) pētījumā izmantoja nikotīna šķīdumu, kura koncentrācija ( $10^{-8}$  un  $10^{-7}$  mol/L) ir tādi pati, kā smēķētāju plazmā, un konstatēja maksimālu imūnstimulējošu iedarbību. Tā kā ateroģenēze attiecas uz nespecifiskām un adaptīvām imūnreakcijām, tad tiek uzskatīts, ka nikotīna aktivētās dendrītiskās šūnas veicina T-šūnu rekrutēšanu un iekaisuma reakcijas paātrināšanos. Aktivētas dendrītiskās šūnas ekspresē kostimulatoro proteīnu CD40, kas inducē IL-12 producēšanu, kā rezultātā veidojas aterosklerotisks bojājums un plātnišu destabilizācija asinsvados (Aicher et al. 2003).

Nikotīns dendrītiskajās šūnās aktivē vairākas kināzes - ERK1/2, p38 MAPK un Akt, no kurām p38 MAPK aktivitāte ir saistīta ar lipopolisaharīda (LPS) inducēto kostimulatoro molekulu ekspresiju caur NF- $\kappa$ B aktivāciju (Ardeshna et al. 2000).

Tā kā cigarešu dūmi satur vairāk kā 4700 ķīmisku savienojumu, tad nav iespējams paredzēt nikotīna fizioloģisko ietekmi šajā ķīmisko savienojumu kompleksā. Lai gan ir noskaidrots, ka nikotīnam piemīt imūnstimulējoša ietekme, ir pierādīts citu, dūmos esošo vielu toksiskums uz dendrītiskajām šūnām, piemēram, kadmija un brīvo radikāļu ietekme (Powell 1998). Cigarešu dūmu kopējais jeb ģeneralizētais efekts uz organisma šūnu funkcijām var atšķirties no tā, kāds tas ir tikai no nikotīna ietekmes.



### 1.3. Endoteliālās disfunkcijas izcelsmes mehānismi

Vazodilatorās funkcijas bojājums ir viena no agrīnajām aterosklerotisko izmaiņu izpausmēm asinsvados. Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka gan aktīva, gan pasīva smēķēšana ir saistīta ar samazinātu vazodilatācijas kapacitāti asinsvados. Cigarešu dūmos esošās komponentes samazina endotēlija atkarīgo vazodilatāciju mikrovaskulārajā un makrovaskulārajā – koronārās un pleca artērijas gultnēs (Barua et al. 2003; Ijzerman et al. 2003).

Viens no galvenajiem aterosklerotisko izmaiņu dilatējošiem faktoriem ir slāpekļa oksīds (NO), kura sintēze notiek endotēlija šūnās. Redoks reakcijā endoteliālā NO sintāze (eNOS) šķēļ L-arginīnu, kura produkti ir NO molekula un L-citrulīns. Šīs reakcijas norisei ir nepieciešams skābeklis,  $Ca^{2+}$ /kalmodulīna komplekss, koenzīms NADP un kofaktors tetrahidrobiopterīns ( $BH_4$ ) (Khazaei et al. 2008). Daudzos *in vitro* pētījumos, kur izmantoja cigarešu dūmu ekstraktu vai izolētu tā komponenti, piemēram, nikotīnu, noskaidroja to koncentrācijas korelāciju ar samazinātu NO bioaktivitāti. Cigarešu dūmi satur lielu skaitu dažādu ķīmisku savienojumu, kuru metabolisms cilvēka organismā nav zināms, tāpēc cigarešu dūmu iedarbības izpēte uz cilvēka organismu ir apgrūtināta. Bieži vien *in vitro* pētījumos endotēlija šūnas, kuras iegūtas no nesmēķētāju centrālās vēnas un/vai koronārās artērijas, tiek inkubētas kopā ar smēķētāju serumu. Tādā veidā iegūtie rezultāti parāda, ka smēķētāju serumā esošās ķīmiskās komponentes no cigarešu dūmiem izmaina eNOS enzīma ekspresiju un aktivitāti, kā rezultātā endotēlija šūnās samazinās NO bioaktivitāte (Barua et al. 2003).

Par proteīnu oksidatīvā bojājuma marķieri tiek izmantots peroksinitrīts – spēcīgs oksidants, kas veidojas, NO spontāni reaģējot ar superoksīdu. Peroksinitrīts, reaģējot ar proteīnu tirozīnu atlikumiem, veido nitrotirozīnus. Peroksinitrīts oksidē tetrahidrobiopterīnu ( $BH_4$ ) līdz biopterīnam, tādējādi izraisot eNOS atvienošanu, kā rezultātā samazinās NO bioaktivitāte un papildus tiek ģenerēti ROS (Cai, Harrison 2000; Yoshie, Ohshima, 1997).

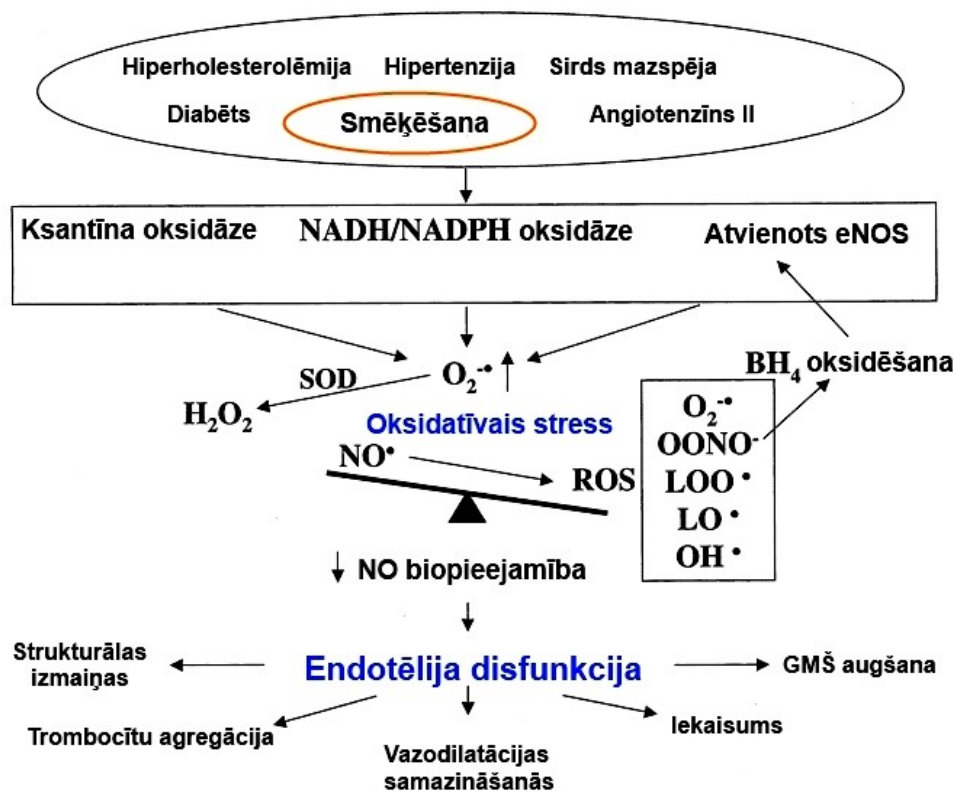
Fizioloģiski normālos apstākļos NO ir ne tikai vazomociju regulējoša molekula, bet tai piemīt spēja arī samazināt trombocītu aktivāciju un agregāciju, adhēzijas molekulu ekspresiju, trombocītu un monocītu adhēziju pie endotēlija, zema blīvuma lipoproteīna (ZBL) oksidēšanu un gludo muskuļu šūnu proliferāciju (Khazaei et al. 2008). Tādējādi, bojātai eNOS enzīmātikajai aktivitātei un samazinātai NO biopieejamībai ir gan primāra, gan sekundāra ietekme uz aterosklerozes un trombozes veicināšanu un attīstību.

### 1.3.1. BH<sub>4</sub> oksidēšana un eNOS aktivitātes inhibīcija

Cigarešu dūmos esošie brīvie radikāļi NO<sup>•</sup> un O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, reaģējot savā starpā, veido spēcīgu oksidantu peroksinitrītu (ONOO<sup>-</sup>). Bez tam, darvas frakcijā esošo tādu polihidroksiaromātisko savienojumu kā katehola un 1,4-hidrokvinaona pašoksidēšanās inducē O<sub>2</sub><sup>•-</sup> producēšanu plaušu audos, kas, savukārt, reaģē ar cigarešu dūmu gāzes frakcijā esošo NO<sup>•</sup> un veidot ONOO<sup>-</sup> (Yoshie, Ohshima, 1997). Augstas ONOO<sup>-</sup> koncentrācijas izraisa pastiprinātas oksidatīvas reakcijas audos ar sekojošu asinsvadu audu bojājumu. Asinsvadu bojājumu raksturo antioksidantu kapacitātes samazināšanās, lipīdu peroksidācija, proteīnu nitrozilēšana, endotēlija šūnu aktivācija un iekaisumu veicinošo citokīnu ekspresija, imūnšūnu adhēzija un iefiltrēšanās asinsvada sieniņā (Hazen, Heinecke 1997; Heitzer et al. 2000; van der Veen et al. 2009; Yanbaeva et al. 2007; Yoshie, Ohshima, 1997).

Izmantojot spektrofotometrijas analīzi ir noskaidrots, ka ONOO<sup>-</sup> ar augstu afinitāti oksidē BH<sub>4</sub> līdz dihidrobiopterīnam (BH<sub>2</sub>) un biopterīnam, tādējādi samazinās BH<sub>4</sub> bioizmantojamība un notiek enzīma eNOS atvienošana. Atvienots eNOS lielos daudzumos generē O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Lai gan NO producēšanas apjoms var palikt nemainīgs, bet tā bioizmantojamība samazinās, jo superoksīds saistās pie NO un veido peroksinitrītu lielos daudzumos (6.att.). BH<sub>4</sub> ir kritiski nozīmīgs eNOS aktivitātes kofaktors NO producēšanai un kalpo kā elektronu donors L-arginīna hidroksilēšanai *jeb* L-arginīna pievienošanai pie eNOS (Cai, Harrison 2000). Endoteliocītu funkcijas bojājums ir iemesls samazinātai endotēlija atkarīgai vazodilatācijai hroniskiem smēķētājiem (Kato et al. 1999). Heitzer et al. (2000) pētījumā hroniskiem smēķētājiem, intravenozi ievadot BH<sub>4</sub>, konstatēja, ka būtiski uzlabojas acetilholīna (Ach) inducēta endotēlija atkarīgā vazodilatācija. Savukārt, kontroles grupai nesmēķētājiem izmaiņas vazodilatācijā pēc BH<sub>4</sub> ievadīšanas netika iegūtas. BH<sub>4</sub> intravenoza ievadīšana uzlabo endotēlija atkarīgo vazodilatāciju arī tādu slimību gadījumos, kā hiperholesterolemija un cukura diabēts, kad ir palielināta superoksīda producēšana asinsvadu sieniņā (Heitzer et al. 2000).

Superoksīds nav vienīgais oksidants, kurš var reaģēt ar NO. Lipīdu radikāļi (LO<sup>•</sup>, lipīdu alkoksils un LOO<sup>•</sup>, lipīdu peroksils) arī var reaģēt ar NO, veidojot attiecīgi LONO un LOONO, un veicināt eNOS atvienošanu (O'Donnell et al. 1997) (6.att.). Ja oksidētu ZBL pievieno koronāro artēriju izolātam, tiek inhibēta endotēlija atkarīgā vazodilatācija, jo ZBL oksidēšana izraisa linolēna hidroperoksila un alkoksila radikāļus, kuri var reaģēt ar NO (Tanner et al. 1991).



6. attēls. Oksidatīvā stresa inducētas endoteliālās disfunkcijas attīstības mehānismi  
(Cai, Harrison 2000)

### 1.3.2. Arginīna metabolisma izmaiņas un tā transportiera CAT1 modifikācija

Arginīna normāla iekļūšana šūnā un metabolisma nodrošināšana ir būtiska turpmākai NO sintēzei endotēlija šūnās. Šajā sakarā, katjonu aminoskābju transportieris-1 (CAT1) ir viens no galvenajiem endoteliocītu transportieriem, kas nodrošina normālu arginīna iekļūšanu šūnā. CAT1 ir membrānas proteīns, kas atrodas endoteliocītu kaveolās un veido funkcionālu vienību ar enzīmu eNOS šūnas membrānā. Zhang et al. (2006) pētījumā tika atklāts, ka cigarešu dūmi akūti samazina L-arginīna transportu endotēlija šūnās un hroniski samazina gan L-arginīna transportu, gan CAT1 mRNS. Iespējams, notiek CAT1 pēctranslācijas modifikācija, ko mediē proteīnkināze C (PKC) un cigarešu dūmos esošie ūdeņraža radikāļi un  $\alpha, \beta$ -nepiesātinātie aldehīdi, kuriem ir augsta reaģētspēja ar tioliem, veidojot sulfhidril-ētera savienojumus (Zhang et al. 2006).

Bez ietekmes uz arginīna transportu, cigarešu dūmu ierosināts oksidatīvais stress palielina intracelulārā asimetriskā dimetilarginīna (ADMA) saturu endoteliocītos, kas ir endogēns eNOS inhibitors. Arginīna metilācijas produkts ADMA tiek uzskatīts par oksidatīvā

stresa marķieri un vienu no endoteliālās disfunkcijas marķieriem, jo ir raksturīgākais visu trīs tipu NOS inhibitors. Pētījumos ir parādīta paaugstinātas ADMA koncentrācijas saistība ar vaskulārām slimībām un kardiovaskulārajiem riska faktoriem – hiperholesterolemiju, cukura diabētu un insulīna rezistenci, kā arī negatīva korelācija starp ADMA un endotēlija atkarīgo vazodilatāciju, tādēļ ADMA tiek uzskatīts par prognostisku kardiovaskulāro slimību riska faktoru (Anderssohn et al. 2010).

Oksidatīvais stress inhibē dimetilargināzes (DDAH) aktivitāti, līdz ar to stimulē ADMA producēšanu. DDAH enzīma aktīvā saite satur cisteīna atlikumu (Cys-249), kas reaģē ar brīvajiem radikāļiem un smago metālu joniem, tādējādi inhibējot enzīma aktivitāti. Rezultātā uzkrājas ADMA, kas supresē NO sintēzi. Fizioloģiski normālos apstākļos DDAH katalizē ķīmisku reakciju, kuras rezultātā veidojas dimetilamīns un L-citrulīns. DDAH degradē metilarginīnus, tajā skaitā ADMA, tādējādi novēršot eNOS aktivitātes samazināšanos. DDAH aktivitātes inhibīcija izraisa metilarginīnu uzkrāšanos, NO sintēzes inhibīciju un vazokonstrikciju (Cooke, 2000).

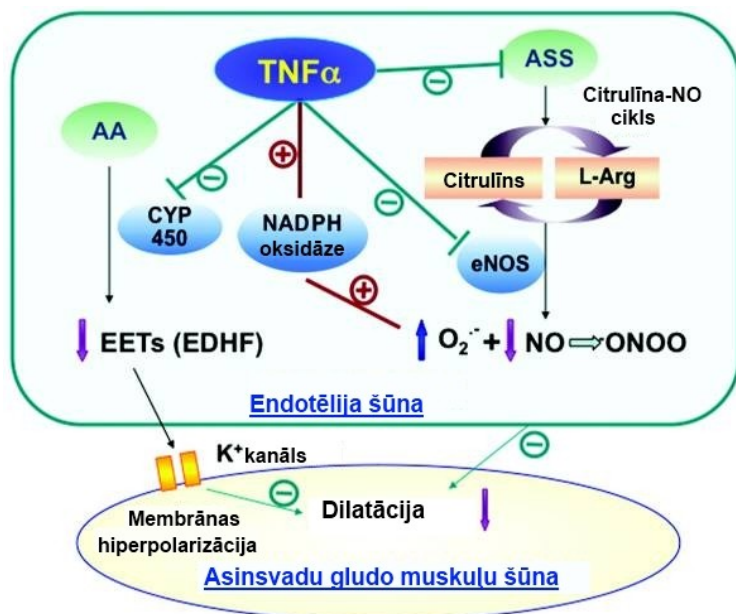
### **1.3.3. TNF- $\alpha$ loma endotēlija disfunkcijas un asinsvadu patoģenēzes attīstībā**

Epidemioloģisko pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka organisma novecošanās, smēķēšana, audu mehāniskais bojājums, dislipidēmija un hiperglikēmija ierosina iekaisumu veicinošas reakcijas, tajā skaitā, iekaisuma citokīnu ekspresiju un oksidatīvā stresa reakcijas, izraisot asinsvadu audos strukturālas un funkcionālas izmaiņas, piemēram, cirkulējošo imūnsūnu iefiltrēšanos un trombocītu agregāciju, kas rezultējas ar endoteliālās disfunkcijas attīstību un asinsvadu bojājumu (Zhang et al. 2009).

Uzkrātā zinātniskā pieredze rāda, ka iekaisumu veicinošā citokīna TNF- $\alpha$  palielināta koncentrācija samazina endotēlija vazodilatējošās funkcijas un piedalās makro- un mikrocirkulācijas asinsvadu bojājuma veidošanā. Ilgstoši lietojot TNF- $\alpha$  inhibitorus, uzlabojas endotēlija atkarīgā vazodilatācija pretestības asinsvados, kā arī samazinās iekaisuma signālmolekulu, galvenokārt, ICAM-1, gēnu ekspresija (Bruunsgaard et al. 2000; Csiszar et al. 2007).

Endotēlijs ir funkcionāla, relatīvi inerta barjera starp asinsvada sienīņu un asins plūsmu. Endotēlija šūnām piemīt vairākas funkcijas. Tās piedalās fibrinolīzes, koagulācijas, asinsvadu tonusa un angiogēnēzes regulācijā, un imūnreakciju veidošanā. Endotēlijs modulē

asinsvadu relaksāciju, sintezējot un atbrīvojot NO, prostaciklīnu (PGI<sub>2</sub>) un hiperpolarizējošo faktoru (EDHF). Fizioloģiski normālos apstākļos endotēlija izcelsmes NO producēšanu nodrošina citrulīna-NO cikls, ko regulē arginīna-sukcināta sintāze (ASS). eNOS enzimatiskā aktivitāte mediē L-arginīna konvertēšanu par L-citrulīnu, un ASS katalizē arginīna reģenerāciju caur citrulīna-NO ciklu. TNF- $\alpha$  samazina ASS mRNS ekspresiju, kas rezultējas ar samazinātu NO producēšanu (Goodwin et al. 2007).



## 7.attēls. TNF- $\alpha$ loma endotēlija disfunkcijas attīstībā

(Zhang et al. 2009)

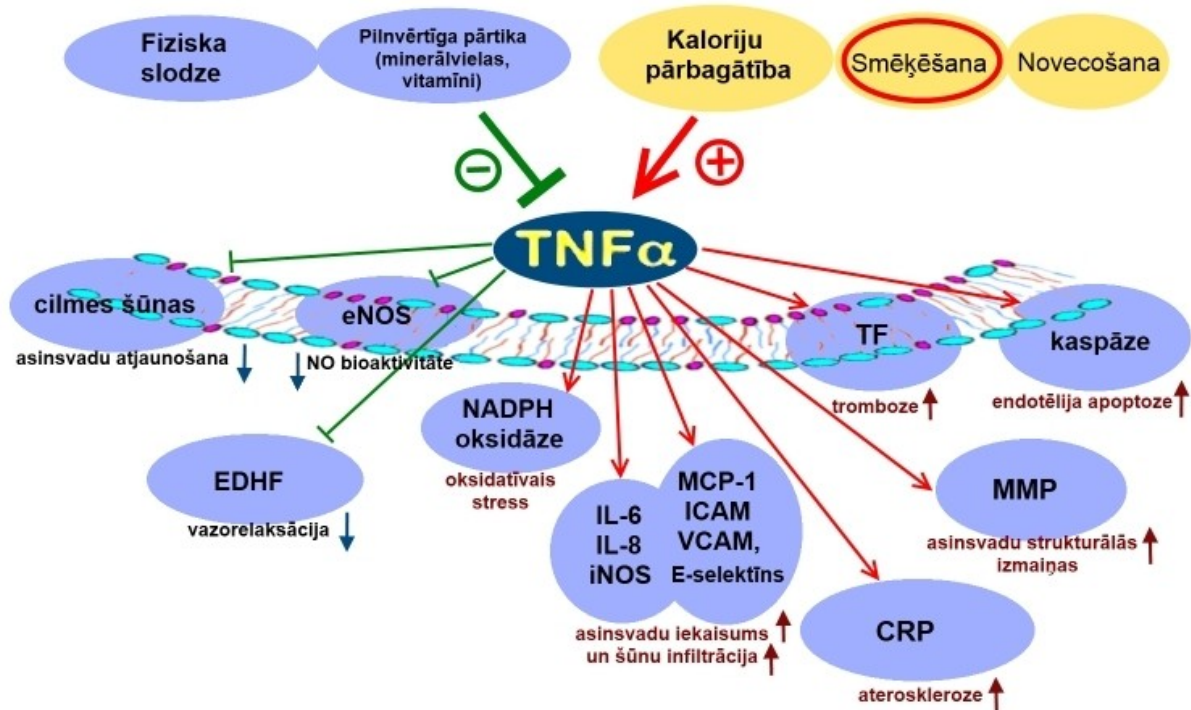
Par endotēlija izcelsmes hiperpolarizējošiem faktoriem (EDHF), kas nodrošina asinsvadu relaksāciju, tiek uzskatīti K<sup>+</sup> joni, epoksieikosatriēnskābe (EET) un ūdeņraža peroksīds (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fizioloģiskās koncentrācijās (Fitzgerald et al. 2005). EET tiek sintezēts endoteliocītos no arahidonskābes, piedaloties citohroma P450 oksigenāzei. Lielas TNF- $\alpha$  koncentrācijas inhibē CYP450 proteīna ekspresiju un tā enzimatisko aktivitāti, tādējādi samazinot EET sintēzi un EDHF mediētu vazodilatāciju (Kessler et al. 1999) (7.attēls).

Tādi riska faktori kā **smēķēšana**, dislipidēmija, aptaukošanās un diabēts ierosina išēmisku sirds slimību, kuras raksturojoša pazīme ir koronāro asinsvadu bojājums. Minētajiem riska faktoriem ir kopīgs mehānisms, kas modulē TNF- $\alpha$  signālceļus. Aktivējoties dziļās glikēšanās galaproduktu receptoriem (RAGEs) (ligands ir AGEs), LOX-1 receptoriem (ligands ir oxZBL) un NF- $\kappa$ B signālsistēmai, tiek stimulēta TNF- $\alpha$  ekspresija un tā

koncentrācijas palielināšanās gan lokāli audos, gan sistēmiskajā cirkulācijā, kas tālāk ierosina iekaisuma citokīnu un hemokīnu gēnu ekspresiju. Arī citi iekaisuma citokīni samazina endoteliālā NO producēšanu, kas rezultējas ar trombocītu adhēziju un agregāciju, vazokonstrikciju, asinsvadu gludo muskuļu šūnu proliferāciju un leikocītu adhēziju pie endotēlija virsmas (Willerson, Ridker 2004).

TNF- $\alpha$  mediēta signalizācija pastiprina oksidatīvo stresu asinsvadu sienīnā – aktivē endotēlija šūnas un pastiprina NADPH oksidāzes aktivitāti, iesaistoties vairākām tās subvienībām – gp91<sup>phox</sup>, NOX-1, p47<sup>phox</sup> un p22<sup>phox</sup>. Rezultātā pastiprināti tiek producēts O<sub>2</sub><sup>-</sup>, kas reaģē ar NO un veido ONOO<sup>-</sup>, tādējādi samazinot NO bioaktivitāti un vazodilatācijas spēju. Šāda iekaisumu veidojoša vide rezultējas ar koronāro un perifēro asinsvadu endotēlija disfunkciju (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009). Vairākos pētījumos ir pierādīts, ka palielināta TNF- $\alpha$  koncentrācija būtiski samazina eNOS ekspresiju endoteliocītos, stimulē iekaisuma citokīnu ekspresiju, leikocītu aktivāciju un infiltrāciju, asinsvadu strukturālas izmaiņas, palielinātu koagulāciju un endotēlija šūnu apoptozi (Goodwin et al. 2007; Xia et al. 2006; Zhang et al. 1997) (8.attēls).

TNF- $\alpha$  aktivētā NF- $\kappa$ B transkripcija, kas stimulē iekaisuma citokīnu gēnu ekspresiju, ierosina arī paša TNF- $\alpha$  ekspresiju un stimulē neitrofilus producēt O<sub>2</sub><sup>-</sup>. TNF- $\alpha$  aktivē signālkaskādes caur IKK (NF- $\kappa$ B inhibitora kināze) kompleksu, kas sastāv no IKK $\alpha$  un IKK $\beta$  (Bonizzi et al. 2004; Kumar et al. 2004). Inhibējošais proteīns I $\kappa$ B $\alpha$  tiek fosforilēts, ubikvitinēts un degradēts, atbrīvojot NF- $\kappa$ B, kas translocējas šūnas kodolā. Normālos fizioloģiskos apstākļos iekaisuma reakcijas noslēdzas ar NF- $\kappa$ B piesaistīšanos inhibējošajam proteīnam I $\kappa$ B. Endotēlija šūnās NF- $\kappa$ B aktivitāte stimulē TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 un adhēzijas molekulu gēnu ekspresiju (Russo et al. 2002). NF- $\kappa$ B ierosina TNF- $\alpha$  mediētu signālceļu, lai pastiprinātu oksidatīvo stresu un endotēlija disfunkciju, ko inducē IKK $\beta$  atkarīgais mehānisms, kas var būt saistīts ar iekaisuma un insulīna signālceļiem, kas ir novērots 2.tipa cukura diabēta (2TCD) gadījumā (Zhang et al. 2009).



**8.attēls. TNF- $\alpha$  centrālā loma asinsvadu patoģenēzes attīstībā**

(Zhang et al. 2009).

### 1.3.4. Mieloperoksidāzes enzimatiskās aktivitātes izraisīta endoteliālā disfunkcija un lipīdu modifikācija

#### MPO fizioloģiskā aktivitāte un tā loma iedzimtās imūnsistēmas reakcijās

Asinsritē cirkulējošie neitrofili, monocīti un dažu audu makrofāgu populācijas uzglabā mieloperoksidāzi (MPO) speciālās granulās. MPO katalītiskā aktivitāte ģenerē dažādus reaktīvos oksidantus un difūzus brīvo radikāļu savienojumus, kuriem ir nozīmīga loma invazīvo parazītu un patogēnu likvidēšanā. Zīdītājiem ar MPO deficītu novēro paaugstinātu uzņēmību mikroorganismu izraisītām infekcijām. Tomēr, MPO izcelsmes reaktīvo oksidantu spēja veicināt organisma audu bojājumu caur lipīdu peroksidēšanu un pēctranslācijas proteīnu modifikāciju liecina, ka MPO piedalās plaša spektra hronisku iekaisuma slimību procesos (Zhang et al. 2002).

Leikocītu aktivācijas laikā MPO palielina šūnu elpošanas oksidatīvo potenciālu, izmantojot ūdeņraža peroksīdu kā kosubstrātu, lai veidotu reaktīvos skābekļa savienojumus. Rezultātā tiek ģenerēti liels daudzums spēcīgu oksidējošu savienojumu, kas veicina oksidatīvās pārmaiņas audos (Abu-Soud, Hazen 2000). MPO aktivitātes specifiku raksturo reaktīvo hlorējošo savienojumu, tādu kā hipohlorskābe (HOCl), producēšana. Šiem savienojumiem ir antimikrobiālā aktivitāte, kas nodrošina iedzimtās imūnreakcijas aizsardzību no patogēniem. MPO katalizēta bioaktīvo lipīdu oksidēšana nodrošina papildus aizsargmehānismus. Pētījumos ar pelēm noskaidroja, ka šī enzīma aktivitāte veicina oksidācijas produktu veidošanos no arahidonskābes. Šie oksidanti ir iesaistīti iekaisuma signālkaskāžu uzsākšanā. Pētījumi liecina, ka pārmērīgai MPO aktivitātei ir būtiska loma iekaisuma radītā audu bojāšanā (Nicholls, Hazen 2009).

Cirkulējošais MPO piesaistās pie  $\beta_2$ -integrīniem (CD11b/CD18) uz neitrofilu un monocītu virsmas. MPO piesaistīšanās pie neitrofilu aktivē signāltransdukcijas ceļus p38 MAPK un NF- $\kappa$ B, tirozīna fosforilēšanu, superoksīda producēšanu un palielinātu integrīnu ekspresiju, kas veicina neitrofilu-endoteliocītu saistīšanos. Audu makrofāgi uzņem MPO, kas izraisa citokīnu TNF- $\alpha$  un IFN- $\gamma$  producēšanu un sekmē patogēnu iznīcināšanu. Arī T limfocītos MPO izcelsmes HOCl spēj ierosināt NF- $\kappa$ B aktivāciju, tirozīna fosforilēšanu un sekojošu TNF- $\alpha$  producēšanu. *In vivo* pētījumos iegūtie rezultāti parādīja, ka pēc cigaretes izsmēķēšanas akūti palielinās MPO koncentrācija bronhoalveolārā skalojumā (van der Veen et al. 2009).

### **MPO enzimatiskās aktivitātes izraisīta endoteliālā disfunkcija**

Dažādi eksogēni un endogēni faktori ierosina MPO katalītisko aktivitāti un sekojošu reaktīvo skābekļa un slāpekļa savienojumu ģenerēšanu: 1) iekaisuma signālmolekulas (citokīni, hemokīni, adhēzijas molekulas), brīvie radikāļi un cigarešu dūmos esošais nikotīns un citi ķīmiskie savienojumi aktivē leikocītus, kuri sekretē MPO; 2) oksidētā ZBL daļiņas asinsvada intīmas slānī ierosina monocītu iefiltrēšanos asinsvada sienīnā. Intīmas slānī iekļuvušie monocīti iemājo un nobriest par makrofāgiem, kuri arī var ekspresēt MPO; 3) hemoatraktantie proteīni (IL-8 un MCP-1) "pievilina" cirkulējošos neitrofilus, kuri ar adhēzijas molekulu palīdzību piesaistītās pie endotēlija virsmas tā bojājuma vietās. Piesaistītie leikocīti atbrīvo MPO, kas ar transcitozes palīdzību nonāk subendotēlija telpā, kur ir īpaši labvēlīga mikrovide MPO aktivitātei (Baldus et al. 2001).



Asinsvadu iekaisuma vietās MPO ģenerē zemas HOCl koncentrācijas, kas aktivē endotēlija šūnas un audu faktoru ekspresiju. MPO molekulas ar augstu afinitāti saistās pie endotēlija šūnu glikozaminoglikāniem un transcitozes ceļā iekļūst subendotēlija telpā, kur saistās ar fibronektīnu. Šeit izpaužas MPO katalītiskā aktivitāte, kur endogēnā kosubstrāta  $H_2O_2$  klātbūtnē tas izmanto NO kā substrātu. Rezultātā veidojas slāpekļa oksīda izcelsmes oksidanti un samazinās NO biopieejamība, kas ne tikai izraisa vazokonstrikciju un iekaisuma reakcijas, bet arī asinsvadu šūnu proliferāciju (Abu-Soud, Hazen, 2000; Eiserich et al. 2002; Vita et al. 2004). Endoteliocītos MPO katalizē proteīnu tirozīna atlikumu nitrēšanu, kur fibronektīns ir galvenais mērķa proteīns. Bez tam, MPO oksidē matriksa proteīnus un lipoproteīnus, līdz ar to izmaina asinsvada sieniņas strukturālo integritāti (Baldus et al. 2001; Rudolph et al. 2012). Atrodies subendotēlija telpā, MPO ierosina IL-6 un IL-8 sekrēciju un stimulē arī skābekļa reaktīvo savienojumu ģenerēšanu (van der Veen et al. 2009).

Klīnisko pētījumu rezultāti ir apliecinājuši, ka cirkulējošā MPO koncentrācija kalpo kā stabils un neatkarīgs endoteliālās disfunkcijas priekšvēstnesis. Bez tam, seruma MPO koncentrācija negatīvi korelē ar endotēlija atkarīgās vazodilatācijas rādītājiem (van der Veen et al. 2009). MPO mediēta endotēlija disfunkcija var būt nozīmīga funkcionāla saikne starp oksidācijas procesiem, iekaisuma reakcijām un kardiovaskulārām saslimšanām (Vita et al. 2004). Lai gan MPO izcelsmes oksidanti, tajā skaitā hipohlorskābe, spēlē fizioloģisku lomu saimniekorganisma aizsardzībā, tomēr paša enzīma un tā katalizēto oksidācijas reakciju (tirozilēšana, nitrēšana, halogenēšana) produkti ir identificēti aterosklerotisko bojājumu vietās, kas liecina par to, ka MPO ir patofizioloģiska loma ateroģenēzē. Pētījumos ir apstiprinājies, ka, gan lokālā koronāro artēriju, gan sistēmiskā endoteliālā disfunkcija ir saistīta ar palielinātu kardiovaskulāro slimību risku (van der Veen et al. 2009).

MPO ir katjons proteīns un viegli saistās pie endotēlija šūnām, un ar savu katalītisko aktivitāti samazina NO bioaktivitāti. Hipohlorskābe reaģē ar NOS substrāta arginīna slāpekļa atomu un producē hlorinētus arginīna savienojumus, kas ir visu NOS izoformu inhibitori, tādējādi bojā endotēlija atkarīgo vazodilatāciju. Bez tam, peroksinitrīts atbrīvo cinka jonu no eNOS cinka-tiolāta grupas, tādējādi veic eNOS enzimatisku atvienošanu. Rezultātā eNOS nespēj sintezēt NO, bet tā vietā producē superoksīda anjonu ( $O_2^-$ ), tādējādi palielinot oksidatīvo stresu endotēlija šūnās (Schindhelm et al. 2009; Xu et al. 2006; Zou et al. 2002).

Vēl viens no mehānismiem, kā MPO veicina aterosklerozes attīstību, ir hipohlorskābei modificējot ZBL un ABL molekulas. Modificēti lipoproteīni izmaina imūnšūnu un endoteliocītu funkcijas. Hlorinēts ZBL stimulē monocītus producēt IL-8, kurš ir hemotaktisks

neitrofiliem. Aktivēti neitrofili producē reaktīvos skābekļa savienojumus un sekretē proteolītiskos enzīmus, kas bojā endotēlija šūnas. Hlorinētie ZBL un ABL arī inhibē NO producēšanu endotēlija šūnās un izraisa endoteliocītu disfunkciju (van der Veen et al. 2009).

### **MPO loma aterogēno ZBL savienojumu ģenerēšanā**

MPO ģenerētie reaktīvie savienojumi – hipohlorskābe, hloramīni, tirozila radikāļi un slāpekļa dioksīds oksidē ZBL sastāvā esošās apolipoproteīna ApoB, lipīda un antioksidanta komponentes (Carr et al. 2000). Daudzi no sākotnējās oksidācijas produktiem ir nestabili un kalpo kā reaktīvie starpsavienojumi, kas sekmē tālāku ZBL oksidatīvo modifikāciju. Hipohlorskābe hlorinē ZBL proteīna tirozīna atlikumus, veidojot 3-hlorotirozīnu. Savukārt, peroksinitrīts  $\text{ONOO}^-$ , kas veidojas, NO reaģējot ar  $\text{O}_2^-$ , un MPO ģenerētie reaktīvie slāpekļa savienojumi modificē proteīnu tirozīna atlikumus, pārvēršot tos par 3-nitrotirozīnu. Modificētie tirozīna atlikumi – 3-nitrotirozīns un 3-hlorotirozīns raksturojas kā stabilākie oksidācijas produkti un kalpo kā MPO katalizētas oksidācijas biomarkķieri (Carr et al. 2000; Hazen, Heinecke 1997; Nicholls, Hazen 2009).

Oksidēts ZBL veicina holesterīna uzkrāšanos un ir piemērots substrāts makrofāģiem, lai tie transformētos par putu šūnām. ZBL atrašanās subendotēlija telpā kalpo kā galvenais mērķis, lai asinsvadu šūnu producētie oksidanti to oksidētu, piedaloties tādiem enzīmiem, kā NAD(P)H oksidāzei, ksantīna oksidāzei, lipoksigenāzei, mitohondriālās elpošanas enzīmiem, MPO un atvienotam NOS (Carr et al. 2000).

Smēķētāju elpceļos palielinātā daudzumā ir tiocianāts ( $\text{SCN}^-$ ), gļotādas virsmu aizsargājošs anjons. MPO katalizē  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidēt  $\text{SCN}^-$  par cianātu, kas iekaisuma vietās karbamilē proteīnu lizīna atlikumus un veido karbamillizīnu (homocitrulīnu), tādējādi maina proteīnu struktūru un funkcijas. MPO katalizēta lipoproteīnu karbamilēšana ierosina aterosklerozi veicinošas aktivitātes. Tātad, MPO katalizēta karbamilēšana ir saistošs mehānisms starp smēķēšanu, iekaisuma reakcijām un asinsvadu disfunkciju (Schindhelm et al. 2009; van der Veen et al. 2009).

### **MPO loma disfunkcionālu ABL daļiņu ģenerēšanā**

ABL molekulas apolipoproteīnam ApoA-1 un enzīmiem piemīt pretiekaisuma un antioksidatīvas īpašības. ABL aizsargājošā loma pret MPO mediētu ZBL oksidēšanu un aterosklerotisko procesu uzsākšanu ir nozīmīga, jo ABL enzīmi – acetilhidrolāze un paraoksonāze spēj novērst vai vismaz palēnināt oksidēšanas procesus asinsvada sienīnā.

Neskatoties ABL daļiņām piemīt spēja samazināt adhēzijas molekulu ekspresiju uz endoteliocītu virsmas, inhibēt monocītu adhēziju un iekaisuma šūnu iekļūšanu asinsvada intīmas slānī. Tomēr, dažādu ar metabolo disfunkciju saistītu saslimšanu gadījumos, ABL daļiņas kļūst funkcionāli defektīvas. Disfunkcionālas ABL daļiņas zaudē asinsvadus aizsargājošas īpašības un kļūst par iekaisumu veicinošām molekulām (Kontush, Chapman 2006).

Pētījumos pārliecinoši ir pierādīts, ka MPO enzimatiskā aktivitāte izraisa ABL molekulas disfunkciju (Kontush, Chapman 2006; Shao et al. 2012; Zheng et al. 2004). MPO katalizētā proteīnu oksidēšana izmaina proteīna apoA-1 transportiera ABCA-1 aktivitāti. Specifiskā oksidācija izpaužas kā proteīnu tirozīna atlikuma Tyr-192 hlorinēšana, kas maina proteīnu struktūru, un rezultātā veidojas tāda konformācija, kas traucē apoA-1 saistīties ar ABCA-1 molekulu un stimulēt holesterīna izkļūšanu no šūnas. Fizioloģiski normālos apstākļos ApoA-1 vispirms saistās pie ABCA-1, pēc tam pie lipīdu domēnes un to šķīdina. ABCA-1 eksportē no makrofāgiem holesterīnu, tādējādi veic asinsvadus aizsargājošu funkciju. Tyr-192 specifiskā oksidācija ir apoA-1 molekulas galvenā hlorinēšanas vieta gan cirkulācijā, gan aterosklerotiskā bojājuma vietā esošām ABL (Shao et al. 2012).

ApoA-1 molekula satur specifisku saistīšanās vietu ar MPO proteīnu. Šī saistīšanās ne tikai uztur MPO enzimatisku aktivitāti, bet arī aizsargā šo enzīmu no celulārās uzņemšanas un tālākas degradācijas. Bez tam, MPO atkarīgā modifikācija būtiski palielina ABL molekulas saistīšanās afinitāti priekš MPO, kas veido noslēgtu loku šī enzīma atkarīgai modifikācijai hroniska iekaisuma vietās. Tātad, nitrotirozīna un hlorotirozīna augstas koncentrācijas kalpo kā molekulārais marķieris, kas norāda par MPO būtisku ietekmi uz ABL molekulas oksidatīvu modifikāciju (Zheng et al. 2004).

Salīdzinot ar citiem cirkulācijā esošiem proteīniem, vislielākā 3-nitrotirozīna un 3-hlorotirozīna koncentrācija ir atrodama ABL molekulā, kas statistiski ticami korelē ar samazinātu spēju eksportēt holesterīnu no šūnām. MPO katalizēta ABL modifikācija un bojāta ABCA-1 atkarīgā holesterīna transportēšana no makrofāgiem ir nozīmīgs faktors aterosklerotisko plātnīšu veidošanās un kardiovaskulārās slimības attīstības riskam (Nicholls, Hazen 2009; Zheng et al. 2004). Tomēr, klīnisko pētījumu rezultāti ir apliecinājuši, ka ne tikai samazināta, bet arī paaugstināta ABL koncentrācija serumā var būt saistīta ar kardiovaskulārām saslimšanām, jo ne vienmēr modificēta ABL ir saistīta ar samazinātu tās koncentrāciju cirkulācijā (Nicholls, Hazen 2009).

## 1.4. Smēķēšanas ietekme uz taukaudu endokrīno funkciju

Cigarešu dūmu izraisīts oksidatīvais stress ne tikai oksidē ZBL un ABL molekulas, bet ietekmē arī taukaudu endokrīno funkciju un samazina adiponektīna gēnu ekspresiju. Pastāv hipotēze, ka samazināta adiponektīna koncentrācija ir saikne starp smēķēšanu un ar to saistītām slimībām, piemēram, hipertenziju, KSS un aterosklerozi (Fasshauer et al. 2001).

Adiponektīns ir adipocītu sintezēts specifisks plazmas proteīns, kuram ir nozīmīga loma insulīna darbības regulācijā un enerģijas homeostāzē, un lielas tā koncentrācijas atrodas cirkulācijā (Miyazaki et al. 2003; Tan et al. 2004). Adiponektīns uzlabo insulīna jutību, jo palielina taukskābju oksidāciju, kā rezultātā samazinās taukskābju koncentrācija cirkulācijā un intracelulāro triglicerīdu daudzums aknu un muskuļu audos (Díez, Iglesias 2003). *In vitro* un dzīvnieku pētījumos ir noskaidrots, ka adiponektīns samazina glikoģenēzi aknās un palielina glikozes utilizāciju muskuļu audos. Klīnisko pētījumu rezultāti rāda, ka adiponektīna koncentrācija plazmā negatīvi korelē ar hiperinsulinēmiju un pozitīvi – ar insulīna jutības rādītāju. Lai gan adiponektīna koncentrācija plazmā un gēnu ekspresija taukaudos ir samazināta personām ar aptaukošanos, hipertenziju, 2TCD un KAS, tomēr mijiedarbība starp adiponektīnu un insulīnu nav atkarīga no ķermeņa aptaukošanās (Tan et al. 2004).

### 1.4.1. Adiponektīna loma endotēlija šūnu normālas funkcijas nodrošināšanā

Adiponektīns ir nozīmīgs antiaterogēns un iekaisuma reakcijas kavējošs faktors, kas fizioloģiski normālos apstākļos inhibē asinsvadu gludo muskuļu šūnu proliferāciju, supresē makrofāgu transformēšanos par putu šūnām (Kadowaki et al. 2006), samazina hemokīna IL-8 ekspresiju endotēlija šūnās un supresē citokīnu producēšanu makrofāgos, tādējādi inhibējot iekaisuma procesus agrīnajās aterosklerozes attīstības fāzēs (Díez, Iglesias 2003). Fizioloģiski normālos apstākļos adiponektīns inhibē TNF- $\alpha$  ierosinātu endoteliālo adhēzijas molekulu ICAM-1, VCAM-1 un E-selektīna ekspresiju. Adhēzijas molekulām ir nozīmīga loma monocītu adhēzijai pie endoteliocītiem, kas ir kritiskais solis asinsvadu slimību attīstībā. Adhēzijas molekulu transkripciju nodrošina nukleārais transkripcijas faktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Tiek izvirzīta hipotēze, ka adiponektīns varētu modulēt endotēlija funkcijas, inhibējot NF- $\kappa$ B signālceļus, ko, savukārt, aktivē dažādi iekaisuma citokīni, tajā skaitā TNF- $\alpha$  (Hattori et al. 2008).

Adiponektīns piesaistās pie saviem receptoriem endoteliocītu membrānā un aktivē AMPK signālceļu un stimulē eNOS enzimatisko aktivitāti un NO producēšanu caur šādiem mehānismiem: stabilizē eNOS mRNS, uzlabo eNOS saistīšanos ar Hsp90 un stimulē eNOS fosforilēšanu pie Ser1179 atlikuma (Chen et al. 2003; Wang, Scherer 2008).

Bojāta endotēlija gadījumā cirkulējošais adiponektīns akumulējas asinsvada subendotēlija telpā un specifiski saistās pie kolagēna I, III un V, kuri ir lielā daudzumā asinsvada intīmas slānī (Okamoto et al. 2000). Tā kā adiponektīns kalpo kā pretiekaisuma molekula asinsvada sienīnā, tad tā pazemināta koncentrācija cirkulācijā varētu norādīt uz endotēlija disfunkciju. Samazināta adiponektīna koncentrācija cirkulācijā korelē ar samazinātu endotēlija atkarīgo vazodilatāciju, neatkarīgi no 2TCD esamības. Diabēta pacientiem šī korelācija ir vājāk izteikta, jo diabēta gadījumā endotēlija disfunkcija ir multifaktoriāla un hipoadiponektinēmija tikai daļēji ir saistīta ar bojātu endotēlija šūnu funkciju šiem pacientiem (Tan et al. 2004). Adiponektīna koncentrācijas pozitīva korelācija ar postokluzīvās hiperēmijas izraisītu vazodilatāciju tiek uzskatīts par vienu no endoteliālās funkcijas rādītājiem (Iwashima et al. 2005).

#### **1.4.2. Adiponektīna inhibējošā ietekme uz lipīdu uzkrāšanos asinsvada sienīnā**

Viena no adiponektīna funkcijām ir sekmēt taukskābju oksidēšana, kā rezultātā samazinās brīvās taukskābes cirkulācijā un samazinās triglicerīdu daudzums aknās un muskuļu šūnās, tādējādi uzlabojot šūnu insulīna jutību. Adiponektīna mRNS ekspresiju un sekrēciju stimulē PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*) agonisti (Havel et al. 2002).

Agrīnajā aterosklerozes attīstības stadijā cirkulējošie monocīti piesaistās pie bojāta endotēlija, iefiltrējas subendotēlija telpā un diferencējas par makrofāgiem un šajā periodā palielinās makrofāgu A klases un B klases (CD36) savācējreceptoru ekspresija. Makrofāgu savācējreceptori atpazīst un uzņem šūnā modificētu ZBL (oxZBL). Ar oksidētiem lipīdiem pildītie makrofāgi transformējas par putu šūnām, kuru akumulēšanās asinsvada sienīnā ir agrīna aterosklerotiska bojājuma galvenā pazīme (Schindhelm et al. 2009).

Adiponektīns fizioloģiskās koncentrācijās specifiski samazina savācējreceptora-A1 proteīna ekspresiju, supresējot tā mRNS. (Ouchi et al. 2001). Monocītu transformācijas laikā par makrofāgiem, palielinās arī lipoproteīnu lipāzes (LPL) un apoE daudzums. Adiponektīns

supresē arī LPL mRNS, bet neietekmē apoE un B klases (CD36) savācējreceptoru ekspresiju. Tādēļ, adiponektīns daļēji samazina makrofāgu diferencēšanos, lipīdu akumulāciju un to transformēšanos par putu šūnām (Ouchi et al. 2001; Stengel et al. 1998; Tan et al. 2004).

### 1.4.3. Oksidatīvā stresa ietekme uz adiponektīna koncentrāciju cirkulācijā

*In vitro* pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka adiponektīna ekspresiju taukaudos samazina gan nikotīns, gan arī TNF- $\alpha$ , IL-6 un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Andersson, Arner 2001; Iwashima et al. 2005; Ryden et al. 2002). Arī citi cigarešu dūmos esošie ķīmiskie savienojumi, piemēram, kadmijs, kotinīns, tiocianāts var būt toksiski adipocītiem (Powell 1998).

Reaktīvos skābekļa savienojumus, piemēram, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fizioloģiski normālos apstākļos ģenerē šūnas oksidēšanās-reducēšanās procesos. Iwashima et al. (2005) pētījumā izmantoja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ar koncentrāciju 100  $\mu$ mol/L, kam bija citotoksiska ietekme uz adipocītiem šūnu kultūrā. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samazināja adiponektīna ekspresiju un sekrēciju devas atkarīgā veidā (Iwashima et al. 2005).

Hipoksijas un cigarešu dūmu izraisītais oksidatīvais stress pastiprina arī TNF- $\alpha$  ekspresiju un sekrēciju (Churg et al. 2002), kas ir spēcīgs iekaisuma mediators un supresē adiponektīna ekspresiju un samazina tā koncentrāciju (Fasshauer et al. 2003; Maeda et al. 2001; Suganami et al. 2005). Bez tam, TNF- $\alpha$  taukaudos ierosina lipolīzi, atbrīvo cirkulācijā brīvās taukskābes, kas arī supresē adiponektīna ekspresiju un samazina insulīna jutību šūnās (Ryden et al. 2002). Hroniskas smēķēšanas inducēta nepārtraukta TNF- $\alpha$  producēšana var veicināt hipoadiponektinēmijas attīstību. Pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka cigarešu dūmos esošais nikotīns caur kateholamīnu pastiprinātu atbrīvošanu arī izraisa taukaudu lipolīzi (Andersson, Arner 2001). Neatkarīgi no  $\text{KMI}$  un HOMA-IR indeksa, adiponektīna koncentrācija cirkulācijā smēķētājiem ir zemāka, nekā nesmēķētājiem (Abbasi et al. 2006; Stolzenberg-Solomon et al. 2008), un tā samazinās atkarībā no izsmēķēto cigarešu skaita (Iwashima et al. 2005).

#### 1.4.4. Nikotīna ietekme uz taukaudu metabolismu un adiponektīna gēnu ekspresiju

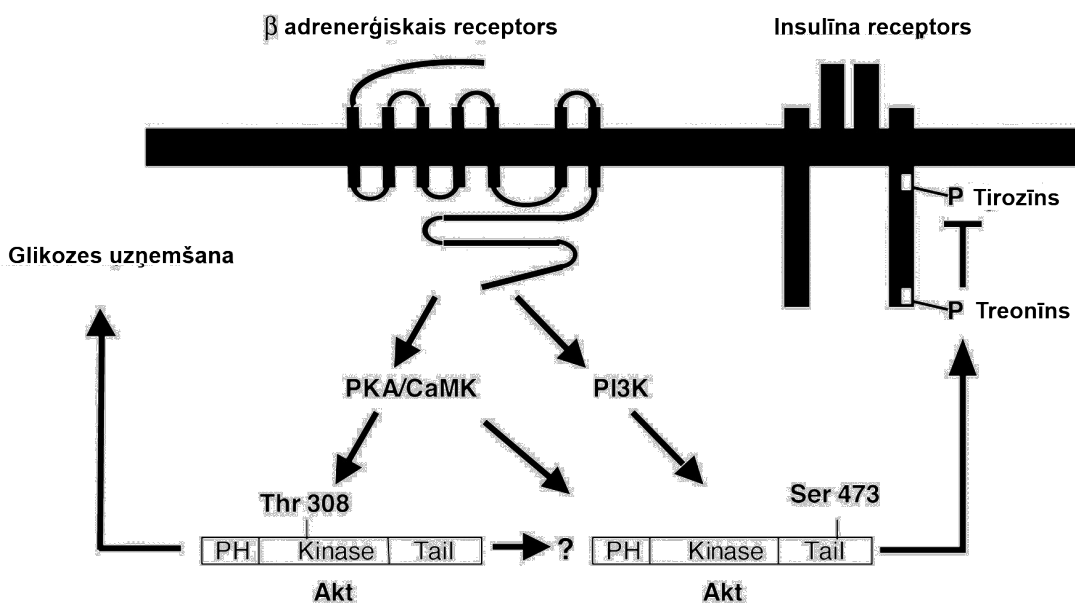
Cigarešu dūmos esošais nikotīns ierosina kateholamīnu, galvenokārt adrenalīna, koncentrācijas palielināšanos cirkulācijā, kas aktivē  $\beta$ -adrenoreceptorus uz adipocītu virsmas un stimulē lipolīzi. Smēķēšanas stimulēto lipolīzi var konstatēt, nosakot cirkulācijā lipīdu metabolītu – brīvo taukskābju un glicerola koncentrācijas. Šādu lipolītisko efektu iegūst arī intravenozi ievadīts nikotīna šķīdums tādā pašā koncentrācijā, kāda ir konstatēta vidējas intensitātes smēķētājam. Starp dažādām organisma sistēmām – metabolajām, kardiovaskulārajām un hormonālajām, taukaudi visjutīgāk reaģē uz nikotīna aktivējošo iedarbību, kas ir apstiprinājies *in vivo* pētījumos (Andersson et al. 1993). Glicerola augstāko koncentrāciju plazmā novēro pēc 30 min. kopš intravenozas nikotīna ievadīšanas. Izsmēķējot vienu cigareti, cirkulācijā konstatē 7 ng/ml nikotīna, un šādu koncentrāciju izmanto *in vivo* pētījumos. Lokāli monitorējot taukaudus ar mikrodialīzes metodi, ir novērots, ka nikotīns stimulē lipolīzi, piesaistoties un aktivējot savus nACh receptorus uz adipocītu virsmas. Tātad, cirkulācijā esošais nikotīns stimulē lipolīzi divējādi. Viens ir klasiskais mehānisms, kad kateholamīni aktivē  $\beta$ -adrenoreceptorus uz adipocītu virsmas, un otrs mehānisms, kad pats nikotīns aktivē nACh receptorus uz adipocītu virsmas (Andersson, Arner 2001).

Pastiprināta taukaudu lipolīze būtiski samazina adiponektīna mRNS ekspresiju, kā rezultātā samazinās adiponektīna koncentrācija cirkulācijā (Iwashima et al. 2005; Fasshauer et al. 2001). Adiponektīna ekspresijas palielināšanās vai samazināšanās var modulēt insulīna jutības attiecīgi palielināšanos vai samazināšanos (Fasshauer et al. 2001). Adiponektīna efekti tiek mediēti caur receptoriem AdipoR1 un AdipoR2 uz miocītu un hepatocītu virsmas, kas veicina AMPK un PPAR- $\alpha$  ligandu aktivitāti. AMPK fosforilē un inaktivē acetyl-CoA karboksilāzi, tādējādi palielina taukskābju transportu mitohondrijos turpmākai  $\beta$ -oksidēšanai (Gil-Campos et al. 2004).  $\beta$ -adrenerģiskā aktivācija sekmē brīvo taukskābju koncentrācijas palielināšanos asinsritē un zema adiponektīna koncentrācija nespēj pietiekami nodrošināt taukskābju oksidāciju, rezultātā tiek bojātas insulīna signālkaskādes insulīna jutīgajos audos, piemēram, tiek inhibēts insulīna receptora substrāts (IRS) (Fasshauer et al. 2001).

$\beta$ -adrenerģiskie agonisti aktivē proteīnkināzes A (PKA) atkarīgo ceļu caur  $G_s$ -proteīnu saistīto receptoru, adenilātciklāzes aktivāciju un palielinātu intracelulārā cAMP līmeni, un rezultātā tiek ierosināta lipolīze (Collins, Surwit 2001; Fasshauer et al. 2001). Lipolīzes ietekmē palielinās brīvo taukskābju koncentrācija, kas inducē akūtu insulīna rezistenci,

palielina bazālo insulīna koncentrāciju un samazina ādas vazodilatāciju personām bez aptaukošanās (de Jongh et al. 2004).

Morisco et al. (2005) izvirzītā hipotēze par  $\beta$ -adrenergiskās stimulācijas mediētu izmainītu insulīna receptora darbības mehānismu ir atspoguļota 9.attēlā. Īslaicīgi stimulējot  $\beta$ -adrenergiskos receptorus, caur PKA un CaMK tiek fosforilēts treonīns 308 un aktivēta Akt, kas sekojoši veicina glikozes uzņemšanu. Savukārt, ilglaicīgi stimulējot  $\beta$ -adrenergiskos receptorus, tiek iesaistīts PI3K atkarīgais ceļš, fosforilēts serīns 473 un aktivēta Akt, kas, savukārt, fosforilē insulīna receptora  $\beta$  subvienības treonīnu. Treonīna fosforilēšana inhibē insulīna inducēto  $\beta$  subvienības tirozīna autofosforilēšanu. Šis mehānisms norāda par bojāta insulīna signālceļa sākotnējo posmu un, tādējādi,  $\beta$ -adrenergisko receptoru inducētu insulīna rezistenci (Morisco et al. 2005). Yamauchi et al. (2001) ziņoja, ka adiponektīna intravenoza ievadīšana pelēm palielināja taukskābju transportu un oksidēšanu muskuļaudos, un rezultātā samazinājās triglicerīdu daudzums muskuļaudos un brīvo taukskābju koncentrācija serumā. Rezultātā uzlabojās insulīna mediēta glikozes uzņemšana miocītos.



9.attēls. Hipotēze par  $\beta$ -adrenergiskās stimulācijas mediētu izmainītu insulīna receptora darbību kardiomiocītā (Morisco et al. 2005)



## 1.5. Smēķēšanas ietekme uz insulīna rezistences attīstību

### 1.5.1. Nikotīna ietekme uz insulīna sekrēciju un funkciju

Vairāku gadu laikā uzkrātie dati ir apliecinājuši, ka hroniskiem smēķētājiem insulīna rezistences attīstības risks ir atkarīgs no dienā izsmēķēto cigarešu skaita (Eliasson, 2003; Facchini et al. 1992; Willi et al. 2007). Tiem smēķētājiem, kuri dienā izsmēķē sākot no 20 cigaretēm un vairāk, pastāv 61% risks, bet tiem, kuri izsmēķē līdz 20 cigaretēm dienā – pastāv 29% liels risks iegūt insulīna rezistenci (Willi et al. 2007).

Eksperimentālo un klīnisko pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka smēķēšanas ietekmē samazinās šūnu insulīna jutība un sekojoši attīstās ar glikozes un lipīdu metabolismu saistītas saslimšanas, piemēram, hiperglikēmija un dislipidēmija, t.sk., samazināta ABL koncentrācija cirkulācijā (Despre, Lemieux 2006; Heine, Dekker 2002; Smith et al. 1999). Gados jauniem, klīniski veselīgiem smēķētājiem atjaunošanās periodā pēc fiziskas slodzes tika novērota samazināta insulīna atkarīgā glikogēna sintēze muskuļšūnās, līdzīgi kā tas ir novērots personām pre-diabēta stāvokļos. Tas liek secināt, ka nikotīns inhibē insulīna mediētu glikozes metabolismu (Price et al. 2003).

Aizkuņģa dziedzerā beta šūnas uz savas virsmas ekspresē nACh receptorus. Acetilholīns piesaistoties pie saviem nACh receptoriem modulē šūnu fizioloģiskās funkcijas, t.sk. insulīna sekrēciju. Savukārt, nikotīns caur šiem receptoriem gan hroniski, gan akūti bojā beta šūnu funkcijas un samazina insulīna sekrēciju (Bruin et al. 2008; Somm et al. 2008; Xie et al. 2009).

Vairākos eksperimentos ar dzīvnieku modeļiem ir pierādījies, ka nikotīns izraisa  $\beta$ -šūnu apoptozi. Žurku mātītēm, sākot ar grūsnības pirmajām dienām ar implantēta Alzet osmotiskā minisūkņa palīdzību tika nodrošināta regulāra nikotīna šķīduma ievadīšana asinsritē. Šo mātīšu mazuliem zīdīšanas periodā parādījās agrīna aizkuņģa dziedzerā un taukaudu attīstība. Rezultāti parādīja, ka pastāv tieša saistība starp nikotīna iedarbību embrionālajā periodā un metabolā sindroma attīstību agrīnā vecumā, kas raksturojas ar agrīnu aizkuņģa dziedzerā attīstību un taukaudu disfunkciju (Somm et al. 2008).

Citos pētījumos ir atklāts, ka nikotīna izraisītu  $\beta$ -šūnu disfunkciju, palielinātu apoptozi un šūnu masas zudumu mediē mitohondriju struktūras un funkciju bojājums un/vai šūnu receptoru bojājums. Grūsnām žurku mātītēm nikotīna šķīdums tika injicēts zemādā 2 nedēļas. Iegūtie rezultāti parādīja, ka nikotīna ietekmē būtiski samazinājās elpošanas ķēdes enzīmu

aktivitāte aizkuņģa dziedzera audos, beta šūnu degranulācija, palielinājās šūnu oksidatīvais stress un samazinājās glikozes stimulēta insulīna sekrēcija, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem (Bruin et al. 2008). Par oksidatīvo stresu liecināja būtiski palielināta glutaciona peroksidāzes-1 (GPx-1) un mitohondriālā superoksīda dismutāzes (MnSOD) proteīnu ekspresija un reaktīvo skābekļa savienojumu ģenerēšana aizkuņģa dziedzera audos. Bez tam, mitohondriju frakcijā bija lielāks daudzums oksidētu proteīnu, salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem. Vēlāk, postnatālajā periodā žurku mazuļiem attīstījās disglīkēmija un aptaukošanās. Minētā pētījuma rezultāti parādīja, ka nikotīns tieši iedarbojas uz aizkuņģa dziedzera nACh receptoriem embrionālās un neonatālās attīstības stadijās, inducējot oksidatīvo stresu, tādējādi izraisot  $\beta$ -šūnu apoptozi un sekojoši samazinātu insulīna sekrēciju (Bruin et al. 2008). Tātad, mitohondriju disfunkcija, oksidatīvais stress un iekaisuma reakcijas ir tieša un toksiska nikotīna inducēta iedarbība uz aizkuņģa dziedzera šūnām, iedarbojoties caur nACh receptoriem (Xie et al. 2009).

### **1.5.2. Smēķēšanas saistība ar viscerālo aptaukošanos un insulīna rezistences attīstību**

Vairāki autori ir vienprātis, ka samazināta insulīna jutība var būt atslēgas mehānisms, caur kuru smēķēšana sekmē aterosklerotiskās kardiovaskulārās slimības risku. Palielināta glikokortikoīdu (kortizola) bazālā koncentrācija cirkulācijā varētu būt nozīmīga saikne starp smēķēšanu un insulīna rezistenci (Girod, Brotman, 2003; Reaven, Tsao, 2003). Smēķētājiem ikdienā ir augstāka seruma kortizola koncentrācija, salīdzinot ar tāda paša vecuma un  $\text{KMI}$  nesmēķētājiem. Atmetot smēķēšanas ieradumu, kortizola koncentrācija cirkulācijā samazinās (Field et al. 1994). Ilgstoši paaugstināta glikokortikoīda koncentrācija izraisa viscerālo aptaukošanos un insulīna rezistenci (Reynolds, Walker, 2003). Hroniska glikokortikoīdu homeostāzes disregulācija smēķētājiem var nelabvēlīgi ietekmēt glikozes metabolismu un ķermeņa tauku izvietojumu. Viscerālā aptaukošanās, pat ja  $\text{KMI}$  ir normas robežās vai zemāks, ir saistīta ar samazinātu insulīna jutību un palielinātu kardiovaskulāro slimību risku, kas smēķētājiem ir 2 reizes lielāks, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Jee et al. 2002).

Reaven un Tsao (2003) ir izvirzījuši hipotēzi, ka smēķētājiem palielināta insulīna rezistences un hiperinsulinēmijas prevalence spēlē galveno lomu dislipidēmijas, endotēlija disfunkcijas un kardiovaskulāro slimību attīstībā (Reaven, Tsao, 2003).

Viscerālo tauku rezerves ir stabilāks samazinātas insulīna jutības rādītājs, nekā subkutānie tauki, neatkarīgi no tā, vai personai ir aptaukošanās. Lipolītiski aktīvie viscerālie tauki ir nozīmīgs neesterificēto taukskābju avots portālajā cirkulācijā, kas iekļūst tieši aknās un izmaina glikozes un lipīdu metabolismu (Shulman, 2000).

Salīdzinot ar tādiem adipokīniem, kā TNF- $\alpha$ , leptīnu un rezistīnu, kuru koncentrācijas serumā palielinās līdz ar tauku masas palielināšanos, adiponektīna koncentrācija samazinās personām ar dislipidēmiju (aptaukošanos), kardiovaskulāru saslimšanu vai 2TCD. Kā jau iepriekš tika minēts, cirkulējošā adiponektīna koncentrācija serumā cieši korelē ar insulīna jutību. Adiponektīns tiek uzskatīts par nozīmīgu mediatoru saistībā starp viscerāliem taukaudiem un insulīna jutību (Cnop et al. 2003). Insulīna rezistences un viscerālo taukaudu palielināšanās gadījumā ir palielināta aknu lipāzes aktivitāte un neesterificēto taukskābju daudzums, kas, savukārt, var darboties kā insulīna antagonists aknās un perifērajos audos, galvenokārt muskuļos. Tiek uzskatīts, ka samazināta adiponektīna koncentrācija var kalpot kā priekšvēstnesis bojātai insulīna funkcijai perifērajos audos, kā rezultātā samazinās glikozes uzņemšanas efektivitāte un palielinās triglicerīdu uzkrāšanās muskuļu audos (Havel et al. 2002).

Smēķēšanas izraisīta kateholamīnu koncentrācijas palielināšanās ir spēcīgs antagonists insulīna funkcijai, kas ir viens no iemesliem smēķēšanas saistībai ar insulīna rezistences attīstību. Vairākos pētījumos ir apstiprinājies, ka hroniskiem smēķētājiem, klīniski veselīgiem un bez aptaukošanās, ir insulīna rezistencei raksturīgas pazīmes – palielinātas TG un samazinātas ABL koncentrācijas, un palielinātas insulīna un PAI-1 koncentrācijas serumā. Lai gan, hroniskiem smēķētājiem ir novērotas palielinātas arī kopējā holesterīna un ZBL koncentrācijas serumā, tomēr šiem rādītājiem nav saistības ar insulīna rezistenci (Eliasson et al. 1994; Facchini et al. 1992).

Nikotīna un, iespējams, citu cigarešu dūmos esošo komponentu ietekmē akūti palielinās taukaudu lipolīze un, līdz ar to, glicerola un brīvo taukskābju koncentrācija cirkulācijā (Hellerstein et al 1994). Hroniskiem smēķētājiem, pat pēc 48 stundu atturēšanās no smēķēšanas, ir palielināta cirkulējošā noradrenālīna koncentrācija, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem. Kateholamīni caur palielinātu cAMP koncentrāciju bojā gan insulīna signāltransdukcijas ceļus, gan arī glikozes transporta proteīnu sintēzi un aktivitāti. Pētījumu rezultātos iegūta negatīva korelācija starp taukskābju koncentrāciju un insulīna jutības rādītājiem intensīviem smēķētājiem apstiprina brīvo taukskābju ietekmi uz samazinātu insulīna funkciju (Eliasson et al. 1994).

### **1.5.3. Nikotīna ietekme uz kortizola diennakts sekēciju**

Lai gan smēķēšanas kaitīgā ietekme uz veselību ir pētīta, galvenokārt, saistībā ar kardiovaskulārām slimībām, pēdējos gados tiek pievērsta uzmanība smēķēšanas ietekmei uz endokrīnām funkcijām un hormonu sekrēciju, tajā skaitā, uz hipotalāma-hipofīzes-adrenālo (HHA) asi. Organisma atbildes reakcijā uz fizisku un mentālu stresu sākotnēji iesaistās HHA ass un bioloģiskais marķieris šajā reakcijā ir palielināta kortizola koncentrācija perifērijā. Kortizola sekrēcijai ir diennakts svārstību ritms un tā sekrēciju visas dienas garumā nosaka dažādi kontroles mehānismi, tomēr visaugstākais sekrēcijas maksimums ir rīta pusē pēc pamošanās. Salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, smēķētājiem, neatkarīgi no dzimuma, kortizola koncentrācija ir augstāka gan pēc pamošanās, gan visas dienas garumā, kas ir atkarīgs no izsmēķēto cigarešu skaita (Badrick et al. 2007).

Nikotīns akūti aktivē nACh receptorus centrālajā nervu sistēmā, kas izraisa palielinātu kortizola koncentrāciju sistēmiskajā cirkulācijā. Arī pārējie dūmos esošie ķīmiskie savienojumi var aktivēt HHA asi. Nikotīna koncentrācija organismā samazinās dažu stundu laikā, bet citi cigarešu dūmu metabolīti tiek izvadīti no organisma dažu dienu laikā (Hecht et al. 1999), un šie varētu būt iemesli palielinātai kortizola koncentrācijai no rīta. Bez tam, arī cigarešu dūmu izraisītas zemas pakāpes iekaisuma reakcijas plaušu audos, kas tālāk tiek ģeneralizētas perifērijā, var izskaidrot palielinātas kortizola koncentrācijas smēķētājiem (Badrick et al. 2007).

Lai gan kortizola koncentrācijas izmaiņas smēķēšanas ietekmē nav lielas, tomēr ilgstošākā laika periodā (vairāku gadu garumā), tas var samazināt endokrīnās funkcijas, piemēram, glikozes un insulīna metabolismu (Plat et al. 1999), kā minēts 1.5.2.nodaļā.

### **1.5.4. Smēķēšanas izraisīta lipīdu akumulācija aknās**

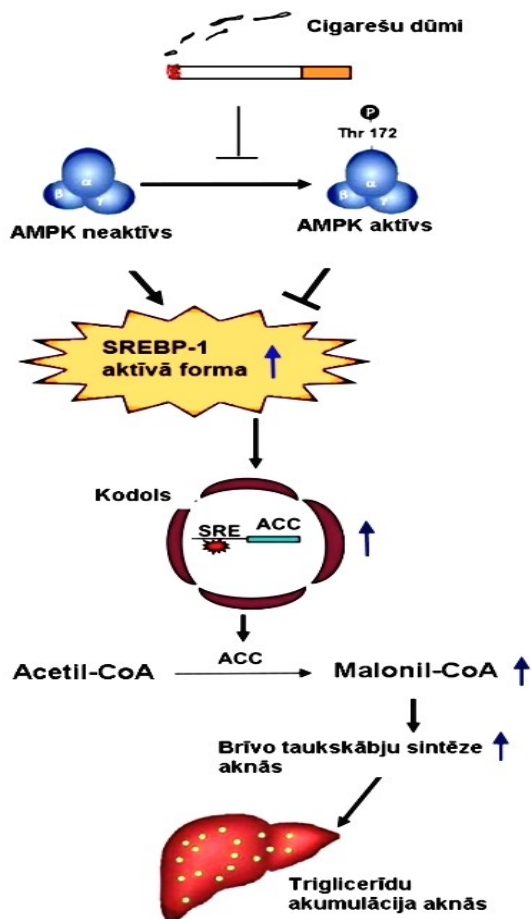
Smēķēšanas izraisīta lipīdu akumulācija aknās tiek saistīta ar AMPK un SREBP enzīmu darbību. Yuan et al. (2009) pētījums apstiprina faktu, ka smēķēšanas izraisīta AMPK inaktivācija un SREBP aktivācija veicina triglicerīdu neosintēzi un lipīdu akumulāciju hepatocītos.

Fizioloģiski normālos apstākļos AMPK enzīms stimulē taukskābju oksidāciju un ketoģenēzi hepatocītos, un inhibē holesterola sintēzi, lipoģenēzi un triglicerīdu sintēzi, tādējādi nodrošinot šūnas enerģētisko metabolismu. SREBP galvenā funkcija ir netieša iesaiste holesterola un taukskābju biosintēzes procesos.

Cigarešu dūmos esošie savienojumi inaktivē AMPK fosforilāciju, t.i., fosfāta grupas  $PO_4^{3-}$  pievienošanu, paralēli aktivējot SREBP fosforilāciju. Būtiski, ka smēķēšanai ir kumulatīvs efekts uz AMPK fosforilācijas inhibīciju - jo vairāk cigarešu tiek izsmēķēts, jo vairāk tiek inhibēta AMPK fosforilācija un, attiecīgi, aktīvāk notiek lipīdu akumulēšanās aknu audos (10.attēls).

SREBP-1 aktivē acetil-CoA karboksilāzes ekspresiju, kas nodrošina acetil-CoA pārvēršanos par malonil-CoA, kā rezultātā paaugstinās brīvo taukskābju sintēzes rādītāji un notiek triglicerīdu akumulācija aknās, kas var izraisīt aknu steatozi.

Šajā mehānismā ir iesaistīts arī adiponektīns, kuš fizioloģiski normālos apstākļos stimulē AMPK fosforilāciju un vienlaicīgi inaktivē acetil-CoA karboksilāzi. Ja adiponektīna koncentrācija ir samazināta, tad samazinās arī AMPK fosforilācijas rādītāji un attiecīgi tiek aktivēts SREBP, kas izraisa triglicerīdu akumulāciju aknās. Ja tiek stimulēta adiponektīna ekspresija *in vivo*, tad ir vērojama SREBP fosforilācijas inhibīcija un triglicerīdu daudzuma samazināšanās aknās (Yuan et al. 2009).



10.attēls. Cigarešu dūmu inducēta lipīdu akumulācija hepatocītos (Yuan et al. 2009)

### 1.5.5. TNF- $\alpha$ ietekme uz lipīdu metabolismu un insulīna signālceļiem

Vairums šūnu tipu, tajā skaitā adipocīti, sintezē TNF- $\alpha$  un tā receptorus. Taukaudi palielinātā daudzumā producē TNF- $\alpha$  mRNS personām ar palielinātu taukaudu daudzumu un insulīna rezistences gadījumā (Hotamisligil et al. 1996). TNF- $\alpha$  regulē to gēnu ekspresiju, kas ir saistīti ar glikozes un lipīdu metabolismu, tajā skaitā, samazina glikozes transportiera GLUT-4 un palielina lipoproteīnu lipāzes un aterogēnā proteīna PAI-1 gēnu ekspresiju (Samad, Loskutoff 1997; Stephens et al. 1997). TNF- $\alpha$  molekulai ir tieša inhibējoša ietekme uz insulīna receptoru signālceļu: samazina insulīna receptora tirozīna kināzes aktivitāti un ierosina IRS-1 serīna fosforilāciju, kas ir tirozīna kināzes aktivitātes inhibitors. Samazinot TNF- $\alpha$  sintēzi, uzlabojas insulīna jutība perifērajos audos (Hotamisligil et al. 1996).

TNF- $\alpha$  netieši ir iesaistīts brīvo taukskābju koncentrācijas palielināšanā cirkulācijā. TNF- $\alpha$  adipocītos stimulē lipolīzi un taukaudu triglicerīdi tiek sašķelti par brīvajām taukskābēm un glicerolu, kas tiek atbrīvoti asinsritē. Hroniska brīvo taukskābju palielināta

koncentrācija cirkulācijā samazina šūnu insulīna jutību un veicina insulīna rezistenci (Boden, 1997; Hauner et al. 1995). Šādu pašu efektu novēro veselām žurkām, kurām TNF- $\alpha$  infūzija palielināja brīvo taukskābju daudzumu cirkulācijā un sekojošu insulīna rezistenci (Miles et al. 1997). TNF- $\alpha$ , piesaistoties saviem receptoriem TNFR1 un TNFR2, regulē gēnu ekspresiju caur transkripcijas faktoru aktivāciju, kur nozīmīgu lomu spēlē mitogēn-aktivētās proteīnkināzes (MAPK). Šīs kināzes pārvada TNF- $\alpha$  ierosinātos signālus no šūnas virsmas uz kodolu, fosforilējot un aktivējot transkripcijas faktoru kompleksu. MAPK signālceļa aktivācija ierosina brīvo taukskābju atbrīvošanu cirkulācijā (Ryden et al. 2002).

Klīnisko un bāzes pētījumu rezultāti ir parādījuši saistību starp iekaisuma reakcijām un lipīdu (dis)metabolismu, kur starpnieka loma ir TNF- $\alpha$ . Personām ar dislipidēmiju TNF- $\alpha$  koncentrācija statistiski ticami pozitīvi korelē ar triglicerīdu un kopējā holesterīna koncentrācijām, bet negatīvi – ar augsta blīvuma lipoproteīna (ABL) koncentrāciju serumā (Jovinge et al. 1998). TNF- $\alpha$  ietekmes mehānismi uz lipīdu metabolismu ir komplicēti, kuros ir iesaistīti dažādi signālceļi – sākot no proteīnu ekspresijas līdz enzīmu aktivitātes inhibīcijai. Personām ar dislipidēmiju ir palielinātas TNF- $\alpha$ , IL-6 un ICAM-1 koncentrācijas cirkulācijā, bet samazināts L-arginīna metabolisms, līdz ar to novājināta endotēlija funkcija (Giannattasio et al. 2005; Hennig et al. 2001). Starp iekaisuma citokīniem, TNF- $\alpha$  ir noteicošā loma sistēmiskā zema līmeņa iekaisuma veidošanā, stimulējot adhēzijas molekulu ekspresiju uz endoteliocītu virsmas, tādējādi, inducējot endotēlija disfunkciju (8.attēls)(Willerson, Ridker 2004). Palielināta TNF- $\alpha$  seruma koncentrācija ir nozīmīgs aterosklerozes un 2TDM riska faktors (Bruunsgaard, 2005).

## 1.6. Mikrovaskulāro funkciju izpēte ar lāzerdoplerogrāfijas (LDI) metodi

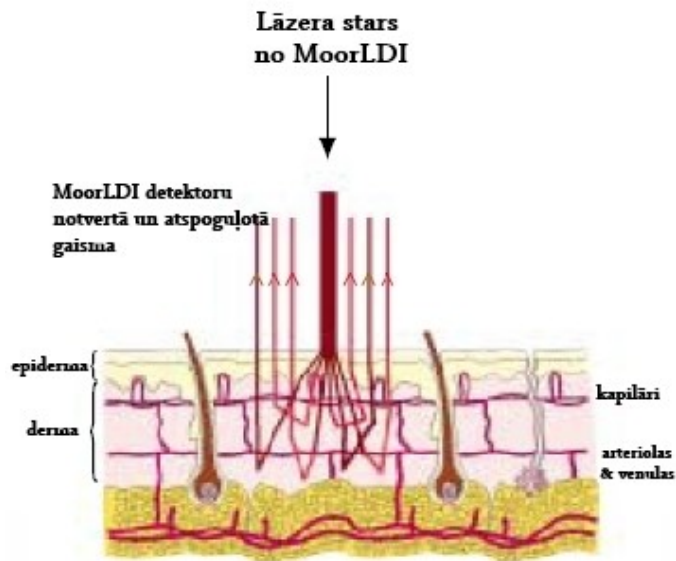
### 1.6.1. Lāzerdoplerogrāfijas metodes darbības princips un metodes raksturojums

Metode ir balstīta uz doplera principu, kur lāzera gaisma ar viļņa garumu robežās no 630 līdz 780 nm ar optiskās zondes palīdzību tiek pievadīta audiem, kur tā difūzi izkliedējas. Daļu gaismas audi absorbē, bet daļu atstaro. Gaismas daļiņām saduroties ar kustībā esošām asins šūnām novēro izmaiņas gaismas viļņa garumā jeb doplera efektu. Savukārt, ja notiek sadursme starp gaismas daļiņām un statiskiem objektiem, šādas pārmaiņas nenotiek. Šo pārmaiņu intensitāte un biežums ir tieši atkarīgi no kustībā esošo asins šūnu skaita un to kustības ātruma, bet nav atkarīgi no to kustības virziena. No audiem atstarotā gaisma tiek uztverta un pārvērsta elektriskajos signālos un šādā formā iegūtā informācija tiek apstrādāta. Izmantojot lāzerdoplerogrāfijas plūsmas metodi, ir iespējams iegūt vairākus atšķirīga veida rādītājus: kustībā esošo asins šūnu koncentrāciju, asins šūnu kustības ātrumu un perfūziju. Perfūziju izsaka kā kustībā esošo asins šūnu ātruma un to koncentrācijas noteiktā audu tilpumā reizinājumu. Tā kā šobrīd nav tādu lāzerdoplerogrāfijas mēraparātu, kas spētu izteikt asins perfūziju absolūtās vienībās (piem. ml/min/100 g audu), mērījumu rezultāti tiek izteikti nosacītās perfūzijas vienībās (PU).

Lāzerdoplerogrāfijas attēldiagnostikas metode ļauj veikt mikrocirkulācijas izmeklējumus bez tieša kontakta ar ādu. Attālums starp skeneri un izmeklējamo ādas rajonu ir 35-45 cm. Attēli tiek iegūti, skenējot audus ar lāzera staru, kura viļņa garums ir 780 nm. Kustībā esošās asins šūnas izmaina atstarotās gaismas viļņa garumu, ko uztver fotodetektors un, iegūtos signālus tālāk apstrādājot, tiek izveidota ar krāsu iezīmēta asinsrites karte. Iegūtajos attēlos redzams, kādas ir asinscirkulācijas izmaiņas konkrētajā ādas rajonā. Lāzera stars atkārtoti pārvietojas pār izmeklējamo audu rajonu 30 sekundes, kas veido vienu noskenētu krāsainu attēlu. Ar LDI metodi ir iespējams iegūt noskenētus laukumus, kuru izmēri ir no 5cm x 5cm līdz 50cm x 50cm ar izšķirtspēju 256 x 256 pikseļi.

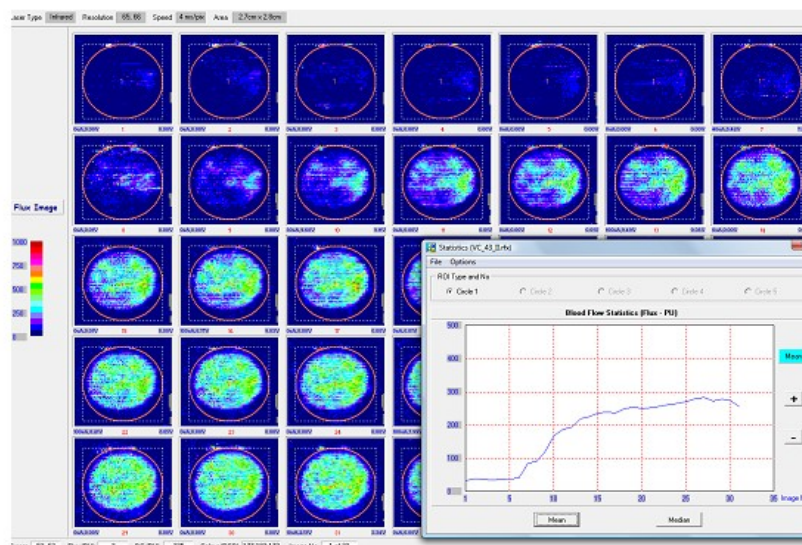
Lāzera gaismas iespiešanās dziļums audos ir atkarīgs no ādas optiskajām īpašībām un sasniedz aptuveni 2-3 mm. LDI mērījumos atspoguļojas asinsplūsma kapilāros, arteriolās, venulās un dermas asinsvadu pinumos.





**11.attēls MoorLDI skenera mērījuma diagramma. (Moor Instruments, brochure).**

Datorprogramma, kas paredzēta atkārtotu skanējumu veikšanai, ļauj pētīt mikrovaskulārās atbildes reakcijas dinamikā. Izvēloties attēlā konkrētu rajonu, ir iespējams iegūt vidējos asins plūsmas rādītājus gan grafiskā, gan arī tabulas veidā.



**12.attēls. LDI datu pieraksts krāsu koda attēlu formā un asinsplūsmas dinamikas līknes grafisks attēlojums (LU EKMI).**

Audu perfūzijas telpiskā sadalījuma attēla iegūšanai izmanto zemas intensitātes lāzera staru, kas secīgi, pa solim pārvietojoties pār izmeklējamo ādas rajonu, veic perfūzijas mērījumus. Perfūziju var izteikt skaitliskās vērtībās vai attēla veidā kā konkrētā ādas rajona asins perfūzijas telpiskā sadalījuma krāsu koda karti. Viena no lāzera skenera izmantošanas

priekšrocībām ir iespēja atkārtot mērījumus precīzi vienā un tai pašā vietā, kas ļauj novērtēt perfūzijas pārmaiņas konkrētā ādas rajonā laika gaitā, kā arī spriest par dažādu provokāciju izraisītām ādas reakcijām.

Izmantojot optiskās zondes ar dažādu gaismas viļņa garumu, mērījumus iespējams veikt atšķirīgās mikrovaskulārajās gultnēs. Šāda metodes priekšrocība ir viens no iemesliem, kādēļ lāzerdoplerogrāfijas mērījumi aizvien plašāk tiek izmantoti kā diagnostiskie testi dažādu slimību agrīnai diagnosticēšanai. Ņemot vērā to, ka āda ir rajons, kas raksturojas ar dinamiskām pārmaiņām, ko izraisa dažādi organismā notiekošie procesi un aktīvi piedalās organisma homeostāzes nodrošināšanā (piem., temperatūras regulācija), tā var kalpot kā labs modelis, lai pētītu mikrocirkulācijas pārmaiņas dažādu slimību attīstības procesā.

Būtiska nozīme šādam metodes pielietojumam ir cukura diabēta mikroangiopātijas izpētē, kas visspilgtāk izpaužas nierēs (diabētiskā nefropātija) un acs tīklenē (diabētiskā retinopātija), taču pētījumi pierāda, ka diabētiskās mikroangiopātijas procesā iesaistītas daudzas citas kapilāras gultnes, tajā skaitā āda. Neskatoties uz mikrovaskulāro bojājumu klīnisko nozīmi, zināšanas par to izcelsmes mehānismiem uzkrājas lēni. Tādēļ būtiska nozīme ir tiešo asins mikrocirkulācijas pētīšanas metožu attīstībai, kā rezultātā ir izvirzīta mikroangiopātijas patoģenēzes hemodinamiskā hipotēze. Tās pamatā ir pierādījumi, kas liecina par agrīnām funkcionālām pārmaiņām hemodinamikā, kuras parādās jau pirms klīniskajām mikroangiopātijas pazīmēm.

### **1.6.2 Mikrovaskulāro reakciju novērtēšanai izmantotie provokatīvie testi**

Vairāku autoru pētījumi ir apliecinājuši, ka LDI tehnikas izmantošana ir viegli pielietojama, atkārtojama un apstiprināta metode pētniekiem, lai novērtētu un monitorētu endotēlija funkciju pacientiem dažādos patoloģiskos stāvokļos. Šī metode var tikt izmantota arī, lai monitorētu slimības attīstību ilgākā laika periodā un asinsvadu reakcijas uz ārstēšanu. (Turner et al. 2008).

Ādas mikrocirkulācijas novērtēšanas procesā būtiska loma ir dažādu fizioloģisko provokāciju izmantošanai, kas ļauj novērtēt ādas mikrovaskulārās atbildes reakcijas. Šādu provokatīvo testu (postokluzīvās hiperēmijas, siltuma hiperēmijas, farmakoloģiskās jontoforēzes, elpošanas testu u.c.) izmantošana ļauj diferencēt dažāda rakstura mikrovaskulārās regulācijas traucējumus, gan arī iegūt vispārēju endoteliālās funkcijas novērtējumu.

Šajā pētījumā tika izmantotas divas neinvazīvas metodes – siltuma hiperēmijas tests un acetilholīna jontoforēzes tests.

### 1.6.2.1. Siltuma hiperēmijas tests

Matainās ādas (piem., pēdas un plaukstu virspusē) mikrovaskulārā atbildes reakcija uz lokālu sildīšanu izraisa ādas asins plūsmas palielināšanos, kas notiek divās fāzēs, kuru pamatā ir atšķirīgi regulācijas mehānismi. LD pierakstā šīs fāzes atspoguļo divi atšķirīgi vazodilatācijas pīķi jeb siltuma hiperēmijas maksimumi (I max un II max). Temperatūras izraisītais vazodilatācijas maksimums atspoguļo asinsvadu maksimālo vazodilatācijas kapacitāti (Charkoudian, 2003).

Pirmais vazodilatācijas maksimums (I max), kas atbilst sākotnējai ātrajai fāzei, parādās apmēram 5-10 minūšu laikā pēc sildīšanas uzsākšanas. Šajā fāzē dominējošā loma ir neirālajai regulācijai, kas tiek mediēta caur aksonu refleksu. Kairinot matainās ādas nociceptīvos sensoros nervgaļus, tie sekretē kalcitonīna gēna saistīto peptīdu (CGRP) un substanci P (Charkoudian, 2003; Golay et al. 2004; Minson et al. 2002). Tad seko asins plūsmas samazinājums jeb kritums, pēc kura atkal asins plūsma pakāpeniski pieaug, kas atbilst otrajai vēlīnajai fāzei (II max), un tā parādās apmēram pēc 20-30 minūtēm no sildīšanas uzsākšanas. Šajā fāzē dominējošā loma ir endotēlijam, kas lokāli sekretē vazodilatāciju stimulējošos faktoros (Golay et al. 2004).

Matainajā ādā darbojas neiroģenās vazodilatācijas mehānisms, ko iedarbina siltuma vai kāda kaitīga stimula izraisīts aferento nervu šķiedru brīvo nervgaļu kairinājums. Sākumā dilatāciju veicina simpātiskā tonusa samazināšanās, kam seko dažādu peptīdu, tai skaitā substances P un CGRP sekrēcija no jušanas nervgaļiem, kā rezultātā vazodilatācija kļūst vēl intensīvāka.

Ir zināmas sensoro nervu šķiedru populācijas ādā, kuras ir jutīgas uz siltumu. Vieni no tiem ir TRPV1 jeb VR1, kuri zināmi kā vaniloīdie (kapsaicīna) receptori un kaitīgas temperatūras sensori, un to aktivācijas sliekšnis ir ~ 43°C. Šos receptorus aktivē arī kapsaicīns, anandamīds, etanols, kā arī netieši – bradikinīns un nervu augšanas faktors (*NGF, nerve growth factor*). Šo receptoru fizioloģiskās funkcijas ir šūnas depolarizācija un kalcija jonu ieplūšana, reaģējot uz sildīšanu vai endogēniem un eksogēniem agonistiem, sāpju sajūtas veidošana un vazodilatācija. Lokālas sildīšanas ietekmē tiek ierosināts lokāls aksona reflekss, kas izraisa vazodilatējošo neurotransmiteru antidromu sekrēciju, kas veicina lokālu ādas asinsplūsmas palielināšanos (Clapham et al. 2005).

Munce un Kenney (2003) pētījums atklāja, ka atbildes reakcijā uz lokālu sildīšanu piedalās arī tādi ādas sensorie nervi, kuri nav kapsaicīna-jutīgie. Tie ir siltuma-jutīgie receptori TRPV3, kuri tiek aktivēti pie temperatūras ~ 35°C. Tādējādi, neironi, kuri ekspresē VRL-3 receptorus, arī ir iesaistīti vazodilatācijas sākotnējā maksimuma veidošanā.

Liela nozīme siltuma testos ir temperatūrai, kuru izmanto lokālai ādas sildīšanai. Piemēram, kapsaicīna-jutīgie sensorie nervgaļi pie zemsliekšņa temperatūras +42°C sāk aktivēties ātrāk un vazodilatācija parādās agrāk, nekā pie +40°C. Tātad, pie temperatūras, kas ir tikai dažus grādus zemāka par sliekšņa temperatūru, kas aktivē šos neironus, atšķirība aktivitātes izraisītā vazodilatācijā, iespējams, ir liela (Munce, Kenney 2003).

Vēlīnā plato fāze galvenokārt ir NO mediēta (Kellogg et al. 1999; Minson et al. 2002), neatkarīgi no neiroģenās vazodilatācijas. Tomēr sensoro nervgaļu sekretētie neuropeptīdi papildus stimulē asinsvadus paplašināties un tādējādi palielina asins plūsmas intensitāti (Munce, Kenney 2003).

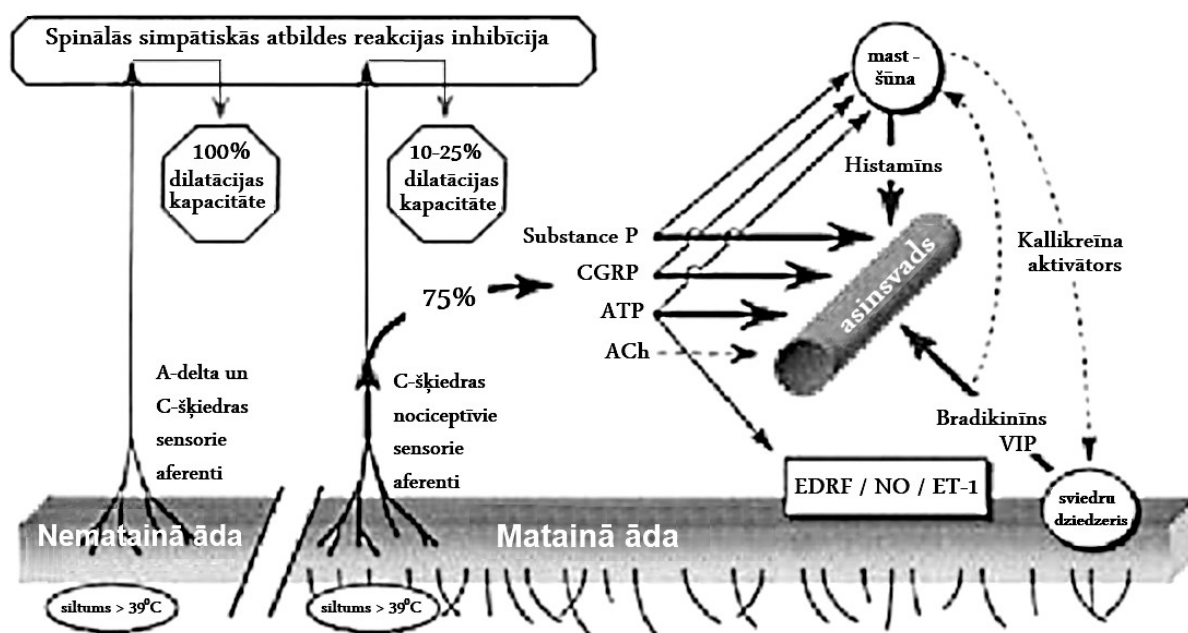
Lokāla NO producēšana plato fāzē ir apstiprinājusies vairākos pētījumos, kuros pirms lokālas ādas sildīšanas izmantoja NOS inhibitoru L-nitroarginīna metilesteri (L-NAME), kas inhibē cGMF veidošanos endotēlija šūnās, un rezultātā ādas asins plūsmas intensitāte ievērojami samazinājās (Kellogg et al. 1999; Minson et al. 2002). Ir zināms, ka karstuma šoka proteīns 90 (Hsp90) saistās ar eNOS un palielina tā aktivāciju un NO producēšanu. Shastry et al. savā pētījumā izmantoja Hsp90 inhibitoru geldanamīcīnu. Viņi novēroja, ka šī viela samazina ādas asins plūsmu par 20% (Shastry et al. 2002). Tātad, Hsp90 daļēji piedalās NO sekrēcijā caur eNOS aktivāciju. Hsp90 klātbūtne ir vajadzīga, lai kalcija-aktivētais kalmodulīns varētu atšķelt eNOS no kaveolīna-1, tādējādi aktivējot eNOS, kas pastiprina NO sintēzi.

Vairāki pētījumi apstiprina, ka termālas hiperēmijas testos vazodilatācija ir samazināta diabēta gadījumos. Termālo hiperēmiju izmanto arī, lai novērtētu mikrovaskulāro funkciju sistēmiskās sklerozes gadījumā. Ir apstiprinājies, ka gan aksonu reflekss, gan endotēlija atkarīgā vazodilatācija ir samazināti šīs patoloģijas gadījumā. Tā pat ir konstatēts, ka pacientiem ar posturālās tahikardijas sindromu ir samazināta vazodilatācija tikai plato fāzē, savukārt, pacientiem ar hronisku muguras smadzeņu bojājumu ir samazināta aksonu refleksa mediēta vazodilatācija (Nicotra et al. 2004).

Minson et al. (2002), pētot vecuma-saistītu ādas vazodilatāciju lokālas sildīšanas laikā, secināja, ka vecākiem indivīdiem ir samazināta spēja producēt un/vai izmantot NO. Tā kā kapsaicīna jutīgo sensoro nervgaļu aktivitāte lokālas sildīšanas vēlīnajā fāzē arī ir daļēji

iesaistīta, tad primāro aferentu aktivācija ir tā, kas izraisa maksimālo ādas asins plūsmas intensitāti uz lokālu sildīšanu. Bez tam, novājināta sensoro nervu funkcija novecojušā ādā var izraisīt samazinātu neiroģēno vazodilatāciju uz lokālu sildīšanu (Munce, Kenney 2003).

Kopumā ņemot, veiktajos pētījumos iegūtie dati paver jaunas izpētes iespējas attiecībā uz termālo hiperēmiju kā integratīvu metodi, ar kuru novērtēt mikrovaskulāro funkciju dažādu patoloģiju gadījumos.



13.attēls. Aksona refleksa diagramma, kas parāda nociceptoru lomu ādas vazodilatācijā (Stanberry et al. 1999)

### 1.6.2.2. Acetilholīna jontoforēzes tests

Jontoforēze ir neinvazīva transdermāla vielu ievadīšanas metode, kas raksturojas ar pastiprinātu jonu kustību cauri ādai zemas intensitātes elektriskās strāvas ietekmē. Metodes pamatā ir princips, ka vienādi lādiņi atgrūžas, bet dažādi pievelkas. Izmantojot ārēju enerģijas avotu, var paātrināt vielu nokļūšanu cauri membrānai. Ja viela, kas jāizvada cauri epitēlija barjerai, ir negatīvi lādēta, tā tiek novietota zem negatīvi lādētā ievadīšanas elektroda (katoda), no kura tā tiek atgrūsta un to pievelk pozitīvais elektrods, kas novietots tālāk uz ķermeņa. Ja ievadāmās vielas joni ir pozitīvi lādēti, elektroda orientācija ir pretēja (14.attēls).

Pēdējo gadu laikā ir pieaugusi lāzerdoplerogrāfa izmantošana un vielu jontoforētiska ievade, lai novērtētu endotēlija funkciju dažādos patoloģiskos stāvokļos. Hansell et al. (2004) pētīja sakarību starp asinsvadu reakcijām un endotēlija atkarīgo vazodilatāciju mazajos ādas asinsvados ar lāzera doplerogrāfu un pleca artērijā plūsmas mediēto dilatāciju ar ultrasonogrāfu (USG). Viņi atklāja nozīmīgu korelāciju starp abu veidu mērījumiem veselīem

cilvēkiem, parādot endotēlija funkcijas sistēmisko dabu un, ka ādas mikrovaskulārā disfunkcija nozīmīgi korelē ar lielo artēriju endoteliālo disfunkciju (Hansell et al. 2004).

Endotēlija funkcija var tikt novērtēta pēc asinsvadu reakcijas uz agonistu, piemēram, Ach, kura ietekmē no endotēlija šūnām tiek sekretēts NO un prostaciklīns (PGI<sub>2</sub>). Tā pat ir novērots, ka Ach-inducēta vazodilatācija apakšdelma ādā nozīmīgi korelē ar citiem sistēmiskās endotēliālās funkcijas maķieriem, piemēram, pozitīva korelācija ar plazmas NO un negatīva korelācija ar plazmas endotelīna-1 (ET-1) koncentrāciju, kā arī korelācija ar koronāro mikrovaskulāro funkciju. Ādas mikrovaskulārās reakcijas uz Ach jontoforēzi korelē ar maksimālo skābekļa patēriņu fiziskas slodzes laikā, atspoguļojot mikrovaskulārās reakcijas strādājošo muskuļu pretestības asinsvados. Tiek uzskatīts, ka ar Ach inducētās endotēlija atkarīgās vazodilatācijas metodi ir iespējams priekšlaicīgi novērtēt KSS risku (Ijzerman et al. 2003).

### **Ach darbības mehānismi mikrocirkulācijā**

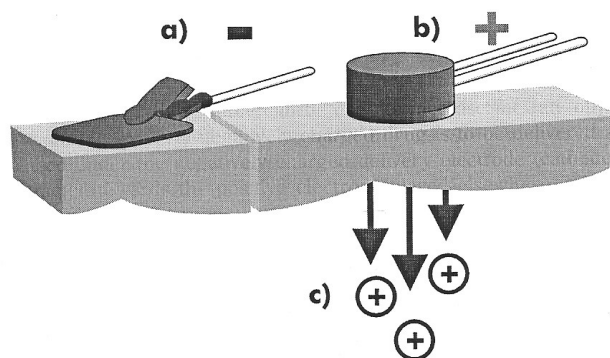
Acetilholīnu bieži izmanto kā standarta testa vielu endotēlija funkciju novērtēšanai mikrocirkulācijā, lai gan arī citu vielu – metaholīna, bradikinīna un substances P jontoforētiska ievadīšana var tikt izmantota šādos testos (Morris, Shore 1996).

Joprojām plaši tiek diskutēts par Ach izraisītās ādas vazodilatācijas mehānismiem. Acetilholīnam iedarbojoties uz endotēliju, tiek sekretēti dažādi vazomotorie faktori, tajā skaitā EDHF, NO un daži prostanoīdi (Durand et al. 2004). Tomēr dažādos pētījumos ir iegūti pretrunīgi rezultāti par to, ka Ach ierosina endotēliju producēt minētos vazodilatatorus. Agrākos pētījumos novērots, ka vazodilatējošā atbildes reakcija uz Ach jontoforēzi samazinās, ja tiek inhibēta vazoaktīvo prostanoīdu producēšana ar orālu vai intravenozi ievadītu aspirīnu, kas parādīja, ka prostaglandīni var spēlēt nozīmīgu lomu Ach mediētajā vazodilatācijā. Tomēr tas ir pretrunā ar citu autoru darbiem, kur nenovēroja nozīmīgas izmaiņas pēc aspirīna lietošanas. Šīs pretrunas var rasties no protokolu atšķirībām dažādos pētījumos (Durand et al. 2004).

Daži pētnieki novēroja, ka jontoforēze pati par sevi izraisīja nespecifisku ilglaicīgu vazodilatāciju dēļ pielietotās elektriskās strāvas. Transdermāli ievadīts Ach izraisa vazodilatāciju, iedarbojoties uz ādas muskarīna-jūtīgajiem M<sub>2</sub> receptoriem. Šo receptoru iesaistīšanās nespecifiskajā vazodilatācijā nav zināma. Tomēr, lokāli inhibējot šos M<sub>2</sub> receptorus ādā, nenovēroja vazodilatāciju, kas norāda, ka Ach ir specifiski iesaistīts ādas

vazodilatācijā. Kā arī, dejonizēta ūdens jontoforētiska ievadīšanā ādā neizraisīja pastiprinātu asins plūsmu, kas apliecina, ka tehnika neizraisa vazodilatāciju (Durand et al. 2004).

Jontoforētisko transportu ietekmē daudzi faktori, to skaitā ādas pH, ievadāmās vielas koncentrācija un īpašības, jonu konkurence, molekulu izmēri, strāvas stiprums, spriegums, vielas ievadīšanas ilgums un ādas pretestība.



#### 14.attēls. Elektrodu izvietošanas shēma uz ādas

(*Iontophoresis- theory by Bertil Gazelius , PERIMED ReriIont brochure*)

- Negatīvi lādētais elektrods ir novietots vismaz 15 cm attālumā no b.
- Zonde ar tai pievienoto zāļu ievadīšanas elektrodu, kas satur pozitīvi lādētus jonus.
- Pievienojot strāvas avota pozitīvo polu pie zāļu ievadīšanas elektroda, pozitīvi lādētie joni tiek atgrūsti no elektroda un iziet cauri ādas raga slānim (*stratum corneum*).

Vazoaktīvo vielu ievadīšana ādā ar jontoforēzi ļauj izvairīties no traumām, kas var rasties no intradermālām injekcijām jeb mikrodialīzes. Arī ievadītās vielas daudzums ir pārāk nenozīmīgs, lai izraisītu sistēmiskus blakusefektus. Lai gan lokālas mērenas alerģiskas reakcijas un ādas kairinājums ir novērots dažiem indivīdiem (Ramsay et al. 2002). Ir ļoti svarīgi, lai visi iespējamie, vazoaktivitāti ietekmējošie faktori, paliktu konstanti visa pētījuma laikā, piemēram, dienas laiks, kad tiek veikti mērījumi, telpas temperatūra (vispiemērotākais ir 22-23°C), atturēšanās no kafijas un smēķēšanas dažas stundas pirms mērījumiem. Aklimatizācijas periodam jābūt pietiekošam (20-25 min.) un nemainīga guļus/pusguļus poza visa mērījuma laikā (Turner et al. 2008).

#### Vielu šķīdinātāji un jontoforēzes elektrodi

Jontoforēzei paredzētā viela tiek atšķaidīta ar kādu no šķīdinātājiem, tajā skaitā, dejonizētu ūdeni vai nātrija hlorīda (NaCl) šķīdumu. Jontoforēzes elektroda izmērs ietekmē

galvanisko atbildes reakciju, ietekmējot lādiņu blīvumu. Pielietojot lielāku strāvu, galvanisko reakciju novēroja tajās pētījumu grupās, kur izmantoja maza diametra elektrodus. Ir vispārīgi pieņemts, ka, izmantojot vājāku strāvu un/vai lielākus elektrodus (piemēram, 22 mm diametrā) ievērojami samazinās strāvas inducētā vazodilatācija, kas notiek, samazinoties lādiņu blīvumam. Tādos gadījumos dejonizēts ūdens vai 0.5% NaCl ir piemēroti šķīdinātāji (Morris, Shore 1996).

### **Ādas pretestība**

Ramsay et al. (2002) novēroja, ka zāļu pievadi ietekmē ne tikai lādiņu blīvums, bet arī ādas pretestība, kas nozīmīgi mainās starp indivīdiem un dažādās vietās uz ķermeņa, ko ietekmē sviedru kanāli un matu folikuli. Viņi atklāja, ka lielāka ādas pretestība ir saistīta ar mazāku vazodilatācijas reakciju gan uz Ach, gan nātrija nitroprusīdu (NNP). Lai samazinātu ādas rezistenci un atvieglotu vielu piegādi, ir pietiekoši ar spirtā samērcētu vates gabaliņu notīrīt jontoforēzei paredzēto ādas laukumiņu, tā atbrīvojoties no taukvielām un atmirušām ādas šūnām (keratinocītiem) (Turner et al. 2008).

### **Jontoforēzes protokols**

Ar jontoforēzi ievadītās vielas daudzums ir atkarīgs no pievadītās strāvas stipruma un/vai ilguma. Tādējādi tiek iegūta devas-atkarīgā (*dose-response*) līkne vai nu mainot konstanta strāvas stipruma laiku (piem., 100  $\mu$ A ar 10-, 20-, 40-, un 80-sekunžu devas), vai arī graduāli palielinot strāvu (10-100  $\mu$ A) ik pēc noteikta laika. Pēdējās minētās metodes galvenā priekšrocība ir tāda, ka tā ļauj novērtēt asinsvadu reakciju uz ievadāmo vielu pie mazas strāvas, tādējādi novēršot jebkādu iespējamu nespecifisku, strāvas inducētu galvanisko reakciju (Turner et al. 2008).

Neraugoties uz esošo metodoloģisko bāzi, aizvien ir plašas iespējas izstrādāt jaunus lāzerdoplerogrāfijas mērījumu pielietojuma protokolus, lai uzlabotu metodes diagnostisko precizitāti un vienlaikus ļautu paplašināt tās informatīvo kapacitāti, tādējādi paverot plašākas iespējas pētniekiem veidot pētījuma dizainu, atbilstoši pētāmās problēmas specifikai. Pētnieku vidū nav vienota viedokļa par to, kura no metodēm būtu piemērotāka asinsvadu funkcionālai diagnostikai, jo katrai no tām ir savas priekšrocības un trūkumi. Daudzi autori ir vienprātis, ka protokolu standartizēšana varētu uzlabot lāzerdoplerogrāfa izmantošanu un novērst pretrunīgus rezultātus, kas novēroti literatūrā.



## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Pētījumā iesaistīto personu grupas un to raksturojums

Pētījumā tika iesaistītas 128 brīvprātīgas personas. Pētījumā netika iekļautas personas ar kardiovaskulārām slimībām, hipertenziju, 1. un 2. tipa cukura diabētu, infekciju, alerģiskām un autoimūnām saslimšanām.

**Smēķēšanas hroniskā efekta** novērtēšanai pētījuma dalībnieki tika sagrupēti divās grupās: s – smēķētāji un n – nesmēķētāji. Tā kā, starp pētījuma dalībniekiem bija būtiski atšķirīgi šādi rādītāji:  $\text{KMI}$ , vidukļa apkārtmērs, ABL un TG koncentrācijas serumā, tad izveidojām divas galvenās grupas: V – veselas personas un D – personas ar dislipidēmiju, kurās iekļāvām „s” un „n” grupas. Tātad, Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju un Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju. Pētījuma dalībnieku raksturojums un antropometriskie rādītāji ir apkopoti 1.tabulā.

**Smēķēšanas akūtā efekta** novērtēšanai tika iesaistītas 20 personas. Tika izveidotas divas grupas atbilstoši vecumam: JS – jaunieši smēķētāji ( $26 \pm 6$  g.v.) un PS – pieaugušie smēķētāji ( $44 \pm 6$  g.v.). Starp dalībnieku grupām statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) atšķirības bija vecumam,  $\text{KMI}$  un smēķēšanas pakģadu skaitam. Pētījuma dalībnieku raksturojums un antropometriskie rādītāji ir apkopoti 2.tabulā.

Visi dalībnieki tika iztaujāti pēc viena parauga anketas (Pielikums Nr.1), lai noskaidrotu smēķēšanas paradumus, medikamentu lietošanu, slimību anamnēzi un fiksētu katras personas antropometriskos rādītājus.

Pētījums tika veikts LU Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūtā (EKMI) saskaņā ar Ētikas komisijas atļauju zinātnisko projektu ietvaros:

1. Valsts pētījumu programmas Medicīnā projekts Nr.8 «Aptaukošanās izraisīto slimību un cukura diabēta mūsdienīgu agrīnās diagnostikas, profilakses un terapijas pasākumu izstrāde», LZP 07-VP-ZP; LU Y3-23464-003. Vadītājs Dr.biol. P.Tretjakovs.
2. «Jaunas pieejas eksogēno veselības riska faktoru izraisīto traucējumu diagnostikā», IZM-LU projekts Nr. Y2-ZP80-003. Vadītājs Dr.biol. P.Tretjakovs.

1.tabula. Pētījuma dalībnieku antropometriskie un bioķīmiskie rādītāji

	V grupa		p	D grupa		p
	Vn (n=40)	Vs (n=36)		Dn (n=28)	Ds (n=24)	
Dzimums, s (v)	18 (22)	12 (24)		13 (15)	10 (14)	
Vecums	47,5 ± 8,3	43,3 ± 9,1	0,23	51,3 ± 7,2	48,2 ± 7,3	0,43
ĶMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 2,2	25,4 ± 2,7	0,71	35,8 ± 3 *	36,6 ± 4 *	0,70
<i>siev.</i>	25,7 ± 1,4	24,4 ± 3,1		34,0 ± 3,18	38,2 ± 5,37	
<i>vīr.</i>	26,2 ± 2,2	25,8 ± 1,9		37,4 ± 2,96	35,8 ± 3,34	
Vidukļa apkārtmērs (cm)	87,2 ± 3,7	90,3 ± 5,8	0,34	111,4 ± 5,6 *	115,1 ± 7,3 *	0,39
<i>siev.</i>	83,5 ± 3,4	86,7 ± 7,5		99,3 ± 8,36	112,3 ± 9,52	
<i>vīr.</i>	94,9 ± 5,3	93,1 ± 4,7		123,0 ± 7,4	117,1 ± 8,63	
Glikoze (mmol/l)	5,18 ± 0,45	4,88 ± 0,41	0,48	5,49 ± 0,34	5,78 ± 0,36 *	0,09
<i>siev.</i>	4,99 ± 0,22	4,88 ± 0,48		5,63 ± 0,43	5,52 ± 0,78	
<i>vīr.</i>	5,26 ± 0,34	4,86 ± 0,30		5,46 ± 0,42	6,0 ± 0,58	
Insulīns (μU/ml)	6,56 ± 0,93	6,12 ± 1,19	0,63	13,1 ± 2,39**	22,3 ± 2,91**	< 0,01
<i>siev.</i>	7,83 ± 1,30	6,30 ± 2,87		14,5 ± 5,17	18,8 ± 5,24	
<i>vīr.</i>	6,72 ± 2,03	6,69 ± 1,79		14,9 ± 4,49	24,4 ± 5,40	
HOMA-IR (mmol*μU)	1,54 ± 0,30	1,38 ± 0,38	0,55	3,46 ± 0,69**	4,42 ± 0,78**	< 0,01
<i>siev.</i>	1,76 ± 0,32	1,39 ± 0,71		3,82 ± 1,18	4,64 ± 1,12	
<i>vīr.</i>	1,58 ± 0,50	1,50 ± 0,44		3,72 ± 1,11	5,70 ± 1,08	
Holesterīns, kopēj. (mmol/l)	5,77 ± 0,44	5,62 ± 0,57	0,68	5,92 ± 0,52	5,98 ± 0,72	0,89
<i>siev.</i>	5,60 ± 0,59	5,67 ± 1,23		6,31 ± 0,81	6,50 ± 0,90	
<i>vīr.</i>	6,13 ± 0,83	5,61 ± 0,71		5,59 ± 0,74	5,88 ± 0,81	
ABL-holesterīns (mmol/l)	1,51 ± 0,14	1,32 ± 0,16	0,09	1,26 ± 0,14 *	1,08 ± 0,16**	0,09
<i>siev.</i>	1,63 ± 0,15	1,51 ± 0,31		1,49 ± 0,21	1,21 ± 0,29	
<i>vīr.</i>	1,34 ± 0,22	1,32 ± 0,18		1,10 ± 0,18	1,10 ± 0,19	
ZBL-holesterīns (mmol/l)	3,57 ± 0,42	3,64 ± 0,53	0,65	3,71 ± 0,49	3,84 ± 0,53	0,53
<i>siev.</i>	3,38 ± 0,48	3,51 ± 1,0		3,93 ± 0,79	4,32 ± 0,83	
<i>vīr.</i>	4,12 ± 0,70	3,71 ± 0,57		3,5 ± 0,74	3,88 ± 0,78	
Triglicerīdi (mmol/l)	1,25 ± 0,25	1,23 ± 0,33	0,96	1,73 ± 0,38 *	2,82 ± 0,71**	< 0,01
<i>siev.</i>	1,32 ± 0,50	1,55 ± 0,92		1,58 ± 0,92	2,90 ± 0,86	
<i>vīr.</i>	1,69 ± 0,72	1,41 ± 0,59		2,23 ± 0,81	3,01 ± 0,88	
Pakgadu skaits ***	0	12,4 ± 3		0	14 ± 4	
<i>siev.</i>	0	8,8 ± 4,1		0	11,4 ± 3,7	
<i>vīr.</i>	0	15,3 ± 2,6		0	16,3 ± 5,6	

Vidējais aritmētiskais ± standartnovirze (SD)

\* p< 0,05 un \*\* p< 0,01 attiecībā pret Vn grupu

\*\*\* Pakgadu skaits = (dienā izsmēķēto cigarešu skaits x smēķēšanas ilgums gados)/20

2.tabula

## Pētījumā iesaistīto personu raksturojums

	Jaunieši smēķētāji (JS) (n=10)	Pieaugušie smēķētāji (PS) (n=10)	p vērtība
Vecums (gadi)	26 ± 6	44 ± 6	< 0,05
ĶMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 ± 4	28,4 ± 4,6	< 0,05
Vidukļa apkārtmērs (cm)	88,6 ± 12	98,6 ± 16	0,19
Cigarešu skaits dienā	14 ± 5	16 ± 5	0,39
Pakgadu skaits *	8,4 ± 4	15,7 ± 7	< 0,05

Vidējais aritmētiskais ± SD, JS – jaunieši smēķētāji, PS – pieaugušie smēķētāji.

\* Pakgadu skaits = (dienā izsmēķēto cigarešu skaits x smēķēšanas ilgums gados)/20

Asins serumu paraugu noņemšanu un sagatavošanu veica medicīnas darbinieki, saskaņā ar klīniski diagnostiskajās laboratorijās aprobētām bioķīmiskām metodēm, izmantojot Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas bāzi.

Pētījumā rekrutētām personām tika veikti funkcionālās diagnostikas izmeklējumi: neinvazīva apakšdelma ādas mikrocirkulācijas lāzerdoplerogrāfija, pielietojot standartizētus lokālu siltuma (+44<sup>0</sup>C) testu un acetilholīna jontoforēze testu. Pētījumā tika izmantoti arī klīniski diagnostiskie izmeklējumi, lai bioloģiskajā materiālā (venoza asiņu serumā) noteiktu indicētos bioķīmiskos rādītājus - insulīna, glikozes un lipīdu koncentrācijas, un endoteliālo (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijas.

## 2.2. LDI testu protokols, izmantotā aparatūra un metodes

Ādas mikrocirkulācijas bazālās asins plūsmas un vazodilatācijas intensitātes mērījumi tika veikti LU EKMI, izmantojot sekojošu aparatūru:

- lāzerdoplera attēldiagnostikas aparatūra MoorLDI2, (*Moor Instruments Ltd.*, Lielbritānija);
- audu sildītājs *SHO2* ar termostātisku zondi (*Moor Instruments Ltd.*, Lielbritānija);
- jontoforēzes aparāts *MIC2*, ar kura palīdzību tiek dozēts vielu ievadījumu ilgums un strāvas stiprums; zonde-elektrods ION6 (anods) un elektrods-hidrogēla plāksnīte (katods) acetilholīna ievadīšanai audos (*Moor Instruments Ltd.*, Lielbritānija);
- 1% acetilholīna šķīduma pagatavošanai tika izmantots acetilholīna hlorīds (CAS60-31-1; FW 181,66; SIGMA) un dejonizēts ūdens.

Pirms lāzerdoplerogrāfijas izmeklējumiem tika ievēroti sekojoši priekšnosacījumi:

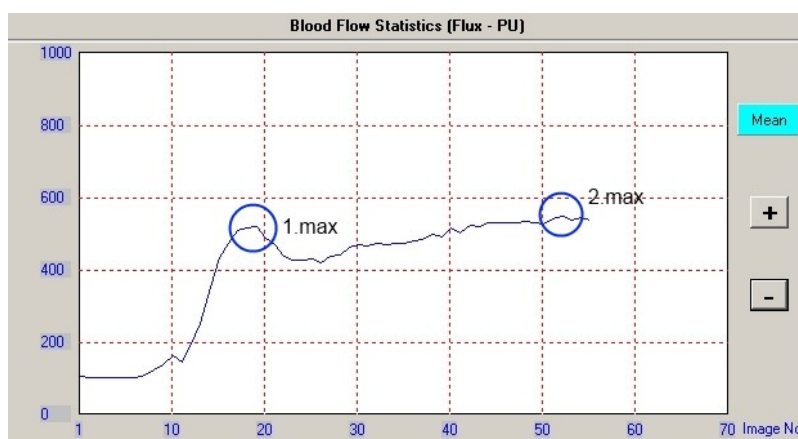
- 1) testējamām personām tika ieteikts pirms izmeklējumiem nelietot kofeīnu saturošus dzērienus un alkoholiskus dzērienus, nesmēķēt un nelietot medikamentus, kuriem ir vazoaktīva iedarbība;
- 2) pirms izmeklējuma personas 20 minūtes aklimatizējās telpā, kurā veicām mērījumus;
- 3) izmeklējumu telpā tika nodrošināta nemainīga telpas temperatūra  $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  un apgaismojums;
- 4) pēc aklimatizācijas personas tika informētas par izmeklējumu gaitu;
- 5) izmeklējumu laikā personām tika nodrošināti maksimāli ērts pusguļus stāvoklis, lai samazinātu LDI zondes nobīdīšanās iespēju ķermeņa kustību dēļ;
- 6) pirms LDI zondes uzlikšanas rūpīgi tika novērtēts mērījumam paredzētais ādas rajons; mērījumi tika veikti uz ādas rajoniem bez redzamiem bojājumiem, pretējā gadījumā iegūtie rezultāti var būt neadekvāti.

Ādas mikrovaskulārās atbildes reakcijas novērtēšanai smēķēšanas hroniskā un akūtā efekta ietekmē, izmantojam divas neinvazīvas metodes – siltuma hiperēmijas testu un acetilholīna jontoforēzes testu.

## LDI siltuma hiperēmijas tests (audu lokāla sildīšana ar +44° C)

Uz labās rokas plauksts virsmas tiek uzlīmēta siltuma zonde ar iemontētu temperatūras uztvērēju un sildelementu. Pirms LDI zondes piestiprināšanas rūpīgi tiek novērtēts mērījumam paredzētais ādas rajons, kuru apstrādā ar 70% spirtā samērcētu vates tamponu. Mērījumu drīkst veikt vienīgi tad, ja uz ādas nav redzamu bojājumu, kā arī, jāizvairās no lielo asinsvadu iekļaušanas mērījumos. Pretējā gadījumā iegūtie rezultāti var būt neadekvāti. Zondes piestiprināšanai tiek izmantoti īpaši zondes diametram pielāgoti divpusēji līmējami adhēzijas gredzeni. Mērījumus veic, izmeklējamai personai atrodoties pusguļus stāvoklī. Pēc 20 minūšu aklimatizācijas tiek uzsākti LDI mērījumi. Pirmās 3 minūtes tiek veikts bazālās plūsmas pieraksts. Pēc tam tiek ieslēgts zondes sildītājs, kurš pakāpeniski uzsilda zondē iepildīto destilēto ūdeni (2 ml) līdz +44°C temperatūrai. Konstanta (+44°C) temperatūra tiek sasniegta apmēram pēc 6 minūtēm no sildīšanas uzsākšanas. Lokāla audu sildīšana notiek 25 minūtes un kopējais testa laiks ir 28 minūtes jeb 56 skenējumi.

Iegūtie dati tika apstrādāti un analizēti ar *MoorLDI V5.0 Research Software* programmu.



## 15.attēls LDI Siltuma hiperēmijas testa grafiskais attēlojums

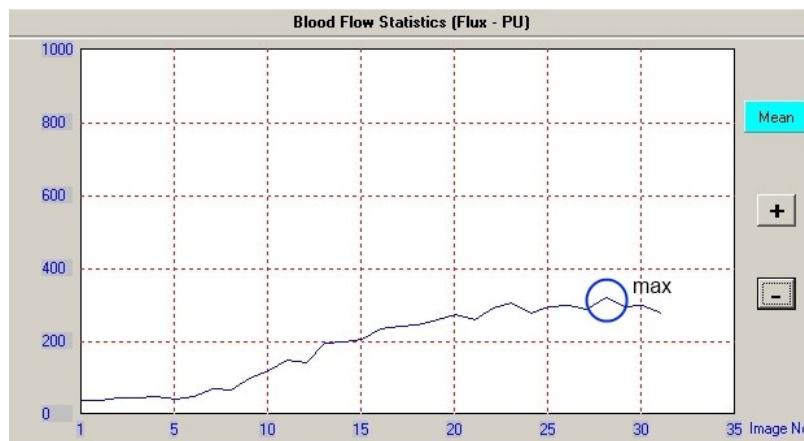
### LDI acetilholīna jontoforēzes tests

Vazoaktīvo substanču jontoforēze arī ir neinvazīva metode, kur ar zemas strāvas palīdzību audos ievada 1% Ach šķīdumu. Šķīduma ievadīšana notiek nelielā ādas laukumā, kas neizraisa sistēmisku ietekmi.

Izmeklējums tiek veikts uz kreisās rokas plauksts virsmas. Āda tiek apstrādāta ar 70% spirtā samērcētu vates tamponu, kas palīdz samazināt ādas elektrisko pretestību un, vienlaikus, samazina augsta strāvas blīvuma rajonu izveidošanās risku, kas var būt cēlonis C-šķiedru aktivācijai, vazodilatācijai un lokāliem ādas mikroapdegumiem. Jontoforēzes zonde

no iekšpuses ir izklāta ar platīna stiepli-elektrodu. Zondi uz plaukstas ādas pielīmē ar divpusēji līmējamu gredzenu. Zondi piepilda ar 1,8 ml 1% Ach šķīduma. Tā kā Ach ir pozitīvi lādēts, tad 15 cm attālumā no zondes-elektroda uz rokas ādas piestiprina negatīvi lādētu hidrogēla plāksnīti, ar kura palīdzību Ach šķīdums tiek ievadīts ādā. Lai izvairītos no galvaniskās ietekmes jeb elektriski inducētas hiperēmijas, Ach šķīdumu ievada pēc speciāli izstrādāta protokola. Zāļu ievadīšana notiek 30 sekundes ilgi ar 1 minūtes pārtraukumu. Pirmās ievades periods sākas ar 40  $\mu\text{A}$ , nākošais ar 80  $\mu\text{A}$  un turpmākie 6 periodi ir ar 100  $\mu\text{A}$  strāvas stiprumu. Pēdējam zāļu ievades periodam ir 10  $\mu\text{A}$  (skat. 2.Pielikums). Pirms jontoforēzes uzsākšanas pirmās 3 minūtes tiek veikts ādas bazālās perfūzijas pieraksts. Kopējais testa laiks - 16 minūtes jeb 32 skenējumi

LDI plūsmas maksimālais pieaugums tika aprēķināts, izmantojot *MoorLDI V5.0 Research Software* programmu.



### 16.attēls. LDI Acetilholīna jontoforēzes testa grafiskais attēlojums

Lai novērtētu vazodilatācijas intensitātes izmaiņas hroniskas smēķēšanas ietekmē, pētījumā iekļautiem dalībniekiem iepriekš aprakstītā mērījumu gaita ar LDI aparātu tika veikta vienu reizi. Savukārt, **smēķēšanas akūtā efekta** izmaiņu novērtēšanai, mērījumi ar LDI aparātu un asinsspiediena mērītāju tika veikti atkārtoti:

- 1) pirms LDI mērījumu veikšanas katrai personai izmēra arteriālo asinsspiedienu un pulsu (kopā 3 reizes, lai izrēķinātu vidējo vērtību);
- 2) uz labās rokas plaukstas virsmas veic siltuma hiperēmijas testu (28 minūtes), pēc tam uz kreisās plaukstas virsmas veic Ach jontoforēzes testu (16 minūtes);
- 3) pēc abiem mērījumiem persona dodas uz blakus telpu un 5 minūšu laikā izsmēķē 1 cigareti un tad dodas atpakaļ uz mērījumu veikšanas vietu;

- 4) pēc 5-8 minūtēm kopš cigaretes izsmēķēšanas tiek mērīts arteriālais asinsspiediens un pulss (kopā 3 reizes)
- 5) uz labās rokas plaukstas virsmas veic siltuma hiperēmijas testu (28 minūtes);
- 6) *tā pat kā 3.punktā;*
- 7) *tā pat kā 4.punktā;*
- 8) uz kreisās plaukstas virsmas veic Ach jontoforēzes testu (16 minūtes).

Smēķēšanas akūtā efekta izmaiņas tiek novērtētas, salīdzinot iegūtos LDI siltuma testa, Ach testa un hemodinamikas mērījumu rezultātus pirms un pēc smēķēšanas.

### 2.3. Signālmolekulu koncentrāciju noteikšana seruma paraugos

Analīžu veikšanai tika iegūtas tukšas dūšas (pēdējā maltīte pirms 12 stundām) venozās asinis tieši no vēnas vakutaineros bez antikoagulanta. Asins paraugiem ļāva sarecēt 20 minūtes; maksimālais to atrašanās laiks istabas temperatūrā bija 2 stundas.

Centrifugējot (20 minūtes, 1600 RPM, 4°C), tika atdalīts asins serums. Seruma paraugi tika sadalīti porcijās polipropilēna Ependorfa stobriņos un sasaldēti pie -20°C; uzglabāti pie -80°C. Analīzēm netika izmantoti hemolītiski vai lipēmiski paraugi, kā arī paraugi pēc otrā sasaldēšanas/ atkausēšanas cikla.

Rādītāji glikoze, insulīns, lipīdi (kopējais holesterīns, ABL, ZBL un triglicerīdi) tika noteikti P.Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas laboratorijās, saskaņā ar aprobētām metodēm. Insulīna rezistences noteikšanai tika izmantots insulīna homeostāzes modelis (Matthews et al. 1985), kurā insulīna rezistences indekss (HOMA-IR) tiek aprēķināts matemātiski pēc sekojošas formulas:

$$\text{HOMA-IR} = \text{tukšas dūšas insulīns } (\mu\text{U/ml}) \times \text{tukšas dūšas glikoze } (\text{mmol/l})/22.5.$$

Citokīnu, hemokīnu un citu ar endotēlija funkcijām saistītu molekulu koncentrācijas seruma paraugos tika noteiktas, izmantojot uz xMAP tehnoloģijas bāzēto testēšanas sistēmu LUMINEX-200, komplektā ar to esošo datorprogrammu Luminex 200 v2.3. (*Luminex Corporation, ASV*) un Millipore (ASV) un Linco Research (ASV) reaģentu kitus.

Ar reaģentu kitu “Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Kit, #MPXHCYTO-60K” (Millipore, ASV) tika noteiktas IL-6, IL-8, MCP-1, un TNF $\alpha$  koncentrācijas seruma paraugos. Analīzes iekšējais (*intra-assay*) %CV noteiktajām molekulām ir robežās no 4,6% līdz 12,0%, starpanalīžu (*inter-assay*) %CV – no 3,7% līdz 16,8%.

Kits “Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1 LincoPlex Kit, #HCVD1-67AK” (Linco Research, ASV) tika izmantots sE-selektīna, sICAM-1, MPO, adiponektīna un kopējā PAI-1 koncentrāciju noteikšanai seruma paraugos. Analīzes iekšējais %CV ir no 4,5 % līdz 12,3%, starpanalīžu %CV – no 8,5% līdz 16,3%.

Paraugu sagatavošana un analīze tika veikta atbilstoši reaģentu kitiem pievienotajiem protokoliem. Protokola paraugs, izmantojot reaģentu kitu Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Kit ir pielikumā (3.Pielikums).

## 2.4. Datu statistiskā analīze

Datu statistiskai apstrādei tika izmantota datorprogramma STATISTICA 7.0 (*StatSoft Inc, USA*). Rādītāju atšķirības starp grupām tika noteiktas, izmantojot *ANOVA Two-way* testu. Datu atbilstība normālam sadalījumam tika novērtēta ar Pīrsona (*Pearson*) normalitātes testu. Kvantitatīvie rādītāji, kuru sadalījums bija atbilstošs normālajam sadalījumam (būtiski neatšķīrās no normālā sadalījuma), tika aprakstīti ar vidējo aritmētisko ± standartnovirzi (SD), bet rādītājiem, kuri neatbilda normālajam sadalījumam, tika izmantota mediāna un kvartīles (I un III jeb 25% un 75%).

Rādītājiem, kuri neatbilda normālam sadalījumam, tika piemērota logaritmiskā transformācija  $\log_{10}$ . Normālajam sadalījumam atbilstošo rādītāju atšķirības grupās tika noteiktas, izmantojot *Fisher LSD* testu. Šis tests tika izmantots arī rādītājiem, kuriem tika panākta atbilstība normālajam sadalījumam pēc logaritmiskās transformācijas. Par vērtību, kas norādīja būtisku atšķirību, tika uzskatīta  $p < 0,05$  vai  $p < 0,01$ , un tendence, ja  $p < 0,1$ .

Tā kā lielākā daļa rādītāju bija neparametriski, tad rādītāju savstarpējo korelāciju noteikšanai tika izmantota Spīrmena (*Spearman*) rangu korelācijas tests. Korelācija tika vērtēta kā vāja, ja korelācijas koeficients  $r \leq 0,25$ , kā vidēja, ja korelācijas koeficients  $r$  iekļāvās intervālā  $[0,26 - 0,74]$ , un kā cieša, ja  $r \geq 0,75$ .



### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. SMĒĶĒŠANAS HRONISKĀ IETEKME

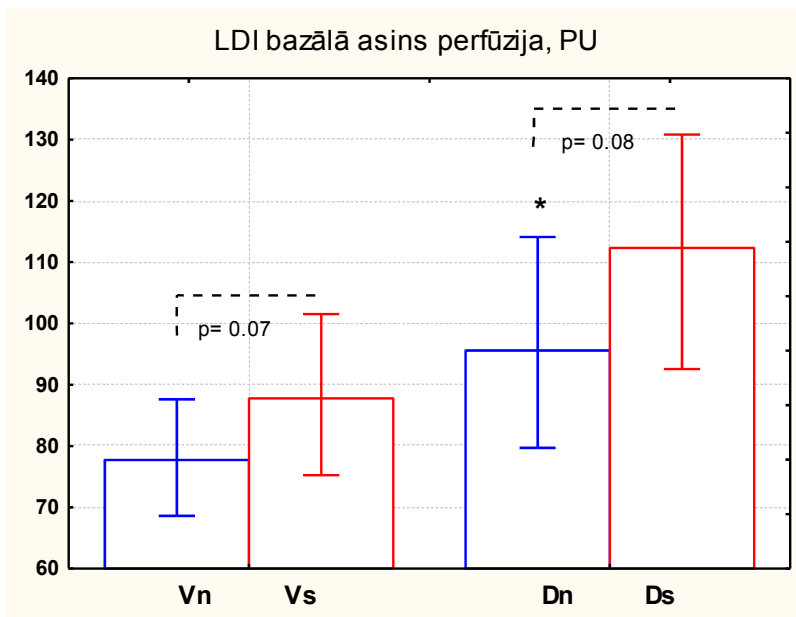
##### 3.1.1. Vazodilatācijas testu rādītāji

###### Bazālās asins plūsmas intensitāte ādas mikrocirkulācijā

Smēķētājiem abās pētījuma grupās (V un D) bazālās asins plūsmas jeb fona intensitāte ādas mikrocirkulācijā ir palielināta ar tendenci, salīdzinot ar atbilstošu grupu nesmēķētājiem – V grupā  $p=0,07$  un D grupā  $p=0,08$ . Savukārt, bazālās asins plūsmas atšķirības starp nesmēķētāju grupām Vn un Dn ir būtiskas: 78 (69-87) PU pret 95 (80-114) PU, attiecīgi ( $p<0,05$ ). Rezultāti ir atspoguļoti 3.tabulā un 17.attēlā.

3.tabula  
Bazālās asins plūsmas intensitāte pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

LDI bazālā perfūzija, PU	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	78 (69-87)	88 (75-102)	95 (80-114)	112 (93-131)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p=0,07$		$p=0,08$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p<0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



###### 17. attēls. Bazālās asins plūsmas intensitāte pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

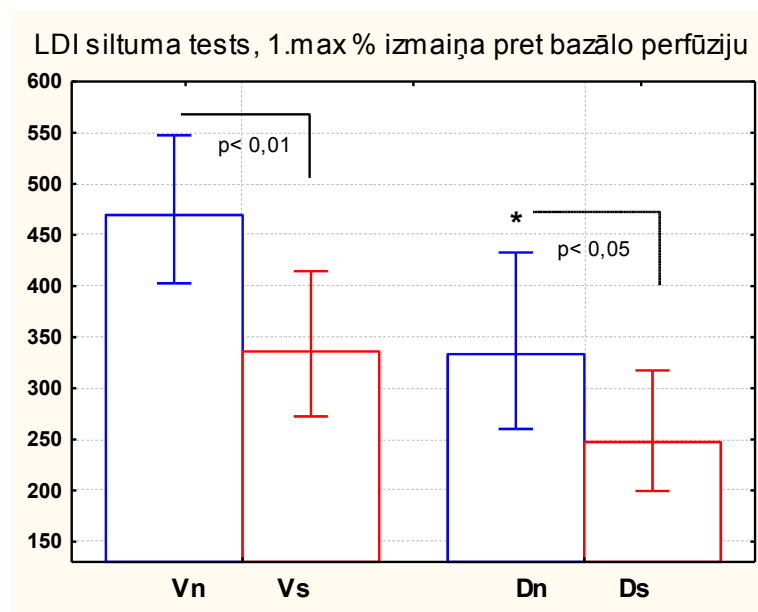
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, PU – perfūzijas vienības (*perfusion units*); \*  $p<0,05$  pret Vn

## Lokāla siltuma inducētās vazodilatācijas intensitāte ādas mikrocirkulācijā

Siltuma inducētās aksona refleksa mediētas vazodilatācijas intensitātes 1.maksimums (% izmaiņa no bazālās asins plūsmas) ir būtiski samazināts smēķētājiem abās pētījuma grupās, salīdzinot ar attiecīgo grupu nesmēķētājiem. Arī Dn grupā, salīdzinājumā ar Vn grupu, vazodilatācijas intensitātes 1.maksimuma % izmaiņa ir būtiski samazināta ( $p < 0,05$ ). Rezultāti ir atspoguļoti 4.tabulā un 18.attēlā.

**4.tabula**  
**Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes 1.maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

LDI silt.t.1 max %	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	470 (403-547)	336 (272-415)	333 (260-433)	247 (199-317)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,01$		$p < 0,05$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**18.attēls. Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes 1.maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

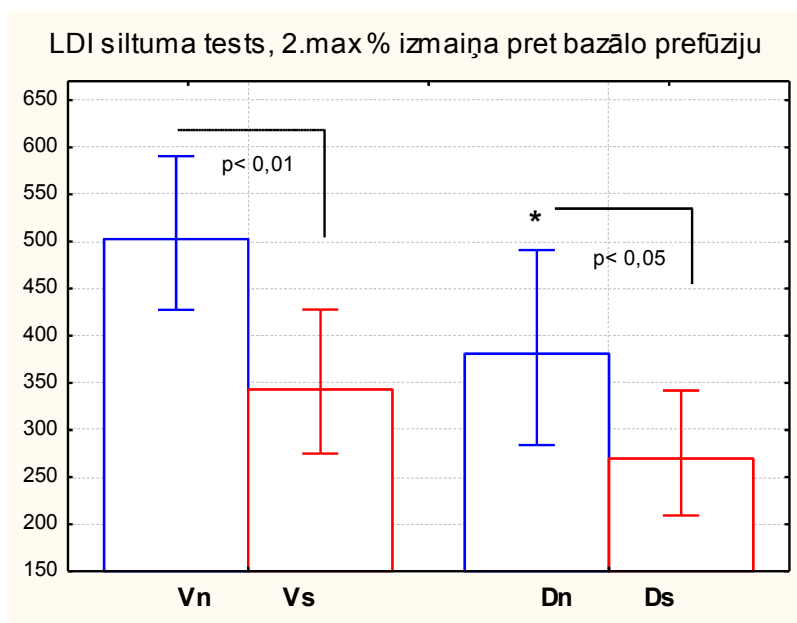
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p < 0,05$  attiecībā pret Vn

Siltuma inducētās endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitātes 2.maksimums (% izmaiņa no bazālās asins plūsmas) ir būtiski samazināts smēķētājiem abās pētījuma grupās, salīdzinot ar attiecīgo grupu nesmēķētājiem – V grupā  $p < 0,01$ , D grupā  $p < 0,05$ . Savukārt, Dn grupā, salīdzinājumā ar Vn grupu, vazodilatācijas intensitātes 2.maksimums (% izmaiņas) arī ir būtiski samazināts ( $p < 0,05$ ). Rezultāti ir atspoguļoti 5.tabulā un 19.attēlā.

**5.tabula**

**Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes 2.maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

LDI silt.t.2 max %	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	502 (428-591)	343 (275-428)	381 (284-491)	270 (209-342)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,01$		$p < 0,05$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**19.attēls. Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes 2.maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

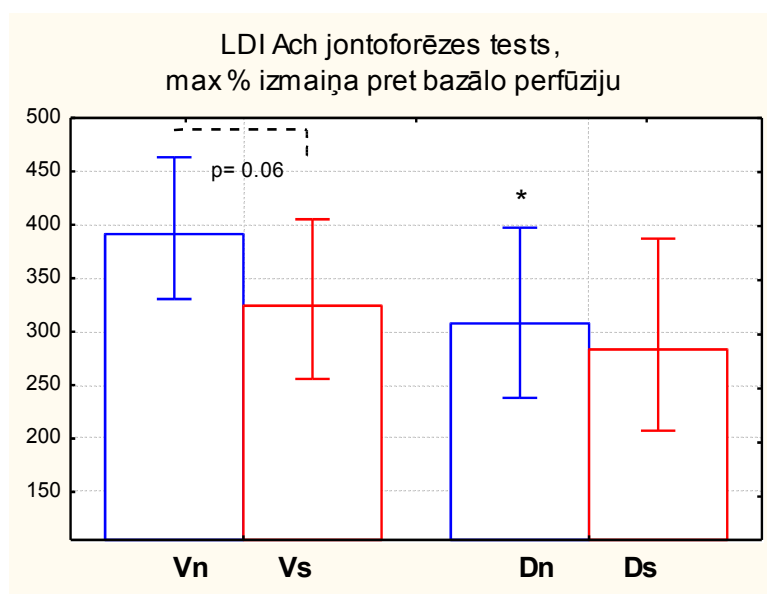
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p < 0,05$  attiecībā pret Vn

## Acetilholīna inducētās vazodilatācijas intensitāte ādas mikrocirkulācijā

Acetilholīna inducētās endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitātes maksimums (% izmaiņa no bazālās asins plūsmas) ir samazināts ar tendenci veselo smēķētāju grupā, salīdzinājumā ar veselo nesmēķētāju grupu ( $p=0,06$ ) bet būtiskas izmaiņas nav vērojamas starp smēķētājiem un nesmēķētājiem dislipidēmijas grupā. Salīdzinot Vn un Dn grupas, tad Dn grupā Ach inducēta vazodilatācija samazinās būtiski ( $p<0,05$ ). Rezultāti ir atspoguļoti 6.tabulā un 20.attēlā.

**6.tabula**  
Acetilholīna inducētās vazodilatācijas intensitātes maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

LDI Ach max %	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	391 (331-463)	324 (256-405)	308 (238-397)	283 (207-387)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p=0,06$		$p=0,36$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p<0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**20.attēls.** Acetilholīna inducētās vazodilatācijas intensitātes maksimums (% izmaiņas no bazālās asins plūsmas) pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju,  
Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p<0,05$  attiecībā pret Vn

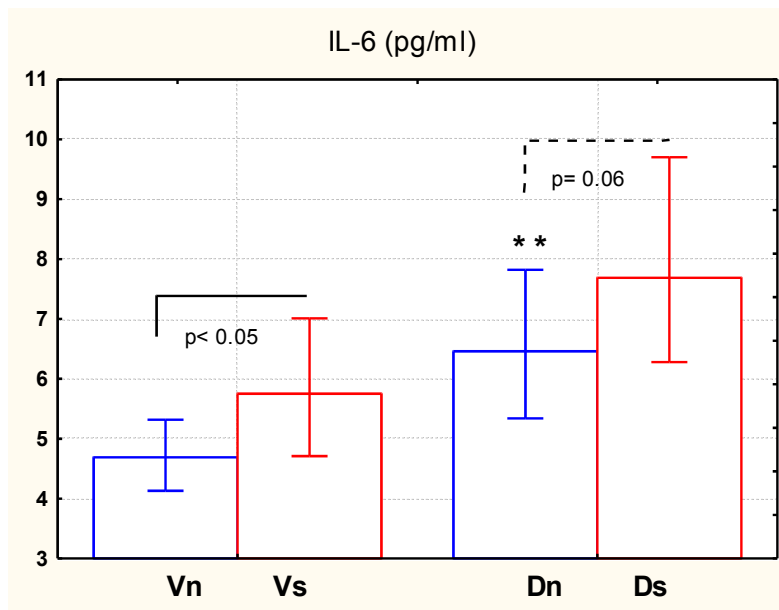
### 3.1.2. Endotēlija (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu seruma koncentrācijas

#### Iekaisuma reakcijas stimulējošie faktori IL-6, TNF- $\alpha$ , sE-selektīns, sICAM-1, IL-8, MCP-1, MPO

Veseliem smēķētājiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, IL-6 seruma koncentrācija ir būtiski palielināta ( $p < 0,05$ ), bet smēķētājiem ar dislipidēmiju minētais iekaisuma citokīns serumā ir palielināts ar tendenci ( $p = 0,06$ ). Nesmēķētājiem ar dislipidēmiju (Dn grupā), salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem (Vn grupu), IL-6 seruma koncentrācija ir būtiski palielināta ( $p < 0,01$ ).

7.tabula  
IL-6 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

IL-6	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	4,69 (4,13-5,32)	5,75 (4,71-7,01)	6,46 (5,34-7,82)	7,69 (6,28-9,7)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,05$		$p = 0,06$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,01$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



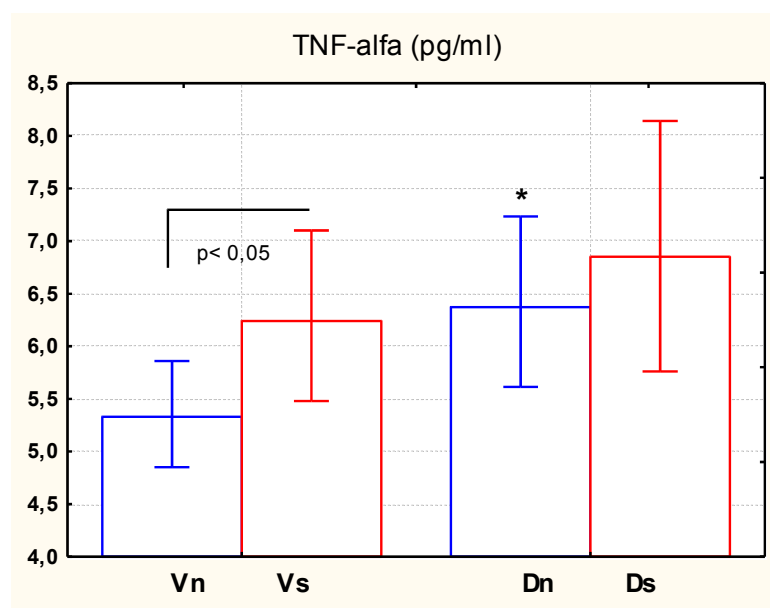
21.attēls. IL-6 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*\*  $p < 0,01$  attiecībā pret Vn grupu.

Iekaisuma citokīna TNF- $\alpha$  seruma koncentrācija veseliem smēķētājiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, ir būtiski palielināta ( $p < 0,05$ ), bet dislipidēmijas grupā nav atšķirību starp smēķētājiem un nesmēķētājiem. Savukārt, nesmēķētājiem ar dislipidēmiju (Dn), salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem (Vn), TNF- $\alpha$  seruma koncentrācija ir būtiski palielināta ( $p < 0,05$ ).

**8.tabula**  
**TNF- $\alpha$  seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

TNF- $\alpha$	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	5,33 (4,85-5,86)	6,24 (5,48-7,11)	6,37 (5,61-7,24)	6,85 (5,76-8,14)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,05$		$p = 0,28$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



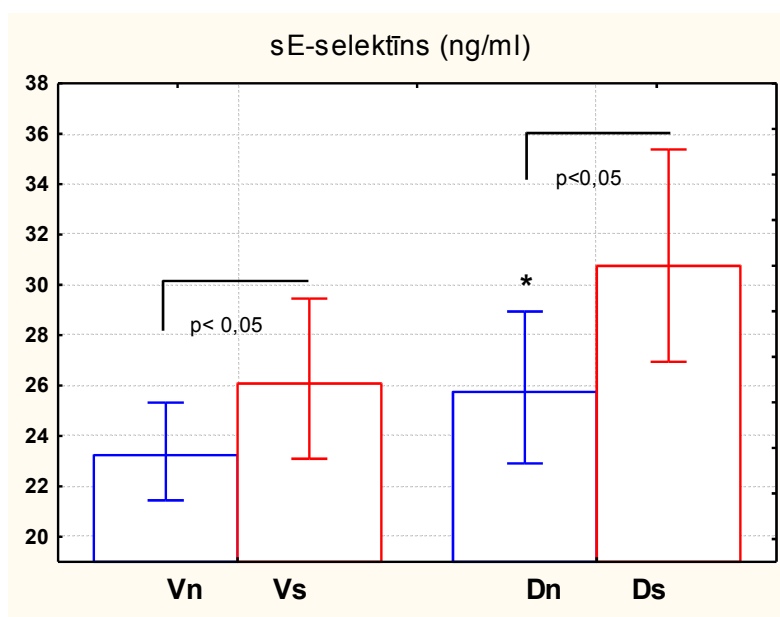
**22.attēls. TNF- $\alpha$  seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p < 0,05$  attiecībā pret Vn grupu.

Adhēzijas molekulas sE-selektīna seruma koncentrācija būtiski ir palielināta gan veselo smēķētāju grupā ( $p < 0,05$ ), gan smēķētāju grupā ar dislipidēmiju ( $p < 0,05$ ), salīdzinājumā ar attiecīgo nesmēķētāju grupu. Savstarpēji salīdzinot nesmēķētāju grupas Vn pret Dn, tad dislipidēmijas grupā sE-selektīna seruma koncentrācija ir palielināta būtiski ( $p < 0,05$ ).

**9.tabula**  
sE-selektīna seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

sE-selektīns	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	23,3(21,4-25,3)	26,1 (23,1-29,5)	25,7 (22,9-28,9)	30,8 (26,9-35,4)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,05$		$p < 0,05$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



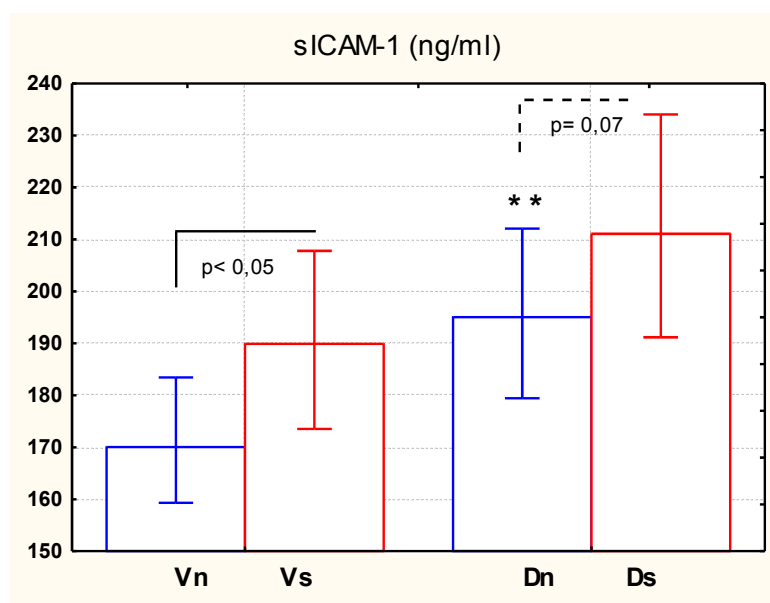
**23.attēls.** sE-selektīna seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p < 0,05$  attiecībā pret Vn grupu.

Adhēzijas molekulas sICAM-1 seruma koncentrācija veselo smēķētāju grupā, salīdzinājumā ar veselo nesmēķētāju grupu, būtiski ir palielināta ( $p < 0,05$ ), bet dislipidēmijas grupā smēķētājiem šīs molekulas koncentrācijas vidējā vērtība ir palielināta ar tendenci, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem ( $p = 0,07$ ). Salīdzinot nesmēķētāju grupas Vn un Dn, tad sICAM-1 seruma koncentrācija būtiski ir palielināta dislipidēmijas grupā ( $p < 0,01$ ).

**10.tabula**  
sICAM-1 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

sICAM-1	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	170 (159-183)	190 (174-208)	195 (179-212)	211 (191-234)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,05$		$p = 0,07$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,01$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**24.attēls.** sICAM-1 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

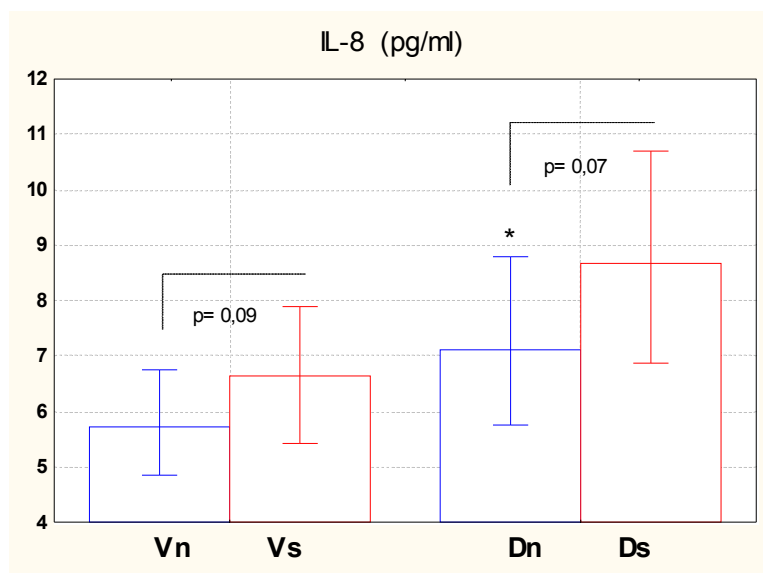
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*\*  $p < 0,01$  attiecībā pret Vn grupu.



Hemoatraktantā proteīna IL-8 seruma koncentrācijas vidējās vērtības starp atbilstošo grupu smēķētājiem un nesmēķētājiem atšķiras nebūtiski, tātad, Vs pret Vn  $p=0,09$  un Ds pret Dn  $p=0,07$ . Savukārt, nesmēķētāju grupā Dn, attiecībā pret nesmēķētāju grupu Vn, IL-8 koncentrācija serumā ir būtiski palielināta ( $p<0,05$ ).

**11.tabula**  
**IL-8 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

IL-8	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	5,72 (4,85-6,75)	6,64 (5,42-7,89)	7,11 (5,75-8,79)	8,67 (6,87-10,7)
Statistiska ticamība starp <b>Vn-Vs; Dn-Ds</b>	$p= 0,09$		$p= 0,07$	
Statistiska ticamība starp <b>Vn-Dn</b>	$p< 0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



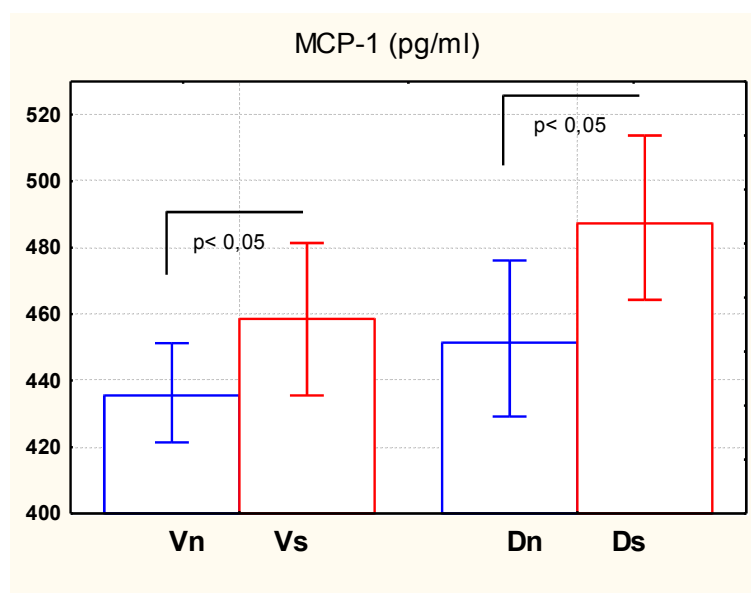
**25.attēls. IL-8 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*  $p<0,05$  attiecībā pret Vn grupu.

Hemoatraktantā proteīna MCP-1 seruma koncentrācija abās smēķētāju grupās, salīdzinājumā ar atbilstošo nesmēķētāju grupu, ir palielinātas būtiski – Vs pret Vn  $p < 0,05$  un Ds pret Dn  $p < 0,05$ . Salīdzinot nesmēķētāju grupas Vn un Dn, tad MCP-1 seruma koncentrācijas vidējā vērtība starp grupām neatšķiras.

**12.tabula**  
MCP-1 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

MCP-1	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	436 (421-451)	459 (436-481)	451 (429-476)	487 (464-514)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,05$		$p < 0,05$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p = 0,11$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



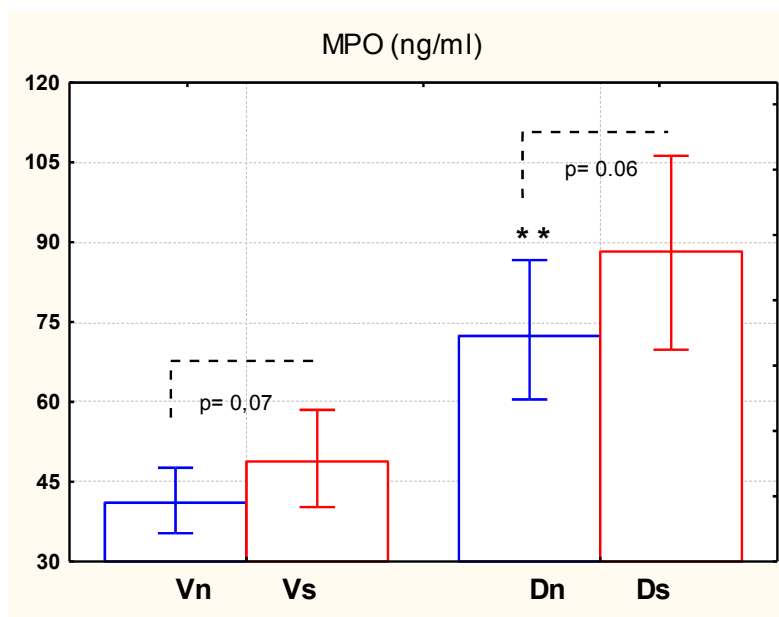
**26.attēls. MCP-1 seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju.

Mieloperoksidāzes (MPO) seruma koncentrācija abās smēķētāju grupās, salīdzinājumā ar attiecīgo nesmēķētāju grupu, ir palielināta ar tendenci – Vs pret Vn  $p=0,07$  un Ds pret Dn  $p=0,06$ . Savukārt, savstarpēji salīdzinot nesmēķētāju grupas Vn un Dn, MPO seruma koncentrācija būtiski ir palielināta personām ar dislipidēmiju ( $p<0,01$ ).

**13.tabula**  
**MPO seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

MPO	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	41,1 (35,3-47,6)	48,8 (40,2-58,5)	72,4 (60,4-86,7)	88,2 (69,8-106)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p= 0,07$		$p= 0,06$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p< 0,01$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**27.attēls. MPO seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

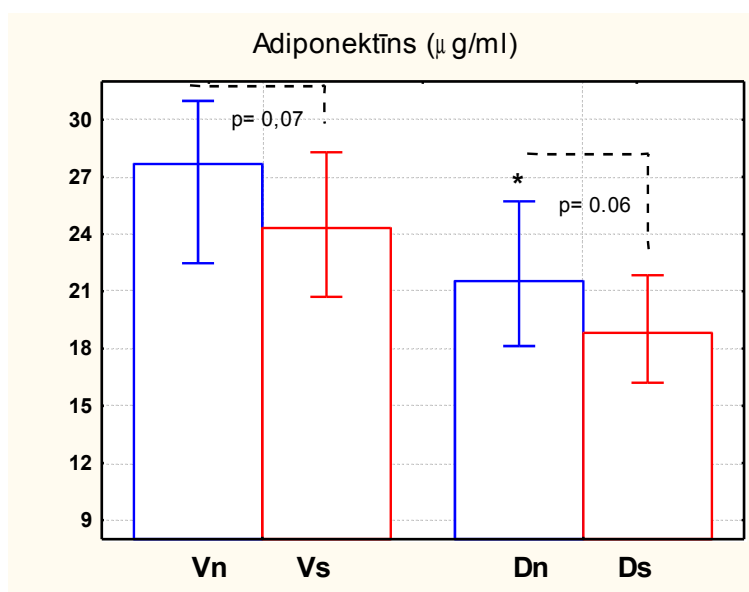
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju, \*\*  $p<0,01$  attiecībā pret Vn grupu.

## Iekaisuma reakcijas kavējošais faktors adiponektīns

Adiponektīna seruma koncentrācija ir samazināta ar tendenci abās smēķētāju grupās, salīdzinājumā ar attiecīgo nesmēķētāju grupu – Vs pret Vn  $p=0,07$  un Ds pret Dn  $p=0,06$ . Savstarpēji salīdzinot nesmēķētāju grupas Vn un Dn, adiponektīna koncentrācija būtiski ( $p<0,05$ ) ir samazināta personām ar dislipidēmiju (Dn grupā).

**14.tabula**  
**Adiponektīna seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

Adiponektīns	Vn	Vs	Dn	Ds
Mediāna (25% - 75% kvartīles)	27,7 (22,5-31)	24,3 (20,7-28,3)	21,5 (18,1-25,7)	18,8 (16,2-21,8)
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p=0,07$		$p=0,06$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p<0,05$			
Datu transformācija	log transformācija			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



### 28.attēls. Adiponektīna seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds

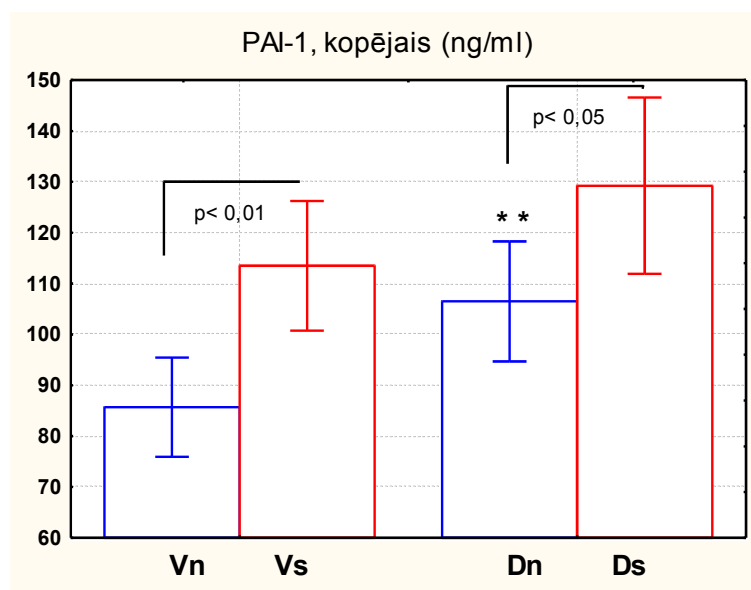
Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju; \*  $p<0,05$  attiecībā pret Vn grupu.

### Fibrinolīzi kavējošais faktors PAI-1 (kopējais)

PAI-1 seruma koncentrācija būtiski ir palielināta abās smēķētāju grupās, salīdzinājumā ar attiecīgo nesmēķētāju grupu – Vs pret Vn  $p < 0,01$  un Ds pret Dn  $p < 0,05$ . Savstarpēji salīdzinot nesmēķētāju grupas, PAI-1 koncentrācija būtiski ( $p < 0,01$ ) ir palielināta personām ar dislipidēmiju.

**15.tabula**  
**PAI-1 (kopējā) seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

PAI-1, kopējais	Vn	Vs	Dn	Ds
Vidējā vērtība $\pm$ SD	85,7 $\pm$ 9,8	113,5 $\pm$ 12,8	106,5 $\pm$ 11,8	129,2 $\pm$ 17,3
Statistiska ticamība starp Vn-Vs; Dn-Ds	$p < 0,01$		$p < 0,05$	
Statistiska ticamība starp Vn-Dn	$p < 0,01$			
Datu transformācija	netransformēti			
Grupu salīdzināšanas tests	Fisher LSD			



**29.attēls. PAI-1 (kopējā) seruma koncentrācija pētījuma grupās Vn, Vs, Dn un Ds**

Vn – veseli nesmēķētāji, Vs – veseli smēķētāji, Dn – nesmēķētāji ar dislipidēmiju, Ds – smēķētāji ar dislipidēmiju; \*\*  $p < 0,01$  attiecībā pret Vn grupu.

### 3.1.3. KORELĀCIJU ANALĪZE

Izmantojot Spīrmena (*Spearman*) rangu korelācijas testu, nosakot korelāciju būtiskuma līmeni  $p$  un korelācijas koeficientu  $r$ , tika veikta korelāciju analīze starp hroniskas smēķēšanas ietekmi, mikrocirkulācijas vazodilatācijas intensitāti, insulīna rezistences rādītājiem un endotēlija (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu seruma koncentrācijām.

**Smēķēšanas kumulatīvā efekta (pakgadu skaita) un dienā izsmēķēto cigarešu skaita korelācijas.** Rezultāti ir atspoguļoti 16. un 17.tabulā.

16.tabula

Pakgadu skaita korelācijas

Smēķēšanas pakgadi	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
LDI-bazālā plūsma	0.212	0.045	0.308	0.013	0.382	0.060
LDI-silt.t.1 max % izmaiņa	-0.360	0.001	-0.299	0.015	-0.409	0.042
LDI-silt.t.2 max % izmaiņa	-0.339	0.001	-0.280	0.023	-0.390	0.050
LDI-Ach max %	-0.261	0.014	-0.227	0.071		
Vidukļa apk/mērs	0.199	0.037				
Insulīns					0.569	0.001
HOMA-IR					0.582	0.001
ABL	-0.240	0.028	-0.234	0.091	-0.266	0.082
TG	0.214	0.052			0.486	0.003
Adiponektīns	-0.227	0.015	-0.267	0.048	-0.261	0.082
MCP-1	0.237	0.012	0.220	0.063	0.240	0.073
IL-8	0.208	0.030	0.250	0.036		
sE-selektīns	0.259	0.006	0.288	0.082	0.446	0.003
sICAM-1	0.278	0.003	0.299	0.010	0.263	0.079
TNF-alfa	0.205	0.033	0.238	0.044		
IL-6	0.353	0.001	0.490	0.001	0.267	0.092
PAI-1 (kopējais)	0.370	0.001	0.443	0.001	0.290	0.046
MPO			0.258	0.081		

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Kā redzams 16.tabulā, smēķēšanas kumulatīvais efekts pozitīvi korelē ar bazālo asins plūsmas jeb fona intensitāti V grupā ( $r=0,308$ ;  $p=0,013$ ) un D grupā ( $r=0,382$ ;  $p=0,060$ ). Aksonu refleksa mediētas (LDI-silt.t.1 max, % izmaiņa) un endotēlija atkarīgās vazodilatācijas (LDI-silt.t.2 max, % izmaiņa) intensitātes negatīvas korelācijas ar pakgadu

skaitu ir būtiskas, un ciešāka korelācija ir smēķētājiem ar dislipidēmiju, salīdzinot ar veseliem smēķētājiem: LDI silt.t.1.max (%) Ds grupā  $r = -0,409$ ; pret Vs grupā  $r = -0,299$ ; LDI silt.t.2.max (%) Ds grupā  $r = -0,390$  pret Vs grupā  $r = -0,280$ .

Pakgadu ietekme ciešāk pozitīvi korelē ar insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem personām ar dislipidēmiju: insulīna seruma koncentrācija ( $r=0,569$ ;  $p=0,001$ ), HOMA-IR indekss ( $r=0,582$ ;  $p=0,001$ ) un triglicerīdu seruma koncentrācija ( $r=0,486$ ;  $p=0,003$ ). Smēķēšanas kumulatīvā efekta saistība ar endotēlija (dis)funkciju raksturojošām signālmolekulām parādīja, ka pakgadu skaits negatīvi korelē ar adiponektīna koncentrāciju, kas vairāk ir izteikts veselu personu grupā ( $r = -0,267$ ;  $p=0,048$ ), jo grupā ar dislipidēmiju ir vērojama tikai negatīva tendence ( $r = -0,261$ ;  $p=0,082$ ). Savukārt, pozitīvas un būtiskas korelācijas ir vērojamas starp pakgadu skaitu un asinsvadu iekaisuma signālmolekulām, kas izteiktāk ir vērojams veselu cilvēku grupā. Grupā ar dislipidēmiju būtiskas korelācijas ir vērojamas starp pakgadu skaitu un sE-selektīna ( $r=0,446$ ;  $p=0,003$ ) un PAI-1 ( $r=0,290$ ;  $p=0,046$ ) seruma koncentrācijām.

## 17. tabula

### Dienā izsmēķēto cigarešu skaita korelācijas

Cigarešu skaits dienā	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
LDI-Ach max %			<i>-0.330</i>	<i>0.088</i>		
Vidukļa apk/mērs	0.335	0.030	<i>0.367</i>	<i>0.054</i>	0.666	0.009
Glikoze					<i>0.430</i>	<i>0.087</i>
Insulīns	0.320	0.039	0.435	0.021	0.517	0.050
HOMA-IR	<i>0.296</i>	<i>0.057</i>	0.384	0.044	0.529	0.050
IL-8			0.390	0.044		
IL-6	<i>0.264</i>	<i>0.091</i>	0.426	0.024		
PAI-1 (kopējais)	0.400	0.010	0.531	0.004		

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

17.tabulā redzams, ka dienā izsmēķēto cigarešu skaits pozitīvi korelē ar insulīna rezistences rādītājiem abās pētījuma grupās (V un D), tomēr dislipidēmijas grupā ir vērojamas ciešākas korelācijas: vidukļa apkārtmērs D grupā ( $r=0,666$ ;  $p=0,009$ ) pret V grupu ( $r=0,367$ ;  $p=0,054$ ), insulīna seruma koncentrācija D grupā ( $r=0,517$ ;  $p=0,050$ ) pret V grupu ( $r=0,435$ ;

p=0,021) un HOMA-IR indekss D grupā (r=0,529; p= 0,050) pret V grupu (r=0,384; p=0,044). Bez tam, tikai veselo smēķētāju grupā dienā izsmēķēto cigarešu skaitam ir būtiskas pozitīvas korelācijas ar IL-8 (r=0,390; p=0,044), IL-6 (r=0,426; p=0,024) un PAI-1 (r=0,531; p=0,004) seruma koncentrācijām.

### Mikrocirkulācijas vazodilatācijas intensitātes korelācijas

Rezultāti ir atspoguļoti 18., 19. 20. un 21.tabulā.

18.tabula

#### Bazālās asins plūsmas (PU) korelācijas

	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
LDI bazālā plūsma, PU	0.256	0.015				
Vidukļa apk/mērs						
HOMA-IR					0.316	0.081
MCP-1	0.230	0.066	0.287	0.026		
sICAM-1	0.214	0.087	0.263	0.078		

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Mikrocirkulācijas bazālā asins plūsma jeb fona intensitāte pozitīvi korelē ar vidukļa apkārtmēru visiem pētījuma dalībniekiem kopā, bet ne atsevišķi pa grupām (r=0,256; p=0,015). Veselu cilvēku grupā bazālā asins plūsma būtiski pozitīvi korelē ar MCP-1 seruma koncentrāciju (r=0,287; p=0,026), bet korelāciju tendence vērojama ar sICAM-1 seruma koncentrāciju (r=0,263; p=0,078). Personām ar dislipidēmiju mikrocirkulācijas bazālās plūsmas intensitātei ir pozitīvas korelācijas tendence ar HOMA-IR indeksu (r=0,316; p=0,081).



19.tabula

## Siltuma inducētās vazodilatācijas 1 max (%) korelācijas

LDI silt.t.1 max (%)	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
Vidukļa apk/mērs	-0.336	0.001				
Glikoze	-0.239	0.024				
Insulīns	-0.220	0.038			-0.364	0.068
HOMA-IR	-0.239	0.024			-0.463	0.023
TG	-0.314	0.007				
MCP-1	-0.298	0.040	-0.276	0.072		
sICAM-1	-0.274	0.043				
IL-6	-0.279	0.049				

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes pirmais maksimums (LDI silt.t.1 max, % izmaiņa no bazālās perfūzijas) statistiski ticami negatīvi korelē ar visiem insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem abās dalībnieku grupās kopā: vidukļa apkārtmēra lielumu ( $r = -0,336$ ), HOMA-IR indeksu ( $r = -0,239$ ), glikozes ( $r = -0,239$ ), insulīna ( $r = -0,220$ ) un triglicerīdu ( $r = -0,314$ ) seruma koncentrācijām. Grupā ar dislipidēmiju veidojas ciešāka negatīva korelācija ar HOMA-IR indeksu ( $r = -0,463$ ;  $p = 0,023$ ), un tendence ar insulīna seruma koncentrāciju ( $r = -0,364$ ;  $p = 0,068$ ). Vazodilatācijas pirmais maksimums statistiski ticami negatīvi korelē ar MCP-1, sICAM-1 un IL-6 seruma koncentrācijām abās pētījuma grupās kopā, bet veselo personu grupā ir negatīvas korelācijas tendence ar MCP-1 seruma koncentrāciju.

20.tabula

## Siltuma inducētās vazodilatācijas 2 max (%) korelācijas

LDI silt.t. 2 max (%)	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
Vidukļa apk/mērs	-0.259	0.014				
insulīns					-0.325	0.087
HOMA-IR					-0.410	0.046
TG	-0.246	0.037				
MCP-1	-0.298	0.045	-0.289	0.069		
MPO	-0.316	0.044				
IL-6	-0.287	0.049				

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes otrais maksimums (LDI silt.t.2 max, % izmaiņa no bazālās perfūzijas) statistiski ticami negatīvi korelē ar insulīna rezistences rādītājiem: vidukļa apkārtmēra lielumu ( $r = -0,259$ ;  $p = 0,014$ ) un triglicerīdu seruma koncentrāciju ( $r = -0,246$ ;  $p = 0,037$ ) abās grupās kopā, bet atsevišķi, personām ar dislipidēmiju – ar HOMA-IR indeksu ( $r = -0,410$ ;  $p = 0,046$ ). Attiecībā uz endoteliālās (dis)funkcijas signālmolekulu koncentrācijām, ir iegūtas statistiski ticamas negatīvas korelācijas ar MCP-1 ( $r = -0,298$ ;  $p = 0,045$ ), MPO ( $r = -0,316$ ;  $p = 0,044$ ) un IL-6 ( $r = -0,287$ ;  $p = 0,049$ ) seruma koncentrācijām abās pētījuma grupās kopā, bet veselām personām korelāciju tendence ar MCP-1 seruma koncentrāciju ( $r = -0,289$ ;  $p = 0,069$ ).

**21.tabula**

**Acetilholīna inducētās vazodilatācijas max (%) korelācijas**

LDI Ach t.max (%)	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
Vidukļa apk/mērs	-0.217	0.043				
Glikoze	-0.240	0.025			-0.347	0.07
TG	-0.293	0.016				
sICAM-1	-0.309	0.049	-0.283	0.061	-0.323	0.057
MPO	-0.316	0.043				

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Acetilholīna inducētās vazodilatācijas maksimums statistiski ticami negatīvi korelē ar šādiem insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem abās dalībnieku grupās kopā: vidukļa apkārtmēra lielumu ( $r = -0.217$ ;  $p = 0.043$ ), glikozes ( $r = -0.240$ ;  $p = 0.025$ ) un triglicerīdu ( $r = -0.293$ ;  $p = 0.016$ ) seruma koncentrācijām. Visās grupās kopā Ach inducētās vazodilatācijas intensitātes maksimums negatīvi korelē ar ICAM-1 ( $r = -0.309$ ;  $p = 0.049$ ) un MPO ( $r = -0.316$ ;  $p = 0.043$ ) seruma koncentrācijām.

## Insulīna seruma koncentrācijas un HOMA-IR indeksa korelācijas

Rezultāti ir atspoguļoti 22. un 23.tabulā.

22.tabula

### Insulīna seruma koncentrācijas korelācijas

Insulīns	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
LDI-silt.t.1 max % izmaiņa	-0.220	0.038			-0.364	0.068
LDI-silt.t.2 max % izmaiņa					-0.325	0.087
Adiponektīns	-0.321	0.001			-0.391	0.011
IL-8	0.215	0.024				
sE-selektīns	0.241	0.011			0.309	0.050
sICAM-1	0.281	0.003			0.323	0.040
TNF-alfa	0.278	0.003			0.387	0.014
IL-6	0.426	0.001			0.331	0.035
MPO	0.406	0.001				
PAI-1 (kopējais)	0.362	0.001	0.223	0.100	0.372	0.020

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Palielināta insulīna koncentrācija serumā statistiski ticami negatīvi korelē ar siltuma inducētas vazodilatācijas intensitātes 1.maksimumu visiem pētījuma dalībniekiem kopā ( $r = -0,220$ ;  $p = 0,038$ ), bet atsevišķi pa grupām – korelāciju tendence tikai personām ar dislipidēmiju 1.maksimumam ( $r = -0,364$ ;  $p = 0,068$ ) un 2.maksimumam ( $r = -0,325$ ;  $p = 0,087$ ).

Palielināta insulīna koncentrācija visiem dalībniekiem kopā būtiski korelē ar samazinātu adiponektīna koncentrāciju ( $r = -0,321$ ;  $p = 0,001$ ), un atsevišķi personām ar dislipidēmiju ( $r = -0,391$ ;  $p = 0,011$ ). Savukārt, insulīna seruma koncentrācija statistiski ticami korelē ar palielinātām endotēlija (dis)funkciju raksturojošo signālmolekulu koncentrācijām - IL-8, sE-selektīns, sICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, MPO un PAI-1 visiem dalībniekiem kopā. Personām ar dislipidēmiju palielināta insulīna koncentrācija būtiski korelē ar iepriekšminēto iekaisumu veicinošo signālmolekulu seruma koncentrācijām, izņemot IL-8 un MPO.

## HOMA-IR indeksa korelācijas

HOMA-IR	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
LDI-bazālā plūsma					<i>0.316</i>	<i>0.081</i>
LDI-silt.t.1 max % izmaiņa	-0.239	0.024			-0.463	0.023
LDI-silt.t.2 max % izmaiņa					-0.410	0.046
Adiponektīns	-0.318	0.001			<i>-0.297</i>	<i>0.060</i>
IL-8	0.248	0.009				
sE-selektīns	0.281	0.003			0.379	0.017
sICAM-1	0.313	0.001			0.348	0.028
TNF-alfa	0.258	0.007			<i>0.300</i>	<i>0.063</i>
IL-6	0.415	0.001			<i>0.302</i>	<i>0.058</i>
MPO	0.396	0.001				
PAI-1 (kopējais)	0.383	0.001	<i>0.231</i>	<i>0.082</i>	0.358	0.025

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

HOMA-IR indekss statistiski ticami negatīvi korelē ar siltuma inducētās vazodilatācijas intensitātes 1.maksimumu abās dalībnieku grupās kopā ( $r = -0,239$ ;  $p = 0,024$ ), bet ciešāka negatīva korelācija ir atsevišķi dislipidēmijas grupā – ar siltuma inducētās vazodilatācijas 1.maksimumu ( $r = -0,463$ ,  $p = 0,023$ ) un 2.maksimumu ( $r = -0,410$ ;  $p = 0,046$ ).

HOMA-IR indekss abās pētījuma grupās kopā statistiski ticami negatīvi korelē ar adiponektīna seruma koncentrāciju, bet pozitīvi – ar visu šajā darbā noteikto endoteliālās (dis)funkcijas signālmolekulu seruma koncentrācijām. Savukārt, atsevišķi dislipidēmijas grupā statistiski ticamas pozitīvas korelācijas ir starp HOMA-IR indeksu un sE-selektīna ( $r = 0,379$ ;  $p = 0,017$ ), sICAM-1 ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,028$ ) un kopējā PAI-1 ( $r = 0,358$ ;  $p = 0,025$ ) koncentrācijām serumā.

## Adiponektīna seruma koncentrācijas korelācijas

Adiponektīns	V + D grupas		V grupa		D grupa	
	r	P	r	P	r	P
Vidukļa apk/mērs	-0.330	0.001	-0.262	0.025		
Insulīns	-0.321	0.001			-0.391	0.011
HOMA-IR	-0.318	0.001			-0.297	0.060
ABL	0.542	0.001	0.459	0.001	0.479	0.003
TG	-0.272	0.091			-0.321	0.060
MCP-1	-0.211	0.026				
IL-8	-0.280	0.008	-0.240	0.086		
sE-selektīns	-0.379	0.001	-0.319	0.006	-0.336	0.032
sICAM-1	-0.257	0.006	-0.222	0.059		
TNF-alfa	-0.351	0.001	-0.307	0.009	-0.340	0.032
IL-6	-0.259	0.006				
MPO	-0.279	0.004				
PAI-1 (kopējais)	-0.283	0.004	-0.269	0.030		

V – veselu cilvēku grupa; D – personu grupa ar dislipidēmiju

Adiponektīna seruma koncentrācijai ir statistiski ticamas negatīvas korelācijas ar insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem – vidukļa apkārtmēra lielumu, HOMA-IR indeksu un insulīna seruma koncentrāciju abās pētījuma grupās kopā, bet atsevišķi pa grupām negatīva korelācija ar vidukļa apkārtmēru veseliem cilvēkiem ( $r = -0.262$ ;  $p = 0.025$ ), un ar palielinātu insulīna koncentrāciju personām ar dislipidēmiju ( $r = -0.391$ ;  $p = 0.011$ ). Cieša pozitīva korelācija ir starp adiponektīna un ABL koncentrācijām ( $r = 0.542$ ;  $p = 0.001$ ) visiem pētījuma dalībniekiem kopā, un atsevišķi pa grupām – veseliem cilvēkiem ( $r = 0.459$ ;  $p = 0.001$ ) un personām ar dislipidēmiju ( $r = 0.479$ ;  $p = 0.003$ ).

Statistiski ticamas negatīvas korelācijas adiponektīnam ir vērojamas ar visu šajā darbā noteikto endoteliālās (dis)funkcijas signālmolekulu seruma koncentrācijām abās pētījuma grupās kopā. Savukārt, atsevišķi pa grupām statistiski ticamas negatīvas korelācijas ir starp adiponektīna un sE-selektīna ( $r = -0.319$ ;  $p = 0.006$ ), TNF- $\alpha$  ( $r = -0.307$ ;  $p = 0.009$ ) un PAI-1 ( $r = -0.269$ ;  $p = 0.03$ ) koncentrācijām veselām personām, bet personām ar dislipidēmiju – arī ar sE-selektīna ( $r = -0.336$ ;  $p = 0.032$ ) un TNF- $\alpha$  ( $r = -0.340$ ;  $p = 0.032$ ) koncentrācijām.

### 3.2. SMĒĶĒŠANAS AKŪTĀ IETEKME

#### Hemodinamiskie mērījumi

Smēķēšanas akūtā ietekmē (pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas) statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) paaugstinās sistoliskais un diastoliskais asinsspiediens (AS) un paātrinās sirds frekvence jauniešu smēķētāju grupā. Savukārt, pieaugušo smēķētāju grupā statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) palielinās sistoliskais AS, bet nav atšķirības diastoliskā AS un sirds frekvences vidējām vērtībām pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas. Rezultāti atspoguļoti 25.tabulā.

#### Mikrocirkulācijas vazodilatācijas intensitātes rādītāji

Bazālā asins perfūzija ādas mikrocirkulācijā neatšķiras pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas ne vienā no dalībnieku grupām (25.tabula).

#### 25.tabula

Ādas mikrocirkulācijas vazodilatācijas intensitātes rādītāji un hemodinamikas mērījumi pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas

	Jaunieši smēķētāji (JS)			Pieaugušie smēķētāji (PS)		
	Pirms 1cs	Pēc 1cs	p	Pirms 1cs	Pēc 1cs	p
LDI silt.t. bazālā ,PU	81,4 ± 23,9	87 ± 36,8	-	94,3 ± 39,9	84,2 ± 40,5	-
LDI silt.t. 1.max ,PU	440,5 ± 43,7	490 ± 60	0,08	395,5 ± 48	325,4 ± 37	0,09
LDI silt.t. 2.max ,PU	465 ± 56	398 ± 92,3	0,09	404 ± 78,2	361,2 ± 84	0,08
LDI Ach bazālā ,PU	68 ± 27,5	66,3 ± 31	-	71,2 ± 31,5	60,8 ± 22	-
LDI-Ach.t. max ,PU	415,5 ± 97	300,5 ± 98	< 0,05	262,6 ± 58	199,8 ± 52	< 0,05
Sist.AS, mmHg	119,8 ± 8	128 ± 9	< 0,05	126 ± 10	136 ± 9,8	< 0,05
Diast.AS, mmHg	76,6 ± 7,8	84 ± 7	< 0,05	81,2 ± 13	86,3 ± 12	-
Sirds ritms, sit/min.	63,3 ± 5	71,4 ± 7,8	< 0,05	65,3 ± 7,8	68,5 ± 8	-

Vidējais aritmētiskais ± SD, JS – jaunieši smēķētāji, PS – pieaugušie smēķētāji.

Siltuma inducētās vazodilatācijas pirmais maksimums (LDI silt.t.1.max) smēķēšanas akūtā ietekmē palielinās ar tendenci abās pētījuma grupās – JS ( $p=0,08$ ) un PS ( $p=0,09$ ) (31.attēls). Siltuma inducētās vazodilatācijas otrais maksimums (LDI silt.t. 2.max) akūtas smēķēšanas ietekmē samazinās ar tendenci abās smēķētāju grupās – JS grupā ( $p=0,09$ ) un PS grupā ( $p=0,08$ ) (32.attēls). Savukārt, acetilholīna inducētās vazodilatācijas maksimums (LDI Ach.t. max) statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) samazinās abās pētījuma grupās pēc izsmēķēšanas

cigaretes (33.attēls). Abu pētījuma grupu vazodilatācijas rādītāji ādas mikrocirkulācijā pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas ir atspoguļoti 25.tabulā.

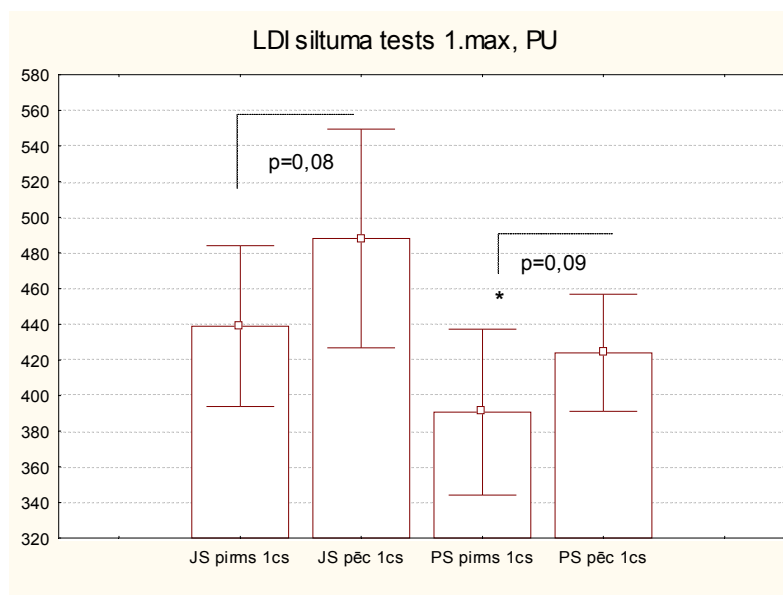
26.tabula

Vazodilatācijas testu rādītāju salīdzinājums starp vecuma grupām

	Jaunieši smēķētāji (JS)	Pieaugušie smēķētāji (PS)	p vērtība
LDI silt.t. bazālā, PU	81,4 ± 23,9	94,3 ± 39,9	-
LDI silt.t. 1.max, PU	440,5 ± 43,7	395,5 ± 48	< 0,05
LDI silt.t. 2.max, PU	465 ± 56	404 ± 78,2	-
LDI Ach bazālā, PU	68 ± 27,5	71,2 ± 31,5	-
LDI-Ach.t. max, PU	415,5 ± 97	262,6 ± 58	< 0,05

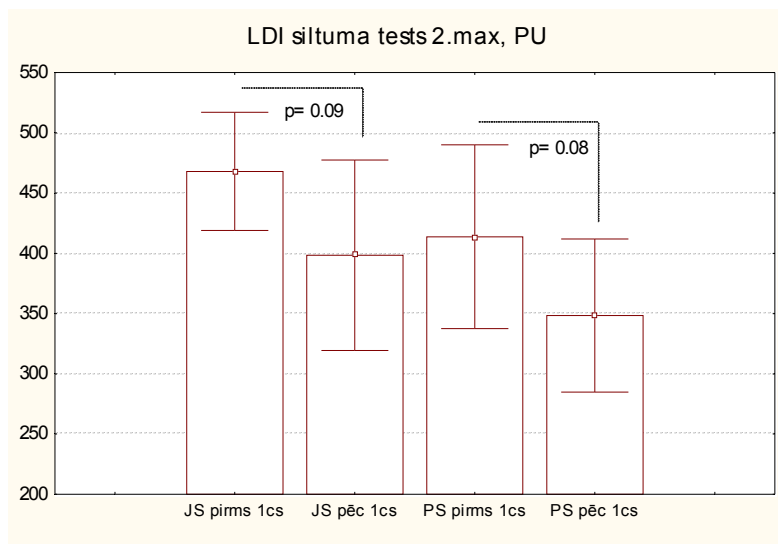
Vidējais aritmētiskais ± SD, JS – jaunieši smēķētāji, PS – pieaugušie smēķētāji

Savstarpēji salīdzinot jauniešu un pieaugušo smēķētāju grupu vazodilatācijas intensitātes vidējās vērtības pirms cigaretes izsmēķēšanas, tad rezultāti parāda, ka PS grupā būtiski ( $p < 0,05$ ) ir samazināta siltuma inducētā aksonu refleksa mediētā vazodilatācija (LDI silt.t. 1.max) un Ach inducētā endotēlija atkarīgā vazodilatācija (LDI-Ach.t.max). Siltuma inducētas endotēlija atkarīgās vazodilatācijas (LDI silt.t. 2.max) un bazālās asins plūsmas vidējās vērtības neatšķiras starp pētījuma grupām – JS un PS. (26.tabula).

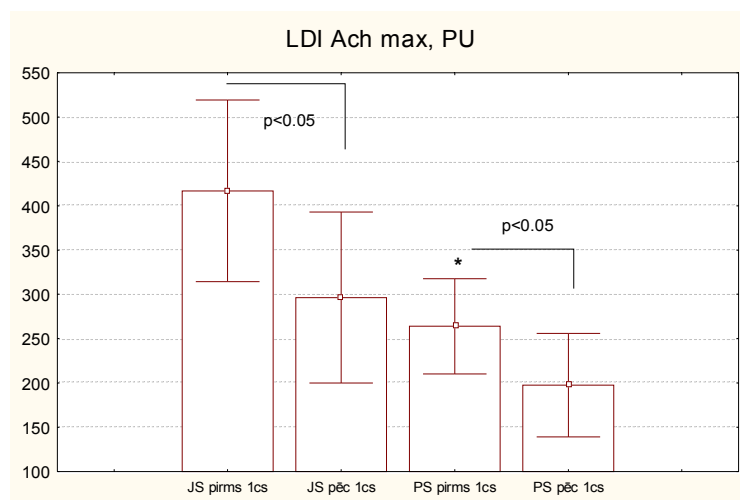


31.attēls. Siltuma inducētās vazodilatācijas testa 1 max (PU) pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas (1cs) jauniešiem smēķētājiem (JS) un pieaugušiem smēķētājiem (PS).

\*  $p < 0,05$  attiecībā pret JS pirms 1cs



**32.attēls. Siltuma inducētās vazodilatācijas testa otrais maksimums (PU) pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas (1cs) jauniešiem smēķētājiem (JS) un pieaugušiem smēķētājiem (PS)**



**33.attēls. Acetilholīna inducētās vazodilatācijas testa maksimums (PU) pirms un pēc 1 cigaretes izsmēķēšanas (1cs) jauniešiem smēķētājiem (JS) un pieaugušiem smēķētājiem (PS). \* p<0,05 attiecībā pret JS pirms 1cs**



## 4. DISKUSIJA

### 4.1. SMĒĶĒŠANAS HRONISKĀ IETEKME

Literatūrā tiek ziņots, ka cigarešu dūmu ietekmē palielinās kardiovaskulāro slimību risks, kas ietver dažādus mehānismus – asinsvadu endotēlija disfunkciju, sistēmiskās hemostāzes un koagulācijas disfunkciju, pastiprinātas iekaisuma reakcijas, lipīdu dismetabolismu un insulīna rezistenci (Yanbaeva et al. 2007).

Šajā pētījumā tika novērtēta hroniskas smēķēšanas ietekme uz endotēlija funkcionālo aktivitāti (vazodilatācijas intensitāti mikrocirkulācijā), insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem (ABL un TG seruma koncentrācijas, un HOMA-IR indekss) un endotēlija funkcijas raksturojošo signālmolekulu (adiponektīna, adhēzijas molekulu, hemokīnu, citokīnu, PAI-1, MPO) koncentrācijām serumā veselām personām un personām ar dislipidēmiju. Bez tam, tika novērtēta savstarpēja saistība starp endoteliālo (dis)funkciju raksturojošiem un insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem.

Endotēlija (dis)funkcijas novērtēšana balstās uz tādu metožu un testu izmantošanu, ar kuriem nosaka endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitāti koronārajos un perifērajos asinsvados, kā arī endotēlija funkcijas raksturojošo cirkulējošo biomarkieru - adhēzijas molekulu, iekaisumu veicinošo citokīnu un koagulācijas faktoru (jeb fibrinolīzi inhibējošo faktoru) noteikšana serumā (Poredos, 2002). Signālmolekulu koncentrāciju mērījumi sniedz informāciju ne tikai par kopējo vazodilatējošo kapacitāti, bet arī par citiem endotēlija funkcionalitāti raksturojošiem aspektiem, piemēram, iekaisumu veicinošo/ inhibējošo, prokoagulanto/ fibrinolītisko (PAI-1, tPA), trombotisko (vWF) un vazokonstriktoro aktivitāti (ET-1), kā arī NOS inhibitoru aktivitāti (ADMA) un oksidēto savienojumu (oxZBL) koncentrāciju. Tomēr, jāņem vērā tas, ka signālmolekulas, ko sintezē endotēlija šūnas, var producēt arī citu tipu šūnas. Salīdzinoši specifiski endotēlija šūnu produkti, kas var liecināt par endotēlija disfunkciju, ir trombomodulīns, tPA, PAI un E-selektīns (Avogaro et al. 2008).

Dažādu pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka iekaisuma citokīni samazina endoteliālā NO biopieejamību. Fizioloģiski normālos apstākļos NO ir ne tikai vazodilatējoša molekula, bet tai piemīt spēja inhibēt trombocītu adhēziju un agregāciju, asinsvadu gludo muskuļu šūnu proliferāciju un leukocītu adhēziju pie endotēlija (Willerson, Ridker 2004).

#### 4.1.1. Smēķēšanas ietekme uz mikrocirkulācijas intensitāti perifērijā

Mūsu pētījuma rezultāti parādīja statistiski ticamu smēķēšanas kumulatīvā efekta (pakgadu skaita) ietekmi uz mikrocirkulācijas asins plūsmas intensitāti perifērijā abās pētījuma dalībnieku grupās, t.i., veselām personām un personām ar dislipidēmiju.

Lai novērtētu endotēlija funkcionālo stāvokli, ir lietderīgi noskaidrot arī bazālās asins plūsmas jeb fona intensitāti, t.i., bez farmakoloģiskiem vai fizikāliem kairinātājiem. Literatūrā šie rezultāti ir pretrunīgi, kā arī šādi mērījumi tiek veikti ļoti reti. Vieni autori ziņo, ka hroniskiem smēķētājiem ir būtiski samazināta bazālā NO bioaktivitāte jeb bazālās plūsmas intensitāte, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Butler et al. 2001), bet citu autoru pētījumos atšķirības starp grupām nav vērojamas (Guthikonda et al. 2003). Savukārt, mūsu pētījumā **bazālās asins plūsmas intensitātei** ir tendence palielināties abās smēķētāju grupās, kas norāda par endotēlija šūnu aktivāciju miera apstākļos. Smēķētājiem ar dislipidēmiju bazālās plūsmas palielināšanās daļēji ir saistīta arī ar dislipidēmiju, jo nesmēķētājiem ar dislipidēmiju (Dn grupa) bazālās plūsmas intensitāte ir būtiski ( $p < 0,05$ ) lielāka, salīdzinot ar veselo nesmēķētāju (Vn) grupu. Šie rezultāti rosina domāt, ka asins plūsmas palielināšanās mikrocirkulācijā ir atkarīga ne tikai no eNOS aktivitātes un NO biopieejamības, bet gan dažādu metabolītu, jonu,  $H_2O_2$  palielinātas koncentrācijas un simpātiskās aktivācijas ietekmē.

Korelāciju analīze parādīja, ka pakgadu skaits būtiski korelē ar palielinātu bazālo asins plūsmu, kas bija vērojama abu grupu smēķētājiem kopā ( $p = 0,045$ ), gan atsevišķi pa grupām – Vs ( $p = 0,013$ ) un Ds tendence ( $p = 0,06$ ).

Mikrocirkulācijas asinsvadu reakcijas uz lokālu **siltuma inducētu vazodilatāciju** abās smēķētāju grupās (Vs un Ds) ir būtiski samazinātas gan vazodilatācijas pirmajam maksimumam (LDI silt.t.1.max (%)), gan vazodilatācijas otram maksimumam (LDI silt.t.2.max (%)), salīdzinot ar attiecīgo nesmēķētāju grupu. Rezultāti liecina par to, ka smēķēšanas inducēta oksidatīvā stresa komponentes (ROS, RNS, oxZBL, MPO, NADPH oksidāze u.c.) samazina gan eNOS aktivitāti, gan endoteliālā NO bioaktivitāti, tādēļ asinsvadu gludo muskuļu šūnas nespēj nodrošināt savu dilatējošo funkciju (Cai, Harrison 2000; Vita et al. 2004; Zhang et al. 2009).

Vazodilatācijas intensitātes 1.maksimuma un 2.maksimuma negatīvas korelācijas ar pakgadu skaitu būtiski un ciešāk korelē smēķētājiem ar dislipidēmiju, salīdzinājumā ar veseliem smēķētājiem, kuriem šīs korelācijas ir vājākas. Ņemot vērā, ka vazodilatācijas

intensitātes vidējās vērtības siltuma testa 1 max un 2 max būtiski ( $p < 0,05$ ) ir samazinātas Ds grupā, attiecībā pret Dn, tad šāds rezultāts var norādīt uz to, ka hroniska smēķēšana pastiprina dislipidēmijas ietekmi uz endotēlija disfunkciju.

**Acetilholīna inducēta vazodilatācija** būtiski neatšķiras starp hronisko smēķētāju grupām, salīdzinājumā ar attiecīgo grupu nesmēķētājiem, bet veselo smēķētāju grupā vazodilatācijas intensitātei ir tendence samazināties. Tomēr, pakģadu skaita negatīva ietekme uz Ach inducētu vazodilatāciju ir statistiski ticama ( $p = 0,014$ ) abās smēķētāju grupās kopā. Citi autori ir ziņojuši, ka Ach inducētā endotēlija atkarīgā vazodilatācija hroniskiem smēķētājiem ir būtiski samazināta, salīdzinot ar nesmēķētāju grupu (Butler et al. 2001; Heitzer et al. 2000), ko mēs novērojam smēķēšanas akūtā efekta ietekmē (skat. 3.4.nodaļā).

Samazinātu Ach stimulētu vazodilatāciju daži autori pamato ar samazinātu vazodilatējošo mediatoru – NO, EDHF un PGI<sub>2</sub> atbrīvošanu no endoteliocītiem. Cigarešu dūmu ietekmē palielinās brīvo radikāļu katalizēta arahidonskābes produktu veidošanās. Reilly et al. (1996) pētījumā noskaidroja, ka C vitamīna lietošana samazināja, bet COX inhibitora aspirīna lietošana nesamazināja arahidonskābes produkta izoprostāna daudzumu plazmā, kas nozīmē, ka 8-izo-PGF<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub> izoforma) veidošanos mediē brīvie radikāļi, bet ne COX signālceļš (Reilly et al. 1996). Hroniskiem smēķētājiem ir novērots, ka samazināta Ach inducēta endotēlija atkarīgā vazodilatācija cieši korelē ar oxZBL autoantivielu titru ar un bez hiperholesterolēmijas, kas rosina domāt, ka cigarešu dūmu izraisītais oksidatīvais stress modificē lipoproteīnus, un oksidētais ZBL ir cieši saistīts ar endoteliālās disfunkcijas attīstību (Heitzer et al. 1996).

#### **4.1.2. Smēķēšanas ietekme uz insulīna rezistenci raksturojošiem rādītājiem**

##### **Insulīna seruma koncentrācijas un HOMA-IR indeksa izmaiņas smēķēšanas ietekmē**

Vairāki autori ir ziņojuši, ka hroniskiem smēķētājiem ir palielināti insulīna rezistences rādītāji (Ambrose, Barua 2004; Chiolero et al. 2008; Facchini et al. 1992). Arī mūsu rezultāti parādīja, ka hroniskiem smēķētājiem ar dislipidēmiju ievērojami ir palielināta gan insulīna koncentrācija serumā, gan HOMA-IR indekss, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, kuriem konstatēta dislipidēmija. Tomēr, jāatzīmē, ka minētās atšķirības nenovērojām starp smēķētājiem un nesmēķētājiem veselu cilvēku grupā.

Dzien et al. (2004) pētījumā smēķētāji, kuriem bija KVS, dienā izsmēķēja ievērojami lielāku skaitu cigarešu, nekā smēķētāji bez KVS, kas liecina par intensīvāku hroniskas smēķēšanas ietekmi. Šie rezultāti bija saskaņā ar Magis et al. 2002 pētījuma rezultātiem, kur ikdienā izsmēķēto cigarešu daudzums korelēja ar insulīna rezistences HOMA-IR indeksu. Šāda saistība varētu norādīt uz to, ka hroniska smēķēšana ir diabēta attīstības riska faktors (Gaede et al. 2003; Kong et al. 2001).

Mūsu rezultātos cigarešu pakgadu skaits statistiski ticami un cieši korelē ar palielinātu HOMA-IR indeksu ( $r=0.582$ ) un insulīna koncentrāciju ( $r=0.569$ ) dislipidēmijas grupā. Rezultāti parāda pozitīvas korelācijas arī starp dienā izsmēķēto cigarešu skaitu un šādiem insulīna rezistences rādītājiem dislipidēmijas grupā: glikozes ( $r=0,430$ ) un insulīna ( $r=0,517$ ) koncentrācijām un HOMA-IR indeksu ( $r=0,529$ ). Lai gan veselo smēķētāju grupā insulīna koncentrācija un HOMA-IR indekss neatšķiras no nesmēķētājiem, tomēr dienā izsmēķēto cigarešu skaits būtiski pozitīvi korelē ar insulīna koncentrāciju ( $r=0,435$ ) un HOMA-IR indeksu ( $r=0,384$ ). Šādi rezultāti parāda, ka smēķēšana akūti samazina šūnu insulīna jutību.

#### **ABL un TG seruma koncentrāciju izmaiņas smēķēšanas ietekmē**

Vairāku autoru pētījumu rezultāti parādīja, ka smēķētājiem ir palielinātas seruma ZBL, TG un samazinātas ABL koncentrācijas, neraugoties uz to, ka  $\text{KMI}$  smēķētājiem var būt mazāks, salīdzinot ar nesmēķētājiem. (Antoniades et al. 2004; Gharipour et al. 2008; Raupach et al. 2006). Mūsu pētījumā veselo smēķētāju grupā kopējā holesterīna, ZBL un TG seruma koncentrācijas neatšķiras no veselo nesmēķētāju grupas, bet ABL koncentrācija smēķētājiem ir samazināta ar tendenci ( $p=0,09$ ). Savukārt, smēķētājiem ar dislipidēmiju kopējā holesterīna un ZBL koncentrācijas neatšķiras no nesmēķētājiem ar dislipidēmiju, bet TG koncentrācija ir būtiski ( $p<0,01$ ) palielināta un ABL koncentrācija ir samazināta ar tendenci ( $p=0,09$ ), salīdzinot ar nesmēķētājiem.

Korelāciju analīze parāda, ka pakgadu skaits statistiski ticami korelē ar palielinātu triglicerīdu koncentrāciju ( $r=0.486$ ) dislipidēmijas grupā. Pakgadu skaits statistiski ticami korelē ar ABL koncentrāciju ( $r= -0.240$ ) abās smēķētāju grupās kopā, bet atsevišķi pa grupām vērojama negatīvas korelācijas tendence katrā grupā.

#### **Vidukļa apkārtmēra izmaiņas smēķēšanas ietekmē**

No klīnisko un uz populāciju balstīto pētījumu rezultātiem tiek ziņots, ka smēķētājiem  $\text{KMI}$  var būt mazāks, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, tomēr vidukļa apkārtmērs smēķētājiem

ir lielāks. Vidukļa apkārtmērs tiek uzskatīts par viscerālo taukaudu daudzuma indikatoru, kas pozitīvi korelē ar pakgadu skaitu (Chiolo et al. 2008). Mūsu pētījuma rezultātos pakgadu skaits būtiski korelē ar vidukļa apkārtmēra lielumu visiem dalībniekiem kopā, tomēr korelācija ir ļoti vāja ( $r=0,199$ ). Atsevišķi pa grupām korelācija nav iegūta. Šādu vāju korelāciju varētu izskaidrot ar to, ka smēķētāju grupās - gan veselo, gan dislipidēmijas, vidukļa apkārtmērs neatšķiras no attiecīgās nesmēķētāju grupas. Arī  $\text{KMI}$  smēķētājiem neatšķiras no nesmēķētājiem attiecīgajās grupās.

Tomēr, statistiski ticama un cieša korelācija ir iegūta starp vidukļa apkārtmēra lielumu un dienā izsmēķēto cigarešu skaitu ( $r=0,666$ ) dislipidēmijas grupā, bet veselo smēķētāju grupā vērojama korelācijas tendence ( $r=0,367$ ). Tas nozīmē, ka dienā izsmēķēto cigarešu skaits ir proporcionāls vidukļa apkārtmēram, it īpaši personām ar dislipidēmiju.

Vairāki autori ir ziņojuši, ka smēķēšanas ietekmē palielinās viscerālo tauku uzkrāšanās un metabolā sindroma attīstības risks (Dzien et al. 2004; Jee et al. 2002). Viscerālā aptaukošanās, ko raksturo palielināts vidukļa apkārtmērs, tiek saistīta ar dislipidēmiju un insulīna rezistences attīstību. Citi autori to ir apstiprinājuši savos pētījumos, jo viscerālā aptaukošanās cieši korelē ar samazinātām ABL un palielinātām ZBL koncentrācijām (Cnop et al. 2003; Matsubara et al. 2002).

Dzien et al. (2004) pētījumā klīniski veseliem (bez cukura diabēta un KVS) vīriešiem smēķētājiem konstatēja būtiski augstākas tukšas dūšas glikozes un triglicerīdu koncentrācijas, un samazinātu ABL koncentrāciju cirkulācijā. Dzien et al. uzskata, ka viņu iegūtie rezultāti apstiprina hipotēzi, ka insulīna rezistence ir saikne starp smēķēšanas saistību ar kardiovaskulāro slimību attīstību (Dzien et al. 2004; Facchini et al. 1992; Magis et al. 2002; Reaven, Tsao 2003). Lielāks kardiovaskulāro slimību (KVS) risks ir smēķētājiem ar dislipidēmiju, īpaši ar viscerālo aptaukošanos, kas izpaužas ar palielinātu vidukļa apkārtmēru (Dzien et al. 2004; Lakka et al. 2002).

Neraugoties uz šiem pārlicinošiem rezultātiem, smēķēšanas saistība ar insulīna rezistenci tomēr paliek diskutējams jautājums, jo citos pētījumos, starp kuriem ir arī liela apjoma epidemioloģisks pētījums *The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*, šāda saistība netika atklāta (Henkin et al. 1999; Wareham et al. 1996).

#### **4.1.3. Smēķēšanas ietekme uz endoteliālās (dis)funkcijas signālmolekulu seruma koncentrācijām, to saistība ar vazodilatācijas intensitātes un insulīna rezistences rādītājiem**

Klīniskajos un uz populāciju balstītajos pētījumos ir ziņots, ka veselīgiem smēķētājiem būtiski ir palielinātas iekaisuma signālmolekulu koncentrācijas cirkulācijā, kas ir saskaņā ar hipotēzi, ka smēķēšana sekmē sistēmiskā iekaisuma veidošanos (Levitzky et al. 2008; Yanbaeva et al. 2007). Mūsu darba rezultāti ir saskaņā ar citu autoru (Ambrose, Barua 2004; Haddy et al. 2005; Levitzky et al. 2008; Yanbaeva et al. 2007) iegūtajiem rezultātiem, ka smēķēšanas ietekmē palielinās noteiktu signālmolekulu - IL-6, TNF $\alpha$ , sE-selektīna, sICAM-1, MCP-1, PAI-1 un MPO koncentrācijas serumā, salīdzinot ar nesmēķētājiem (skat.3.1.2.nodaļā).

#### **IL-6**

Mūsu darba rezultāti parāda, ka abās smēķētāju grupās IL-6 koncentrācija ir palielināta, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem – Vs pret Vn  $p < 0,05$ ; Ds pret Dn  $p = 0,06$ . Būtiski palielināta IL-6 koncentrācija ir vērojama arī Dn grupā, attiecībā pret Vn grupu -  $p < 0,01$ , kas nozīmē, ka personām ar dislipidēmiju IL-6 sintēzi un sekrēciju nodrošina taukaudos iefiltrējušies makrofāgi.

Lai gan IL-6 tiek uzskatīts par nespecifisku iekaisuma marķieri (Levitzky et al. 2008), vairāki autori ir novērojuši pozitīvu korelāciju starp hronisku smēķēšanu un palielinātām IL-6 koncentrācijām veselām personām (de Maat, Kluit 2002), kas arī apstiprinājās šajā darbā. Mūsu rezultāti rāda, ka IL-6 seruma koncentrācija statistiski ticami pozitīvi korelē ar pakgadu skaitu ( $r = 0,490$ ) un dienā izsmēķēto cigarešu skaitu ( $r = 0,426$ ) veselo smēķētāju grupā. Savukārt, smēķētājiem ar dislipidēmiju vērojama korelāciju tendence starp IL-6 un pakgadu skaitu.

Būtiska saistība starp samazinātu endotēlija atkarīgo vazodilatāciju un palielinātu IL-6 seruma koncentrāciju ir vērojama LDI silt.t.1.max (%) ( $r = -0,279$ ) un LDI silt.t.2.max (%) ( $r = -0,287$ ) rādītājos visās pētījuma grupās kopā. Lai gan korelāciju starp IL-6 koncentrāciju un Ach inducēto vazodilatāciju neiegūvām, tomēr korelācijas ar siltuma inducēto vazodilatācijas intensitāti liecina par sistēmiskā iekaisuma tiešu ietekmi uz endotēlija funkcijām.

Personu grupā ar dislipidēmiju, IL-6 koncentrācijai ir pozitīva korelācija ar palielinātām insulīna ( $r = 0,331$ ;  $p = 0,035$ ) un TG koncentrācijām ( $r = 0,326$ ;  $p = 0,03$ , nepublicēti dati), un korelāciju tendence ar HOMA-IR indeksu ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,058$ ), kas varētu norādīt uz

iekaisuma procesu saistību ar šūnu insulīna jutības samazināšanos, kur vienlīdzīgu lomu spēlē gan cigarešu dūmu, gan lipīdu dismetabolisma ietekme.

### **TNF- $\alpha$**

Mūsu rezultātos TNF- $\alpha$  seruma koncentrācijas ir būtiski palielinātas tikai veselo smēķētāju grupā ( $p < 0,05$ ). Savukārt, smēķētājiem ar dislipidēmiju TNF- $\alpha$  vidējā vērtība neatšķiras no nesmēķētājiem, kuriem šī koncentrācija seumā jau ir būtiski palielināta, attiecībā pret veselo nesmēķētāju grupu ( $p < 0,05$ ). No rezultātiem var secināt, ka personām ar dislipidēmiju cigarešu dūmi neietekmē TNF- $\alpha$  koncentrācijas palielināšanos.

Literatūrā ir aprakstīta smēķēšanas saistība ar palielinātām TNF- $\alpha$  koncentrācijām, kas mediē sistēmisko iekaisumu klīniski veselīgiem subjektiem (bez HOPS), un pakģadu skaitu jeb smēķēšanas kumulatīvā efekta ciešu korelāciju ar TNF- $\alpha$  koncentrācijām serumā (Díez Piña et al. 2012; Tanni et al. 2010). Minētais ir apstiprinājies arī mūsu rezultātos, jo veselu smēķētāju grupā pakģadu skaits statistiski ticami korelē ar TNF- $\alpha$  seruma koncentrāciju ( $r = 0,238$ ). Tomēr dažos pētījumos tiek ziņots, ka veselīgiem vīriešiem nekonstatē smēķēšanas kumulatīvā efekta ietekmi uz TNF- $\alpha$  koncentrāciju izmaiņām (de Maat, Kluft 2002). Mūsu pētījumā būtisku pakģadu skaita ietekmi uz TNF- $\alpha$  novērojām tikai veselīgiem smēķētājiem, bet ne smēķētājiem ar dislipidēmiju.

Vairāki autori ir ziņojuši, ka TNF- $\alpha$ -mediē endotēlija šūnu bojājumu un samazina endotēlija atkarīgo NO mediēto vazodilatāciju dažādās vaskulārajās gultnēs. TNF- $\alpha$  tieši iedarbojas uz eNOS aktivitāti, nomācot šī enzīma ekspresiju, tādējādi samazinot NO producēšanu (Giannattasio et al. 2005; Goodwin et al. 2007; Hennig et al. 2001; Xia et al. 2006). Dislipidēmijas gadījumā endotēlija disfunkciju izraisa pārmērīga TNF- $\alpha$  ekspresija un tai sekojoša reaktīvo skābekļa savienojumu producēšana. No iekaisuma citokīniem, TNF- $\alpha$  (un arī IL-6, IL-1 $\beta$ ) ir noteicošā loma sistēmiskā zemas pakāpes iekaisuma veidošanā, stimulējot adhēzijas molekulu ekspresiju uz endoteliocītu virsmas, mediējot turpmākās iekaisuma signālkaskādes, tādējādi inducējot endotēlija disfunkciju (Hennig et al. 2001).

Palielinātas TNF- $\alpha$  un IL-6 koncentrācijas cirkulācijā ir saistītas ar metabolo disfunkciju un endoteliālās disfunkcijas attīstību. Vairāki autori ir ziņojuši par cigarešu dūmu ietekmi uz iekaisuma reakciju un dislipidēmijas palielinātu prevalenci pieaugušajiem (Nagel et al. 2009). Mūsu pētījumā vazodilatācijas intensitātes rādītāji nekorelē ar TNF- $\alpha$  koncentrācijām nevienā no dalībnieku grupām, bet statistiski ticami negatīvi korelē ar

palielinātu vidukļa apkārtmēru visām grupām kopā - LDI silt.t.1 max (% izmaiņa) ( $r = -0.336$ ), LDI silt.t.2 max (% izmaiņa) ( $r = -0.259$ ) un LDI Ach max (% izmaiņa) ( $r = -0.217$ ).

Vairāki autori ir ziņojuši, ka personām ar dislipidēmiju TNF- $\alpha$  koncentrācija statistiski ticami pozitīvi korelē ar triglicerīdu un kopējā holesterīna koncentrāciju, un negatīvi – ar ABL koncentrāciju serumā (Bruunsgaard, 2005; Jovinge et al. 1998), tādējādi parādot saistību starp iekaisuma reakcijām un lipīdu metabolismu. Šāda saistība ir apstiprinājusies arī mūsu pētījuma rezultātos, jo TNF- $\alpha$  koncentrācija statistiski ticami pozitīvi korelē ar triglicerīdu koncentrāciju ( $r = 0,266$ ;  $p < 0,05$ ) un negatīvi ar ABL koncentrāciju ( $r = -0,368$ ;  $p < 0,01$ ) serumā visās pētījuma grupās kopā (nepublicēti dati). Ņemot vērā, ka adiponektīnam piemīt pretiekaisuma un anti-aterogēnas īpašības, tad nozīmīga varētu būt TNF- $\alpha$  koncentrācijas korelācija ar samazinātu adiponektīna koncentrāciju, ko novērojām katrā grupā atsevišķi – V grupā ( $p < 0,01$ ) un D grupā ( $p < 0,05$ ).

Literatūrā tiek ziņots, ka TNF- $\alpha$  veicina insulīna receptora substrāta-1 (IRS-1) serīna fosforilēšanu, kas bojā insulīna signālceļus, tādējādi ierosinot insulīna jutības samazināšanos šūnās. Mūsu pētījumā dislipidēmijas grupā palielinātas TNF- $\alpha$  koncentrācijas pozitīvi korelē ar insulīna koncentrāciju ( $r = 0,387$ ;  $p < 0,05$ ) un HOMA-IR indeksu ( $r = 0,300$ ;  $p = 0,063$ ).

Neraugoties uz iepriekšminēto, ka cigarešu dūmu ietekmē palielinās gan TNF- $\alpha$ , gan IL-6 koncentrācijas cirkulācijā veselām personām (Haddy et al. 2005), citi autori ir ziņojuši, ka smēķēšanas ietekmē samazinās TNF- $\alpha$  koncentrācija, un secina, ka veselu smēķētāju makrofāgiem ir samazināta kapacitāte atbrīvot citokīnus, tajā skaitā TNF- $\alpha$  (Vayssier et al. 1998). Vayssier et al. (1998) izpētīja, ka cigarešu dūmi ierosina karstuma šoka proteīna transkripcijas faktora aktivāciju, kā rezultātā palielinās Hsp70 ekspresija un tiek inhibēta NF $\kappa$ B saistīšanās aktivitāte monocītos un sekojoša TNF- $\alpha$  sekrēcija. Tomēr jāņem vērā, ka TNF- $\alpha$  sekretē ne tikai makrofāgi, bet arī citi šūnu tipi – mastšūnas, kardiomiocīti, endotelocīti, limfocīti, adipocīti un neironi (Vayssier et al. 1998).

No iepriekšminētā var secināt, ka personām bez dislipidēmijas, būtiski palielinātas TNF- $\alpha$  koncentrācijas ir tikai smēķētājiem, ko parāda arī pozitīva korelācija ar pakģadu skaitu. Tā kā TNF- $\alpha$  būtiski korelē ar pārējām šajā darbā noteiktām iekaisuma signālmolekulām, t.sk., hemokīniem un adhēzijas molekulām (nepublicēti dati), tas norāda, ka klīniski veseliem smēķētājiem cigarešu dūmu inducētas iekaisuma reakcijas ir saistītas ar TNF- $\alpha$  koncentrācijas palielināšanos. Savukārt, personām ar dislipidēmiju nebija vērojama smēķēšanas ietekme uz TNF- $\alpha$  palielināšanos, tādēļ var secināt, ka šīm personām taukaidu makrofāgi pastiprināti sekretē TNF- $\alpha$  cirkulācijā, kas arī varētu ietekmēt palielinātu insulīna



koncentrāciju un HOMA-IR indeksu. Bez tam, TNF- $\alpha$  tieši neietekmē endotēlija funkciju, bet gan caur palielinātu adhēzijas molekulu ekspresiju un leikocītu hemotaksi un migrāciju šūnās.

### **Adhēzijas molekulas (sE-selektīns, sICAM-1)**

Endotēlija šūnas ar traucētu normālu funkciju zaudē savu fizioloģisko spēju novērst cirkulējošo šūnu (monocītu, makrofāgu, T-limfocītu un trombocītu) piesaistīšanos pie savas virsmas. Kā atbildes reakciju uz asinsvada sienīgas bojājumu, endoteliocīti producē adhēzijas molekulas, tajā skaitā E-selektīnu un ICAM-1, tādējādi nodrošinot leikocītu un limfocītu adhēziju un migrāciju asinsvada sienīgā.

Selektīnu ekspresiju postkapilāro venulu endotēlija šūnu virsmas membrānā izraisa citokīnu signāli, ko producējušas mikroorganismu-aktivētas šūnas (piem., makrofāgi), kā arī pašu mikroorganismu signāli. E-selektīna sintēze uzsākas pēc aktivējošā signāla (TNF, IL-1, IFN $\gamma$ , mikroorganismu produktu) saņemšanas un uz šūnas virsmas tas tiek ekspresēts 1-2 stundu laikā.

sE-selektīns ir endotēlija šūnu specifiska molekula, un atšķeltā, asinīs cirkulējošā E-selektīna paaugstināta koncentrācija liecina par endotēlija aktivāciju. Aktivētam endotēlijam raksturīga arī adhēzijas molekulu VCAM-1 un ICAM-1 ekspresija, bet jāņem vērā, ka atšķeltās asinīs cirkulējošās sICAM-1 un sVCAM-1 var būt limforetikulārās sistēmas šūnu produkti, līdz ar to šo molekulu koncentrācijas paaugstināšanās var nozīmēt iekaisuma procesu aktivāciju nevis endotēlija disfunkciju. Adhēzijas molekulu ekspresiju endotēlija šūnās mediē kardiovaskulāro slimību riska faktori, tajā skaitā smēķēšana, caur palielinātām iekaisumu veicinošo citokīnu IL-6 un TNF- $\alpha$  koncentrācijām. Adhēzijas molekulu paaugstinātas koncentrācijas liecina par iespējamu endotēlija disfunkcijas un tai sekojošās aterosklerozes attīstību un insulīna rezistences attīstības risku. Iekaisumu veicinošie citokīni endotēlija šūnās ierosina ne tikai adhēzijas molekulu, bet arī hemokīnu ekspresiju, un samazina eNOS enzimatisko aktivitāti (Avogaro et al. 2008).

Pētījumos ir noskaidrots, ka smēķētāju plazmā ir lielākas adhēzijas molekulu (sICAM-1, sE-selektīns) koncentrācijas, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Yanbaeva et al. 2007). Pat mērena smēķēšana izraisa cirkulējošo monocītu aktivāciju un palielinātu to adhēziju pie endotēlija virsmas. Cigarešu dūmu aktivētās NADPH oksidāzes producētais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spēlē svarīgu lomu endotēlija aktivācijā (Orosz et al. 2007).

Mūsu pētījuma rezultāti parāda, ka veseliem smēķētājiem (Vs grupā) statistiski ticami (p<0.05) ir palielinātas seruma sICAM-1 un sE-selektīna koncentrācijas, salīdzinot ar



Korelāciju analīze parāda, ka grupā ar dislipidēmiju gan sE-selektīna, gan sICAM-1 koncentrācija statistiski ticami korelē ar palielinātu insulīna koncentrāciju ( $p < 0,05$ ) un HOMA-IR indeksu ( $p < 0,05$ ).

Mūsu rezultātos sE-selektīnam nav tiešu saistību ar mikrocirkulācijas vazodilatācijas intensitātes rādītājiem. Savukārt, sICAM-1 seruma koncentrācija negatīvi korelē ar siltuma testa vazodilatācijas pirmo maksimumu (LDI silt.t.1 max (% izmaiņa) ( $p < 0,05$ ) un Ach inducētas endotēlija atkarīgās vazodilatācijas maksimumu ( $p < 0,05$ ) visās pētījuma grupās kopā.

Šajā darbā gan sE-selektīna, gan sICAM-1 koncentrācija statistiski ticami pozitīvi korelē ar visām iekaisuma signālmolekulām, kuras ir noteiktas šajā darbā (nepublicēti dati).

No iepriekšminētā var secināt, ka hroniskas smēķēšanas kumulatīvais efekts būtiski ietekmē adhēzijas molekulu sE-selektīna un sICAM-1 koncentrāciju palielināšanos serumā, neatkarīgi no dislipidēmijas. Abu adhēzijas molekulu palielinātas koncentrācijas būtiski ir saistītas ar sistēmiskā iekaisuma reakcijām, dislipidēmiju un insulīna jutības samazināšanos.

### **Hemokīni (IL-8, MCP-1)**

Smēķēšanas ietekmē būtiski palielinās IL-8 un MCP-1 koncentrācijas serumā, kas korelē ar smēķēšanas kumulatīvo efektu. IL-8 un MCP-1 seruma koncentrācijas var tikt izmantoti kā diagnostiskie bioķīmiskie marķieri iekaisuma reakciju novērtēšanai. (Berrahmoune et al.2006).

Mūsu pētījumā abās smēķētāju grupās, salīdzinot ar nesmēķētājiem, IL-8 koncentrācija serumā ir palielināta ar tendenci, bet MCP-1 koncentrācijas palielināšanās ir statistiski ticama ( $p < 0,05$ ). Dislipidēmijas ietekmē, tātad, salīdzinot Dn grupu pret Vn grupu, IL-8 koncentrācija ir palielināta statistiski ticami ( $p < 0,05$ ), bet MCP-1 atšķirības ir nebūtiskas.

Smēķēšanas kumulatīvais efekts būtiski ( $p < 0,05$ ) korelē gan ar IL-8, gan MCP-1 seruma koncentrācijām abās smēķētāju grupās kopā. Lai gan IL-8 koncentrācija veselo smēķētāju grupā, salīdzinot ar nesmēķētājiem, ir palielināta ar tendenci, tomēr gan pakgadu skaits, gan dienā izsmēķēto cigarešu skaits statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) korelē ar šī hemokīna palielinātu seruma koncentrāciju.

Endoteliocītu aktivācija ir atbildes reakcija uz kardiovaskulārā riska faktoriem, tajā skaitā smēķēšanu, kas izraisa hemokīnu un adhēzijas molekulu ekspresiju un sekrēciju. Cigarešu dūmu ierosināta TNF- $\alpha$  pastiprināta sekrēcija aktivē endotēlija šūnas sekretēt hemokīnus. Bez tam, proaterogēnais oxZBL ierosina endoteliocītus un cirkulācijā esošos

leikocītus ekspresēt un sekretēt IL-8 un MCP-1 (Berrahmoune et al. 2006; Braunersreuther et al. 2007).

Korelāciju analīze parāda, ka veselo personu grupā bazālās asins plūsmas palielināšanās ir saistīta ar palielinātu MCP-1 seruma koncentrāciju ( $p < 0,05$ ). Tas varētu norādīt par to, ka cigarešu dūmos esošās komponentes ir iesaistītas asinsvadu šūnu aktivācijā, kā rezultātā palielinās bazālā asins plūsma mikrocirkulācijā. Visās pētījuma grupās kopā MCP-1 seruma koncentrācija negatīvi korelē gan ar siltuma testa vazodilatācijas pirmo maksimumu (LDI silt.t.1 max (% izmaiņa) ( $p < 0,05$ ), gan ar siltuma testa vazodilatācijas otro maksimumu (LDI silt.t.2 max (% izmaiņa) ( $p < 0,05$ ).

Savukārt, IL-8 seruma koncentrācija pozitīvi korelē gan ar insulīna koncentrāciju ( $p < 0,05$ ), gan ar HOMA-IR indeksu ( $p < 0,01$ ) visās pētījuma grupās kopā.

Mūsu rezultāti rāda, ka adiponektīna seruma koncentrācijai ir negatīva korelācija ar IL-8 ( $p < 0,01$ ) un MCP-1 ( $p < 0,05$ ) koncentrācijām, kas arī ir vērojams visās pētījuma grupās kopā.

Hemokīni ir iesaistīti arī trombocītu aktivēšanā. Aktivēti trombocīti sekretē dažādus augšanas faktorus un iekaisuma mediatorus, tajā skaitā hemokīnus. Galvenais trombocītu sekretētais proteīns ir PAI-1 (Braunersreuther et al. 2007).

## **PAI-1**

PAI-1 ir nozīmīgākais endogēnais fibrinolīzi inhibējošais faktors. PAI-1 saistās ar t-PA un veido PAI-1/t-PA kompleksu, kas ir bojātas fibrinolītiskās aktivitātes indikators smēķētājiem (Yarnell et al. 2000). Pētījumos tiek ziņots, ka smēķētājiem PAI-1 koncentrācija cirkulācijā ir būtiski palielināta, un tā pozitīvi korelē ar pakgadu skaitu (Dzien et al. 2004; Yarnell et al. 2000). Šādi rezultāti apstiprinās arī Ozaki et al. (2010) pētījumā, kurā bez tam ieguva PAI-1 negatīvu korelāciju ar endotēlija atkarīgo vazodilatāciju. Autori secina, ka hroniskas smēķēšanas inducēta samazināta vazodilatācijas intensitāte un palielināta PAI-1 koncentrācija var būt noderīgs endoteliālās disfunkcijas marķieris gados jauniem smēķētājiem (Ozaki et al. 2010).

Mūsu darbā apstiprinās augstākminētais, ka abās smēķētāju grupās PAI-1 koncentrācija serumā statistiski ticami ir palielināta, salīdzinājumā ar attiecīgām nesmēķētāju grupām – Vs pret Vn ( $p < 0,01$ ) un Ds pret Dn ( $p < 0,05$ ). Korelāciju analīze parāda, ka PAI-1 koncentrācija būtiski korelē ar pakgadu skaitu – Vs grupā ( $r = 0,443$ ;  $p = 0,001$ ) un Ds grupā ( $r = 0,290$ ;  $p = 0,046$ ). Bez tam, Vs grupā PAI-1 koncentrācija būtiski korelē arī ar dienā

izsmēķēto cigarešu skaitu ( $r=0,531$ ;  $p=0,004$ ). Mūsu rezultāti neuzrāda tiešu korelāciju starp PAI-1 koncentrāciju un vazodilatācijas intensitātes rādītājiem nevienā no grupām.

PAI-1, galvenokārt, sekretē aktivēti trombocīti un adipocīti, kas norāda par to, ka palielinātas PAI-1 seruma koncentrācijas ir saistītas gan ar smēķēšanas ietekmi, gan ar dislipidēmiju, kas raksturojas ar pastiprinātu ROS producēšanu un aušu hipoksiju (Alessi, Juhan-Vague 2006). Minētais apstiprinās arī mūsu rezultātos, jo nesmēķētājiem ar dislipidēmiju (Dn grupa), PAI-1 seruma koncentrācija ir būtiski palielināta ( $p<0,01$ ), salīdzinājumā ar nesmēķētājiem bez dislipidēmijas (Vn grupa). Bez tam, PAI-1 ne tikai veicina aterotrombozi, bet bojā arī insulīna signālceļu kaskādes adipocītos (Alessi, Juhan-Vague 2006). Iepriekšminēto var attiecināt uz mūsu rezultātiem, kur personām ar dislipidēmiju palielināta PAI-1 koncentrācija statistiski ticami korelē ar HOMA-IR indeksu ( $r=0,358$ ;  $p=0,025$ ) un insulīna koncentrāciju serumā ( $r=0,372$ ;  $p=0,02$ ).

Chen et al. (2006) pētīja hipoksijas un reaktīvo skābekļa savienojumu ietekmi uz adiponektīna un PAI-1 koncentrāciju izmaiņām 3T3-L1 adipocītu kultūrās. Kvantitatīvā PĶR un imūnķīmiskā analīze parādīja, ka hipoksiska vide būtiski supresē adiponektīna mRNS ekspresiju un sekrēciju, un ievērojami palielina PAI-1 producēšanu nobriedušos adipocītos. Šie rezultāti apstiprina hipotēzi, ka smēķēšana veselām personām var veicināt hipoadiponektinēmiju un supresēt fibrinolīzi, kas turpmāk var sekmēt kardiovaskulāro slimību attīstību (Chen et al. 2006). Minētā pētījuma rezultāti ir saskaņā ar mūsu darba rezultātiem, kur PAI-1 koncentrācija būtiski korelē ar samazinātu adiponektīna koncentrāciju personām bez dislipidēmijas ( $p<0,05$ ).

No iepriekšminētā var secināt, ka veselām personām PAI-1 koncentrācija serumā ir palielināta smēķēšanas ietekmē, ko parāda būtiski palielinātas seruma koncentrācijas un korelācijas ar pakgadu skaitu. Savukārt, personām ar dislipidēmiju palielināta PAI-1 koncentrācija būtiski korelē gan ar pakgadu skaitu, gan palielinātu insulīna koncentrāciju un insulīna rezistences indeksu.

## **MPO**

Mieloperoksidāzes enzimatiskā aktivitāte ir galvenais skābekļa un slāpekļa savienojumu ģenerētājs šūnās. Smēķētājiem cigarešu dūmu ietekmē palielinās ROS un RNS daudzums cirkulācijā, kas sekmē ZBL oksidēšanu. Oksidēts ZBL ierobežo endotēlija sintezētā NO bioaktivitāti, tā vietā stimulējot reaktīvo skābekļa savienojumu producēšanu, kas sekmē

imūnšūnu aktivāciju un iefiltrēšanos asinsvada sienīņā (Liao et al. 1995; Schindhelm et al. 2009).

Cigarešu dūmos esošie ķīmiskie savienojumi palielina leukocītu aktivāciju. Aktivēti leukocīti sekretē MPO ekstracelulārajā vidē, tādēļ MPO plazmas koncentrāciju var uzskatīt par specifisku leukocītu aktivācijas indeksu (Hoy et al. 2001). Palielinātas MPO koncentrācijas var norādīt par iekaisuma procesu, palielināta oksidatīvā stresa norisēm un pastiprinātu ROS producēšanu. Šādos apstākļos endoteliālais NO spontāni reaģē ar superoksīdu, kā rezultātā samazinās NO bioaktivitāte un asinsvadu spēja dilatēties (Tang et al. 2009).

Hoy et al. (2001) pētījumā klīniski veseliem vīriešiem, hroniskiem smēķētājiem, bija palielinātas MPO koncentrācijas serumā, salīdzinot ar nesmēķētājiem. Šie dati ir saskaņā ar mūsu rezultātiem. Lai gan abās smēķētāju grupās MPO seruma koncentrācija ir palielināta nebūtiski, tomēr nesmēķētājiem ar dislipidēmiju (Dn grupā), salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem (Vn grupu), MPO koncentrācija ir palielināta statistiski ticami ( $p < 0,01$ ), kas parāda, ka MPO ir saistīts ar dislipidēmijas inducētu oksidatīvo stresu un iekaisuma reakcijām.

Klīnisko pētījumu rezultāti ir pierādījuši, ka sistēmiskā MPO palielinātas koncentrācijas kalpo kā stabils un neatkarīgs endoteliālās disfunkcijas priekšvēstnesis (Vita et al. 2004). Neskatoties uz to, ir pierādīts, ka MPO koncentrācijai ir cieša negatīva korelācija ar endotēlija atkarīgās vazodilatācijas rādītājiem, kas novērots cilvēku grupā bez akūtiem iekaisumiem, diabēta, kardiovaskulārām slimībām un citām hroniskām slimībām (Vita et al. 2004). Arī mūsu darba rezultātos MPO koncentrācija būtiski korelē ar samazinātu endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitāti – siltuma inducētu vazodilatācijas 2.maksimumu ( $p < 0,05$ ) un Ach inducētas vazodilatācijas maksimumu ( $p < 0,05$ ). Ņemot vērā to, ka minētās korelācijas ir vērojamas tikai visās pētījuma grupās kopā, varētu liecināt par to, ka mieloperoksidāze caur dažādiem mehānismiem ierosina akūtas un hroniskas asinsvadu iekaisuma slimības un turpmāku to progresēšanu. Tā, piemēram, MPO izcelsmes hipohlorskābes (HOCl) zema koncentrācija bojā intracelulārās signālkaskādes, MPO atkarīgā lipoproteīnu peroksidācija modulē to afinitāti pie makrofāgiem un asinsvada sienīņas, MPO mediēta endoteliālā NO deplēcija (bioaktivitātes inhibīcija) bojā endotēlija atkarīgo vazodilatāciju un MPO izcelsmes nitrotirozīns viegli iekļūst asinsvada sienīņā, kur tas var izmainīt matricsa proteīnu struktūru un funkcijas (Baldus et al. 2001). Bez tam, mūsu rezultātos MPO koncentrācija būtiski korelē arī ar palielinātu insulīna koncentrāciju ( $p < 0,01$ ) un HOMA-IR indeksu ( $p < 0,01$ ), un

samazinātu adiponektīna koncentrāciju ( $p < 0,01$ ) visās grupās kopā, kas var norādīt uz MPO katalizēto reakciju izraisītu adipocītu un insulīna signālceļu disfunkciju.

### **Adiponektīns**

Vairāki autori ir ziņojuši, ka adiponektīna koncentrācija cirkulācijā smēķētājiem ir zemāka, nekā nesmēķētājiem. Šī sakarība tika novērota klīniski veselām personām, bez cukura diabēta un metabolā sindroma. (Abbasi et al. 2006; Iwashima et al. 2005; Miyazaki et al. 2003; Takefuji et al. 2007; Thamer et al. 2005).

Cigarešu dūmos esošie ķīmiskie savienojumi tieši inhibē adiponektīna ekspresiju taukaudos, tādējādi samazinot tā daudzumu cirkulācijā. Tas tika pierādīts eksperimentāli, apstrādājot 3T3-L1 adipocītu kultūras gan ar  $H_2O_2$ , gan ar nikotīnu dažādās koncentrācijās. Rezultāti uzrādīja samazinātu adiponektīna mRNS ekspresiju un sekrēciju, kas bija atkarīgs no iedarbīgās vielas devas (Chen et al. 2006; Iwashima et al. 2005). Organismā nikotīns caur kateholamīnu atbrīvošanu izraisa lipolīzi taukaudos, kas supresē adiponektīna sintēzi (Andersson, Arner 2001; Iwashima et al. 2005).

Mūsu iegūtie rezultāti ir saskaņā ar minēto autoru rezultātiem, jo abās smēķētāju grupās seruma adiponektīna koncentrācija ir samazināta, salīdzinājumā ar attiecīgo nesmēķētāju grupu. Lai gan smēķēšanas kumulatīvais efekts vāji, tomēr korelē ar samazinātu adiponektīna seruma koncentrāciju gan V grupā ( $p < 0,05$ ), gan D grupā ar tendenci ( $p = 0,082$ ), kas arī apstiprina citu autoru rezultātus, ka smēķētājiem ar dislipidēmiju samazināta adiponektīna koncentrācija primāri ir dislipidēmijas ietekmē. Palielinātas viscerālās aptaukošanās un samazinātas insulīna jutības gadījumā ir samazināta adiponektīna koncentrācija, kas ir saistīts ar palielinātu aknu lipāzes aktivitāti (Cnop et al. 2003). Arī mūsu rezultātos dislipidēmijas ietekmē adiponektīna koncentrācija ir samazināta būtiski, ko mēs novērojām, salīdzinot nesmēķētāju grupas –  $V_n$  pret  $D_n$  ( $p < 0,05$ ).

Neskatoties uz to, ka adiponektīna koncentrācija ir būtiski samazināta smēķētājiem bez vispārējas aptaukošanās ( $QMI \leq 30 \text{ kg/m}^2$ ), tomēr viscerālo tauku daudzums ir adiponektīna koncentrācijas rādītājs (Cnop et al. 2003). Salīdzinājumā ar  $QMI$ , tieši viscerālo tauku daudzums (ko var noteikt ar kompjūtertomogrāfijas metodi) būtiski korelē ar samazinātu adiponektīna koncentrāciju un insulīna jutības rādītājiem. Tādēļ seruma adiponektīna koncentrācija daudz precīzāk, nekā  $QMI$ , atspoguļo viscerālo aptaukošanos vidēja vecuma smēķētāju populācijā (Cnop et al. 2003). Bez tam, adiponektīna koncentrācija statistiski ticami korelē ar TG un ABL seruma koncentrācijām un HOMA-IR indeksu (Cnop

et al. 2003; Iwashima et al. 2005; Matsubara et al. 2002). Tomēr mūsu rezultātos smēķētājiem bez dislipidēmijas (Vs grupā) neatšķiras ĶMI, vidukļa apkārtmērs, kopējā holesterīna un ZBL koncentrācijas serumā, salīdzinot ar nesmēķētājiem (Vn grupu).

Vairāku pētījumu rezultāti ir apliecinājuši saistību starp smēķēšanu un palielinātām iekaisuma reakcijām, samazinātu insulīna jutību un dislipidēmiju (Facchini et al. 1992; Frohlich et al. 2003; Nagel et al. 2009). Tomēr, starp vairāku pētījumu rezultātiem ir vērojamas pretrunas, kurās ir skaidri parādīts, ka smēķētājiem ir samazināta ķermeņa masa un izmainīts ķermeņa taukaudu izvietojums. Smēķēšanas intensitāte ietekmē adiponektīna koncentrācijas samazināšanos cirkulācijā gan vīriešiem, gan sievietēm, un tam ir noteicošā loma metabolo un aterosklerotisko slimību attīstībā un progresijā. Bijušiem smēķētājiem, kuri šo paradumu atmetuši pirms vairāk kā 10 gadiem, adiponektīna koncentrācija ir līdzīga kā nesmēķētājiem (Takefuji et al. 2007).

Pētījumos ir pierādīts, ka plazmas adiponektīna koncentrācija pozitīvi korelē ar insulīna jutību un ABL koncentrāciju, bet negatīvi - ar ĶMI, vidukļa apkārtmēru un ZBL daļiņu lielumu (Cnop et al. 2003; Matsubara et al. 2002). Mūsu rezultātos arī novērojām, ka personām ar dislipidēmiju adiponektīna koncentrācija negatīvi korelē ar insulīna rezistences rādītājiem: palielinātu insulīna koncentrāciju ( $p < 0,05$ ), TG koncentrāciju ( $p = 0,06$ ) un HOMA-IR indeksu ( $p = 0,06$ ). Pozitīva korelācija ir iegūta starp adiponektīna un ABL koncentrācijām gan V grupā ( $p < 0,01$ ), gan D grupā ( $p < 0,01$ ). Fasshauer et al. (2001) apgalvo, ka zemas adiponektīna koncentrācijas samazina taukskābju oksidāciju muskuļos un rezultātā palielinās brīvo taukskābju daudzums cirkulācijā, kas bojā insulīna signālkaskādes insulīna jutīgajos audos.

Lai gan vairākos pētījumos ir pierādījies, ka zema adiponektīna koncentrācija nav saistīta ar insulīna rezistences esamību (t.i., adiponektīna zemā koncentrācija nav insulīna rezistences marķieris), tomēr no klīniskā viedokļa ir jāņem vērā, ka personām, kuras smēķē un kurām ir zema adiponektīna koncentrācija un/vai dislipidēmija, pastāv lielāks risks kardiovaskulārām saslimšanām, nekā, ja kāds no šiem faktoriem ir tikai viens (Abbasi et al. 2006). Adiponektīns ir insulīnu sensitizējošs hormons ar pretiekaisuma un antiaterogēnām īpašībām. Pilotpētījumos noskaidroja, ka zema adiponektīna koncentrācija ir saistīta ar samazinātu insulīna jutību. Bez tam, adiponektīna receptorus AdipoR1 un AdipoR2 uz savas virsmas ekspresē aizkuņģa dziedzerā  $\beta$ -šūnās (Kadowaki et al. 2006), kas varētu būt potenciālā saikne starp adiponektīnu un aizkuņģa dziedzerā endokrīno funkciju (Stolzenberg-Solomon et al. 2008).



Taukaudu producētajām un sekretētajām bioaktīvajām substancēm – adiponektīnam, TNF- $\alpha$ , PAI-1 ir tieša ietekme uz asinsvadu funkcijām. Cirkulējošais adiponektīns akumulējas bojāta asinsvada subendotēlija telpā, tādējādi inhibējot TNF- $\alpha$  ierosinātu adhēzijas molekulu ekspresiju endotēlija šūnās. Tomēr, palielinātas TNF- $\alpha$  koncentrācijas samazina adiponektīna ekspresiju (Maeda et al. 2001). Bez tam, adiponektīnam piemīt spēja inhibēt monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām un inhibēt lipīdu akumulāciju. Tiek uzskatīts, ka samazināta adiponektīna koncentrācija tieši korelē ar asinsvadu slimību attīstības pakāpi (Ouchi et al. 2001).

Augstāk minētais ir saskaņā ar mūsu pētījumu, jo korelāciju analīze parāda, ka samazinātai adiponektīna koncentrācijai ir būtiskas korelācijas ar palielinātu sE-selektīna koncentrāciju V grupā ( $p < 0,01$ ) un D grupā ( $p < 0,05$ ), un palielinātu TNF- $\alpha$  koncentrāciju V grupā ( $p < 0,01$ ) un D grupā ( $p < 0,05$ ). Tas norāda, ka gan smēķēšanai, gan dislipidēmijai ir būtiska nozīme iekaisuma citokīnu palielinātām koncentrācijām, konkrēti TNF- $\alpha$ , kas ierosina adhēzijas molekulu ekspresiju. Bez tam, V grupā adiponektīns negatīvi korelē ar PAI-1 seruma koncentrāciju ( $p < 0,05$ ), kas varētu norādīt, ka PAI-1 ietekmē samazinās adiponektīna koncentrāciju netieši, caur ietekmi uz endotēlija šūnu aktivāciju un iespējamu asinsvadu bojājumu.

## 4.2. SMĒĶĒŠANAS AKŪTĀ IETEKME

Klīniskos un eksperimentālos pētījumos ir noskaidrots, ka gan aktīvas, gan pasīvas smēķēšanas ietekmē tiek bojāta endotēlija atkarīgā vazodilatācija gan makrovaskulārajā (t.sk. koronārajās artērijās), gan mikrovaskulārajā gultnē (Ambrose and Barua 2004).

Pētījumos tiek ziņots par akūtas smēķēšanas izraisītu samazinātu vazodilatācijas intensitāti, nikotīna ietekmē palielinātu sirds minūtes tilpumu (SMT), sirds ritmu, sistolisko un diastolisko asinsspiedienu (Ambrose and Barua 2004; Ijzerman et al. 2003; Shinozaki et al. 2008). Bez nikotīna, arī citi cigarešu dūmos esošie ķīmiskie savienojumi un brīvie radikāļi var bojāt endotēlija struktūru un funkcijas (Ambrose and Barua 2004; Ijzerman et al. 2003).

Mūsu pētījuma rezultāti parādīja, ka akūtas smēķēšanas ietekmē (pēc vienas izsmēķētas cigaretes) statistiski ticami paaugstinās sistoliskais un diastoliskais asinsspiediens un paātrinās sirdsdarbība. Šie rezultāti ir saskaņā ar citu autoru datiem.

Asinsspiediena paaugstināšanos pēc izsmēķētas cigaretes skaidro ar samazinātu lielo asinsvadu elasticitāti un traucētu vazodilatācijas kapacitāti koronārajās artērijās, kas palielina asinsvadu kopējo perifēro pretestību, tādējādi palielinot sirds darbu. Bez tam, smēķēšanas ietekmē tiek stimulēta kateholamīnu sekrēcija un adrenergiskā aktivācija, tādējādi nodrošinot simpātiskās nervu sistēmas aktivitāti (Ijzerman et al. 2003; Yufu et al. 2009).

Ielpojot cigarešu dūmos esošās komponentes ir pietikoši, lai izraisītu akūtu endotēlija disfunkciju caur eNOS inaktivāciju, tieši bojā endotēlija šūnu dzīvotspēju un samazina cirkulējošo endoteliālo priekšteču šūnu skaitu un funkcionālo aktivitāti, aktivētu imūnšūnas un izraisītu sistēmiskā iekaisuma reakcijas, kas sekojoši arī var izraisīt asinsvadu bojājumu. Tā pat kā caur muti ievilktajos dūmos, tā arī ieelpotajos degošas cigaretes dūmos esošie ķīmiskie savienojumi ierosina oksidatīvo stresu, aktivē trombocītus un veicina asinsvadu iekaisuma reakcijas. Bez vazokonstrikcijas un trombu veidošanās, miokarda skābekļa nodrošinājums ir samazināts dēļ dūmos esošo ķīmisko substanču inducētas adrenergiskās stimulācijas un veģetatīvās funkcijas traucējumiem, kas var manifestēties kā akūta KVS (Raupach et al. 2006).

Smēķēšanas akūtā efekta izraisīta simpātiskā aktivācija šajā darbā bija vērojama arī aksonu refleksa mediētai asinsplūsmi (LDI-silt.t.1 max), kam bija tendence palielināties lokālas sildīšanas ietekmē pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas. Šī neirālās regulācijas vazodilatācijas intensitātes palielināšanās ir vērojama abu vecuma grupu smēķētājiem. Savukārt, endotēlija atkarīgā vazodilatācija (LDI-silt.t.2 max) lokālas sildīšanas jeb termālas

hiperēmijas ietekmē samazinās ar tendenci abās smēķētāju grupās pēc izsmēķētas cigaretes. Tātad, cigarešu dūmu ietekmē tiek inhibēta eNOS aktivitāte un NO biopieejamība. Šie rezultāti ir saskaņā ar citu autoru pētījumiem, kuros tā pat apstiprinājās samazināta endotēlija atkarīgā vazodilatācija pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas (Ijzerman et al. 2003).

Cigarešu dūmu ietekmē tieši tiek stimulēti postganglionārie nervgaļi, kas samazina muskuļu simpātisko aktivitāti, un palielinās ādas simpātisko nervu aktivitāte neatkarīgi no barorefleksa aktivācijas un asinsspiediena paaugstināšanās (Groppelli et al. 1990; Shinozaki et al. 2008). Kateholamīnu atbrīvošana no perifērām postganglionārām simpātiskām nervu šķiedrām varētu izskaidrot palielināto neirāli mediēto vazodilatāciju pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas (31.attēls).

Saskaņā ar Butler et al. (2001) ziņojumu, akūtas smēķēšanas ietekmē samazinās bazālā asinsplūsma, ko nosaka samazināta fona NO aktivitāte. Mūsu pētījumā bazālā asinsplūsma ādas mikrocirkulācija nesamazinājās pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas ne jauniešu, ne pieaugušo smēķētāju grupā, kas ir saskaņā ar Guthikonda et al. (2003) pētījuma rezultātiem. NO sekrēcija kā atbildes reakcija uz tādu stimulu kā Ach jontoforēze vai lokāla sildīšana ir jutīgāks endoteliālās (dis)funkcijas marķieris, nekā bazālā NO bioaktivitāte (Guthikonda et al. 2003). Dažu pētījumu autori (Butler et al. 2001; Kiowski et al. 1994) ir ziņojuši, ka bazālā asinsplūsma smēķētājiem samazinājās, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kas ir pretrunā ar mūsu un citu autoru rezultātiem.

Shinozaki et al. (2008) pētījumā jauniem smēķētājiem ( $23 \pm 1$  g.v.) bija jāizsmēķē divas cigaretes 5 minūšu laikā. Pēc 10 minūtēm veica mērījumus un ieguva sekojošus rādītājus - būtiski paātrinātu sirds ritmu, palielinātu sistolisko un diastolisko asinsspiedienu, un nikotīna koncentrāciju plazmā, un būtiski samazinātu endotēlija atkarīgo vazodilatāciju, ko noteica ar postokluzīvās hiperēmijas testu. Pētījumos ir ziņots, ka klīniski veseliem vīriešiem smēķēšanas ietekmē paātrinās sirds darbības ritms un paaugstinās asinsspiediens, un palielinās noradrenalīna koncentrācija cirkulācijā. Šie rādītāji būtiski samazinās ar  $\alpha$ - un  $\beta$ -adrenergiskajiem blokatoriem (Groppelli et al. 1990).

Kiowski et al. (1994) ziņoja par sava pētījuma rezultātiem, kad pēc 2 cigarešu izsmēķēšanas 15 minūšu laikā, statistiski ticami palielinājās sistoliskais un diastoliskais asinsspiediens, un sirds darbības frekvence. Tieši akūtais smēķēšanas efekts palielina akūtu išēmisku notikumu risku dēļ hemostātiskām izmaiņām – trombocītu aktivācija, palielināta asiņu viskozitāte un pangu nestabilitāte (Kool et al. 1993).

Smēķēšanas ietekmē attīstās gan akūta, gan hroniska barorefleksa disfunkcija (Gerhardt et al. 1999). Barorefleksa jutība normā samazinās līdz ar vecumu, bet pacientiem ar hipertenziju vai cukura diabētu ir vērojama simpātiskā hiperaktivitāte (Huggett et al. 2003), tādēļ smēķēšana pastiprināti stimulē simpātisko aktivitāti, kas veido noslēgtu loku. Tomēr, smēķēšanas pārtraukšana var samazināt šo aktivitāti.

Endotēlija funkcija tiek arī novērtēta, pētot asinsvadu reakciju uz Ach jontoforēzes stimulu, kurš sekmē NO un PGI<sub>2</sub> atbrīvošanu no endotēlija šūnām (Pellaton et al. 2002). Mūsu pētījumā statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) samazinājās Ach inducēta vazodilatācija smēķētājiem abās vecuma grupās pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas. Bez tam, statistiski ticami samazināta neirāli mediēta un Ach inducēta vazodilatācija pirms cigaretes smēķēšanas bija vērojama vidēja vecuma smēķētājiem ( $p < 0,05$ ), salīdzinājumā ar gados jauniem smēķētājiem. Šie rezultāti ir saskaņā ar citu autoru pētījumiem, kuros ir ziņots, ka vazodilatācijas intensitāte ādas mikrocirkulācijā samazinās atkarībā no smēķēšanas ilguma gados (Butler et al. 2001; Pellaton et al. 2002; Toda, Toda 2010), kas parāda hroniskas smēķēšanas kumulatīvo efektu. Līdzīgi tika novērots makrocirkulācijā, kad hroniskiem smēķētājiem bija samazināta plūsmas jeb postokluzīvās hiperēmijas mediēta dilatācija pleca artērijā. Bez tam, samazināta vazodilatācijas intensitāte korelēja ar smēķēšanas kumulatīvo efektu jeb pakģadu skaitu (Toda, Toda 2010). Arī mūsu pētījuma rezultāti parādīja statistiski ticamu negatīvu korelāciju starp vazodilatācijas intensitāti mikrocirkulācijā un pakģadu skaitu ( $p < 0,05$ ).

Epidemioloģisko pētījumu rezultāti ir parādījuši tendenci, ka intensīviem smēķētājiem pastāv lielāks risks dažādu kardiovaskulāro slimību attīstībai, kas ir atkarīgs no izsmēķēto cigarešu skaita dienā un/vai pakģadu skaita (Ambrose and Barua 2004).

Tātad, smēķēšana akūtais efekts (pēc vienas cigaretes izsmēķēšanas) samazina endotēlija atkarīgās vazodilatācijas intensitāti perifērajā mikrocirkulācijā un ievērojami palielina kardiovaskulāro simpātisko aktivitāti veselām personām. Bez tam, akūtas smēķēšanas ietekmē palielinās neirālās regulācijas jeb neuropeptīdu mediētas vazodilatācijas intensitāte kā atbilde uz lokālu termālu hiperēmiju veseliem vīriešiem, neatkarīgi no vecuma.

Frati et al. (1996) pētījumā noskaidroja, ka smēķēšana akūti samazina glikozes toleranci. Autori šo ietekmi saista ar samazinātu šūnu jutību uz insulīnu. Pirms un pēc smēķēšanas personām noteica insulīna jutības indeksu, kas bija būtiski zemāks pēc smēķēšanas. Autori uzskata, ka kateholamīnu koncentrācijas palielināšanās daļēji ir atbildīga par insulīna jutības samazināšanos. Smēķēšanas laikā absorbētais nikotīns stimulē

kateholamīnu atbrīvošanu no virsnieru dziedzera, kā rezultātā palielinās AS un sirds darbības frekvence. Lai gan hiperinsulinēmija, kas ir insulīna rezistences pazīme, arī var izraisīt adrenergisko aktivāciju, tomēr, pārmērīgu simpātisko aktivāciju sākotnēji izraisa smēķēšana, pirms rodas būtiska hiperinsulinēmija. Tādēļ, smēķētājiem par insulīna rezistences attīstību ir atbildīga smēķēšanas, bet nevis hiperinsulinēmijas izraisīta adrenergiskā aktivācija (Fratl et al. 1996).

Smēķēšanas akūtais efekts palielina neitrofilu un makrofāgu hemotaksi un aktivāciju. Dažu pētījumu rezultāti parādīja, ka smēķēšana akūti supresē eozinofilu aktivitāti un dažu iekaisuma citokīnu (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, un IFN- $\gamma$ ) gēnu ekspresiju. Tiek uzskatīts, ka cigarešu dūmos esošie iekaisumu veicinošie un pretiekaisuma (piem., oglekļa monoksīds) faktori vienlaicīgas darbības rezultātā bojā pulmonālā epitēlija matriksu. Pētījumi ar dzīvnieku modeļiem parādīja, ka cigarešu dūmu akūtā ietekmē būtiski palielinās MPO koncentrācijas serumā. Churg et al. pētījumā ar pelēm konstatēja, ka TNF- $\alpha$  ir centrālā loma smēķēšanas akūtā efekta ierosinātā iekaisuma veidošanā un ekstracelulārā matriksa degradācijā. Arī citu iekaisuma mediatoru (MCP-1, makrofāgu iekaisuma proteīna-2) gēnu ekspresija palielinās akūtas smēķēšanas ietekmē (Levitzky et al. 2008). Minētais ir saskaņā ar mūsu pētījuma rezultātiem, jo korelāciju analīze parādīja, ka dienā izsmēķēto cigarešu skaits statistiski ticami korelē ar palielinātām IL-6, IL-8 un PAI-1 seruma koncentrācijām personām bez dislipidēmijas.

## SECINĀJUMI

1. Veselām personām hroniskas smēķēšanas ietekmē ir būtiski palielinātas endotēlija disfunkciju raksturojošo iekaisuma signālmolekulu koncentrācijas serumā. Personām ar dislipidēmiju minēto signālmolekulu koncentrācijas ir palielinātas, galvenokārt, dēļ dislipidēmijas, tādēļ hroniskas smēķēšanas ietekmē tās palielinās ar tendenci.
2. Smēķētājiem, neatkarīgi no dislipidēmijas, vazodilatācijas intensitātes kapacitāte ādas mikrocirkulācijā ir būtiski samazināta. Hroniskas smēķēšanas negatīvas ietekmes korelācija ar mikrocirkulācijas asinsvadu spēju dilatēties ciešāka ir personām ar dislipidēmiju. Šāds rezultāts parāda, ka hroniska smēķēšana pastiprina dislipidēmijas ietekmi uz endotēlija disfunkciju.
3. Veselām personām hroniska smēķēšana neietekmē insulīna rezistences rādītājus un to saistību ar endoteliālās disfunkcijas iekaisuma signālmolekulām un vazodilatācijas intensitāti ādas mikrocirkulācijā, kas neapstiprina insulīna rezistences attīstības risku.
4. Personām ar dislipidēmiju hroniska smēķēšana būtiski palielina insulīna seruma koncentrāciju un HOMA-IR indeksu, kas pozitīvi korelē ar palielinātām iekaisumu veicinošo signālmolekulu (IL-6, TNF- $\alpha$ , sE-selektīna, sICAM-1, PAI-1) seruma koncentrācijām un negatīvi ar samazinātu vazodilatācijas intensitāti. Rezultāti norāda uz hroniskas smēķēšanas un dislipidēmijas ierosināta sistēmiskā iekaisuma saistību ar šūnu insulīna jutības samazināšanos un insulīna rezistences attīstības risku.
5. Dienā izsmēķēto cigarešu skaits pozitīvi korelē ar HOMA-IR, insulīna, IL-6, IL-8 un PAI-1 koncentrāciju, kas parāda, ka smēķēšana caur iekaisuma signālmolekulām īslaicīgi samazina šūnu insulīna jutību neatkarīgi no dislipidēmijas.
6. Personām ar dislipidēmiju dienā izsmēķēto cigarešu skaits būtiski korelē ar palielinātu vidukļa apkārtmēru, kas parāda, ka viscerālā aptaukošanās ir saikne starp hronisku smēķēšanu un insulīna rezistences attīstības risku.
7. Smēķēšana akūti samazina vazodilatācijas intensitāti mikrocirkulācijā un palielina kardiovaskulāro simpātisko aktivitāti veselām personām, neatkarīgi no vecuma.

## TĒZES

1. Veselām personām hroniskas smēķēšanas ietekmē ir būtiski palielinātas endotēlija disfunkciju raksturojošo iekaisuma signālmolekulu koncentrācijas serumā. Personām ar dislipidēmiju minēto signālmolekulu koncentrācijas ir palielinātas, primāri, dislipidēmijas, bet sekundāri – hroniskas smēķēšanas ietekmē.
2. Smēķētājiem, neatkarīgi no dislipidēmijas, vazodilatācijas intensitāte ādas mikrocirkulācijā ir būtiski samazināta, bet hroniska smēķēšana pastiprina dislipidēmijas ietekmi uz samazinātu vazodilatācijas intensitāti.
3. Veselām personām hroniska smēķēšana neietekmē insulīna rezistences rādītājus un to saistību ar endoteliālās disfunkcijas iekaisuma signālmolekulām un vazodilatācijas intensitāti.
4. Personām ar dislipidēmiju hroniskas smēķēšanas un dislipidēmijas ierosinātas iekaisuma reakcijas veicina šūnu insulīna jutības samazināšanos un insulīna rezistences attīstības risku, kas korelē ar samazinātu vazodilatācijas intensitāti ādas mikrocirkulācijā.
5. Dienā izsmēķēto cigarešu skaits akūti caur iekaisuma signālmolekulām īslaicīgi samazina šūnu insulīna jutību neatkarīgi no dislipidēmijas.
6. Personām ar dislipidēmiju viscerālā aptaukošanās ir saikne starp hronisku smēķēšanu un insulīna rezistences attīstības risku.
7. Smēķēšana akūti samazina vazodilatācijas intensitāti mikrocirkulācijā un palielina kardiovaskulāro simpātisko aktivitāti veselām personām, neatkarīgi no vecuma.

## **PATEICĪBAS**

Liels paldies promocijas darba vadītājam Dr.biol.,asoc.profesoram Pēterim Treťjakovam par pētījuma izstrādes iespēju un praktiskiem padomiem. Liela pateicība darba zinātniskajam konsultantam Dr.hab.biol., profesoram Jurim I.Aivaram par vērtīgajiem ieteikumiem darba izstrādē un atbalstu doktorantūras studiju laikā. Liels paldies kolēģiem – Dr.biol. Antrai Jurkai par praktisku atbalstu pētījuma datu ieguvē un Dr.biol. Normundam Jurkam par ieteikumiem liela apjoma datu statistiskā apstrādē.



## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Abbasi F, Farin HM, Lamendola C, McLaughlin T, Schwartz EA, Reaven GM, Reaven PD. The relationship between plasma adiponectin concentration and insulin resistance is altered in smokers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(12): 5002–5007.
- Abu-Soud H.M., Hazen S.L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem*. 2000; 275: 37524–37532.
- Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2003; 107: 604–611
- Alessi M.C., Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26(10): 2200-2207.
- Ambrose J.A., Barua R.S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: An update. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43:1731–1737.
- Anderssohn M, Schwedhelm E, Lüneburg N, Vasan RS, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2010, 7(105): 106 – 113.
- Andersson K, Arner P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001; 25: 1225–1232.
- Andersson K, Eneroth P, Arner P. Changes in circulating lipid and carboxyhydrate metabolites following systemic nicotine treatment in healthy men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17: 675–680.
- Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Marinou K, Tentolouris C, Ntarladimas I, Stefanadis C. Combined effects of smoking and hypercholesterolemia on inflammatory process, thrombosis/fibrinolysis system, and forearm hyperemic response. *Am J Cardiol*, 2004; 94(9): 1181-4.
- Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol*, 2003; 15(10): 1029–1038.

- Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S, et al. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000; 96: 1039–1046.
- Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini G. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008; 82 Suppl 2: S94-S101.
- Badrick E., Kirschbaum C., Kumari M. The Relationship between Smoking Status and Cortisol Secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(3): 819-824.
- Baldus S., Eiserich J.P., Mani A., Castro L., Figueroa M., et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest*, 2001; 108: 1759–1770.
- Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 2003; 107(18): 2342-7.
- Battaglia S, Mauad T, van Schadewijk AM, Vignola AM, Rabe KF, Bellia V. Differential distribution of inflammatory cells in large and small airways in smokers. *J Clin Pathol*. 2007; 60: 907–911
- Berrahmoune H, Lamont JV, Herbeth B, FitzGerald PS, Visvikis-Siest S. Biological determinants of and reference values for plasma interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor: Results from the STANISLAS cohort. *Clin Chem*, 2006; 52(3): 504-510.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 1997; 46(1): 3-10.
- Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, et al. Activation of IKK $\alpha$  target genes depends on recognition of specific  $\kappa$ B binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J*, 2004;23:4202–4210.
- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2007; 97(5): 714–721.
- Bridges RB, Fu MC, Rehm SR. Increased neutrophil myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking. *Eur J Respir Dis*. 1985;67:84–93.

- Bruin JE, Petre MA, Raha S, Morrison KM, Gerstein HC, Holloway AC. Fetal and neonatal nicotine exposure in Wistar rats causes progressive pancreatic mitochondrial damage and beta cell dysfunction. *PLoS One*, 2008; 3(10): e3371.
- Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J. Leukocyte Biol*, 2005; 78: 819–835.
- Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and atherosclerosis. *Clin Exp, Immunol*. 2000; 121: 255–260.
- Butler R, Morris AD, Struthers AD. Cigarette smoking in men and vascular responsiveness. *Br J Clin Pharmacol*, 2001; 52: 145-149.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000; 87: 840–844.
- Calabresi L, Gomaschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22(4): 656-661.
- Carr A.C., McCall M.R., Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716-1723.
- Chapman JT, Otterbein LE, Elias JA, et al. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001; 281 :L209–216.
- Charkoudian N. Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why. *Mayo Clin Proc*, 2003; 78: 603-612.
- Chen B, Lam KS, Wang Y, Wu D, Lam MC, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 341(2): 549-556.
- Chen H., Montagnani M., Funahashi T., Shimomura I., Quon M.J. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem*, 2003; 278(45): 45021–45026.
- Chiarugi A, Moskowitz MA. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 2003; 85: 306–317.
- Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87: 801–809.

- Churg A, Dai J, Tai H, Xie CS, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 849–854.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(4): 427-450.
- Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.* 2003; 46: 459–469.
- Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, et al. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol.* 2000; 393: 279–294.
- Collins S., Surwit R.S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2001; 56: 309-328.
- Cooke J.P. Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(9): 2032 – 2037.
- Csiszar A., Labinskyy N., Smith K., Rivera A., Orosz Z., Ungvari Z. Vasculoprotective effects of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment in aging. *Am. J. Pathol.* 2007; 170: 388–398.
- Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci.* 2009; 14: 3128–3144.
- Davies BD, Hoss W, Lin JP, et al. Evidence for a noncholinergic nicotine receptor on human phagocytic leukocytes. *Mol Cell Biochem.* 1982; 44: 23–31.
- de Jongh RT, Serné EH, Ijzerman RG, de Vries G, Stehouwer CD. Free fatty acid levels modulate microvascular function: relevance for obesity-associated insulin resistance, hypertension, and microangiopathy. *Diabetes.* 2004; 53(11): 2873-2882.
- de Maat MP, Kluft C. The association between inflammation markers, coronary artery disease and smoking. *Vasc Pharmacol.* 2002; 39: 137–139.
- Despre JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444:881–87
- Díez Piña JM, Fernández Aceñero MJ, Llorente Alonso MJ, Díaz Lobato S, Mayoralas Alises S., et al. Tumor necrosis factor as an early marker of inflammation in healthy smokers. *Med Clin (Barc).* 2012; 139(2): 47-53.

- Díez J.J., Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*, 2003;148(3): 293-300.
- Durand S, Tartas M, Bouyé P, Koitka A, Saumet JL, Abraham P. Prostaglandins participate in the late phase of the vascular response to acetylcholine iontophoresis in humans. *J Physiol*, 2004; 561(Pt 3): 811-819.
- Dzien A, Dzien-Bischinger C, Hoppichler F, Lechleitner M. The metabolic syndrome as a link between smoking and cardiovascular disease. 2004; 6(2):127-32.
- Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*. 2002; 296(5577): 2391–2394.
- Eliasson B. Cigarette smoking and diabetes. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 45: 405–413.
- Eliasson B, Attvall S, Taskinen M-R, Smith U. The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits *Arterioscler Thromb* 1994;14:1946-1950.
- Facchini F.S., Hollenbeck C.B., Jeppesen J., Chen Y-D.I., Reaven G.M. Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet* 1992; 339: 1128–30.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 2001; 507(2): 142–146.
- Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 301: 1045–1050
- Field AE, Colditz GA, Willett WC, Longcope C, McKinlay JB. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1310 –6.
- Fitzgerald S. M., Kemp-Harper B. K., Tare M., Parkington H. C. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005; 32: 482–487.
- Fрати AC, Iniestra F, Ariza CR. Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care*, 1996;19(2): 112-118.
- Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J*, 1991; 277: 133–138.

- Frohlich M., Sund M., Lowel H., Imhof A., Hoffmeister A., Koenig W. Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95). *Eur Heart J.* 2003; 24: 1365–1372.
- Furie MB, Raffanella JA, Gergel EI, et al. Extracts of smokeless tobacco induce pro-inflammatory changes in cultured human vascular endothelial cells. *Immunopharmacology*, 2000; 47: 13–23.
- Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2003; 348: 383–393.
- Gerhardt U, Vorneweg P, Riedasch M, Hohage H. Acute and persistent effects of smoking on the baroreceptor function. *J Auton Pharmacol*, 1999; 19: 105-8
- Gharipour M, Kelishadi R, Sarrafzadegan N, Baghaei A, Yazdani M, Anaraki J, Eshrati B, Tavassoli AA. The association of smoking with components of the metabolic syndrome in non-diabetic patients. *Ann Acad Med Singapore*, 2008; 37(11): 919-923.
- Giannattasio C., Zoppo A., Gentile G., et al. Acute effect of high-fat meal on endothelial function in moderately dyslipidemic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 406–410.
- Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr*, 2004; 23(5): 963–974.
- Girod JP, Brotman DJ. Does Glucocorticoid Dysregulation Contribute to the Link Between Cigarette Smoking and Insulin Resistance? *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42(4): 771
- Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease: Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation*, 1991; 83:1–12.
- Golay S, Haeberli C, Delachaux A, Liaudet L, et al. 2004. Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by muscarinic cholinergic receptors or prostanoids. *J Appl Physiol.* 97: 1781-1786.
- Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. Tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 293: H1115–H1121.
- Groppelli A, Omboni S, Parati G. Blood pressure and heart rate response to repeated smoking before and after beta-blockade and selective alpha 1 inhibition. *J Hypertens Suppl*, 1990; 8: S35-40.

- Guthikonda S., Sinkey C., Barenz T., Haynes W.G. Xanthine Oxidase Inhibition Reverses Endothelial Dysfunction in Heavy Smokers. *Circulation*, 2003;107: 416-421.
- Haddy N, Sass C, Maumus S, Marie B, Drosch S, Siest G, Lambert D, Visvikis S. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(1): 109-117.
- Hansell J, Henareh L, Agewall S, Norman M. Non-invasive assessment of endothelial function - relation between vasodilatory responses in skin microcirculation and brachial artery. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2004; 24(6): 317-322.
- Hansson GK. Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 947: 157–165; discussion 165–166.
- Hattori Y, Nakano Y, Hattori S, Tomizawa A, Inukai K, Kasai K. High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* . 2008;582:1724.
- Hauner H, Petruschke T, Russ M, Röhrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*, 1995; 38(7): 764-71.
- Havel P.J. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol*, 2002; 13(1): 51–59.
- Hazen S.L., Heinecke J.W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997; 99: 2075-2081.
- Hecht SS, Carmella SG, Chen M, Dor Koch JF, Miller AT, Murphy SE, Jensen JA, Zimmerman CL, Hatsukami DK. Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res*, 1999; 59: 590–596
- Heine RJ, Dekker JM. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. *Diabetologia* 2002; 45: 461–475.
- Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: Evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*, 2000; 86: E36–E41.
- Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia: role of oxidized LDL. *Circulation*, 1996; 93: 1346–1353.

- Hellerstein M.K., Benowitz N.L., Neese R.A., Schwartz J.M., Hoh R., et al. Effects of cigarette smoking and its cessation on lipid metabolism and energy expenditure in heavy smokers. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 265–272.
- Henkin L., Zaccaro D., Haffner S. et al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke and insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Ann Epidemiol*, 1999; 9: 290–296.
- Hennig B., Toborek M., McClain C. J. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001; 20: 97–105.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.
- Hoy A., Trégouët D., Leininger-Muller B., Poirier O., Maurice M., Sass C., Siest G., Tiret L., Visvikis S. Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. *Eur J Hum Genet*, 2001; 9(10): 780–786.
- Huggett RJ, Scott EM, Gilbey SG, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation*, 2003; 108: 3097-3101.
- Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*, 1997; 96: 4219–4225.
- Ijzerman R.G., Serné E.H., van Weissenbruch M.M., de Jongh R.T., Stehouwer C.D.A. Cigarette smoking is associated with an acute impairment of microvascular function in humans. *Clin Sci (Lond)*, 2003; 104: 247–252
- Iwashima Y., Katsuya T., Ishikawa K., Kida I., Ohishi M., Horio T., Ouchi N., Ohashi K., Kihara S., Funahashi T., Rakugi H., Ogihara T. Association of hypoadiponectinemia with smoking habit in men. *Hypertension*, 2005; 45(6): 1094-100.
- Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, Raij L. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24(6): 1031-6.
- Jee SH, Lee SY, Nam CM, Kim SY, Kim MT. Effect of smoking on the paradox of high waist-to-hip ratio and low body mass index. *Obes Res* 2002;10:891–5.



- Jovinge S., Hamsten A., Tornvall P., et al. Evidence for a role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metab. Clin. Exp.* 1998; 47: 113–118.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006;116(7):1784–92.
- Kamp DW, Srinivasan M, Weitzman SA. Cigarette smoke and asbestos activate poly-ADP-ribose polymerase in alveolar epithelial cells. *J Investig Med*, 2001; 49: 68–76.
- Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, Narkiewicz K, Haynes WG, Pesek CA, Somers VK. The effects of short-term passive smoke exposure on endothelium-dependent and independent vasodilation. *J Hypertens*, 1999; 17:1395–1401.
- Kellogg DL Jr, Liu Y, Kosiba IF, and O'Donnell D. Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol*, 1999; 86: 1185–1190.
- Kessler P., Popp R., Busse R., Schini-Kerth V. B. Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation*. 1999; 99: 1878–1884.
- Kiowski W., Linder L., Stoschitzky K., Pfisterer M., Burckhardt D., Burkart F., Bühler F.R. Diminished vascular response to inhibition of endothelium-derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers. *Circulation*. 1994; 90: 27–34.
- Khazaei M., Moien-Afshari F., Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*, 2008; 15(1): 49–67.
- Kong C, Nimm L, Eatrozy T et al. Smoking is associated with increased hepatic lipase activity, insulin resistance, dyslipidaemia and early atherosclerosis in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2001; 156: 373–378
- Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342-374.
- Kool MJ, Hoeks AP, Struijker BH, Reneman RS, Van Bortel LM. Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 22(7): 1881–1886.
- Kumar A., Takada Y., Boriek A. M., Aggarwal B. B. Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 2004;82:434–448.

- Lakka HM, Lakka TA, Tuomilheto J, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with increase risk of acute coronary events in men. *Eur Heart J*, 2002; 23: 706–713.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*, 2012; 91(2): 142-149.
- Levitzky Y.S., Guo C-Y., Rong J., Larson M.G., Walter R.E., Keaney J.F. Jr., Sutherland P.A., Vasan A., Lipinska I., Evans J.C., Benjamin E.J. Relation of Smoking Status to a Panel of Inflammatory Markers: The Framingham Offspring. *Atherosclerosis*, 2008, 201(1): 217–224.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995; 270: 319–324.
- 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.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 2001; 50: 2094–2099.
- Magis D, Geronoz I, Scheen AJ. Smoking, insulin resistance and type 2 diabetes. *Rev Med Liege*, 2002; 57: 575–581.
- Matsubara M., Maruoka S., Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6): 2764–2769.
- Matsumoto A., Naito M., Itakura H., Ikemoto S., Asaoka H., et al. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(23): 9133–9137.
- Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, et al. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol*. 2001; 167: 6518–6524.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985; 28(7): 412-419.
- Miles P.D., Romeo O.M., Higo K., Cohen A., Rafaat K., Olefsky J.M. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes*, 1997; 46(11): 1678-83.

- Minson C.T., Holowatz L.A., Wong B.J., Kenney W.L., Wilkins B.W. Decreased nitric oxide- and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. *J Appl Physiol*, 2002; 93: 1644-1649.
- Miyazaki T., Shimada K., Mokuno H., Daida H. Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease. *Heart*, 2003; 89(6): 663.
- Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162(3 Pt 1): 1175–1177.
- Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res*, 2005; 96(2): 180–188.
- Morris SJ, Shore AC. Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *J Physiol*, 1996; 496(Pt 2):531-42.
- Morse D., Choi A.M. Heme oxygenase-1: the “emerging molecule” has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002; 27: 8–16.
- Munce T.A. and Kenney W.L. Age-specific modification of local cutaneous vasodilation by capsaicin-sensitive primary afferents. *J Appl Physiol*, 2003; 95:1016–1024.
- Nagel G., Arnold F.J., Wilhelm M., Link B., Zoellner I., Koenig W. Environmental tobacco smoke and cardiometabolic risk in young children: results from a survey in south-west Germany *Eur Heart J*, 2009; 30(15): 1885-1893.
- Nicholls S.J., Hazen S.L. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res*, 2009; 50 Suppl: S346-351.
- Nicotra A, Asahina M, Mathias CJ. Skin vasodilator response to local heating in human chronic spinal cord injury. *Eur J Neurol*, 2004; 11(12): 835-7.
- O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry*, 1997; 36: 15216 –15223.
- Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, *et al.* An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res*, 2000; 32: 47–50.
- Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial

- phenotype: Role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H130–H139.
- Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Nishida M., Matsuyama A., et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 2001; 103(8): 1057–1063.
- Ouyang Y , Virasch N, Hao P, et al. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 280–287.
- Ozaki K., Hori T., Ishibashi T., Nishio M., Aizawa Y. Effects of chronic cigarette smoking on endothelial function in young men. *J Cardiol*. 2010; 56(3): 307–13.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87:315–424.
- Pellaton C, Kubli S, Feihl F, Waeber B. Blunted vasodilatory responses in the cutaneous microcirculation of cigarette smokers. *Am Heart J*, 2002; 144(2): 269-274.
- Plat L, Leproult R, L’Hermite-Baleriaux M, Fery F, Mockel J, Polonsky KS, Van Caeter E. *Metabolic* effects of short-term elevations of plasma cortisol are more pronounced in the evening than in the morning. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 3082–3092
- Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol*. 2002; 21(2): 109–116.
- Powell JT. Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vasc Med*. 1998; 3: 21–28.
- Price TB, Krishnan-Sarin S, Rothman DL. Smoking impairs muscle recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E116–22.
- Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686:12–28.
- Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996;154(4 Pt 1): 1055–1060.
- Ramsay JE, Ferrell WR, Greer IA, Sattar N. Factors critical to iontophoretic assessment of vascular reactivity: implications for clinical studies of endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002; 39(1): 9-17.
- Raupach T., Schafer K., Konstantinides S., Andreas S. Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur Heart J*, 2006; 27: 386-392.

- Reaven G., Tsao P.S. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia. The key player between cigarette smoking and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41: 1044–1047.
- Reilly M., Delanty N., Lawson J.A., FitzGerald G.A. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, 1996; 94: 19–25.
- Reynolds RM, Walker BR. Human insulin resistance: the role of glucocorticoids. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5: 5–12.
- Rudolph TK, Wipper S, Reiter B, Rudolph V, Coym A, et al. Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. *Eur Heart J*, 2012; 33(13): 1625–1634.
- Russo G., Leopold J. A., Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vasc. Pharmacol.* 2002;38:259–269.
- Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 1085–1091.
- Sakai M, Sato Y, Sato S, Ihara S, Onizuka M, Sakakibara Y, Takahashi H. Effect of relocating to areas of reduced atmospheric particulate matter levels on the human circulating leukocyte count. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1774–1780.
- Samad F., Loskutoff D.J. The fat mouse: a powerful genetic model to study elevated plasminogen activator inhibitor 1 in obesity/ NIDDM. *Thromb Haemost*, 1997; 78(1): 652-5.
- Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem*, 2009; 55(8): 1462–1470.
- Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*, 2012; 287(9): 6375–6386.
- Sharp C, Warren A, Oshima T, Williams L, Li JH, Alexander JS. Poly ADP ribose-polymerase inhibitors prevent the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in response to Th1 cytokine stimulation. *Inflammation*, 2001; 25: 157–163.
- Shastry S, Joyner MJ. Geldanamycin attenuates NO-mediated dilation in human skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 282(1): H232-6.
- Shinozaki N., Yuasa T., Takata S. Cigarette Smoking Augments Sympathetic Nerve Activity in Patients With Coronary Heart Disease. *Int Heart J*, 2008; 49(3): 261-272.

- Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000; 106(2): 171–176
- Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C. Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: 119–126.
- Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, Camm EJ, Chen CY, Giacobino JP, *et al.* Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology*, 2008; 149: 6289–99.
- Sorescu D., Griendling K. K. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Failure*, 2002; 8: 132–140.
- Stanberry KB, Peppard HR, Babyak LM, Popp G, McNitt PM, Vinik AI. Primary nociceptive afferents mediate the blood flow dysfunction in non-glabrous (hairy) skin of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22 (9):1549-1554.
- Stefan N, Vojarova B, Funahashi T, *et al.* Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, 2002; 51(6): 1884–1888.
- Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 1997; 272(2): 971-6.
- Stolzenberg-Solomon R.Z., Weinstein S., Pollak M., Tao Y., Taylor P.R., Virtamo J., Albanes D. Prediagnostic Adiponectin Concentrations and Pancreatic Cancer Risk in Male Smokers *Am J Epidemiol.*, 2008; 168(9): 1047–1055.
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25: 2062–2068.
- Takefuji S., Yatsuya H., Tamakoshi K., Otsuka R., Wada K., *et al.* Smoking status and adiponectin in healthy Japanese men and women. *Preventive Medicine*, 2007; 45 (6): 471–475

- Tan K.C.B., Xu A., Chow W.S., Lam M.C.W. et al. Hypoadiponectinemia Is Associated with Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89(2): 765–769
- Tang W.H.W., Katz R., Brennan M.L., Aviles R.J., Tracy R.P., Psaty B.M., Hazen S.L. Usefulness of Myeloperoxidase Levels in Healthy Elderly Subjects to Predict Risk of Developing Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2009; 103(9): 1269–1274.
- Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries: role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 1991; 83: 2012–2020.
- Tanni SE, Pelegrino NR, Angeleli AY, Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm (Lond)*. 2010; 7: 29.
- Tanriverdi, H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Selecic D, Enli Y, et al. Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries. *Circ J*. 2006;70:593–599.
- Tardif J, Borgeat P, Laviolette M. Inhibition of human alveolar macrophage production of leukotriene B4 by acute in vitro and in vivo exposure to tobacco smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2:15 5–61.
- Thamer C, Stefan N, Stumvoll M, Haring H, Fritsche A Reduced adiponectin serum levels in smokers. *Atherosclerosis*, 2005; 179: 421–422.
- Toda N, Toda H. Nitric oxide-mediated blood flow regulation as affected by smoking and nicotine. *Eur J Pharmacol*, 2010; 649: 1–13
- Totti N, McCusker KT, Campbell EJ, et al. Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides. *Science*, 1984; 223: 169–71.
- Turner J, Belch JJF, Khan F. Current Concepts in Assessment of Microvascular Endothelial Function Using Laser Doppler Imaging and Iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*, 2008; 18(4): 109–116.
- Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: Involvement of protein kinase C-dependent NAD (P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol*, 2004; 165: 219–226.
- van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 2004; 59(8): 713-721.

- van der Veen B.S., de Winther M.P., Heeringa P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal*, 2009; 11(11): 2899–2937.
- van Eeden SF, Yeung A, Quinlam K, Hogg JC. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005; 2(1): 61-67.
- Vayssier M, Banzet N, François D, Bellmann K, Polla BS. Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. *Am J Physiol*, 1998; 275(4 Pt 1): L771-9.
- Vita J.A., Brennan M.L., Gokce N., Mann SA., Goormastic M., et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, 2004; 110(9): 1134-1139.
- Wang Y, Pereira EF, Maus AD, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 2001;60:1201–1209.
- Wang Z.V., Scherer P.E. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. *Hypertension*, 2008; 51(1): 8-14.
- Wareham NJ, Ness EM, Byrne CD, Cox BD, Day NE, Hales CN. Cigarette smoking is not associated with hyperinsulinemia: evidence against smoking and insulin resistance. *Metabolism*, 1996; 45: 1551–1556.
- Willerson J. T., Ridker P. M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*, 2004; 109: II2–II10.
- Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 298: 2654–2664.
- Xia Z., Liu M., Wu Y., et al. N-acetylcysteine attenuates TNF- $\alpha$ -induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression. *Eur J Pharmacol*, 2006; 550: 134–142.
- Xie XT., Liu Q., Wu J., Wakui M. Impact of cigarette smoking in type 2 diabetes development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009; 30: 784–787.
- Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 2688-2695.



- Yamaguchi Y., Nasu F., Harada A., Kunitomo M. Oxidants in the Gas Phase of Cigarette Smoke Pass Through the Lung Alveolar Wall and Raise Systemic Oxidative Stress. *J Pharmacol Sci*, 2007; 103: 275 – 282.
- Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Terauchi Y., Kubota N., Hara K. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*, 2001; 7: 941–946
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*, 2007; 131(5): 1557–1566.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages *in vitro* and in rat lungs *in vivo*: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol*. 2007; 292: L567–576.
- Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease : the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20(1): 271-279.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 2004; 23: 2369–2380.
- Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis*, 1997; 18(7): 1359-63.
- Yuan H., Shyy J.Y.-J., Martins-Green M. Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1. *J Hepatol*, 2009; 51(3): 535–547.
- Yufu K., Takahashi N., Okada N., Shinohara T., Hara M., Saikawa T., Yoshimatsu H. Influence of Systolic Blood Pressure and Cigarette Smoking on Endothelial Function in Young Healthy People. *Circulation Journal* , 2009; 73: 174–178.
- Zhang H., Park Y., Wu J., Chen X., Lee S., et al. Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. *Clinical Science*, 2009; 116: 219 – 230.
- Zhang J., Patel J. M., Li Y. D., Block E. R. Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, 1997; 96: 71–87.
- Zhang R., Brennan M.L., Shen Z., MacPherson J.C., Schmitt D., Molenda C.E, Hazen S.L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 46116–46122.

- Zhang W.Z., Venardos K., Chin-Dusting J., Kaye D.M. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: Role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*. 2006; 48: 278–285.
- Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004; 114: 529-541.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002; 109: 817–826.

# PIELIKUMS

## 1.Pielikums

### D A L Ī B N I E K A A N K E T A

Datums: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_

Dalībnieka ID Nr.: \_\_\_\_\_  
(piešķir pētījuma koordinators)

Vecums	
Svars (kg):	
Augums (m):	
Ķermeņa masas indekss	Aprēķina pēc formulas: $\text{KMI} = \text{svars (kg)} / \text{augums (m}^2\text{)}$
Vidukļa apkārtmērs (cm):	
Smēķēšanas ilgums (gadi)	
Cigarešu skaits dienā	
Smēķēšanas pakgadi	Aprēķina pēc formulas : $\text{Pakgadu skaits} = (\text{cigarešu skaits dienā} \times \text{smēķēšanas ilgums gados}) / 20$

#### Izslēgšanas kritēriji:

- ar vairogdziedzera slimībām;
- ar 1.un 2.tipa cukura diabētu;
- ar sirds-asinsvadu slimībām, t.sk. hipertenziju;
- akūtas un hroniskas iekaisuma slimības;
- ar vazoaktīvu, imūnsupresējošu un CNS ietekmējošu terapiju
- dermatoloģiskas iekaisuma reakcijas (psoriāze, dermatīts u.c)

## LĀZERDOPLEROGRĀFISKIE (LDI) TESTI

Dalībnieka ID Nr.: \_\_\_\_\_

Datums: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_

- Telpas +23°C savlaicīga nodrošināšana;
- Pacienta aklimatizācija guļus uz kušetes skanēšanai (ar adekvātu un stabilu) plaukstu pozīciju, izmantojot speciālus spilventiņus);
- LDI ieslēgšana;
- *Heater* +44°C režīma iestatīšana;
- Termozondes uzstādīšana uz plaukstu virsmas;
- Ūdens iepildīšana pirms tam nostabilizējot-līmeņojot termozondi (*instruēt pacientu par plaukstu pozīcijas saglabāšanu visu testu izpildes laikā*) — bez zondes optiskā pārsega;
- Skanēšanas režīma iestatīšana: **līdz 30 s** (ietverot tikai zondes kontūru) ar intervālu: **30 s** ar kopējo skanējumu skaitu: **56 skan.**

I. Bazālo LDI datu ieguve: 3 min (1. – 6. skan.)

II. Siltuma (+44°C) LDI datu ieguve 26 min (*Heater* +44°C „ON” — 7.-56. skan.)

III. Jontoforēzes LDI datu ieguve: 24 min ( „STARTS” — 1.-32 skan.)

- Acetilholīna šķīduma (1% dejonizētā ūdenī) iepildīšana pirms tam **nostabilizējot-līmeņojot** termozondi **uz otras rokas** (*instruēt pacientu par plaukstu pozīcijas saglabāšanu visu testu izpildes laikā*) — bez zondes optiskā pārsega;
- Jontoforēzes aparāta ieslēgšana un režīma iestatīšana jontoforēzes veikšanai;
- Skanēšanas un jontoforēzes režīma iestatīšana: **līdz 30 s** (ietverot tikai zondes kontūru) ar intervālu: **30 s** ar kopējo skanējumu skaitu: **32**

bazālo LDI datu ieguve 3 min: 0,0,0,0,0,0 μA;

Ach jontoforēze: 40, 0,0; 80,0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 100, 0,0; 10, 0 μA.

#### Protokols citokīnu un hemokīnu koncentrāciju noteikšanai seruma paraugos, izmantojot reaģentu kitu #MPXHCYTO-60K ”

##### Vispārēji norādījumi

- Vienā mikroplates bedrītē iespējams analizēt līdz 25µl parauga.
- Ja tiek izmantoti neatšķaidīti atšķaidīti seruma paraugi, tad standartlīknes atšķaidījumiem jāpievieno kitā šim mērķim paredzētais seruma matricas šķīdums.
- Lodītes ir nestabilas gaismā. Inkubācijas laikā plati obligāti jānosedz ar foliju.
- Pirms darba visiem reaģentiem jābūt uzsilušiem līdz istabas temperatūrai.
- Plates apakša nedrīkst saskarties ar absorbējošu materiālu; plate pipetēšanas laikā jānovieto uz atbilstoša paliktņa; pēc katras vakuumbēšanas šķidrums no plates apakšas jānoslauka ar papīra dvieli.
- Vakuums nedrīkst būt pārāk stiprs: ieteicams nepārsniegt 100 mmHg jeb 200µl bufera / 5 sekundēs.
- Pēc izšķīdināšanas visus standartus un kontroles jāpārvieta polipropilēna stobriņos (neatstāt stikla traukos).
- Sagatavotie standartu sērijveida atšķaidījumi jāizlieto 1 stundas laikā. Jebkurš atšķaidīts standartšķīdums jāizmet, izņemot pamata standartšķīdumu (10 ng/ml), kuru var uzglabāt ≤ -20°C 1 mēnesi vai ≤ -80°C ilgāk kā 1 mēnesi. Neizlietotās (atšķaidītās) lodītes var uzglabāt pie 2-8°C līdz 1 mēn.
- Mikroplati vēlams nolasīt tūlīt pēc imūnreakciju procedūras pabeigšanas. Ja tomēr tas nav iespējams, tad plati aizvāko, nosedz ar alumīnija foliju uz uzglabā 2-8°C līdz 24 h. Šajā gadījumā pirms nolasīšanas plati uzliek uz maisītāja istabas temperatūrā 10 min. Tomēr jāņem vērā, ka vēlāka plates nolasīšana var izraisīt pazeminātu jutīgumu dažiem citokīniem.
- Plašu maisītāja apgriezieniem jābūt maksimāli augstiem (500-800 RPM).

**Lodīšu sagatavošana.** Katru lodīšu pudelīti sonicē 30 sek. un pēc tam vorteksē 1 min. Atsevišķā maisīšanas traukā iepilina 0,15 ml katra lodīšu veida. Uzpilda līdz ar Lodīšu atšķaidīšanas šķīdumu (*Bead diluent*) līdz 3,0 ml. Kārtīgi savorteksē. Neizlietotās (atšķaidītās) lodītes var uzglabāt pie 2-8°C līdz 1 mēn.

### **Standartu maisījuma sagatavošana**

- 1) Standartu maisījumam (sausam) pievieno 250µl dejonizēta ūdens, iegūstot koncentrāciju 10 000 pg/ml. Samaisa, apvēršot pudelīti dažas reizes. Vorteksē 10 sek. Nogaida 5-10 minūtes un pārvieto atbilstoši iezīmētā stobriņā – šis tiks izmantots kā 10 000 pg/ml standarts. Neizlietoto tilpumu var uzglabāt pie -20°C vienu mēnesi.
- 2) Iezīmē 5 stobriņus: 2000, 400, 80, 16 un 3,2 pg/ml. Katrā stobriņā iepilina 200µl reakcijas bufera. Gatavo sērijveida atšķaidījumus:
  - pievieno 50µl 10,000pg/ml standarta 2000pg/ml stobriņā; vorteksē;
  - ar jaunu pipetes uzgali pievieno 50µl 2000pg/ml standarta 400pg/ml stobriņā; vorteksē;
  - ar jaunu pipetes uzgali pievieno 50µl 400pg/ml standarta 80pg/ml stobriņā; vorteksē;
  - ar jaunu pipetes uzgali pievieno 50µl 80pg/ml standarta 16pg/ml stobriņā; vorteksē;
  - ar jaunu pipetes uzgali pievieno 50µl 16pg/ml standarta 3,2pg/ml stobriņā; vorteksē;
  - 0 pg/ml standartam (fona signālam) tiek izmantots 200µl reakcijas buferis.

**Kontroles šķīdumu sagatavošana.** Kitā iekļautajām sausās formas kontrolēm “Human Cytokine Control I” un “Human Cytokine Control II” pievieno 250µl dejonizēta ūdens. Samaisa, apvēršot pudelīti dažas reizes. Vorteksē. Pagaida 5-10 minūtes. Pārvieto atbilstoši iezīmētā stobriņā. Neizlietoto kontroles šķīdumu drīkst uzglabāt pie -20°C vienu mēnesi.

**Mazgāšanas bufera sagatavošana.** 10X mazgāšanas buferim ļauj uzsilt līdz istabas temperatūrai un samaisa to, līdz visi sāļu kristāli ir izšķīduši. 30ml 10X bufera atšķaida, pievienojot 270ml dejonizēta ūdens. Atšķaidīto buferi var uzglabāt 2-8°C vienu mēnesi.

**Seruma matricas sagatavošana.** Pudelē, kura satur liofilizēto seruma matricu, pievieno 1,0ml dejonizēta ūdens. Kārtīgi samaisa. Pirms lietošanas pagaida vismaz 10min, lai matricss pilnīgi sajauktos ar ūdeni. Atšķaidīto matricu var glabāt pie -20°C vienu mēnesi.

### **Imūnreakcijas procedūra**

1. Uzskicē analītu izvietošanu plates bedrītēs, vertikāli: standarti (0, 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 pg/ml), kontroles I un II, un paraugi. Ieteicams katru analītu pārbaudīt divreiz (t.i., likt 2 bedrītēs pēc kārtas).
2. Bloķē plati, iepilnot katrā bedrītē 200 µl reakcijas bufera. Aizvāko un inkubē uz plašu maisītāja 10 min istabas temperatūrā.
3. Aizvāc buferi ar vakuumu. Nosusina plates apakšu ar papīra dvieli.

4. Iepilina 25µl reakcijas bufera 0 pg/ml standarta bedrītēs.
5. Iepilina 25µl reakcijas bufera paraugu bedrītēs.
6. Iepilina 25µl katra standarta un kontroles šķīduma atbilstošajās bedrītēs.
7. Iepilina 25µl seruma matricsa visu standartu un kontroles šķīdumu bedrītēs.
8. Iepilina 25µl paraugu tiem atbilstošajās bedrītēs.
9. Lodītes savorteksē un iepilina pa 25µl katrā bedrītē (ilgākas pilināšanas starplaikos var būt nepieciešams lodītes vorteksēt, lai tās nenogulsnētos).
10. Plati aizvāko, pārklāj ar alumīnija foliju un inkubē pie 500-800 RPM, istabas temperatūrā, vienu stundu (seruma un plazmas paraugus var inkubēt pa nakti (12h), +4°C, uz plašu šūpotāja – tā iegūstot augstāku jūtību).
11. Aizvāc šķidrumu ar vakuumu.
12. Plati divas reizes mazgā, iepilino katrā bedrītē 200µl mazgāšanas bufera un aizvācot to ar vakuumsūkni (pēc katras vakuumēšanas jānosusina plates apakša ar papīra dvieli).
13. Katrā bedrītē iepilina 25µl antivielu maisījuma, kas pirms tam uzsildīts līdz istabas temperatūrai.
14. Plati aizvāko, pārklāj ar alumīnija foliju un inkubē pie 500-800 RPM, istabas temperatūrā 30 min (vai 1h, ja inkubācija ar lodītēm ilga 12h). PĒC INKUBĀCIJAS ŠĶIDRUMU ATSTĀJ.
15. Iepilina 25µl Streptavidīna-PE katrā bedrītē.
16. Plati aizvāko, pārklāj ar alumīnija foliju un inkubē pie 500-800 RPM istabas temperatūrā 30 min.
17. Aizvāc šķidrumu ar vakuumu.
18. Plati divas reizes mazgā (200µl mazgāšanas bufera / bedrītē).
19. Iepilina 25µl Luminex 200 sistēmas šķidrumu (*sheath fluid*) katrā bedrītē. Pārklāj ar alumīnija foliju un resuspendē lodītes, inkubējot 5 min pie 500-800 RPM.
20. Nolasa plati ar Luminex 200 instrumentu.
21. Saglabā un aprēķina citokīnu koncentrācijas paraugos, izmantojot programmatūrā iekļauto 5-parametru loģistisko metodi.

## PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTUS ATSPUGUĻOJŠĀS PUBLIKĀCIJAS

1. P.Tretjakovs, A.Jurka, **I.Mikelsone**, K.Elksne, G.Krieviņa, D.Reihmane, J.Verbovenko, G.Bahs. Circulating adhesion molecules, matrix metalloproteinase-9, plasminogen activator inhibitor-1, and myeloperoxidase in coronary artery disease patients with stable and unstable angina. *Clinica Chimica Acta*, 2012; 413(1-2): 25–29.
2. **I.Mikelsone**, I.Bormane, Z.Simsone, A.Jurka, P.Tretjakovs. The acute effects of cigarette smoking on microvascular responsiveness and haemodynamic measurements in healthy male smokers. *Rīgas Stradiņa universitātes Zinātniskie raksti*, 2012,
3. **I.Mikelsone**, I.Bormane, Z.Simsone, A.Jurka, P.Tretjakovs. The effect of chronic cigarette smoking on microvascular function, insulin resistance and inflammatory state. *Environmental and Experimental Biology*, 2011, 9: 23–28
4. Tretjakovs P., Jurka A., Bormane I., Mackevics V., **Mikelsone I.**, Balode L., Reihmane D., Stukena I., Bahs G., Aivars J.I., Pirags V. Relation of inflammatory chemokines to insulin resistance and hypoadiponectinemia in coronary artery disease patients. *European Journal of Internal Medicine*, 2009, 20(7): 712–717.
5. Tretjakovs P., Jurka A., Bormane I., **Mikelsone I.**, Reihmane D., Balode L., Jaunalksne I., Mackēvičs V., Stukēna I., Bahs G., Lejnīeks A., Aivars J.I., Pīrāgs V. Relation of Endothelial dysfunction and adipokines levels to insulin resistance in metabolic syndrome patients. *Proceeding of the Latvian Academy of Sciences*, 2009; 63(4-5): 222–227.



## PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTU PREZENTĀCIJAS KONFERENCĒS

1. **I.Mikelsone**, I.Bormane, Z.Simsone, P.Tretjakovs. Alterations in cutaneous vasomotor responses and inflammatory state affected by chronic cigarette smoking and aging: **Poster presentation 4.222** / The 79th European Atherosclerosis Society (EAS) Annual Congress, Gothenburg, Sweden, June 26-29, 2011.
2. **I.Mikelsone**, I.Bormane, Z.Simsone, P.Tretjakovs. The acute effects of cigarette smoking on microvascular reactivity and haemodynamic measurements in healthy young and adult men: **Poster presentation P13 [4070]** / The Annual Meeting of the Scandinavian Physiological Society, Bergen, Norway, August 12-14, 2011. *Acta Physiologica*, 2011, 202 (685): P13 [4070].
3. P.Tretjakovs, A.Jurka, I.Bormane, **I.Mikelsone**, K.Elksne, G.Krievina, D.Reihmane, J.Verbovenko, G.Bahs. Alteration of skin endothelium-dependent vasodilatation and relationship between insulin resistance and myeloperoxidase levels in metabolic syndrome patients. 5th International Conference of Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Andros, Greece, September 1-4, 2011.
4. P.Tretjakovs, A.Jurka, I.Bormane, **I.Mikelsone**, K.Elksne, G.Krievina, K.Cirule, J.Verbovenko, G.Bahs. Relationship of circulating matrix metalloproteinase-9, plasminogen activator inhibitor-1, and myeloperoxidase with insulin resistance in coronary artery disease patients: **Poster presentation PC9**/ The Physiological Society Meeting *Physiology 2010*, University of Manchester, UK, June 30 – July 2, 2010.
5. **I.Mikelsone**, I.Bormane, A.Jurka, P.Tretjakovs. Evaluation of sE-selectin, insulin resistance and obesity influence to endothelium dependent vasodilatation in 2TDM patients: **Poster presentation No.7.**/ New insights into cell & tissue interactions in cardiovascular development and disease / Madrid, Spain, September 23 - 24, 2010, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Abstract Booklet, 2010.

6. **I.Miķelsone**, A.Jurka, I.Bormane, P.Tretjakovs. Adipokīnu, iekaisuma citokīnu un endoteliālās funkcijas pārmaiņu saistība ar insulīna rezistenci metabolā sindroma pacientiem: *referāts*. / LU 68.konference, Bioloģijas sekcija, 2010.
7. **Miķelsone I.**, Jurka A., Bormane I, Reihmane D., Balode L., Aivars J.I., Tretjakovs P. Alterations of adipokines and cutaneous vasomotor responses in metabolic syndrome patients with insulin resistance: *Poster presentation P22* / The Annual Meeting of the Scandinavian Physiological Society. Uppsala, Sweden, August 14-16, 2009. *Acta Physiologica*, 2009, V 196 (Suppl. 671: 111(P22).
8. **Miķelsone I.** Eksogēno faktoru ietekme uz endotēlija funkcijām: *referāts*. LU 67.konference, Bioloģijas sekcija, 2009.