

LATVIJAS UNIVERSITĀTES  
RAKSTI

812. SĒJUMS

Medicīna

SCIENTIFIC PAPERS  
UNIVERSITY OF LATVIA

VOLUME 812

Medicine

SCIENTIFIC PAPERS  
UNIVERSITY OF LATVIA

VOLUME 812

Medicine

UNIVERSITY OF LATVIA

LATVIJAS UNIVERSITĀTES  
RAKSTI

812. SĒJUMS

Medicīna

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

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

**Redkolēģija**

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

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

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

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

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

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

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

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

*Dr. med. doc. Sergejs Isajevs*

*Dr. med. asoc. prof. Arnolds Jezupovs*

Latviešu valodas literārā redaktore **Ruta Puriņa**

Angļu valodas literārā redaktore **Andra Damberga**

Maketu veidojusi **Ieva Tiltiņa**

Visi krājumā ievietotie raksti ir recenzēti.

Pārpublicēšanas gadījumā nepieciešama Latvijas Universitātes atļauja.

Citējot atsauce uz izdevumu obligāta.

© Latvijas Universitāte, 2016

ISSN 1407-2157

ISBN 978-9934-18-159-7

## Saturs/Contents

### **Tatjana Tračevska, Iveta Līduma, Aija Žileviča**

|  |   |
|--|---|
| Genotipēšana atklāj <i>Staphylococcus epidermidis</i> mainību un spēju ātri iegūt rezistenci<br><i>Genotyping reveals Staphylococcus epidermidis variability and its ability to acquire resistance rapidly</i> ..... | 7 |
|--|---|

### **Zenta Lakovica, Sergejs Isajevs, Ieva Henkuzena**

|   |    |
|---|----|
| Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīnas diagnosticēšanas nozīme un skrīninga metodes<br><i>Oral cancer: Importance of early diagnosis and screening methods</i> ..... | 21 |
|---|----|

### **Jelizaveta Žavoronkova, Valentīna Gordjušina, Inga Januškeviča, Baiba Rozentāle**

|  |    |
|--|----|
| Kapoši sarkoma klīniskajā praksē Latvijā<br><i>Kaposi sarcoma in clinical practice in Latvia</i> ..... | 38 |
|--|----|

### **Agate Galuza, Jurijs Markovs, Eduards Jurševičs, Džanna Krūmiņa, Gundega Knipše**

|   |    |
|---|----|
| Dermālo filleru <i>Restylane</i> , <i>Radiesse</i> un autologo taukaudu izraisīto lūpu audu reakciju strukturālās īpatnības<br><i>Structural peculiarities of lip tissue reactions caused by dermal fillers Restylane, Radiesse and autologous fat tissue</i> ..... | 54 |
|---|----|

### **Inese Kolontaja-Zaube, Ināra Ančupāne, Aija Žileviča**

|   |    |
|---|----|
| Ādas ļaundabīgo audzēju profilaktisko pasākumu efektivitāte ambulatorajā praksē<br><i>Effectiveness of skin tumour prophylaxis in ambulatory practice</i> ..... | 70 |
|---|----|

### **Inese Kolontaja-Zaube, Ināra Ančupāne, Aija Žileviča**

|   |    |
|---|----|
| Nagu bojājumu klīnisko parametru izpēte vieglas, vidēji smagas un smagas psoriāzes slimniekiem ambulatorajā praksē<br><i>The clinical investigation of psoriatic onychia in outpatients with mild, moderate and severe skin psoriasis</i> ..... | 78 |
|---|----|

|   |     |
|---|-----|
| <p><b><i>Ineta Popēna, Kaspars Jēkabsons, Artūrs Ābols, Līga Saulīte,<br/>Una Čonka, Inga Kozlovska, Elīna Zandberga, Juris Stefanovičs,<br/>Velta Ose-Klinklāva, Ruta Muceniece, Aija Linē, Una Riekstiņa</i></b></p> <p>Vēža šūnu līniju producēto eksosomu uzņemšana un funkcionālie efekti<br/>mezenhimālajās cilmes šūnās<br/><i>Uptake and functional effects of cancer cell line-produced exosomes<br/>in mesenchymal stem cells</i> .....</p>                       | 85  |
| <p><b><i>Aina Kratovska, Jekaterina Safronova, Vita Romanova,<br/>Andrejs Bernšteins, Patrīcija Ivanova, Sanita Ponomarjova</i></b></p> <p>Variability of peripheral arterial disease clinical signs in patients<br/>before indicated endovascular revascularization of popliteocrural segment<br/><i>Perifēro artēriju slimības klīnisko izpausmju variabilitāte pacientiem<br/>pirms indicētas popliteokrurālā segmenta endovaskulāras revaskularizācijas</i> .....</p>   | 100 |
| <p><b><i>Madara Tirzīte, Gunta Strazda, Normunds Jurka,<br/>Immanuels Taivans, Māris Bukovskis</i></b></p> <p>Atbalsta vektora analīzes lietojums slimību diagnostikai<br/>ar elektronisko ožas sensoru<br/><i>Application of support vector analysis in diagnostics<br/>with electronic olfactory sensor</i> .....</p>   | 104 |
| <p><b><i>Imanta Ozola-Zālīte, Jeļena Ivanova, Agnese Ūdre,<br/>Anda Vīksna, Aldis Puķītis</i></b></p> <p>Sarkopēnija un miosteatoze datortomogrāfijas izmeklējuma papildu mērījumos<br/>hroniska pankreatīta slimniekiem un to ietekme uz slimības gaitu<br/><i>Prevalence of sarcopenia and miosteatosis according to additional<br/>measurements of computer tomography imaging in chronic pancreatitis<br/>patients and influence on the course of disease</i> .....</p> | 110 |

# Genotipēšana atklāj *Staphylococcus epidermidis* mainību un spēju ātri iegūt rezistenci

## *Genotyping reveals Staphylococcus epidermidis variability and its ability to acquire resistance rapidly*

Tatjana Tračevska, Iveta Līduma, Aija Žileviča

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
 Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: [tatjana.tracevska@lu.lv](mailto:tatjana.tracevska@lu.lv)

Multilokusu sekvenču tipēšana (MLST) ir genotipēšanas metode, kas ļauj noteikt epidemioloģisku saikni starp baktēriju celmiem un izpētīt to mikroevolūciju. Mūsu pētījumā genotipēšana tika veikta galvenokārt kontaminantiem un kolonizējošiem *Staphylococcus epidermidis* celmiem, lai noteiktu genotipu un tā izmaiņas atkarībā no lokalizācijas un cilvēka atrašanās ilguma stacionārā. Sekvenču tipi (ST) ir noteikti, veicot 7 standartģēnu – *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpi*, *yqiL* – sekvenēšanu. Rezultāti ir analizēti ar *BioEdit* un *Vector NTI* datorprogrammu un ar *eBURST* algoritmu. Kopumā tika analizētas 12 *S. epidermidis* tīrkultūras un to 168 DNS sekvences; tika atrasti 9 dažādi ST. Veselam cilvēkam dažādos ķermeņa rajonos konstatēti četri ST. Uz hospitalizēta pacienta ķermeņa virsmas atklāja 3 dažārus ST, kas mainījās 6 dienu stacionēšanas laikā, turklāt viens paraugs (ST130) ieguva meticilīnrezistenci. Neviens no atrastajiem ST nepiederēja pie ST2 vai ST5 grupas, ko parasti veido nozokomiālie *S. epidermidis* celmi. Pētījumu rezultāti ļauj secināt, ka *S. epidermidis* genotipiskā dažādība uz cilvēka ādas ir ļoti liela. Turklāt *S. epidermidis* spēj iegūt meticilīnrezistenci īsā laika posmā, cilvēkam atrodoties hospitālajā vidē. Pirmo reizi ir lietota *S. epidermidis* genotipēšana Latvijā, un tās rezultāti norāda uz nepieciešamību veikt tālākus epidemioloģiskus pētījumus slimnīcās un sabiedrībā.

**Atslēgvārdi:** *S. epidermidis*, komensāls mikroorganisms, multilokusu sekvenču tipēšana.

## Ievads

*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ir komensāls mikroorganisms, kas pieder pie cilvēka normālās mikrofloras. Zināmos apstākļos *S. epidermidis sensu stricto*, kā arī citi koagulāzes negatīvie stafilokoki (KoNS) spēj izraisīt oportūnistiskas infekcijas, piemēram, pēcoperācijas brūču infekciju, katetru un protēžu infekciju, bakterēmiju u. c. [1]. KoNS kopā ar *Staphylococcus aureus* ir biežāk izolētie nozokomiālo infekciju izraisītāji klīnikā. Tas ir skaidrojams ar to, ka *S. epidermidis* kolonizē ādu un spēj veidot biofilmas uz polimēru virsmām, tāpēc katetru ievadīšanas laikā viegli var notikt katetru kontaminācija [2, 3]. KoNS bieži izolē kā viltus pozitīvu kultūru jeb kontaminantu, ja ir konstatētas asinsrites infekcijas, un to klīnisko nozīmi tādā gadījumā ir grūti interpretēt [4–6]. Stafilokoki cirkulē ne tikai slimnīcās, bet nereti sastopami arī sabiedrībā un ātri iegūst bēta laktāmu rezistenci, kalpojot par ģēnu rezervuāru meticilīna rezistentā *S. aureus* infekcijām [7]. Līdz ar to ir aktuāla

*S. epidermidis* izpēte molekulārajā līmenī. Multilokusu sekvenču tipēšanas (*multilocus sequence typing*, MLST) pamatā ir DNS sekvenēšana, kas nosaka 7 gēnu alēļu dažādību. Šie t. s. *housekeeping* gēni nosaka svarīgu proteīnu sintēzi, kas nav saistīti ar baktēriju virulenci vai rezistenci pret antibakteriālajiem līdzekļiem [8]. Ar MLST var noteikt izolēto mikroorganismu celmu epidemioloģisku saistību, atšķirt invazīvus izolātus no komensāliem un raksturot tos pēc noteiktā sekvenču tipa (ST) [9].

Šī pētījuma mērķis bija raksturot *S. epidermidis* celmus, lietojot MLST metodi. MLST metode *S. epidermidis* genotipēšanai Latvijā tika izmantota pirmo reizi. Tika analizēti *S. epidermidis* izolāti trīs dažādos gadījumos – kad tie ir parasti ādas komensāli, kad tie ir kolonizējuši ādu vai brūci vai kad var tikt vērtēti kā potenciāli invazīvie.

Stacionētai personai, kur ādas kolonizējošais *S. epidermidis* neradīja klīniskās izpausmes, tika novērotas genotipa un antibiogrammas izmaiņas sešu stacionēšanas dienu laikā.

## Materiāli un metodes

Koagulāzes negatīvo stafilokoku celmi iegūti sadarbībā ar Paula Stradiņa KUS Mikrobioloģijas laboratoriju un Intensīvās terapijas nodaļu (ITN), ka arī ar Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcas Bakterioloģisko laboratoriju. Paraugu DNS izdalīšana, PCR, sekvenču nolasīšana un genotipēšana tika veikta LU Bioloģijas fakultātes Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijā sadarbībā ar Biomedicīnas pētījumu un studiju centru. Pētījuma izpildes laikā tika saņemta LU Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūta Zinātniskās izpētes ētikas komisijas atļauja paraugu ievākšanai no veselīem cilvēkiem un no slimnīcas pacientiem.

Pētījumā tika analizēti *S. epidermidis* izolāti trīs dažādos gadījumos: tie bija no viena praktiski vesela cilvēka un no diviem hospitalizētiem pacientiem. Pirmajā gadījumā uzsējumi (stafilokoki – ādas kontaminanti) tika ņemti no ādas veselai 20 gadus vecai sievietei: no labās un kreisās nāss, kā arī no cirkšņa un spranda apvidus. Otrajā gadījumā no pacienta ar laboratoriski apstiprinātu bakterēmiju (ar divām pozitīvām hemokultūrām) tika analizēti divi *S. epidermidis* izolāti: no hemokultūras (invazīvie stafilokoki) un no perifēro vēnu katetra uzsējuma (kolonizējošie stafilokoki). Trešajā gadījumā no pacienta, kurš atradās ITN, tika ņemti uzsējumi no kreisās rokas ādas un jugulārās vēnas katetra insercijas vietas: pirmajā, trešajā un sestajā ITN ārstēšanas dienā (ādas kontaminanti vai kolonizējošie stafilokoki, kas atrodas zem hospitālās vides spiediena; lokalizējas tuvu katetra insercijas vietai; ar lielāku risku kļūt par invazīviem). Kopumā tika analizētas 12 *S. epidermidis* tīrkultūras, kam izdalīta DNS, un katram paraugam tika veiktas 7 PCR un 14 sekvenēšanas reakcijas, iegūstot 168 gēnu DNS fragmentu sekvences.

Kā kontrole tika izmantota *S. Epidermidis* biofilmu veidojoša standartcelma ATCC 35984 DNS.

## Identifikācija un pretmikrobu līdzekļu jutības noteikšana

Stafilokoku identificēšanai tika lietota *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma (*Beckton, Dickinson and Company*, ASV). Reakciju interpretācijai izmantoja krāsu karti, lai varētu izveidot profila skaitli. Iegūto profila skaitli un šūnu morfoloģijas datus ievadīja datorā, kurā instalēta *BBL Crystal ID* sistēmas elektroniskā datubāze.



Dati par *S. epidermidis* tīrkultūru jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem tika iegūti, izmantojot *Bauer-Kirby* standartmetodi un CLSI M100-S24 2014 interpretācijas kritērijus. Metodes pamatā ir pretmikrobu aģenta, ar kuru piesātināts papīra disks, difūzija agara gelā.

## DNS izdalīšana

No iegūtajām stafilokoku tīrkultūrām tika izolēta natīvā genomiskā DNS ar standartprocedūru, izmantojot lizoziemu, proteināzi K un N-cetil-N,N,N,-trimetil amonija bromīdu, un izgulsnēta ar izopropanolu [10].

## Multilokusu sekvenču tipēšana

PCR reakcija tika veikta ar PCR standartmaisījumu *Mastermix* (*Thermo Fisher Scientific*, Lietuva) un 7 standartgēnu lokusu praimeru pāri (katrs pāris atsevišķā reakcijā), ka arī ar pozitīvu kontroli (*S. epidermidis* DNS) un negatīvu kontroli (dH<sub>2</sub>O) (1. tabula) [11]. PCR apstākļi: 3 min 95 °C temperatūrā, kam sekoja 34 cikli ar 30 s 95 °C, 1 min 50 °C, 1 min 72 °C un beigu elongācija 7 min 72 °C temperatūrā; aparatūra – amplifikators (*Applied Biosystems*, USA). PCR produkti analizēti elektroforētiski 2% agarozes gelā ar pozitīvu kontroli un negatīvu kontroli, DNS garuma marķieri (*Thermo Fisher Scientific*, Lietuva) un vizualizēti ar etīdija bromīdu.

### 1. tabula. MLST tipēšanā izmantotie 7 standartgēni un to kodētie enzīmi

Table 1. Seven housekeeping gene loci and their encoded enzymes used for MLST

| Gēni (lokusi) un to funkcija                                      | PCR produkta izmērs, ko lieto alēju piešķiršanai, bāzu pāros (bp)* |
|---|--|
| Karbamāta kināze ( <i>arcC</i> )                                  | 465 bp   |
| Šikimāta dehidrogenāze ( <i>aroE</i> )                            | 420 bp   |
| ABC transportieris ( <i>gtr</i> )                                 | 438 bp   |
| DNS sintēzes kļūdas labojošais proteīns ( <i>mutS</i> )           | 412 bp   |
| Pirimidīna sintēzes operona regulējošais proteīns ( <i>pyrR</i> ) | 428 bp   |
| Triosefosfāta izomerāze ( <i>tpiA</i> )                           | 424 bp   |
| Acetil KoA acetiltransferāze ( <i>yqiL</i> )                      | 416 bp   |

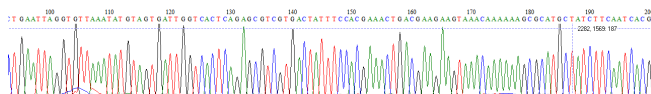
\* atbilstošie 7 gēnu fragmentu praimeru ir atrodamā tiešsaistē <http://sepidermidis.mlst.net>

Attīrīšana pēc PCR veikta, katram paraugam pievienojot 2 μl SAP un 0,5 μl ExoI (*Thermo Fisher Scientific*, Lietuva). Pēc inkubācijas 40 min 37 °C un 20 min 95 °C temperatūrā 2 μl lieto sekvenēšanas reakcijai ar *Big Dye Terminator* kitu (*Applied Biosystems*, USA). Sekvenēšanas reakcijas apstākļi: 40 cikli pa 10 s 96 °C, 5 s 50 °C, 4 min 60 °C temperatūrā; aparatūra – *Applied Biosystems* amplifikators (USA).

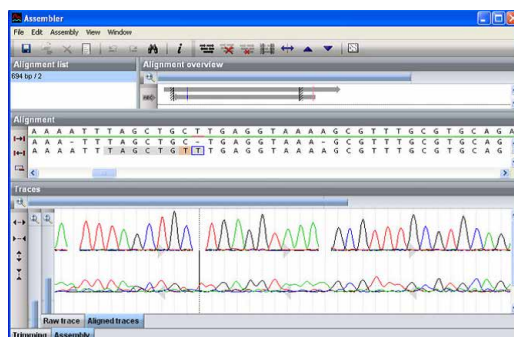
DNS sekvences tika apstrādātas (nogrieztas pēc atbilstoša lokusa) un ievadītas *BioEdit* datorprogrammā. Tālāk notika salīdzināšana ar datubāzes standartu – garuma analoģu fragmentu. Pēc tam sekvences iekopēja *Vector NTI advance 11.5.1* datorprogrammā. Programmā sekvences tika savstarpēji salīdzinātas un tām tika noteiktas mutācijas vai rekombinācijas. Sekvences ievadīja MLST datubāzē (tiešsaistē

<http://sepidermidis.mlst.net>) un ieguva ST numuru, ka arī datus par *S. epidermidis* celmu epidemioloģisko saistību ar citiem celmiem pasaulē ar eBURST algoritmu (tiešsaiste <http://eburst.mlst.net/>), raksturojot tos pēc noteiktā ST. 1. attēlā ir parādīta iegūto datu analīzes secība ar *BioEdit* un *Vector NTI* datorprogrammu, kā arī eBURST algoritmu.

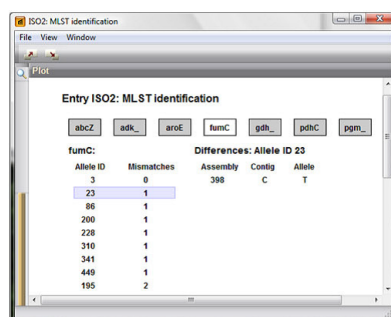
1.1. Sekvenču dati tiek ievadīti *BioEdit* datorprogrammā



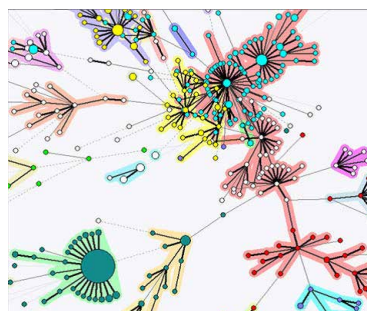
1.2. Alēles tiek salīdzinātas ar *Vector NTI* datorprogrammu



1.3. Sekvenču tipu noteikšana, ievadot datus MLST datubāzē



1.4. Pēc eBURST algoritma tiek uzbūvēta diagramma (piemērs)



1. attēls. Genotipēšanas datu apstrāde ar *BioEdit* un *Vector NTI* datorprogrammu un eBURST algoritmu

Figure 1. MLST data processing with *BioEdit* and *Vector NTI* software

Dažādas DNS sekvences katrā lokusā tiek apzīmētas ar dažādiem alēļu skaitļiem. Katru celmu nosaka pēc alēlēm jeb to septiņiem lokusiem (t. s. alēliskais profils). Katram unikālajam alēliskajam profilam (vai genotipam) tiek piešķirts sekvenču tips (ST) [8]. Visi Latvijā iegūtie ST un arī jaunās sekvenču kombinācijas tika iesūfītas datubāzes moderatoram; tos ievadīja datubāzē, un jaunajiem celmiem tika piešķirts ST numurs.

## Rezultāti

Pētījumā tika analizēti 12 *S. epidermidis* izolāti (apzīmēti kā LAT1–LAT12) no viena praktiski vesela cilvēka un no diviem hospitalizētiem pacientiem. Šie izolāti bija izvēlēti, lai raksturotu genotipisko dažādību trīs dažādos scenārijos: pirmajā – kad komensālie *S. epidermidis* mikroorganismi tika vērtēti kā kontaminanti (LAT1–LAT4), otrajā – kā kolonizējošie un invazīvie (radot bakterēmiju) (LAT5–LAT6) un trešajā gadījumā – kā kontaminanti vai kolonizējošie uz hospitalizēta cilvēka ādas, kas konkrētajā brīdī klīnisko izpausmi nerada, bet kam ir lielāks risks izraisīt infekciju (LAT7–LAT12). Pēdējā grupā bija arī paredzēts novērot, kā mainās jutība pret antibakteriālajiem preparātiem un, iespējams, arī celmu genotips hospitalizācijas apstākļos (1., 3. un 6. dienā).

MLST analīzes gaitā 12 paraugi veidoja 9 dažādus ST variantus. Visi pētījumā iegūtie ST varianti un tiem atbilstošie paraugi ir apkopoti 2. tabulā.

2. tabula. Visi 12 ar MLST analizētie *S. epidermidis* celmu DNS izolāti, katra gēna variants un piešķirtais ST variants

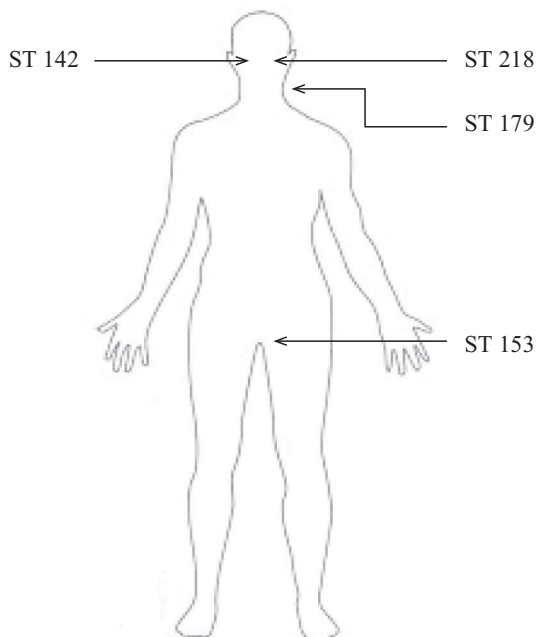
Table 2. Summary of 12 DNA isolates of *S. epidermidis*, the gene variant and the corresponding ST variant

| Celms | Sekvenču tips, ST | <i>arc</i> | <i>aroE</i> | <i>Gtr</i> | <i>mutS</i> | <i>pyrR</i> | <i>tpiA</i> | <i>yqiL</i> |
|-------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LAT1  | ST 142            | 2          | 1           | 2          | 2           | 2           | 1           | 1           |
| LAT2  | ST 218            | 1          | 1           | 2          | 6           | 2           | 16          | 1           |
| LAT3  | ST 179            | 1          | 2           | 2          | 2           | 1           | 1           | 1           |
| LAT4  | ST 153            | 2          | 1           | 6          | 2           | 2           | 1           | 1           |
| LAT5  | ST 130            | 1          | 1           | 1          | 2           | 1           | 1           | 1           |
| LAT6  | ST 483*           | 2          | 1           | 1          | 6           | 1           | 2           | 1           |
| LAT7  | ST 130            | 1          | 1           | 1          | 2           | 1           | 1           | 1           |
| LAT8  | ST 130            | 1          | 1           | 1          | 2           | 1           | 1           | 1           |
| LAT9  | ST 110            | 1          | 6           | 1          | 6           | 2           | 1           | 1           |
| LAT10 | ST 110            | 1          | 6           | 1          | 6           | 2           | 1           | 1           |
| LAT11 | ST 19             | 8          | 7           | 12         | 4           | 12          | 2           | 2           |
| LAT12 | ST 19             | 8          | 7           | 12         | 4           | 12          | 2           | 2           |

ST\* – jauns sekvenču tips.

## Pirmā gadījuma analīze

Analizējot MLST datus, tika noskaidrots, ka četri celmi, iegūti no vesela cilvēka dažādām ķermeņa daļām (LAT1–LAT4), bija ar atšķirīgu genotipu: atbilstoši ST 142, ST 218, ST 179 un ST 153 (2. attēls). Šis atklājums parāda, ka viena cilvēka ādu var kolonizēt dažādu genotipu stafilokoki, un apstiprina to ģenētisko polimorfismu.



2. attēls. Uzņēmumu paņemšanas vietas veseram cilvēkam un atbilstošais *S. epidermidis* sekvenču tips. ST 142 un ST 218 izolēti atbilstoši no labās un kreisās nāss, ST 179 – no spranda un ST 153 no cirkšņa apvidus

Figure 2. Places of sampling from a healthy person and corresponding MLST sequence type. ST 142 and ST 218 were isolated from right and left nares accordingly, ST 179 – from the skin at the nape of the neck and ST 153 from perineum region

Ādas paraugu dati par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem (antibiogrammas) ir apkopoti 3. tabulā. Trīs no paraugiem bija jutīgi pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, tomēr viens celms, kurš tika iegūts no nāss ar ST 218, bija rezistents pret meticilīnu, t. s. meticilīna rezistentais *S. epidermidis* (MRSE). Šis ST bija rezistents arī pret eritromicīnu un klindamicīnu, bet jutīgs tikai pret vankomicīnu un ciprofloksacīnu.

Eiropā izplatītie *S. epidermidis* celmi ar ST 142 un ST 153 uzrādīja jutību pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem.

## 3. tabula. Sekvenču tips un atbilstoša antibiogramma celmiem no vesela cilvēka

Table 3. The sequence type and the corresponding antibiogram (antibacterial susceptibility) of isolate from a healthy person

| Sekvences tips, ST    | <i>Am</i> | <i>Er</i> | <i>CC</i> | <i>Cip</i> | <i>Fox</i> | <i>Va</i> |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|
| Labā nāss<br>ST 142   | S         | S         | S         | S          | S          | S         |
| Kreisā nāss<br>ST 218 | R         | R         | R         | S          | R          | S         |
| Cirksnis<br>ST 179    | S         | S         | S         | S          | S          | S         |
| Sprands<br>ST 153     | S         | S         | S         | S          | S          | S         |

Antibakteriālo līdzekļu nosaukumu saīsinājumi: *Am* – ampicilīns; *Er* – eritromicīns; *CC* – klindamicīns; *Cip* – ciprofloksacīns; *Fox* – cefoksitīns; *Va* – vankomicīns. Interpretācija: S – jutīgs, R – rezistents.

### Otrā gadījuma analīze

No pacienta ar laboratoriski apstiprinātu bakterēmiju tika analizēti divi klīniski svarīgi paraugi: LAT5 izdalīts no centrālās vēnas katetra gala uzņēmuma (iespējama infekcijas avots) un LAT6 celms izdalīts no hemokultūras (invazīvs).

*S. epidermidis* celms LAT5 no centrālās vēnas katetra uzņēmuma tika noteikts kā ST 130. Otrais *S. epidermidis* celms LAT6 no hemokultūras tika noteikts kā MRSE celms ar pasaulē jaunu sekvenču tipu ST 483 (1. tabula). Tātad hemokultūras parauga un centrālās vēnas parauga genotipi atšķīrās, līdz ar to MLST metode pierādīja, ka katetra lietošana nebija bakterēmijas cēlonis.

Bakterioloģiskā analīze parādīja, ka abi *S. epidermidis* paraugi (gan ST 130, gan ST 483) tīrkultūrā bija noteikti kā MRSE, tomēr abi bija jutīgi pret vankomicīnu, kas šobrīd tiek lietots terapijai pie meticilīnrezistences. Paraugi no katetra (ST 130) *in vitro* veidoja biofilmu un bija *ica/Aap/mecA* pozitīvi, bet paraugs no asinīm – *ica/Aap* negatīvs, *mecA*-pozitīvs, biofilmu *in vitro* neveidoja. Jāpaskaidro, ka gēni *ica/Aap* ir *S. epidermidis* potenciālie virulences faktori un ka *mecA* ir metilīna un attiecīgi visu bēta laktāmu rezistences marķiergēns.

### Trešā gadījuma analīze

No uzņēmumiem, kas atkārtoti iegūti no ITN pacienta ķermeņa ādas (kreisā roka un jugulārās vēnas katetra insercijas vieta), tika izolēti šādi seši komensālie *S. epidermidis* celmi: LAT7, LAT8, LAT9, LAT10, LAT11 un LAT12 (4. tabula). Interesanti, ka sešiem *S. epidermidis* celmiem no viena pacienta bija raksturīgi trīs dažādi ST varianti: ST 130, ST 110 un ST 19, kas mainījās, atrodoties ITN vairākas dienas (4. tabula). Tas korelē ar datiem no vesela cilvēka, kur arī novēroja *S. epidermidis* dažādību atkarībā no lokalizācijas. Interesanti, ka ST 130 bija sastopams arī otrajā gadījumā, t. i., stacionētai personai.

4. tabula. Uz intensīvās terapijas nodaļas pacienta ādas identificēto celmu sekvenču tipi un to jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem

Table 4. Sequence types and antibiogram of the isolates from a skin of the intensive therapy unit patient

|               | Sekvenču tips (ST) | <i>Am</i> | <i>Er</i> | <i>CC</i> | <i>Cip</i> | <i>Ox</i> | <i>Fox</i> | <i>Va</i> |
|---------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| 1. diena Roka | ST 130             | S         | S         | S         | S          | S         | S          | S         |
| 1. diena JVK  | ST 110             | S         | S         | S         | S          | S         | S          | S         |
| 3. diena Roka | ST 110             | S         | S         | S         | S          | S         | S          | S         |
| 3. diena JVK  | ST 19              | S         | S         | S         | S          | S         | S          | S         |
| 6. diena Roka | ST 130             | R         | R         | R         | I          | R         | R          | S         |
| 6. diena JVK  | ST 19              | S         | S         | S         | I          | S         | S          | S         |

JVK – jugulārās vēnas katetra insercijas vieta.

*Am* – ampicilīns; *Er* – eritromicīns; *CC* – klindamicīns; *Cip* – ciprofloksacīns; *Fox* – cefoksitīns; *Va* – vankomicīns. Interpretācija: S – jutīgs, I – vidēji jutīgs, R – rezistents.

Lai iegūtu ticamus rezultātus, uzņēmumā no katras vietas tika identificētas vismaz 5 kolonijas un salīdzinātas to antibiogrammas. Tālāk ar genotipēšanu analizēja tikai vienu celmu.

Pirmajā paraugu paņemšanas dienā visi celmi bija jutīgi pret antimikrobiālajiem līdzekļiem. Viens no izolātiem no rokas ar ST 130, kas pirmajā dienā bija jutīgs, sestajā dienā kļuva rezistents pret ampicilīnu, eritromicīnu, klindamicīnu, cefoksitīnu (analogiski arī pret metilcīnu) un vidēji jutīgs pret ciprofloksacīnu. Tas nozīmē, ka uz pacienta rokas esošais epidermālais stafilokoks kļuva par MRSE. Diemžēl dati par pacienta saņemto antibakteriālo terapiju nav pieejami; ir tikai zināms, ka pacientam nebija stafilokoku izraisītas saslimšanas. Tomēr iegūtie rezultāti parādīja, ka hospitālā vide veicina rezistences parādīšanos konkrētam ST celmam, jo tā genotips nav mainījies.

### Pētījuma datu analīze salīdzinājumā ar pasaulē konstatētiem ST

Pēc e-BURST algoritma iegūta diagramma (sk. pielikumu) norāda, kāda ir Latvijas *S. epidermidis* celmu ST klonālā radniecība ar pasaulē konstatētiem sekvenču tipiem. Tiek uzskatīts, ka ievērojama daļa *S. epidermidis* populācijas pieder pie ierobežota kopu skaita vai pie tuvu radniecīgiem genotipiem; šeit minēti kā klonālie kompleksi. Klonālie kompleksi parasti sastāv no viena dominējoša genotipa ar vairākiem mazāk radniecīgiem genotipiem (pielikumā redzami kā divi lielāki apli – zils un dzeltens, ar zaļiem atzarojumiem). Vienkāršākais klonālo kompleksu modelis veidojas, pieaugot genotipa biežumam populācijā. Genotipus, kuriem alēliskais profils atšķiras no „priekšteču” profila vienā no septiņiem MLST lokusiem, sauc

par viena lokusa variantiem (*single locus variants*, SLVs). SLVs mainoties veido variantus, kuri atšķiras jau ar diviem lokusiem no septiņiem – divu lokusu varianti (*double locus variants*, DLVs).

Diagrammā pielikumā ir redzami šajā pētījumā konstatētie sekvenču tipi: ST 142; ST 218; ST 179; ST 153; ST 130 un ST 110, kas veido klonālo radniecību ar pārējiem ST, kuri ir ārzemēs konstatētie tipi. Šajā grupā nav ST 19 un ST 483, kas neveido klonālo radniecību ne ar vienu no ārzemēs konstatētiem ST. Katram redzamam sekvenču tipam ir konstatēti viena lokusa varianti (desmit SLV) un divu lokusu varianti (48 DLV), piemēram, ST 142 ir radniecīgs ST 6, tam ir desmit SLVs un 48 DLVs varianti.

Diagrammā ir redzams, ka neviens no pētījumā noteiktajiem celmiem nepieder pie ST 2 – ciltskoka priekšteča – vai pie ST 5 – viena no cita ciltskoka priekštečiem, kas veido pēc ģenētiskā polimorfisma lielākas grupas. Tas izskaidrojams ar to, ka ST 2 un ST 5 ir izplatīti pasaulē kā nozokomiālie (ar slimnīcas aprūpi saistīti) celmi.

## Diskusija

Neskatoties uz tām iespējām, ko mūsdienās piedāvā baktēriju pilna genoma sekvenēšana, MLST genotipēšanas metode tiek arvien plašāk izmantota gan epidemioloģiskiem, gan baktēriju evolūcijas pētījumiem [12]. Minētā metode ir arī atzīta par lētāku un nodrīgāku nekā mikroorganismu pilna genoma sekvenēšana [13]. Centrālā *S. epidermidis* MLST datubāze satur unikālu katalogu ar ST variantiem, tā tiek paplašināta, ka arī papildināta ar jaunām datu analīzes metodēm [14]. Ir zināms, ka *S. epidermidis* ir ģenētiski daudzveidīgs, tomēr ar MLST palīdzību tika izdalīta nozokomiālā *S. epidermidis* populācija ar deviņiem klonāliem ciltskokiem, kas ir izplatīti visā pasaulē [15]. Kas attiecas uz ST genotipu pārstāvniecību hospitālajā vidē, ir novērots, ka dažādos reģionos tā ir atšķirīga. Tā, piemēram, ST 69 celms dominē slimnīcās Grieķijā, ST 57 un ST 88 – Portugālē, ST 2 – Ķīnā, ST 2, ST 22, ST 61 un ST 71 – Meksikā un ST 63 – Argentīnā [16, 17]. Lai izdarītu secinājumus par Latvijā cirkulējošo *S. epidermidis* un to epidemioloģisko lomu, ir nepieciešami plašāki pētījumi slimnīcās un sabiedrībā.

Vēl nesen pie nozokomiālām infekcijām visbiežāk sastopamais sekvenču tips bija ST 2, un vēlāk tam pievienojas vēl viens – ST 5. ST 2 plašu izplatību var izskaidrot ar to, ka visiem ST 2 izolātiem konstatē *ica* gēnus un IS256 inserciju. Iepriekš tika noskaidrots, ka *ica* gēni un IS256 ir faktori, kas raksturīgi tieši invazīvajiem *S. epidermidis* celmiem. ST 2 izolātiem biežāk piemīt *in vitro* spēja veidot biofilmas. Pasaulē klonālo kompleksu ar dominējošo sekvenču tipu ST 2 veido aptuveni 74% no visiem nozokomiālo infekciju izraisītājiem [18]. Šajā pētījumā netika atrasts sekvenču tips ST 2, kā arī neviens no konstatētiem ST nepiederēja pie ST 2 vai ST 5 ciltskokiem, kas, visticamāk, skaidrojams ar analizēto *S. epidermidis* celmu komensālo dabu. Vienīgais invazīvais izolāts no hemokultūras ar ST 483 nebija radniecīgs nevienai ST grupai, jo tas bija jauns genotips.

Interesanti, ka pētījuma gaitā konstatējam dažādus ST genotipus uz viena vesela cilvēka ķermeņa daļām. Nevienā iepriekšējā mums zināmā pētījumā no šāda aspekta cilvēka āda un gļotāda nav pētīta. Vienīgi bija zināms, ka uz viena cilvēka ādas var būt no 10 līdz 24 stafilokoku sugām, un 90–100% no tām ir, atkarībā no



ķermeņa daļas, *S. epidermidis* baktērijas [19]. Diemžēl mūsu pētījumā nebija iespējams atkārtoti paņemt paraugus veselam cilvēkam, lai vērotu, kādas izmaiņas notiek laika gaitā. Taču tas bija iespējams, analizējot ST no trešā gadījuma, kad 1., 3. un 6. dienā stacionētai personai ņēma uztriepes no divām nemainīgām vietām. Arī šeit bija vērojama ST dažādība un celmu genotipa maiņa dažu dienu laikā. Tas varētu būt skaidrojams ar to, ka kolonizējošā mikroflora mainās pēc ādas apstrādes ar antiseptiskām vielām, kad no dažām palikušām baktērijām izaug jaunas kolonijas, kas pārņem apstrādāto ķermeņa rajonu. Tātad medicīniskam personālam ir svarīga nozīme nozokomiālo infekciju novēršanā. Lai parādītu, kā notiek ST maiņa dažādos ķermeņa rajonos veselam vai stacionētam cilvēkam, ir nepieciešami plašāki pētījumi. Lai novērstu iespējamās grūtības, interpretējot pozitīvas hemokultūras (ar KoNS), un veicinātu pareizo antibakteriālo kursu, medicīnas personālam ir nepieciešams pareizi veikt vēnu punkciju un stingri ievērot roku mazgāšanas pasākumus [20].

Nav zināms, kādā mērā pētījumā novērotā ST celmu dažādība ietekmētu rezultātus *S. epidermidis* infekcijas gadījumā. Lai meklētu epidemioloģisko avotu, būtu jāapvieno MLST ar antibiogrammas datiem un virulences (biofilmas veidošanas) faktoru noteikšanu. Taču pēdējie pētījumi par asinsrites sistēmas infekcijām neatrod virulences faktoru saistību ar genotipu un spēju izraisīt infekciju. Ir veikti daudzi pētījumi par potenciāliem KoNS virulences faktoriem [21–23], taču joprojām nav izvēlēts kāds viens noteikts faktors, kas atšķirtu kontaminantu celmus no invazīviem. Acīmredzot tam jābūt ģenētisko un fenotipisko faktoru kopumam.

Lai gan MLST ir vērsta uz stabilu standartģēnu noteikšanu, ir interesanti, ka fenotipi ar klīniski svarīgām īpašībām biežāk tiek kodēti ar ģēniem vai mobiliem elementiem, kas var strauji izplatīties populācijā un tikpat ātri var pazust. Ja salīdzina ar *S. aureus*, kam klonālā dažādība veidojas punktveida mutāciju dēļ, tad, pēc MLST datiem, *S. epidermidis* gadījumā tā veidojas galvenokārt rekombināciju rezultātā. Iespējams, *S. epidermidis* populācijas ģenētiskā dažādība veidojas arī ātrās mikroevolūcijas rezultātā, kura notiek ar biežu stafilokoku hromosomālās *mec* kasetes pārnesi [15].

Interesanti, ka šajā pētījumā ir pierādīta horizontāla meticilīnrezistences izplatība. Tas novērots trešajā analizētajā gadījumā. Pēc antibiogrammu datiem, pacientam, kurš atradās ITN, 6. dienā ST 130 uzrādīja rezistenci pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem. Tātad pāris dienu laikā šis celms ir kļuvis polirezistents. Taču ir redzams, ka antibakteriālā rezistence nav saistīta ar konkrētiem ST variantiem. Šādos gadījumos pacientiem paildzinās hospitalizācijas laiks un palielinās ārstēšanas izmaksas. Turklāt ir augsts risks izplatīt rezistentas baktērijas ārpus slimnīcas, jo palielinās iespēja iegūt patogēnus ar iepriekš nenovērotām rezistences īpašībām. MLST lietošana epidemioloģiskiem mērķiem novērš lieku antibakteriālo terapiju vai samazina tās laiku [24]. Izvēles terapijai pret MRSE un meticilīna rezistentiem KONS lieto vankomicīnu, daptomicīnu vai linezolidu, kas ir ievērojami dārgāki [25]. Ārzemēs vankomicīns tiek plaši lietots kā efektīvākais antibakteriālais preparāts, taču tam piemīt tādas blaknes kā nefrotoksicitāte un ototoksicitāte [26].

JMLST metodi lieto ne tikai *S. epidermidis*, bet arī *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* u. c. baktēriju tipēšanai. Šo metodi



arī izmanto, lai uzraudzītu vakcinācijas programmas efektu; MLST dati ir pierādījuši rezistentu celmu rašanos un izplatību, piemēram, *S. pneumoniae* fluorhinolonu rezidences gadījumā [27].

Jāsecina, ka mūsu rezultāti apliecina *S. epidermidis* ātro fenotipisko un genotipisko mainību, ar kuras palīdzību baktērija var pielāgoties mainīgiem ārējās vides apstākļiem. Pētījumā veiktais MLST pielietojums pirmoreiz izmantots *S. epidermidis* celmu genotipēšanai Latvijā; iepriekš tas izmantots tikai *S. aureus* tipēšanai [28]. Mūsu pētījumi arī daļēji apstiprina citu autoru secinājumus, ka, neskatoties uz darbietilpību un to, ka ir nepieciešama speciālistu apmācība datu analīzei, MLST genotipēšanai ir augsts potenciāls zinātniskam un praktiskam lietojumam klīnikā.

## Pateicības

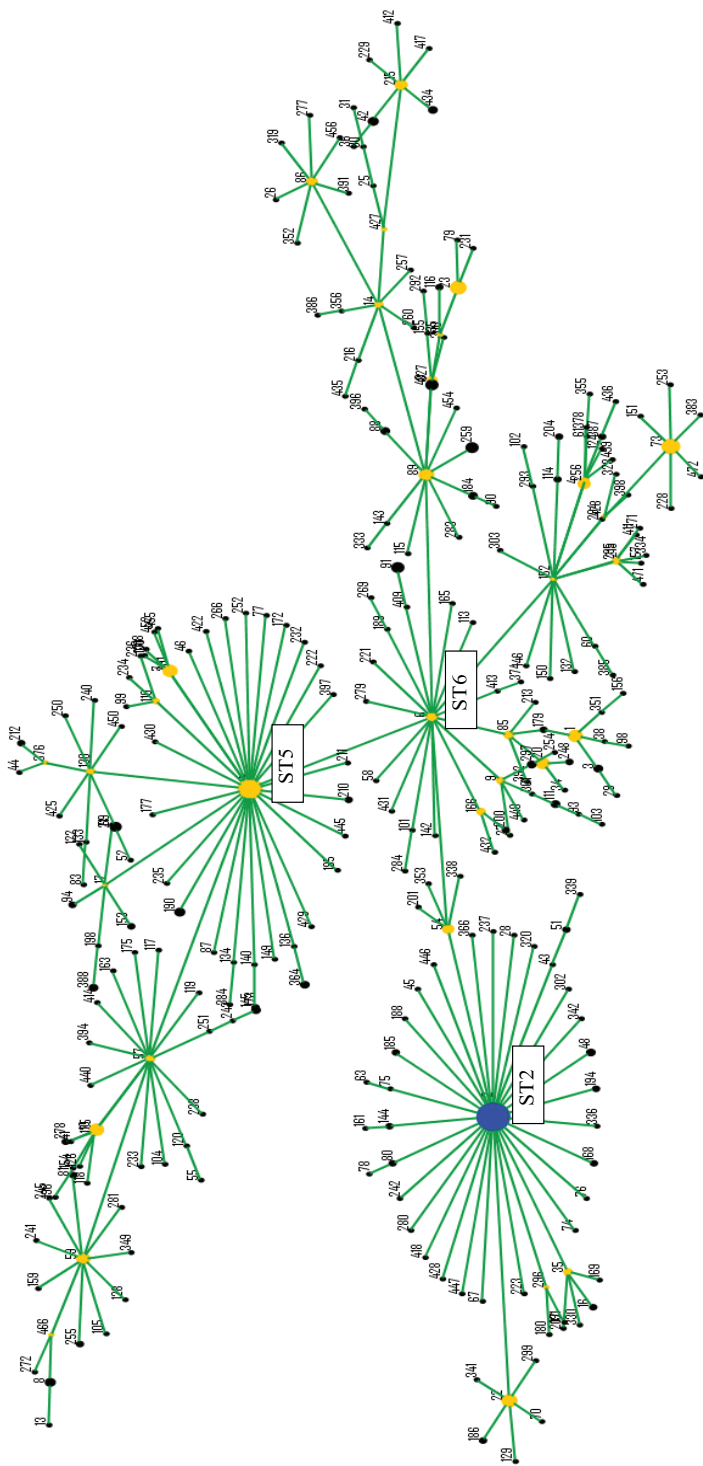
Pētījums tika veikts ESF finansēta projekta „Kapacitātes stiprināšana starpnozaru pētījumos biodrošībā” (2009/0224/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAAA/055) ietvaros. Mēs pateicamies *Staphylococcus epidermidis* MLST datubāzes veidotājiem. Datubāze, kas atrodas Londonas Impērijas koledžā (*Imperial College*), tiek atbalstīta no *Wellcome Trust* līdzekļiem. Mēs arī pateicamies Paula Stradiņa KUS kolektīvam, īpaši LU asoc. prof. *Dr. med.* U. Dumpim, A. Melnbārdei-Kelmeri, U. Bēram par viņu ieguldījumu paraugu un datu ievākšanā.

## Izmantotā literatūra

1. World Health Organisation, (2010). A brief synopsis of patient safety. Pieejams: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0015/111507/E93833.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/111507/E93833.pdf) [pēdējo reizi skatīts 18.04.2016.].
2. Žileviča, A. (2004). *Nozokomiālā jeb slimnīcas infekcija*. Rīga: LU Medicīnas fakultāte, 55 lpp.
3. Vuong, C., Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4, pp. 481-489.
4. Costa, S., Miceli, H., Anaissim E. (2004). Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infectious Diseases*, 4(5), pp. 278-286.
5. Huebner, J., Goldmann, D. A. (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50, pp. 223-236.
6. Halverson, S., Malani, P., Newton, D., Habicht, A., Vander Have, K., Younger, J. (2013). Impact of hourly emergency department patient volume on blood culture contamination and diagnostic yield. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, pp. 1721-1726.
7. Otto, M. (2013). Coagulase-negative *Staphylococci* as reservoirs of genes facilitating MRSA infections. *Bioessays*, 35(1), pp. 4-11.
8. Feil, E., Li, B., Aanensen, D., Hanage, W. (2004). eBURST: Interfering Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), pp. 1518-1530.
9. Turner, K., Feil, E. (2007). Secret life of multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pp. 129-135.
10. van Soolingen, D., de Haas, P., Hermans, P., van Embden, J. (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, 235, pp. 196-205.
11. Thomas, J., Vargas, M., Miragaia, M., Peacock, S., Archer, G., Enright, M. (2007). Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), pp. 616-619.

12. Maiden, M., Jansen van Resnburg, M. J., Bray, J., Earle, S., Ford, S., Jolley, K., McCarthy, N. (2013). MLST Revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews in Microbiology*, 11(10), pp. 728-736.
13. Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infections and Genetical Evolution*, 16, pp. 38-53.
14. Thomas, J., Robinson, D. (2014). Multilocus sequence typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods in Molecular Biology*, 1106, pp. 61-69.
15. Miragaia, M., Thomas, J., Couto, I., Enright, M., de Lencastre, H. (2007). Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 189(6), pp. 2540-2552.
16. Miragaia, M., Lencastre, H., Perdreau-Remington, F., Chambers, H. F., Higashi, J., Sullam, P. M., et al. (2009). Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One*, 4(11), e7722.
17. Liakopoulos, A., Spiliopoulou, I., Damani, A., Kanellopoulou, M., Schoina, S., Papafragas, E., et al. (2010). Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, pp. 1070-1077.
18. Kozitskaya, S., Olson, M., Fey, P. (2005). Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), pp. 4751-4757.
19. Kloos, W., Musselwhite, M. (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology*, 30(3), pp. 381-385.
20. World Health Organisation (2002). Prevention of hospital acquired infections. A practical guide. 2<sup>nd</sup>ed. Pieejams: <http://www.who.int/emc> [pēdējo reizi skatīts 18.04.2016.].
21. Vandecasteele, S., Peetermans, W., Merck, R., Van Eldere, J. (2003). Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *Journal of Infectious Diseases*, 188, pp. 730-737.
22. Liduma, I., Tracevska, T., Bers, U., Zilevica, A. (2012). Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas)*, 48(6), pp. 305-309.
23. Tracevska, T., Liduma, I., Bers, U., Riekstina, U., Zilevica, A. (2012). Evaluation of the expression of *luxS* gene in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from blood-stream infections. *Innovative Journal of Medical and Health Science*, 2(4), pp. 59-62.
24. Alahmadi, Y., Aldeyab, M., McElnay, J., Scott, M., Darwish Elhajji, F., Magee, F., et al. (2011). Clinical and economic impact of contaminated blood cultures within the hospital setting. *Journal of Hospital Infection*, 77(3), pp. 233-236.
25. Paradisi, F., Corti, G., Messeri, D. (2001). Antistaphylococcal (MSSA, MRSA, MSSE, MRSE) antibiotics. *Medical Clinics in North America*, 85(1), pp. 1-17.
26. Levine, D. (2006). Vancomycin: A History. *Clinical and Infectious Diseases*, 42(1), pp. 5-12.
27. Cooper, J., Feil, E. (2004). Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends in Microbiology*, 12(8), pp. 373-377.
28. Balode, A. (2011). *Meticilīnrezistentā Staphylococcus aureus molekulāri bioloģiskās īpatnības daudzprofilā stacionārā ārstētiem pacientiem Latvijā*. Promocijas darbs. Rīga: RSU.

Pielikums. MLST datu rezultāti, analizēti ar eBURST algoritmu MLST datubāzē  
 Attachment. E-BURST analysis results of MLST data within MLST database



Diagrammā ar zilo aplīti ir apzīmēts galvenais klonālā kompleksa „priekštecis” – ST 2, ar dzelteno aplīti – pārējie „priekšteči” (lielākie – ST 5 un ST 6); ar melnu aplīti – pārējie ST. Radniecība apzīmēta ar zaļo līniju. Ir redzami šajā pētījumā konstatētie sekvenču tipi: ST 142; ST 218; ST 179; ST 153; ST 130 un ST 110 (daži numuri pār-klājas). Pārējie ST ir citur pasaulē konstatētie tipi. Šajā grupā nav ST 19 un ST 483, jo tie neveido genētisko radniecību ne ar vienu no citur konstatētiem ST.

## Summary

*Multilocus sequence typing (MLST) is a genotyping method aimed to find epidemiological links and to study bacterial microevolution. In this study, MLST was used mostly on contaminating and colonizing strains of Staphylococcus epidermidis with the aim to determine changes in strain genotypes depending on the localization and hospitalization time. Cultures were isolated from skin/nose epithelium of healthy and hospitalized patients, and from one confirmed positive case of bacteraemia. Sequence types (STs) were determined by sequencing of 7 housekeeping genes – arcC, aroE, gtr, mutS, pyrR, tpi, yqiL. Results were analysed by BioEdit, Vector NTI programs, and compared to MLST database, using eBURST algorithm. From 12 S. epidermidis cultures and the corresponding 168 DNA sequences we revealed 9 different STs. In a healthy person, 4 different STs were found. There were 3 different STs in a hospitalized person, his STs changed during 6 days, and one isolated (ST 130) gained methicillin resistance. None of the STs were related to the globally known clonal complexes of ST 2 or of ST 5 of nosocomial S. epidermidis. Results of the study are showing the genetic polymorphism of S. epidermidis on human skin and the ability to gain methicillin resistance after admission to hospital. This is a first attempt of S. epidermidis genotyping in Latvia, pointing at urgent need for further studies of S. epidermidis epidemiology in hospitals and community.*

**Keywords:** S. epidermidis, commensal bacteria, MLST (multilocus sequence typing).

## Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīnas diagnosticēšanas nozīme un skrīninga metodes *Oral cancer: Importance of early diagnosis and screening methods*

Zenta Lakovica,<sup>1</sup> Sergejs Isajevs,<sup>1,2</sup> Ieva Henkuzena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

<sup>2</sup> Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centrs

E-pasts: [zenta.lakovica@gmail.com](mailto:zenta.lakovica@gmail.com)

Apskata raksta mērķis ir aplūkot mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīnas diagnosticēšanas nozīmi un skrīninga metodes, kā arī iztirzāt mutes dobuma audzēju novēlotas diagnosticēšanas iemeslus.

Vairāk nekā 2/3 mutes dobuma audzēju tiek diagnosticēti vēlīnās attīstības stadijās. Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīna diagnosticēšana ir svarīga, lai atvieglotu ārstēšanas procesu, uzlabotu ārstēšanas rezultātus un pacientu dzīvildzi.

Pašlaik „zelta standarts” mutes dobuma audzēju skrīningā ir mutes gļotādas vizuāla novērtēšana un palpācija. Veidojumu diagnosticēšanu var uzlabot, izmantojot palīgīdzekļus, kam gan līdz šim nav izveidotas skrīninga vadlīnijas. Iespējamie palīgīdzekļi ir gļotādas krāsošana ar toluidīna zilo krāsvielu, nokasījumu citoloģiskās metodes, siekalu izmeklējumi un optiskās vizualizēšanas metodes. Attīstoties tehnoloģijām, nākotnē liels potenciāls var būt audu un siekalu molekulāro biomarķieru izpētei, kuriem ir nozīme audzēju attīstībā un ārstēšanas prognozē.

Novēlotas mutes dobuma ļaundabīgo audzēju diagnosticēšanas iemesli ir saistīti gan ar medicīnas darbinieku nepietiekamo izglītības līmeni, gan ar kopumā zemo sabiedrības informētību par mutes dobuma audzējiem. Liela nozīme ir valsts veselības aprūpes politikai, kā arī valsts atbalstam veselības izglītībai un skrīninga programmām.

Mutes dobuma gļotādas skrīnings jāveic ne tikai zobārstiem, bet arī ģimenes ārstiem, jo mutes dobuma ļaundabīgo audzēju riska grupai piederošie indivīdi retāk apmeklē zobārstu. Nepieciešamas papildu apmācības programmas, lai uzlabotu zobārstu un citu veselības aprūpes speciālistu zināšanas par mutes dobuma gļotādas izmeklējumiem.

**Atslēgvārdi:** mutes dobums, ļaundabīgie audzēji, agrīna diagnosticēšana, skrīnings, biomarķieri.

### Ievads

Mutes dobuma ļaundabīgie audzēji ir septītie visbiežāk novērotie ļaundabīgie audzēji Eiropā. Tā, piemēram, 2012. gadā Eiropā apzināti 100 000 jaunu gadījumu (PVO, 2014) [16].

Mutes dobumā 90% no ļaundabīgajiem veidojumiem ir plakanšūnu karcinomas. Mutes dobuma plakanšūnu karcinomas pacientiem piecu gadu dzīvildze ir 50–63%

[13]. Vairāk nekā 2/3 mutes dobuma audzēju gadījumu diagnosticē vēlīnās slimības stadijās [16, 13], un tā vēl joprojām ir liela sabiedrības veselības problēma pasaulē. Aptuveni trešdaļai pacientu pēc ārstēšanas rodas audzēja recidīvs, kas varētu būt saistīts ar vēlīnu diagnosticēšanu un uzticamu biomarķieru trūkumu audzēja agrīnā diagnosticēšanā [1]. Skrīninga metožu izmantošana varētu veicināt agrīnu audzēju diagnosticēšanu [16].

## Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju simptomi un klīniskās pazīmes

Sāpes ir bieži novērojams simptoms mutes dobuma audzēju pacientiem, veidojot 30–40% no galvenajām sūdzībām. Kaut arī sāpes bieži ir svarīgākais simptoms, parasti tās parādās tikai tad, kad veidojums jau sasniedzis ievērojamu izmēru. Tādējādi agrīnas karcinomas bieži tiek nepamanītas, jo ir asimptomātiskas. Vēlākās stadijās sāpes var variēt no viegla diskomforta līdz spēcīgām sāpēm, īpaši mēlē. Citi simptomi var būt auss sāpes, asiņošana, halitoze, zobu kustīgums, elpošanas problēmas, runāšanas grūtības, disfāģija, problēmas lietot protēzes, trizmi, parestēzija u. c. [3, 13]. Reizēm pacientiem var būt tikai kakla limfadenopātija bez citiem simptomiem. Beigu stadijās var attīstīties ādas fistulas, asiņošana, nopietna anēmija un kaheksija [3].

Ļaundabīgie audzēji var atrasties jebkur mutes dobumā, taču visbiežāk tie skar mēli (2. attēls) un mutes pamatni. Citi rajoni ir vaigu glotāda, retromolārais rajons (1. attēls), smaganas (3. attēls), mīkstās aukslējas, retāk – mēles sakne un cietās aukslējas. Mutes un zobu izmeklēšanas laikā ir nepieciešams veikt pastiprinātu izmeklēšanu vietās, kur audzēji attīstās visbiežāk [3, 13]. Tā kā var būt iesaistīti arī limfmezgli, nepieciešama arī detalizēta kakla limfmezglu izmeklēšana, nosakot to lokalizāciju, izmēru, kustīgumu, tekstūru un cietību [13].

Laikā agrīni diagnosticētu mutes dobuma audzējus, ir jāveic papildu izmeklējumi pacientiem ar mutes veidojumiem, kas nedzīst ilgāk par trim nedēļām. Parasti agrīni šie ļaundabīgie veidojumi ir eritroleikoplastisku veidojumu formā. Tie sastāv no sarkaniem vai sarkaniem un baltiem rajoniem ar viegliem nelīdzenumiem un ir labi norobežoti. Klasiski ļaundabīgiem veidojumiem vēlāk parādās izčūlošana, mezglainums, fiksācija pie zemākesošajiem audiem [3]. Vienmēr ir nepieciešams veikt biopsiju un histopatoloģisko izmeklēšanu, jo klīniskās pazīmes nav pietiekams pamats diagnozes noteikšanai [3].

Tātad mutes dobuma ļaundabīgo veidojumu visbiežākais simptoms ir sāpes, kaut arī tās parasti nenovēro agrīnu karcinomu gadījumos. Izmeklēšanas laikā nepieciešams pārbaudīt arī limfmezglus, kā arī pievērst uzmanību mutes veidojumiem, kas nedzīst ilgāk par trim nedēļām, īpaši eritroleikoplastiskiem veidojumiem. Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju diagnosticēšanu veic, izvērtējot biopsijas un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātus.



1. attēls. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma smaganu rajonā  
Figure 1. Oral squamous cell carcinoma on the gingiva [3]



2. attēls. Eritroplastisks veidojums, karcinoma, uz mēles laterālās robežas  
Figure 2. Erythroplastic lesion, a carcinoma, on the lateral border of the tongue [3]



3. attēls. Mutes dobuma plakanšūnu karcinoma alveolārā izauguma rajonā  
Figure 3. Oral squamous cell carcinoma on the alveolar ridge [3]



## Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīnas diagnosticēšanas nozīme

Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīna diagnosticēšana ir svarīgs faktors, lai uzlabotu pacienta dzīvildzi – agrīnās stadijās mutes dobuma audzēja pacientu izdzīvošanas rādītāji var sasniegt pat 80–90%. Agrīna diagnosticēšana samazina arī ķirurģiskās iejaukšanās apmērus un ārstēšanas izmaksas [3, 13]. Laikus diagnosticētiem pacientiem ir ievērojami labāks funkcionālais rezultāts (runājot par runas un rīšanas funkciju), kā arī ārstēšana ir mazāk deformējoša [12, 13].

Plašā nacionāla apjoma pētījumā Taivānā apsekoja visus 2002.–2009. gadā diagnosticētos mutes dobuma audzēju pacientus. Rezultātā pacientu piecu gadu dzīvildze I, II, III un IV audzēja stadijā bija attiecīgi 78,98%, 69,38%, 54,62%, 36,17% [19]. Šis pētījums parāda agrīnas mutes dobuma audzēju diagnosticēšanas nozīmi.

Mutes dobuma audzēji agrīnās stadijās (I un II stadijā) ir daudz labāk ārstējami (gandrīz 90% pacientu izdzīvo divus gadus), izmantojot atsevišķi ķirurģiju vai radioterapiju. Salīdzinoši vēlīnu stadiju audzēju gadījumā (III un IV stadijā), veicot kombinētu ķirurģiju, radioterapiju un ķīmijterapiju, divus gadus izdzīvo aptuveni 45% pacientu [13].

Mutes dobuma audzēju agrīnas diagnosticēšanas mērķis ir diagnosticēt ne tikai mutes dobuma audzējus, bet arī potenciāli ļaundabīgus veidojumus pēc iespējas agrākā attīstības stadijā. Ja šādus pacientus nosūta pie speciālista laikus, tas veicina agrīnu diagnosticēšanu un ārstēšanu [8].

Pasaules Veselības organizācija ir noteikusi, ka profilakse un agrīna diagnosticēšana ir galvenie mērķi, lai mazinātu mutes dobuma audzēju problēmu pasaulē [5]. Tātad var secināt, ka mutes dobuma ļaundabīgo audzēju agrīna diagnosticēšana ir ļoti svarīga, lai atvieglotu ārstēšanas procesu, uzlabotu ārstēšanas rezultātus un pacientu dzīvildzi.

## Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju augsta riska grupas

Augstāks risks mutes dobuma audzēju attīstībai ir vecāka gadagājuma cilvēkiem, vīriešiem, lieliem alkohola un tabakas patērētājiem, cilvēkiem ar nesabalansētu uzturu (uzturā daudz gaļas un maz augu valsts produktu) un ar zemu socioekonomisko statusu [8, 16, 13]. Lielāks risks ir pacientiem, kam dzīves laikā ir bijis augšējo elpceļu vai gremošanas trakta ļaundabīgs audzējs, kā arī indivīdiem ar noteiktām iedzimtām saslimšanām, piemēram, Fankonī anēmiju [44].

Vēl kā riska faktors tiek minēts īpaši Dienvidāzijas kultūrām raksturīgā arekas riekstu un beteles lapu košļāšana (ar tabaku vai bez tās). Beteles lapu košļāšana un smēķēšana ir mutes dobuma audzēja galvenie riska faktori Dienvidāzijā, Dienvidaustrumāzijā un Taivānā [22]. Cilvēki no šīm kultūrām pārstāv augsta riska populāciju, kurai var būt efektīvas skrīninga programmas [8]. Taivānā no 1981. gada katru gadu pieaug beteles lapu ražošanas, kas daļēji izskaidro straujo mutes dobuma audzēju gadījumu pieaugumu šajā reģionā [5]. Beteles lapu košļāšanas laikā siekalās izdalās arekolīns, safrols un nikotīns, kas samazina fibroblastu kolagēna fagocitozi un var izraisīt mutes dobuma zemgļotādas fibrozi [21].

Mutes dobuma ļaundabīgo audzēju riska faktors ir arī inficēšanās ar cilvēka papilomas vīrusu (HPV). Ar HPV saistītos mutes dobuma ļaundabīgos audzējus diagnosticē gados jaunākiem pacientiem, salīdzinot ar pacientiem, kam diagnosticē



ar HPV nesaistītus mutes dobuma audzējus [8]. Taču jāņem vērā, ka HPV ir riska faktors audzējiem, kas atrodas mēles saknē un mandelēs, bet tas nav nozīmīgs faktors audzējiem mēles pārējās divās trešdaļās un pārējā mutes dobumā. Ar HPV saistītiem audzējiem ir labāka prognoze nekā ar HPV nesaistītiem audzējiem [44].

Citi saistītie riska faktori vēl var būt citas ķīmikālijas, radiācija, vides un ģenētiskie faktori [13].

Skrīninga programmām, kas vērstas uz augsta riska grupas indivīdiem, varētu būt lielāka efektivitāte [8, 16]. Medicīnas literatūrā var atrast dažādus pētījumus, kas apskata mutes dobuma ļaundabīgā audzēja augsta riska populāciju. Indijā veikts pētījums parādījis, ka, lai samazinātu mirstību no mutes dobuma audzēja, efektīvi ir rutīnas vizuālie mutes izmeklējumi augsta riska grupā – tabakas lietotājiem un alkohola lietotājiem [46].

Kanādā veiktā pētījumā vīriešiem, indivīdiem ar zemāku ienākuma līmeni, neprecētajiem, sociāli atstumtajiem, smēķētājiem un lieliem alkohola patērētājiem ievērojami biežāk mutes dobuma audzēju diagnosticēja jau progresējošās stadijās. Šis pētījums arī parādīja, ka smēķētājiem un alkohola lietotājiem biežāk nebija sava zobārsta [12].

Pēdējo gadu pētījumi Vācijā liecina, ka 10 gadu laikā valstī ir samazinājies alkohola patēriņš, smēķētāju skaits un smēķēšanas intensitāte (īpaši iedzīvotājiem, kas jaunāki par 45 gadiem). Tas varētu būt saistīts ar to, ka Vācijā, apkopojot 2003.–2011. gada datus, jaunāko iedzīvotāju grupās ir samazinājies mutes dobuma audzēju gadījumu skaits un mirstība no tā [16].

Var secināt, ka pie augsta riska grupas pieder arī pacienti, kam dzīves laikā ir bijuši augšējo elpceļu vai gremošanas trakta ļaundabīgi audzēji, kā arī indivīdi ar noteiktām iedzimtām saslimšanām, piemēram, Fankonī anēmiju. Savukārt ļaundabīgajiem audzējiem, kas atrodas mēles saknē un mandelēs, riska faktors ir inficēšanās ar HPV vīrusu. Šīs riska grupas jāņem vērā, izstrādājot mutes dobuma ļaundabīgo audzēju skrīninga programmas.

## **Pašreiz pasaulē lietotās mutes dobuma audzēju skrīninga metodes**

Pašreizējā priekšvēžu un audzēju identifikācija un diagnoze pamatojas uz aizdomīgo audu biopsiju un patologa veiktu histoloģisku un citoloģisku pārbaudi. Kaut arī šīs metodes ir „zelta standarts” audzēja diagnosticēšanā, tām piemīt vairāki trūkumi mutes dobuma audzēju skrīningā. Audu biopsija ir invazīva, dārga un bieži patērē daudz laika. Turklāt audu parauga diagnostiskā interpretācija var variēt starp patoloģiem un nav labi definēti patoloģiskie kritēriji priekšvēžu stāvokļu identifikācijai [22].

Pētījumos novēro ievērojamas audzēju stadiju atšķirības starp grupām, kurās pacients pie primārās veselības speciālista ierodas jau ar sūdzībām, salīdzinot ar pacientiem, kuriem skrīningos diagnosticēti asimptomātiski veidojumi [53]. Skrīnings ļauj audzēju diagnosticēt laicīgāk.

Pilnīgai mutes gļotādas pārbaudei vajadzētu būt daļai no rutīnas izmeklēšanas zobārsta apmeklējuma laikā. Šāda rutīnas izmeklēšana ir vienkārša, nav dārga un ir droša, jo ir viegli piekļūt mutes dobumam. Lai diagnosticēšana būtu adekvāta, zobārstiem nepieciešamas laikmetam atbilstošas zināšanas, kā arī nepārtraukta

tālākizglītība, lai spētu diferencēt labdabīgus, potenciāli ļaundabīgus un ļaundabīgus veidojumus [17]. Pašlaik mutes gļotādas rutīnas izmeklējumi (vizuāla novērtēšana un palpācija) ir „zelta standarts” mutes audzēja skrīningā [49]. Veidojumu diagnosticēšanu var uzlabot, izmantojot palīg līdzekļus: gļotādas krāsošanu ar toluidīna zilo krāsvielu, eksfoliatīvas citoloģiskās metodes, siekalu izmeklējumus un optiskās vizualizēšanas metodes [8, 13].

### Mutes dobuma gļotādas krāsošana ar toluidīna zilo krāsvielu

Toluidīna zilo krāsvielu izmanto vairāk nekā 40 gadus, lai palīdzētu diagnosticēt un izvēlēties biopsijas vietu potenciāli ļaundabīgiem veidojumiem, kā arī lai novērtētu plakanšūnu audzēja robežas kakla un mutes gļotādā. Ja šo krāsvielu aplicē gļotādas virsmā, tā iekrāso audus ar straujām šūnu izmaiņām (ieskaitot iekaisīgus, reģeneratīvus un neoplastiskus epitēlijaudus, kā arī atklātus saistaudus) un epitēliālās šūnas, kurās ir atipiskas DNS izmaiņas (4. attēls). Maldīgi pozitīvus rezultātus primāri saista ar iekaisīgiem veidojumiem un dzīstošām čūlām, kurām ir augsts šūnu vielmaiņas ātrums, tāpēc svarīga ir izmeklēšanas veicēja pieredze [13, 40]. Tā kā iekaisuma un čūlu veidojumi arī saista krāsvielu, ieteicams veikt kontroli pēc divām nedēļām, lai ļautu iekaisumam sadzīt un mazināt maldīgi pozitīvo interpretāciju [13].

Toluidīna zilās krāsvielas jutība pret mutes ļaundabīgiem veidojumiem ir 93,5–97,8%, bet specifitāte 73,3–92,9% [12]. Taču toluidīna zilais ir mazāk jutīgs pret pirmsvēža stāvokļiem [40, 49]. Tiek ziņots par līdz pat 58% gadījumu, kad iegūti maldīgi negatīvi rezultāti par vieglām un vidēji izteiktām displāzijām [40].

Toluidīna zilo krāsvielu rekomendē izmantot pieredzējušiem speciālistiem augsta riska populācijās, bet citas rekomendācijas nav sniegtas [13].



4. attēls. Pozitīvs testa rezultāts ar toluidīna zilo krāsvielu mutes dobuma plakanšūnu karcinomas gadījumā

Figure 4. Toluidine blue – positive staining in oral squamous cell carcinoma [49]

## Mutes dobuma gļotādas nokasījuma citoloģija

Nokasījuma citoloģijas mērķis ir ievākt audu paraugu mazāk sāpīgā un vienkāršākā veidā nekā skalpeļa biopsija vai punkcijas biopsija. Mutes dobuma gļotādas nokasījuma citoloģijā izmanto instrumentu ar cirkulāri novietotiem sariem, kas veidoti, lai piekļūtu un ņemtu paraugu no visiem epitēlija slāņiem, arī bazālo šūnu slāņa un *lamina propria* virsējā slāņa. Nokasījuma citoloģijai ir daudz priekšrocību – to var viegli veikt zobārsta krēslā, tas ir nesāpīgs tests, ko var izmantot aizdomīgu veidojumu gadījumos, arī bieži novērojamu nelielu baltu un sarkanu mutes veidojumu gadījumos, lai izslēgtu displāziju [40]. To var arī izmantot, lai lieliem veidojumiem izvēlētos labāko incīzijas vietu [49].

Zobārstniecības speciālisti klīnikā var izmantot eksfoliatīvo šūnu savākšanu, lai apkopotu datus nākamajiem soļiem diagnosticēšanā. Nokasījuma citoloģija ļauj ievākt gļotādas epitēlijaudus pilnā biežumā, lai izpētītu atdalīto šūnu morfoloģiju gaismas mikroskopā. Tā ir minimāli invazīva metode, tādēļ tās lietošana ir piemērota pacientiem, kuriem skalpeļa biopsija nav iespējama, kā arī iepriekš diagnosticētu gļotādas veidojumu kontrolei. Taču diagnozes noteikšanai tāpat nepieciešama ķirurģiska audu biopsija [13].

Ir pētījumi, kuros mutes dobuma gļotādas nokasījuma biopsijas jutība displāzijas un plakanšūnu audzēja noteikšanai ir 71,4%, bet specifitāte – tikai 32% [40]. Šī tehnoloģija rada ievērojami vairāk viltus pozitīvus rezultātus, tādēļ vairums klīnicistu, saskaroties ar aizdomīgu gļotādas veidojumu, labāk izvēlēšies skalpeļa vai punkcijas biopsiju [49].

Ir attīstīta tehnika, kur nokasījuma citoloģiju izmanto kopā ar datora asistētu analīzi. Taču arī šai teknikai ir ierobežota specifitāte agrīnai mutes dobuma audzēju diagnosticēšanai [40].

Ir izstrādātas jaunas metodes, kur iegūtajos epitēlijaudos nosaka molekulārus un morfoloģiskus biomarkierus, ka saistīti ar displāzijām un ļaundabīgiem veidojumiem. Šajā tehnikā izmanto nanobiočipa sensora platformu mutes dobuma audzēju diagnosticēšanai. Šīs metodes jutīgums ir 97–100%, bet specifitāte – 86% [40].

Ir veikti pētījumi, kuros molekulārās izmaiņas eksfoliatīvajās šūnās un biopsijās izmanto, lai monitorētu leikoplakijas pacientus un mēģinātu noteikt biomarkierus, kuri palīdzētu prognozēt veidojuma progresiju ļaundabīgā veidojumā [11].

## Audu molekulāro biomarkieru piemēri un to loma mutes dobuma gļotādas audzēju attīstībā

**Ciklīns D1** – viens no svarīgākajiem protoonkogēniem un šūnas cikla regulētājiem. Ciklīnu D1 ekspresē šūnas cikla G1 fāzē, un tas ir saistīts ar audzēja attīstību un tā rezistenci pret apoptozi, kas padara audzēju izturīgu pret ārstēšanu [37]. Vairākos pētījumos ziņo par ciklīna D1 ekspresijas pozitīvu korelāciju ar audzēja izmēru, stadiju, limfmezglu iesaisti un samazinātu pacienta dzīvildzi [24, 4]. Tā kā ciklīnam D1 ir liela nozīme plakanšūnu audzēja gadījumā, pētījumos tas aplūkots dažādās mutes dobuma audzēja attīstības stadijās. Novēro ciklīna D1 nozīmi audzēja progresijas gaitā [37]. Mutes dobuma plakanšūnu audzēja audos novēro arī ciklīna D1 mRNS līmeņa palielināšanos, un tās ekspresija ir specifiska audzēja stadijai [36]. Ciklīnu D1 iesaka izmantot ne tikai prognozes noteikšanai, bet arī tāpēc, lai

palīdzētu izvēlēties piemērotu terapiju plakanšūnu audzēja pacientiem [4]. Ir pētījumi, kuru rezultāti liecina, ka CCND1 (ciklīna D1) gēna amplifikācija ir daudz ticamāks prognostisks faktors nekā ciklīna D1 proteīna palielināta ekspresija [35, 54]. Audzējiem ar CCND1 gēna aberāciju skaita kopijām vienmēr ir palielināta ciklīna D1 proteīna ekspresija. Šīs gēna skaita aberācijas ievērojami saistās ar invazīvu audzēja fenotipu un patoloģiski noteiktu limfmezglu metastāzēm. CCND1 gēna aberācijas ir svarīgi noteikt, lai identificētu augsta riska pacientus I un II plakanšūnu audzēja stadijā, kam vēlīnās stadijās varētu attīstīties limfmezglu metastāzes [54].

**EGFR** (epidermas augšanas faktora receptors) ir transmembrāns šūnas virsmas receptors. Tas ir tirozīnkināzes receptors, kas ir bieži izmainīts epitēlija audzēju gadījumā. EGFR ir nozīme šūnu augšanā, asinsvadu veidošanā, apoptozes inhibīcijā, šūnu adhēzijā, šūnu kustīgumā un invāzijā, tāpēc epitēlijaudiem, kuros ir pastiprināta EGFR ekspresija, var būt palielināts ļaundabīgais potenciāls [27]. Paaugstināta ekspresija saistīta ar lielāka izmēra audzēju un vēlīnāku stadiju, tādējādi arī ar sliktāku prognozi, paātrinātu audzēja augšanu, metastāzēm, izturību pret ķīmijterapiju un staru terapiju [24, 27, 43]. Ap 80–90% no plakanšūnu audzējiem galvas un kakla rajonā tiek pastiprināti ekspresēti EGFR [42, 54]. Pastiprināta ekspresija ļaundabīga veidojuma attīstībā notiek jau agrīni [39]. Pētījumos ir atrastas apgrieztas attiecības starp EGFR ekspresiju un HPV (cilvēka papilomas vīrusu) klātbūtni galvas un kakla plakanšūnu audzēja gadījumos. HPV pozitīviem plakanšūnu audzējiem bija zemāka EGFR ekspresija un tā negatīvi korelēja ar HPV titru audzēja audos [59]. EGFR ir terapijas mērķis vairāku ļaundabīgu veidojumu gadījumos, piemēram, plaušu un zarnu audzēja ārstēšanā. Tomēr, lai gan vairākos audzējos novēro EGFR mutāciju un palielinātu ekspresiju, tā nomākšana ne vienmēr ir efektīva audzēja ārstēšanā [42, 43].

**P16** ir proteīns, ciklīnatarīgās kināzes inhibētājs, kas funkcionē kā šūnas cikla negatīvs regulators [45, 55]. P16 imūnhistoķīmija ir plaši izmantots izmaksu efektīvs tests, kas ļauj izvērtēt to ekspresiju audzēja šūnās. Vairākos pētījumos imūnhistoķīmiski novērtēta p16 ekspresija dažādu pirmsvēža stāvokļu un audzēja audos. Pētot gan galvas un kakla plakanšūnu audzēju, gan priekšvēža stāvokļus, rezultāti ir bijuši pretrunīgi. Novēro gan palielinātu, gan samazinātu p16 ekspresiju. Šie rezultāti liek domāt, ka p16 nav specifisks audzēja diagnosticēšanas marķieris [45]. Tomēr citi pētījumi parāda, ka palielināta p16 ekspresija saistīta ar labākiem dzīvildzes rādītājiem un ka palielināta p16 ekspresija ir saistīta ar HPV E6/E7 mRNS, kas ir marķieris transkriptīvi aktīvai HPV infekcijai [55, 9]. Tādējādi p16 var izmantot kā surogātmārkieri, lai noteiktu HPV klātbūtni. Taču medicīnas literatūrā iesaka izmantot vismaz vēl vienu HPV parametru, lai noteiktu pacientus ar HPV saistītu galvas un kakla plakanšūnu audzēju [58].

**MMP-9** (matrices metaloproteāze 9 / gelatināze B) – cinkatarīga endopeptidāze. Tā ir atrodama polimorf nukleārajos leukocītos, un tai ir fizioloģiska nozīme audu attīstībā, ievainojumu dzīšanā un iekaisumā. Pastiprināta MMP-9 ekspresija novērojama krūšu, zarnu un ādas ļaundabīgo audzēju gadījumos [2]. MMP-9, pārveidojot ārpusšūnu matricu, spēj veicināt audzēja progresēšanu un stimulēt audzēja šūnu proliferāciju un migrāciju [25]. Galvas un kakla audzēja gadījumā MMP-9 imūnekspressija ir augstāka nekā normālos audos un asociējas ar sliktāku dzīvildzi [2]. Normālā epitēlijā MMP-9 pozitīvu ekspresiju novēro tikai bazālajā šūnu

slānī, bet displastiska epitēlija gadījumā MMP-9 ekspresiju novēro visā epitēlija biezumā [25]. Savukārt samazināta MMP-9 ekspresija korelē ar attālām metastāzēm [2]. Novērota arī saistība starp MMP-9 ekspresiju un tādu pacientu dzīvildzi, kuri ārstēti ar staru terapiju un ķīmijterapiju kopā ar staru terapiju. Tika secināts, ka MMP-9 ekspresija ir vērtīgs prognozes rādītājs, lai noteiktu audzēja lokālo kontroli. Pacienti, kuriem lokāli nebija recidīva un kuriem bija zems MMP-9 ekspresijas līmenis, piecu gadu dzīvildzi novēroja 84,8% gadījumu, taču grupai, kurai bija augsts MMP-9 ekspresijas līmenis, dzīvildze bija 55,2% gadījumu [56].

**VEGF** (vaskulārais augšanas faktors) – iedarbīgs citokīns, kas veicina audzēja asinsvadu jaunveidošanos [1]. VEGF ir saistīts ar endotēlijšūnu proliferāciju un migrāciju, asinsvadu caurlaidību, dažādu vazoaktīvu molekulu produkciju, tuklo šūnu un monocītu hemotaksi [34]. Vairākos pētījumos ziņots par pastiprinātu VEGF ekspresiju dažādos ļaundabīgos veidojumos. Palielināta VEGF ekspresija saistīta ar sliktu mutes dobuma audzēja prognozi [1]. Normālam mutes epitēlijam pārveidojoties displāzijā un plakanšūnu audzējā, rodas ievērojama angiogēnēze. Tā ir saistīta ar audzēja progresēšanu un limfmezglu metastāzēm. VEGF var būt svarīgs faktors asinsvadu veidošanā, kad no normāla mutes dobuma epitēlija veidojas plakanšūnu audzējs [20]. Asinsvadu veidošanās nomākšana pirmsvēža stāvokļu gadījumā varētu būt perspektīva audzēja ārstēšanas metode [34]. Pētījumos ir parādīts, ka VEGF neitralizējošas antivielas uzlabo ķīmijterapijas un staru terapijas efektu audzēju ārstēšanā [38].

**SOD** (superoksīda dismutāze) – antioksidantu enzīms, kas nepieciešams superoksīdu anjona brīvo radikāļu detoksikācijā. No trīs galvenajām SOD subvienībām SOD2, kas lokalizēta mitohondrijos, ir būtiska šūnu dzīvībai, jo mitohondriji ir galvenie superoksīda ražotāji. Pētījumos palielinātu SOD2 daudzumu saista ar vairākiem audzēja veidiem un ar sliktu prognozi un metastāzēm. Tiek ziņots, ka SOD2 ekspresija ir palielināta mēles plakanšūnu audzēja gadījumā un tā veicina audzēja migrāciju un invāziju [30, 31]. Citos pētījumos minēts, ka SOD2 palielināta ekspresija novērota mutes dobuma plakanšūnu audzējos un ka šo proteīnu var izmantot kā biomarķieri vienlaicīgi ar citiem proteīniem [32].

## Siekalu biomarķieru izpēte

Siekalas var uzskatīt par ķermeņa veselības spoguļi. Siekalu sastāvs arvien tiek pētīts, lai tajās atrastu dažādu slimību marķierus un novērtētu vispārējo veselību [51]. Mūsdienās izmanto nanoelektromehāniskās un mikroelektromehāniskās tehnoloģijas, lai izgatavotu automatizētus testus siekalu novērtēšanai [40]. Piemēram, ir radīta integrēta diagnosticēšanas iekārta, kas spēj ātri noteikt mikro RNS biomarķierus no audzēja šūnu līnijām [52].

Jaunākās tehnoloģijas siekalu diagnosticēšanā ievērojami attīstās. Siekalu izmantošana mutes dobuma audzēja diagnosticēšanā ir neinvazīva alternatīva seruma pārbaudei, un metodes precizitāte ir ap 85% [40]. Salīdzinot ar plazmas pārbaudi, siekalu izmantošana diagnosticēšanā ir neinvazīva, lētāka un viegli lietojama [57].

Audzēju biomarķieru atklāšana kopā ar eksfoliatīvu citoloģiju un siekalu biomarķieriem var veidot neinvazīvas metodes, lai diagnosticētu pirmsvēža stāvokļus un plakanšūnu audzēju [8, 23].

ASV attīsta automatizētas tehnoloģijas, kas pēc siekalu testa nākotnē ļaus atlasīt ne tikai tādus augsta riska pacientus, kam ir mutes dobuma audzējs, bet arī pacientus, kam ir vairāki citi audzēju tipi un saslimšanas [40]. Savukārt Japānā ir izstrādāta neinvazīva skrīninga metode, kur, izmantojot mutes skalošanu, ievāc eksfoliatīvās gļotādas šūnas un nosaka biomarķierus. Šāda metode ir vienkārša, neinvazīva, viegli atkārtojama, izslēdz testa izpildītāja subjektivitāti, kā arī testa izpildei nav nepieciešama pieredze un apmācība. Par šo metodi vēl nepieciešams turpināt pētījumus, lai uzlabotu tehniku un metodes precizitāti [26].

## Mutes gļotādas optiskā izmeklēšana

Pēdējo 20 gadu attīstība šķiedru optikā un pusvadītāju tehnoloģijā ir radījusi iespēju attīstīt jaunu nedārgu, miniatūru optisko avotu un sensoru paaudzi. Šim ierīcēm atrasts plašs lietojums, izmantojot audu un gaismas mijiedarbību [28].

Ir radītas optiskās sistēmas, lai klīnicistiem atvieglotu mutes gļotādas veidojumu diagnosticēšanu. Šo sistēmu darbības princips balstās uz audu vielmaiņas, struktūras un audu optisko īpašību izmaiņām, kas parādās mutes jaunveidojumu attīstības laikā. Ir radītas dažādas hemiluminiscences, autofluorescences un multi-spektrālas ierīces, lai būtu vieglāk diagnosticēt potenciāli ļaundabīgus veidojumus. Kopumā vizualizēšanas rezultāti ir atkarīgi no iesaistītās riska populācijas un speciālista pieredzes. Tāpat kā ar citām palīgierīcēm, neeksistē skrīninga vadlīnijas un vadlīnijas vispārējam medicīnas darbiniekam [13].

Lielākā daļa optisko diagnosticēšanas sistēmu ir eksperimentālā stadijā. Šīs sistēmas ir palīgierīces, kuras jālieto kopā ar tradicionālajām intraorālajām un ekstraorālajām izmeklēšanas metodēm [40]. Tā, piemēram, ir aplūkots iespējamais optiskās spektroskopijas potenciāls, lai uzlabotu mutes priekšvēžu stāvokļu un audzēju diagnosticēšanu [28].

Tāpat pašlaik „zelta standarts” mutes audzēju skrīningā ir mutes gļotādas vizuāla novērtēšana un palpācija. Veidojumu diagnosticēšanu var uzlabot, izmantojot palīgīdzekļus, kam gan līdz šim nav izveidotas skrīninga vadlīnijas, un daudzas ierīces atrodas izpētes stadijā. Iespējamie palīgīdzekļi ir gļotādas krāsošana ar toluidīna zilo krāsvielu, nokasījumu citoloģiskās metodes, siekalu izmeklējumi un optiskās vizualizēšanas metodes. Attīstoties tehnoloģijām, nākotnē liels potenciāls var būt audu un siekalu molekulāro biomarķieru izpētei, kuriem ir nozīme audzēju attīstībā un ārstēšanas prognozē.

## Mutes dobuma gļotādas ļaundabīgo audzēju skrīningu programmu piemēri

Salīdzinot ar citiem audzēja veidiem, sabiedrība ir daudz mazāk informēta par mutes dobuma ļaundabīgo audzēju [8, 6]. Taču pēdējos gados ir veikti pētījumi, kuru rezultāti parāda, ka pacientiem nav iebildumu pret skrīninga procedūrām, ja vien pirms tam viņi ir pietiekami informēti par skrīninga mērķiem [6, 41].

2010.–2011. gadā Taivānā tika veicināts pētījums, kurā ambulatorās iestādēs izmantoja automatizētas datorsistēmas, lai, ievadot datus, tās primārās veselības aprūpes darbiniekus brīdinātu, ka pacientam ir augsts mutes dobuma audzēja attīstības risks un ka viņš jānosūta pie skrīninga speciālistiem. Šādā veidā diagnosticēja



vairāk mutes dobuma audzējus sākotnējās stadijās, un šāda pieeja varētu būt laba stratēģija, lai identificētu pirmsvēža stāvokļus vai mutes dobuma audzējus agrīnās stadijās [29, 33]. Tā kā mutes dobuma audzēji ir relatīvi reti novērojami, efektivitātes uzlabošanai iesaka veikt skrīningu augsta riska mērķa populācijas grupām, nevis masu populācijai [29, 50].

Savukārt Džordžijas štatā Atlantas automobiļu sacīkšu ceļa teritorijā skatītājiem veica galvas un kakla audzēju skrīningu. Šeit sacīkstes apmeklētājiem ievērojams skaits cilvēku. Trīs nedēļas nogalēs tika apskatīti 568 cilvēki. 43% no pārbaudītajiem indivīdiem ikdienā lietoja alkoholu, 54% bija smēķētāji. 43% smēķētāju novēroja izmaiņas mutes dobumā, un viņi tika nosūtīti pie ģimenes ārsta tālākai pārbaudei. Pētījums parādīja, ka lielai daļai personu galvas un kakla audzēju skrīnings var tikt efektīvi organizēts nemedicīniskās vietās. Šādi indivīdu kopai veiktam skrīningam ir vairākas priekšrocības – tā ir iespēja piekļūt veselības aprūpei un veselības aprūpes izglītībai ārpus slimnīcas vides [14].

Citā pētījumā – Izraēlā – tika aprakstīta integrēta ļaundabīgo audzēju profilakses centra pieredze. Pētījumā tika veikts skrīnings asimptomātiskai populācijai, lai noteiktu dažādu tipu (t. sk. mutes) jaunveidojumus. Tajā aprakstīti pirmo 1000 indivīdu skrīninga rezultāti. Jaunveidojumi tika diagnosticēti 10% kohorta pārstāvju, ļaundabīgi veidojumi – 2,4%. Visi labdabīgie veidojumi tika izņemti, savukārt 21 ļaundabīgais veidojums no 24 tika diagnosticēts agrīnā stadijā. Šajā pētījumā tika diagnosticēti divi labdabīgi mutes dobuma jaunveidojumi. Šāds centrs ir unikāla iespēja „vienas pieturas” dažāda tipa audzēju skrīningam, kas ir aktuāli, ņemot vērā, ka mirstība no audzēja pēdējos gados vairākās pasaules valstīs ir lielāka nekā mirstība no sirds slimībām [48].

## Novēlotas diagnosticēšanas iemesli

Lielāko daļu mutes dobuma audzēju diagnosticē vēlīnās attīstības stadijās. Vēlīnas diagnosticēšanas iemeslus nepieciešams pētīt, ne tikai meklējot jaunas diagnosticēšanas tehnoloģijas un jaunas terapijas, bet arī apskatot psihosociālos faktorus gan no pacienta, gan no veselības speciālistu perspektīvas. Svarīga ir arī valsts veselības politika [8, 13].

Viens no novēlotas diagnosticēšanas faktoriem varētu būt tas, ka cilvēkiem trūkst vispārīgas un pieejamas informācijas par mutes dobuma audzēju [8, 6]. Pētījumos minēts, ka apmēram 30% pacientu kavējas meklēt palīdzību vairāk nekā trīs mēnešus pēc tam, kad paši ir pamanījuši mutes dobuma audzēja simptomus [41]. Nepieciešami izglītojoši pasākumi augsta riska grupām, lai brīdinātu pacientus par mutes dobuma audzēja iespējamām pazīmēm [8, 13, 47].

Indijā veica pētījumu, kurā izmantoja sabiedrības veselības izglītības programmu, kas pamatojas uz mutes pašizmeklēšanu, lai uzlabotu sabiedrības zināšanas par mutes dobuma audzēju un tā riska faktoriem. Rezultāti liecināja, ka šādām programmām var būt pozitīvs efekts. Pašizmeklēšanās ir veiksmīgi izmantota, lai laikus diagnosticētu krūts audzēju, un šādu stratēģiju var lietot arī, lai diagnosticētu mutes dobuma audzēju [7].

Savukārt pētījumā Brazīlijā izmantoja mutes pašizmeklēšanas principu ļoti augsta riska grupai – Fankonī anēmijas pacientiem. Metodes jutīgums bija 43%, bet

specifitāte – 44% pacientu. Pētījumā tika uzsvērts: lai arī pacienti ziņoja, ka mutes pašizmeklēšana ir vienkārša, lielākā daļa tehniku neizmantoja pareizi. Neskatoties uz precizitātes trūkumu, pētījuma rezultāti liecināja, ka šo neinvazīvo un samērā lēto metodi var lietot agrīnai mutes dobuma audzēja diagnosticēšanai Fankonī anēmijas pacientiem [10].

Izglītojošas programmas ir nepieciešamas arī veselības speciālistiem. Ziemeļvācijā veiktā pētījumā 2008.–2009. gadā zobārstiem piedāvāja izglītojošu tālākizglītības programmu, lai uzlabotu zināšanas par mutes dobuma audzējiem. Pirms programmas tikai 50% zobārstu uzskatīja, ka viņu zināšanas ir atbilstošas. Savukārt pēc izglītojošās programmas, kas ietvēra mutisku prezentāciju, plakātus un informatīvu DVD, jau 62% zobārstu domāja, ka viņiem ir pietiekošas zināšanas. Šis pētījums parāda tālākizglītības nozīmi zobārstu kompetences uzlabošanā [17]. Pētījuma rezultātus arī izmantoja, lai salīdzinātu zobārstu un sabiedrības zināšanas par mutes dobuma audzēju, kuras izrādījās nepietiekamas. Piemēram, tikai 47% zobārstu un 27% sabiedrības locekļu zināja, ka sākuma stadijās mutes dobuma audzējs ir asimptomātisks. Arī zināšanas par riska faktoriem nebija pietiekamas [18].

Nākas secināt, ka novēlotas diagnosticēšanas iemesli var būt saistīti gan ar medicīnas darbinieku nepietiekamu izglītību par mutes dobuma ļaundabīgajiem audzējiem, gan ar to, ka sabiedrībai trūkst vispārīgas un pieejamas informācijas par mutes dobuma audzējiem. Nozīme ir arī valsts veselības politikai un tās atbalstam veselības izglītībai un skrīninga programmām.

## Medicīnas darbinieki, kuri varētu veikt skrīningu

Pastāv uzskats, ka zobārstiem vajadzētu pārbaudīt gļotādu katram pacientam zobu apskates laikā [8, 17]. Arī apmācīti zobārsta palīgi var veikt skrīningu. Skrīningu efektivitāti zobārsta vizītes laikā samazina tas, ka augsta riska pacienti parasti nav regulāri zobārsta apmeklētāji. Ir pierādīts – jo augstāks risks pacientam saslimt ar mutes dobuma audzēju, jo lielāka iespēja, ka pacients retāk dodas uz regulārām zobārsta vizītēm. Īpaši tas raksturīgs smēķētājiem. Pacienti ar tādiem riska faktoriem kā, piemēram, liels alkohola patēriņš un smēķēšana, visticamāk, retāk veiks profilaktiskās veselības pārbaudes [8, 41].

Riska pacienti var būt neregulāri zobārsta apmeklētāji, taču viņi tāpat var apmeklēt citus ārstus, tādēļ arī ģimenes ārstus vajadzētu iesaistīt mutes dobuma audzēja skrīningā [8, 41]. Tomēr ģimenes ārsti bieži neveic mutes dobuma gļotādas izmeklējumus, tas varētu būt saistīts ar pārliecības trūkumu par savām zināšanām mutes dobuma audzēja izmeklējumos [8, 12]. Tādēļ nepieciešams uzlabot medicīnas un zobārstniecības skolu apmācību par šīm saslīmšanām [12].

Kanādā veiktā retrospektīvajā pētījumā, kas apskatīja, kādā veidā pacientam tika diagnosticēts mutes dobuma audzējs, tika parādīts, ka lielākā daļa pacientu (66%) tika nosūtīti no ģimenes ārsta, 24,7% – no zobārsta vai mutes ķirurga, 9,5% – no cita speciālista. Veicot skrīningu, zobārstniecības speciālisti diagnosticēja 15% gadījumu, savukārt ģimenes ārsti skrīninga laikā diagnosticēja tikai 1,4% audzēju [12].

Pētījumi rāda, ka lielākā daļa pacientu (vairāk nekā 70%) simptomu gadījumā drīzāk ietu pie ģimenes ārsta, bet mazāk nekā puse – pie zobārsta [41].



Ir pētījumi, kuru rezultāti liecina, ka skrīningu varētu veikt arī medicīnas māsas, jo viņām ir lielāka saskarsme ar gados vecākiem cilvēkiem, kā arī viņu darbs ir vairāk saistīts ar veselības veicināšanu un slimību profilaksi [15].

Tātad mutes dobuma gļotādas skrīnings jāveic ne tikai zobārstiem, bet arī ģimenes ārstiem, jo mutes dobuma ļaundabīgo audzēju riska grupai piederošie indivīdi retāk apmeklē zobārstu. Lai uzlabotu ģimenes ārstu zināšanas par mutes dobuma gļotādas izmeklējumiem, nepieciešama ģimenes ārstu papildu apmācība. Skrīningu var veikt arī zobārsta palīgi un medicīnas māsas.

## Izmantotā literatūra

1. Aggarwal, S., Devaraja, K., Sharma, S. C., & Das, S. N. (2014). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 436, pp. 35-40.
2. Ahmed Haji Omar, A., Haglund, C., Virolainen, S., Häyry, V., Atula, T., Kontio, R., ... Hagström, J. (2015). MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 119(4), pp. 459-467.
3. Bagan, J., Sarrion, G., & Jimenez, Y. (2010). Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology*, 46(6), pp. 414-417.
4. Carlos de Vicente, J., Herrero-Zapatero, A., Fresno, M. F., & López-Arranz, J. S. (2002). Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncology*, 38(3), pp. 301-308.
5. Chang, I.-H., Jiang, R.-S., Wong, Y.-K., Wu, S.-H., Chen, F.-J., & Liu, S.-A. (2011). Visual screening of oral cavity cancer in a male population: experience from a medical center. *Journal of the Chinese Medical Association, JCMS*, 74(12), pp. 561-566.
6. Dodd, V. J. (2015). Existing Screening Methods for Oral Cancer are Generally Acceptable to Patients in Non-dental Settings. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 15(2), pp. 61-63.
7. Elango, K. J., Anandkrishnan, N., Suresh, A., Iyer, S. K., Ramaiyer, S. K., & Kuria-kose, M. A. (2011). Mouth self-examination to improve oral cancer awareness and early detection in a high-risk population. *Oral Oncology*, 47(7), pp. 620-624.
8. Ford, P. J., & Farah, C. S. (2013). Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. *Journal of Cancer Policy*, 1(1-2), e2-e7.
9. Fotopoulos, G., & Pavlidis, N. (2015). The role of human papilloma virus and p16 in occult primary of the head and neck: a comprehensive review of the literature. *Oral Oncology*, 51(2), pp. 119-123.
10. Furquim, C. P., Pivovar, A., Cavalcanti, L. G., Araújo, R. F., Sales Bonfim, C. M., & Torres-Pereira, C. C. (2014). Mouth self-examination as a screening tool for oral cancer in a high-risk group of patients with Fanconianemia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 118(4), pp. 440-446.
11. Graveland, A. P., Bremmer, J. F., de Maaker, M., Brink, A., Cobussen, P., Zwart, M., ... Brakenhoff, R. H. (2013). Molecular screening of oral precancer. *Oral Oncology*, 49(12), pp. 1129-1135.
12. Groome, P. A., Rohland, S. L., Hall, S. F., Irish, J., Mackillop, W. J., & O'Sullivan, B. (2011). A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. *Oral Oncology*, 47(7), pp. 642-647.
13. Güneri, P., & Epstein, J. B. (2014). Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. *Oral Oncology*, 50(12), pp. 1131-1136.

14. Hapner, E. R., & Wise, J. C. (2011). Results of a large-scale head and neck cancer screening of an at-risk population. *Journal of Voice: Official Journal of the Voice Foundation*, 25(4), pp. 480-483.
15. Haumschild, M. S., Haumschild, R. J., & Holloway, P. L. (2012). The Importance of Oral Cancer Screenings by Nurse Practitioners. *The Journal for Nurse Practitioners*, 8(2), pp. 117-122.
16. Hertrampf, K., Eisemann, N., Wiltfang, J., Pritzkeleit, R., Wenz, H.-J., & Waldmann, A. (2015). Baseline data of oral and pharyngeal cancer before introducing an oral cancer prevention campaign in Germany. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 43(3), pp. 360-366.
17. Hertrampf, K., Wenz, H.-J., Koller, M., Grund, S., & Wiltfang, J. (2013). Early detection of oral cancer: dentists' opinions and practices before and after educational interventions in Northern-Germany. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 41(8), e201-7.
18. Hertrampf, K., Wenz, H.-J., Koller, M., & Wiltfang, J. (2012). Comparing dentists' and the public's awareness about oral cancer in a community-based study in Northern Germany. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40(1), pp. 28-32.
19. Huang, C.-C., Ou, C.-Y., Lee, W.-T., Hsiao, J.-R., Tsai, S.-T., & Wang, J.-D. (2015). Life expectancy and expected years of life lost to oral cancer in Taiwan: a nation-wide analysis of 22,024 cases followed for 10 years. *Oral Oncology*, 51(4), pp. 349-354.
20. Johnstone, S., & Logan, R. M. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36(3), pp. 263-266.
21. Joshi, M. S., Verma, Y., Gautam, A. K., Parmar, G., Lakkad, B. C., & Kumar, S. (2011). Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of Oral Biology*, 56(1), pp. 63-67. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.08.012>
22. Kao, S.-Y., & Lo, W.-L. (2011). Screening for oral cancers – which method is most effective? *Journal of the Chinese Medical Association (JCMA)*, 74(12), pp. 529-530.
23. Katakura, A., Yamamoto, N., Sakuma, T., Sugahara, K., Onda, T., Noguchi, S., & Shibahara, T. (2015). A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 27(1), pp. 1-5.
24. Khan, H., Gupta, S., Husain, N., Misra, S., MPS, N., Jamal, N., & Ghatak, A. (2015). Correlation between expressions of Cyclin-D1, EGFR and p53 with chemoradiation response in patients of locally advanced oral squamous cell carcinoma. *BBA Clinical*, 3, pp. 11-17.
25. Kosunen, A., Pirinen, R., Ropponen, K., Pukkila, M., Kellokoski, J., Virtaniemi, J., ... Kosma, V.-M. (2007). CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 43(1), pp. 51-59.
26. Kugimoto, T., Morita, K., & Omura, K. (2012). Development of oral cancer screening test by detection of squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells. *Oral Oncology*, 48(9), pp. 794-798.
27. Laimer, K., Spizzo, G., Gastl, G., Obrist, P., Brunhuber, T., Fong, D., ... Norer, B. (2007). High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: A TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncology*, 43(2), pp. 193-198.
28. Lane, P., Follen, M., & MacAulay, C. (2012). Has fluorescence spectroscopy come of age? A case series of oral precancers and cancers using white light, fluorescent light at

- 405 nm, and reflected light at 545 nm using the TrimiraIdentafi 3000. *Gender Medicine*, 9(1 Suppl.), S25-35.
29. Liao, L.-J., Chou, H.-L., Lo, W.-C., Wang, C.-T., Chou, H.-W., Chen, C.-D., ... Cheng, P.-W. (2015). Initial outcomes of an integrated outpatient-based screening program for oral cancers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 119(1), pp. 101-106.
  30. Liu, Z., He, Q., Ding, X., Zhao, T., Zhao, L., & Wang, A. (2015). SOD2 is a C-myc target gene that promotes the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma involving cancer stem-like cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 60, pp. 139-146.
  31. Liu, Z., Li, S., Cai, Y., Wang, A., He, Q., Zheng, C., ... Zhou, X. (2012). Manganese superoxide dismutase induces migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via H2O2-dependent Snail signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(1), pp. 44-50.
  32. Lo, W.-Y., Tsai, M.-H., Tsai, Y., Hua, C.-H., Tsai, F.-J., Huang, S.-Y., ... Lai, C.-C. (2007). Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 376(1-2), pp. 101-107.
  33. Macey, R. (2015). An Automated System Targeting Outpatients at High Risk for Oral Cancer Improves Recruitment to Screening Programs for Premalignant or Early-stage Cancerous Lesions. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 15(2), pp. 68-69.
  34. Michailidou, E. Z., Markopoulos, A. K., & Antoniadis, D. Z. (2012). VEGF expression from human dysplastic or malignant oral epithelium may be related to mast cell density and the subsequent angiogenetic phenomena. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41(12), pp. 1467-1473.
  35. Miyamoto, R., Uzawa, N., Nagaoka, S., Hirata, Y., & Amagasa, T. (2003). Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 39(6), pp. 610-618.
  36. Mishra, R. (2013). Cell cycle-regulatory cyclins and their deregulation in oral cancer. *Oral Oncology*, 49(6), 475-81.
  37. Mishra, R., & Das, B. R. (2009). Cyclin D1 expression and its possible regulation in chewing tobacco mediated oral squamous cell carcinoma progression. *Archives of Oral Biology*, 54(10), pp. 917-923.
  38. Nayak, S., Goel, M. M., Chandra, S., Bhatia, V., Mehrotra, D., Kumar, S., ... Agarwal, S. P. (2012). VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 48(3), pp. 233-239.
  39. Nakata, Y., Uzawa, N., Takahashi, K.-I., Sumino, J., Michikawa, C., Sato, H., ... Amagasa, T. (2011). EGFR gene copy number alteration is a better prognostic indicator than protein overexpression in oral tongue squamous cell carcinomas. *European Journal of Cancer*, 47(15), pp. 2364-2372.
  40. Omar, E. (2015). Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma – a systematic review. *Head & Face Medicine*, 11(1), p. 6.
  41. Paudyal, P., Flohr, F. D., & Llewellyn, C. D. (2014). A systematic review of patient acceptance of screening for oral cancer outside of dental care settings. *Oral Oncology*, 50(10), pp. 956-962.
  42. Price, K. A. R., & Cohen, E. E. W. (2015). Mechanisms of and therapeutic approaches for overcoming resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Oral Oncology*, 51(5), pp. 399-408.
  43. Rabinowits, G., & Haddad, R. I. (2012). Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncology*, 48(11), pp. 1085-1089.

44. Rethman, M. P., Carpenter, W., Cohen, E. E. W., Epstein, J., Evans, C. A., Flaitz, C. M., ... Meyer, D. M. (2010). Evidence-Based Clinical Recommendations Regarding Screening for Oral Squamous Cell Carcinomas. *The Journal of the American Dental Association*, 141(5), pp. 509-520.
45. Salehinejad, J., Sharifi, N., Amirchaghmaghi, M., Ghazi, N., Shakeri, M. T., & Ghazi, A. (2014). Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. *Annals of Diagnostic Pathology*, 18(4), pp. 210-213.
46. Sankaranarayanan, R., Ramadas, K., Thara, S., Muwonge, R., Thomas, G., Anju, G., & Mathew, B. (2013). Long term effect of visual screening on oral cancer incidence and mortality in a randomized trial in Kerala, India. *Oral Oncology*, 49(4), pp. 314-321.
47. Scott, S. E., Khwaja, M., Low, E. L., Weinman, J., & Grunfeld, E. A. (2012). A randomized controlled trial of a pilot intervention to encourage early presentation of oral cancer in high risk groups. *Patient Education and Counseling*, 88(2), pp. 241-248.
48. Sella, T., Boursi, B., Gat-Charlap, A., Aroch, I., Liberman, E., Moshkowitz, M., ... Arber, N. (2013). One stop screening for multiple cancers: the experience of an integrated cancer prevention center. *European Journal of Internal Medicine*, 24(3), pp. 245-249.
49. Seoane Lestón, J., & Diz Dios, P. (2010). Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncology*, 46(6), pp. 418-422.
50. Shuman, A. G., McKiernan, J. T., Thomas, D., Patel, P., Palmer, F. L., Shaffer, B. T., ... Boyle, J. O. (2013). Outcomes of a head and neck cancer screening clinic. *Oral Oncology*, 49(12), pp. 1136-1140.
51. Sivadasan, P., Gupta, M. K., Sathe, G. J., Balakrishnan, L., Palit, P., Gowda, H., ... Sirdeshmukh, R. (2015). Human salivary proteome – a resource of potential biomarkers for oral cancer. *Journal of Proteomics*, 127, pp. 89-95.
52. Slouka, Z., Senapati, S., Shah, S., Lawler, R., Shi, Z., Stack, M. S., & Chang, H.-C. (2015). Integrated, DC voltage-driven nucleic acid diagnostic platform for real sample analysis: Detection of oral cancer. *Talanta*, 145, pp. 35-42.
53. Stefanuto, P., Doucet, J.-C., & Robertson, C. (2014). Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(4), pp. 424-429.
54. Takahashi, K.-I., Uzawa, N., Myo, K., Okada, N., & Amagasa, T. (2009). Simultaneous Assessment of Cyclin D1 and Epidermal Growth Factor Receptor Gene Copy Number for Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Oral Science International*, 6(1), pp. 8-20.
55. Thomas, J., & Primeaux, T. (2012). Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Annals of Diagnostic Pathology*, 16(2), pp. 91-99.
56. Virós, D., Camacho, M., Zarraonandia, I., García, J., Quer, M., Vila, L., & León, X. (2013). Prognostic role of MMP-9 expression in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. *Oral Oncology*, 49(4), 322-325.
57. Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 427, pp. 79-85.
58. Wasyluk, B., Abecassis, J., & Jung, A. C. (2013). Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? *Oral Oncology*, 49(10), e33-7.
59. Won, H. S., Jung, C.-K., Chun, S. H., Kang, J.-H., Kim, Y.-S., Sun, D.-I., & Kim, M.-S. (2012). Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 48(10), pp. 985-990.

## **Summary**

*The aim of the current article is to describe the importance of the early diagnosis, the screening methods of the oral cancer and the causes of the delayed diagnosis.*

*More than two-thirds of the oral cancer cases are diagnosed at advanced stages. The early diagnosis of the oral cancer is important to facilitate the treatment, to improve the outcome of the treatment and to improve the patient survival.*

*The visual and palpation examination of oral cavity is the “golden standard” in the screening of oral pre-cancer and cancer. The diagnosis can be improved using adjunctive screening aids like toluidine blue, exfoliative cytology, saliva analysis and light-based detection systems. Guidelines do not exist for the use of the adjuncts. In future, the technology developments can improve the research of the tissue and saliva biomarkers that are important in the development of cancer.*

*The problem of the delayed diagnosis should be solved not only by developing new diagnostic methods, but also by educating the public and medical staff about the risk factors and clinical features of the oral cancer. The screening programmes targeted at high-risk population could help to diagnose precancerous lesions and oral cancer at the early stage.*

**Keywords:** *oral cancer, early diagnosis, screening, biomarkers, oral pathology.*

## Kapoši sarkoma klīniskajā praksē Latvijā *Kaposi sarcoma in clinical practice in Latvia*

Jelizaveta Žavoronkova,<sup>1</sup> Valentīna Gordjušina,<sup>1</sup>  
Inga Januškeviča,<sup>2</sup> Baiba Rozentāle<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: [sonie@inbox.ru](mailto:sonie@inbox.ru); [Valentina.Gordjusina@lu.lv](mailto:Valentina.Gordjusina@lu.lv)

<sup>2</sup> RAKUS stacionārs „LIC”  
Linezera iela 3, Rīga, LV-1006

E-pasts: [Inga.Januskevica@aslimnica.lv](mailto:Inga.Januskevica@aslimnica.lv)

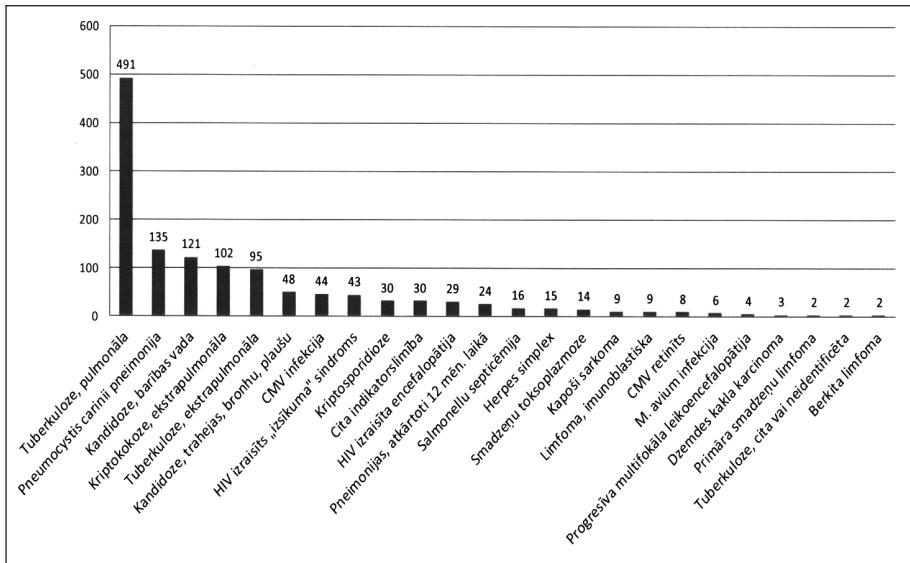
Šī apskata raksta mērķis bija uzsvērt, ka Kapoši sarkoma kā iegūtā imūndeficīta sindroma indikatorslimība nemaz nav tik reta slimība. Iepriekš minēto faktu apstiprina Latvijas Infektoloģijas centrā nesen veiktais pētījums, kur divu gadu laikā histoloģiski tika verificēti 14 Kapoši sarkomas gadījumi. Pētījumā tika pierādīta statistiski nozīmīga korelācija starp dzīvildzi un antiretrovirālo terapiju un ķīmijterapiju. Rakstā aprakstītais veiksmīgais Kapoši sarkomas klīniskais gadījums arī ļauj prognozēt pacienta ilgāku dzīvildzi, pateicoties tam, ka slimības gaitā notiek agrīna iejaukšanās.

**Atslēgvārdi:** Kapoši sarkoma, Kapoši sarkomas herpesvīruss, cilvēka imūndeficīta vīruss, iegūts imūndeficīta sindroms, atipiskas vārpstveida šūnas.

### Kapoši sarkomas statistika Latvijā

Analizējot Slimību profilakses un kontroles centra (SPKC) datus, Kapoši sarkoma (KS) iegūta imūndeficīta sindroma (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) indikatorslimību sarakstā ir 16. vietā ar 9 gadījumiem no 1990. līdz 2012. gadam (1. attēls).

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS) stacionāra „Latvijas infektoloģijas centrā” (LIC) no 2013. gada janvāra līdz 2015. gada martam tika veikts pētījums, kura mērķis bija noteikt HIV inficēto pacientu ar Kapoši sarkomu skaitu Latvijā, vidējo pacientu vecumu, dzimumu un laiku starp cilvēka imūndeficīta vīrusu (*human immunodeficiency virus*, HIV) un Kapoši sarkomas diagnozi, KS stadiju, ārstēšanas taktiku un tās efektivitāti. Pētījumā tika iekļauti pacienti tikai ar histoloģiski verificētu KS (šī pētījuma rezultāti tika prezentēti piektajā Eirāzijas Dermatovenerologu asociācijas kongresā Rīgā 2015. gadā). Kopumā šajā laika posmā tika noteikti 14 histoloģiski pierādīti KS gadījumi. Vidējais pacientu vecums bija 33,3 gadi ± 8,5 gadi ar vīriešu dominanci (79% jeb



1. attēls. Latvijā biežāk sastopamās AIDS indikatorslimības no 1990. līdz 2012. gadam (Slimību profilakses un kontroles centra dati)

Figure 1. Most frequently presented AIDS indicator diseases from 1990 to 2012 (The Centre for Disease Prevention and Control (CDPC) of Latvia)

11 pacienti). Puse no pacientiem (50% jeb 7 personas) Kapoši sarkomas diagnozes noteikšanas brīdī bija dzīvi. Tika noteikts vidējais laiks starp HIV un KS noteikšanas diagnozi (7,5 mēneši), kā arī starp KS noteikšanu un nāvi (4 mēneši). Vidējais CD4 šūnu skaits KS diagnosticēšanas brīdī bija 115 šūnas/mm<sup>3</sup>. No biežākām Kapoši sarkomas lokalizācijām jāatzīmē ekstremitātes (57% jeb 8 pacienti) un iekšējie orgāni (50% jeb 7 pacienti). Tika novērota arī statistiski nozīmīga korelācija starp dzimumu un nāvi ( $\chi^2 = 3,8, p = 0,05$ ), starp iekšējo orgānu bojājumu un nāvi (OR 36,0; CI 95% 1,8–718,7,  $p = 0,026$ ). Kā arī statistiski nozīmīga korelācija tika atrasta starp dzīvildzi un antiretrovirālo terapiju ( $\chi^2 = 5,6, p = 0,018$ ) un ķīmijterapiju ( $\chi^2 = 7,8, p = 0,005$ ).

## Klīniskais gadījums

29 gadu vecs pacients 2013. gada 9. janvārī vērsies RAKUS stacionārā LIC 2. HIV/AIDS ambulatorajā nodaļā sakarā ar pozitīvu HIV testu, ko pats nolēma pārbaudīt anonīmi. Pozitīva rezultāta dēļ stājās uzskaitē ar diagnozi HIV I B III stadija. Imunoloģiskie rādītāji, stājoties uzskaitē: CD4 – 122 šūnas/mm<sup>3</sup> (N 700–1100), HIV RNS slodze – 8,06 E5 kopijas/ml (N < 20 kopijas/ml). No dzīves anamnēzes: dzīvo Rīgā, pabeigta augstākā izglītība, strādā profesijā, homoseksuāli orientēts, i/v narkotiku un alkohola lietošanu noliedz.

Pēc papildu analīzēm pacientam ir negatīvi anti-HCV, HBsAg un antivielas pret *T. pallidum*.



Šā paša gada 14. janvārī pieprasīta dermatologa konsultācija un veikta diagnostiska ādas biopsija sakarā ar nelielu ādas defektu kreisā vaiga rajonā (2. attēlā) ar aizdomām par Kapoši sarkomu. Patohistoloģiskais slēdziens: morfoloģiskā un imūnhistoķīmiskā aina atbilst Kapoši sarkomai.



2. attēls. Vairāki violeti dažādas formas ādas defekti (LIC arhīva bilde)

*Figure 2. Several various forms of violet skin defects  
(illustration from the Latvian Centre of Infectious Diseases archive)*

LIC infektologu konsilijs (29.01.2013.) nosaka galīgo diagnozi – HIV I C III stadija Kapoši sarkoma – un piemēro šādu antiretrovirālo terapiju (ART): Efavirenzs 600 mg pa 1 tabletei 1 reizi dienā un Tenofovīrs/Emtricitabīns 200/245 mg pa 1 tabletei 1 reizi dienā. Tā kā bija pazemināts CD4 šūnu skaits un pastāvēja oportūnistisko infekciju risks, pacientam profilaktiski tika izrakstīts arī Trimetoprimis/Sulfametoksazols 480 mg pa 1 tabletei 1 reizi dienā. Sakarā ar Kapoši sarkomu pacientam tika rekomendēta onkologa konsultācija.

LOC onkologu konsilijs nolēma, ka slimniekam jāsaņem pegilētais liposomālais doksorubicīns un radikāla staru terapija fotonu režīmā RD = 2Gy, SD = 40Gy, 20 – frakcijās. Papildu doza tika pievadīta uz diviem lielākiem veidojumiem pie kreisās auss tuvākuma RTG režīmā RD = 2Gy, SD = 46Gy (3. attēls).

2013. gada 20. martā tika veikti papildu izmeklējumi – augšējā endoskopija un kolonoskopija ar biopsiju. Augšējās endoskopijas laikā ar ureāzes eksprestestu ir pierādīta *H. pylori* un vizualizējams kuņģa gļotādas hiperplastisks polips. Kolonoskopijas laikā redzamu patoloģiju nevizualizē. Resnās zarnas gļotādas biopsijas materiālā vēro erozijas; kolīta pazīmes nekonstatē.





3. attēls. Ādas defektu regresija pēc staru terapijas kursa (LIC arhīva bilde)

*Figure 3. The regression of skin defects after radiation therapy (illustration from the Latvian Centre of Infectious Diseases archive)*

Onkologu slēdziens pēc staru terapijas kursa pabeigšanas (24.04.2013.): Kapoši sarkoma. Stāvoklis pēc staru terapijas. HIV infekcija. Neskaidra rakstura anēmija. Pancitopēnija.

Pacientam ir sniegtas šādas rekomendācijas:

- kontrole pie infektologa pēc 10 dienām ar asins analīzēm;
- hematologa konsultācija sakarā ar anēmiju;
- kontrole pie staru terapeita pēc 3 mēnešiem.

2013. gada 27. maijā slimniekam laboratoriski tika atklāta HIV-1 rezistence pret nenuklozīdu reversās transkriptāzes inhibitoriem, nukleozīdu reversās transkriptāzes inhibitoriem un proteāzes inhibitoriem.

2013. gada 28. maijā LIC infektologu konsilijs sakarā ar atklātu HIV-1 rezistenci nomaina ART pret šādiem medikamentiem:

- *Atazanavir* 300 mg – 1 tablete 1 reizi dienā;
- *Ritonavir* 100 mg – 1 tablete 1 reizi dienā;
- *Tenofovir* 245 mg – 1 tablete 1 reizi dienā;
- *Etravirin* 100 mg – 2 tabletes 2 reizes dienā.

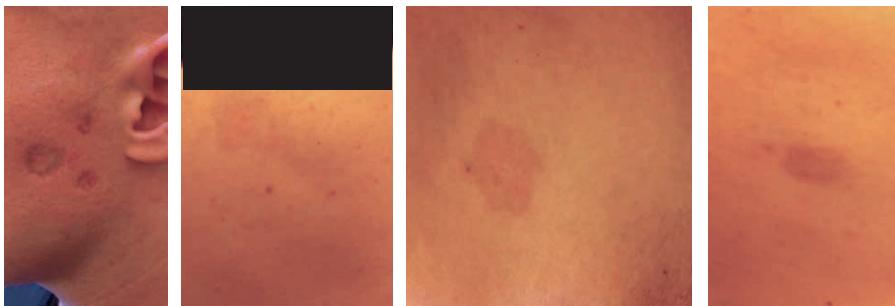
Uzsākot jauno ārstēšanas shēmu, pacientam tika novērota pozitīva Kapoši sarkomas dinamika, ko apstiprina ādas defektu regresija (4.–6. attēls), jauno defektu trūkums un imunoloģiskie rādītāji: CD4 – 299 šūnu/mm<sup>3</sup> (27.12.2013.), HIV-RNS vīrusa slodze < 20 kopijas/ml (jeb vīruss ir nenosakāms). Defektu novēršanai pacients veica arī dažādas kosmetoloģiskas procedūras.



4. attēls. Kontroles vizīte 2013. gada maijā (LIC arhīva bilde)

*Figure 4. Control visit in May, 2013*

*(illustration from the Latvian Centre of Infectious Diseases archive)*



5. attēls. Kontroles vizīte 2014. gada februārī (LIC arhīva bilde)

*Figure 5. Control visit in February, 2014*

*(illustration from the Latvian Centre of Infectious Diseases archive)*



6. attēls. Kontroles vizīte 2014. gada septembrī (LIC arhīva bilde)

Figure 6. Control visit in September, 2014

(illustration from the Latvian Centre of Infectious Diseases archive)

## Slimības etioloģija

Kapoši sarkoma (multipla hemorāģiska idiopātiska Kapoši sarkoma, Kapoši angiosarkoma, ādas angioendotelioma) – ļaundabīgs audzējs, kas attīstās no *vārpstveida* formas endotēlijšūnām, kuras izklāj asinsvadus un limfvadus [1].

Kapoši sarkomas etioloģiju saista ar Kapoši sarkomas herpesvīrusu (KSHV), ko sauc arī par cilvēka herpesvīrusu 8 (*human herpesvirus-8*, HHV-8) [2].

Kapoši sarkomas kofaktori galvenokārt ir imūnsupresija (HIV/AIDS, kortikosteroīdu lietošana, diabēts), vīriešu dzimums, Vidusjūras, Tuvo Austrumu vai Āfrikas zonas iedzīvotāji, paaugstināta dažādu citokīnu un augšanas faktoru ekspresija, ieskaitot audzēja nekrozes faktoru  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleikīnu-6 (IL-6), bāzisko fibroblastu augšanas faktoru (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), HIV-tat proteīnu un onkostatīnu M [1].

## Epidemioloģija un dzīvildze

Vairāki seroloģiskie pētījumi pierādīja, ka ir atrodama tieša saistība starp HHV-8 infekciju un Kapoši sarkomas incidenci. Dati arī pierādīja svarīgu ģeogrāfisku dažādību HHV-8 prevalencē. Kopumā par zemu prevalenci tika ziņots Ziemeļamerikā, Ziemeļeiropā un Āzijā; mērena seroprevalence ir novērota Austrumeiropā, Vidusjūras un Karību valstīs. Augsta seroprevalence tika pierādīta Centrālāfrikā (Uganda, Zambija) un Dienvidāfrikā [3].

Kapoši sarkomu novēro mazāk nekā 1% no kopējas pasaules populācijas. Aptuveni 1 no 200 transplantāta recipientiem ASV attīstās Kapoši sarkoma [4].

Piecu gadu dzīvildze pacientiem ar diagnosticētu audzēju ir 72% slimnieku. Efektīvākā HIV/AIDS ārstēšana uzlabo dzīvildzes rādītājus, gan ārstējot infekcijas, kas ir saistītas ar HIV/AIDS, gan Kapoši sarkomu [4].

Ar AIDS saistītai Kapoši sarkomai, atšķirībā no citām Kapoši formām, ir agresīvāka klīniskā gaita. Ja pacients saņem antiretrovirālu terapiju, viņa slimībai ir vairāk indolenta, lēni progresējoša gaita vai tā var spontāni regresēt. Visbiežākais nāves cēlonis pacientiem ar KS ir plaušu asiņošana [1].

## Transmisija

Kapoši sarkomas herpesvīruss izplatās dažādos ceļos: orālā, seksuālā ceļā, ar pārlietām donoru asinīm vai transplantējot inficēto orgānu. Vīruss tika atrasts arī krūts pienā un mātes siekalās, tas apstiprina to, ka bērni iegūst herpesvīrusu no mātes orālā ceļā [5].

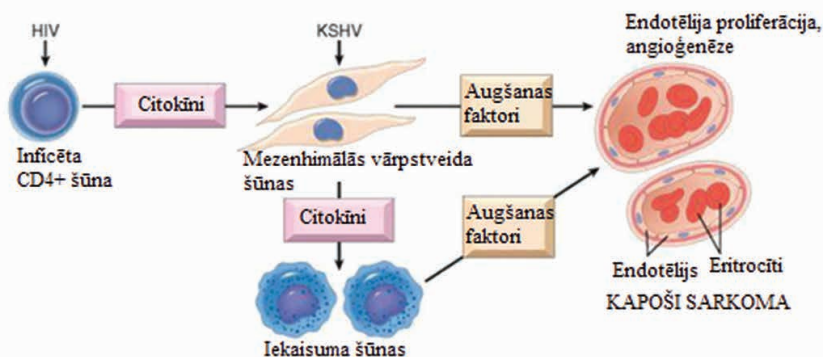
## Klasifikācija

Kapoši sarkoma tiek klasificēta četros klīniskos tipos, kuri ir novērojami noteiktās cilvēku populācijās: klasiska (hroniska vai Eiropas) KS, endēmiska (Āfrikas vai limfadenopātiska) KS, jatroģēna (vai saistīta ar imūnsupresiju) KS un epidēmiska (vai saistīta ar AIDS). Visi Kapoši sarkomas tipi ir saistīti ar HHV-8 infekciju un atšķiras pēc primārā audzēja lokalizācijas un slimības progresijas ātruma [3].

1. **Klasiska Kapoši sarkoma** ir raksturīga Austrumeiropas, Vidusjūras un aškenazi ebreju izcelsmes vecākiem cilvēkiem, un tā nav bieža Ziemeļamerikā. Tas ir lēni augošs audzējs, kas tipiski izpaužas kā solitārs vai multifokāls ādas bojājums apakšējās ekstremitātēs. Sistēmiska progresija ir reta, un iekšējo orgānu bojājumus novēro mazāk nekā 10% gadījumu. Trūkst HIV koinfekcijas.
2. **Endēmiskā Kapoši sarkomā** ietilpst 2 slimības apakštipi: Āfrikas ādas un Āfrikas limfadenopātiska slimība. Endēmiska Kapoši sarkoma ir agresīvāka un kopumā ietekmē endēmiskas Āfrikas valstis. Šis slimības tips nav saistīts ar HIV infekciju. Bieži novēro ādas un nodulāru manifestāciju, sistēmiskas izpausmes novēro retāk. Parasti tā ir bērnu un jaunu cilvēku slimība.
3. **Jatroģēna Kapoši sarkoma** ietekmē indivīdus ar novājinātu imunitāti pēc orgānu transplantācijas vai imūnsupresējošas terapijas lietošanas gadījumā. Tādiem pacientiem tipiskus ādas bojājumus ar slimības sistēmisku progresiju novēro aptuveni 50% gadījumu. Pacientiem, kuriem Kapoši sarkoma attīstījusies pēc transplantācijas, lietotu medikamentu devas samazināšana vai medikamentu atcelšana bieži noveda pie audzēja regresijas vai dažos gadījumos pie pilnīgas slimības atrisināšanās. Šis tips arī attīstās bez HIV koinfekcijas.
4. **Epidēmiska vai ar HIV saistīta Kapoši sarkoma** ir biežākais slimības tips ASV. Tā var attīstīties jebkurā HIV infekcijas stadijā, bet biežāk uz smagas imūnsupresijas fona. Klīniskas izpausmes ir līdzīgas iepriekšējam tipam ar ādas bojājumiem un iekšējo orgānu bojājumu slimības progresijas gadījumā [3, 6].

## Slimības patoģenēze

Kapoši sarkomas attīstībai nepietiek tikai ar to, ka inficējas ar Kapoši sarkomas herpesvīrusu, ir nepieciešami papildu faktori. Ar AIDS saistītajā Kapoši sarkomas gadījumā tas noteikti ir HIV. (Atbilstošie kofaktori HIV negatīvai KS paliek nezināmi.) Visvieglākais modelis ir tāds, ka HIV mediēta imunitātes supresija pieļauj KSHV plašu disemināciju saimnieka organismā, ļaujot iesaistīt vairāk vārpstveida endotēlijšūnu un virzot tās uz nekontrolētu vairošanos. Cita ideja ir tāda, ka ar HIV inficētas T šūnas producē citokīnus, citus proteīnus, kuri sekmē vārpstveida šūnu proliferāciju un izdzīvošanu (7. attēls). Skaidrs, ka šie abi varianti neizslēdz viens otru [6].



7. attēls. **Postulēta Kapoši sarkomas patoģenēze.** Piedāvāta HIV, KS herpesvīrusa (KSHV; HHV-8) un citokīnu loma KS attīstībā. Citokīnus producē ar KSHV inficētas mezenhimālās šūnas vai ar HIV inficētas CD4+ šūnas. B šūnas arī var būt inficētas ar KSHV, bet to loma KS nav zināma [7]

*Figure 7. Postulated pathogenesis of Kaposi's sarcoma. Proposed roles of HIV, KS herpesvirus (KSHV; HHV8), and cytokines in the development of KS. Cytokines are produced by mesenchymal cell infected by KSHV, or by HIV-infected CD4+ cells. B cells may also be infected by KSHV; they are the probable cells in body cavity lymphomas, also associated with KSHV infection, but their role in KS is unclear*

Ilgstoša Kapoši sarkomas herpesvīrusa persistēšana organismā sākumā izraisa hroniska iekaisuma procesu ar humorālu imunitāti (T-helperu 2 mediēta atbilde), kam seko šūnas imunitātes (T-helperu 1 mediēta atbilde) samazināšanās [8].

Kopumā Kapoši sarkomas patoģenēzes centrā ir sarežģīta imūna disregulācija, kura ietver celulārās un humorālās imunitātes defektus un asinsvadu endotēlija augšanas faktora anomālijas [1].

## Klīnika

**Mukokutānā Kapoši sarkoma.** Tā ir visbiežākā KS forma. Perēkļi uz ādas var izskatīties kā plankumi, mezgliņi vai audzēja veida elementi: dažāda izmēra un formas infiltratīvas pangas ar papilomatoziem izaugumiem. Parasti pacienti sūdzas par sāpēm, dedzināšanu mezglos, infiltrātos; sāpes pastiprinās, veidojoties čūlai. Sāpju raksturs ir paroksizmiāls vai pastāvīgs, pastiprinās nakts laikā. Locītavu funkciju traucējums ir saistīts ar tūsku un periartikulāro audu infiltrāciju [9].

Kapoši sarkomas elementi var lokalizēties jebkur uz ķermeņa [5]. Tomēr visbiežāk ir skartas apakšējās ekstremitātes, jāatzīmē arī liels veidojumu skaits, izplatība un simetriskums. Primārā audzēja perēkļu lokalizācija var liecināt par labdabīgu un lēnu slimības attīstību [9].

Plankumiem, pangām un mezgliņiem krāsu piešķir sarecējušas asinis, kas ir daudzu asinsvadu plānu un trauslu sienu traumatizācijas sekas, ko rada, piemēram, apģērbu berzēšana [9].

KS bieži pavada tūskas, kas tipiski neveido bedrīti pēc uzspiešanas. Biežāk tūska attīstās uz apakšējām ekstremitātēm, retāk uz ģenitālīgām, periorbitālajā apvidū (ar sekojošiem redzes traucējumiem), augšējām ekstremitātēm un uz ķermeņa [5, 9].

Kapoši sarkomai izšķir 3 klīniskas stadijas: 1 – plankumaina, 2 – papulozā, 3 – nodulāra.

*Plankumaina.* Visagrākā stadija. Plankumi ir mazi, var būt sarkanīgi, rozīgi, violeti vai brūni, diametrā no 1 līdz 5 mm, bet var būt lielāki, nepareizas formas ar gludu virsmu [9]. Šie perēkļi var būt nemanāmi. Tie var atrasties uz ādas, mutes gļotādas, limfvadiem un iekšējiem orgāniem. Retos gadījumos pacientam ir vienīgs ādas perēklis, bieži uz galvas, kakla vai uz pēdas (8. attēls) [10].

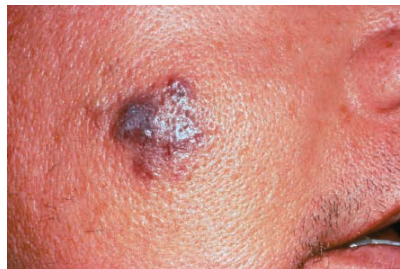
*Papulozā.* Šajā stadijā biežāk parādās izolēti elementi ar blīvu elastisku konsistenci; eritematozi vai ar violetu nokrāsu. Tiem ir sfēriska vai pussfēriska forma (9. attēls), diametrs – no 2 mm līdz 1 cm. Saplūstot papulām, veidojas pangas plankanā vai puslodes formā. Pangu virsma ir gluda vai raupja (līdzīga apelsīnu mizai) [9]. Aprakstītās ādas izmaiņas mēdz būt grūti atšķiramas no granulācijas audiem, un tās tipiski novietojas uz distālām apakšējām ekstremitātēm [6].

*Nodulāra.* Veidojas solitāri vai multipli mezgli diametrā no 1 līdz 5 cm sarkanā, violetā, rozā, brūnā krāsā, ir iespējama šo krāsu kombinācija (10. attēls). Mezgliem ir mīksta vai blīvi elastīga konsistence, tendence uz saplūšanu un čūlas veidošanu [9].



8. attēls. Klasiskās Kapoši sarkomas plankumaina stadija: plankumi un makulas no sarkana līdz brūnam, neregulāras formas [11]

*Figure 8. Patch stage of classic KS: plaques and macules from red to brownish, of irregular shape*



9. attēls. Kapoši sarkoma. Vienīgā violetas krāsas panga uz sejas HIV pozitīvam pacientam [12]

*Figure 9. Kaposi sarcoma. A single purple patch is seen on the face of an HIV-positive patient*





10. attēls. Kapoši sarkomas nodulārā stadija. Cieto aukslēju zilgansarkans nodulārs veidojums [13]

Figure 10. Kaposi sarcoma. Nodular stage. Bluish-red nodular formation of the hard palate

**Iekšējo orgānu Kapoši sarkoma.** Bieži novēro arī limfmezglu iesaisti, un limfadenopātija var būt vienīgais slimības perēklis. Kapoši sarkoma ingvinālajos limfmezglos bieži ir saistīta ar apakšējo ekstremitāšu tūsku [5]. Klīniskas Kapoši sarkomas izpausmes ir atspoguļotas tabulā.

Tabula. Saslimstība un klīniskas izpausmes HIV inficētiem slimniekiem

Table. Incidence and clinical manifestations in HIV-infected patients

| Lokalizācija          | Biežums* | Klīniskas izpausmes   |
|-----------------------|----------|---|
| Āda                   | > 95%    | Purpursārti vai melni-brūni mezgliņi uz ādas vai gļotādas ± tūska   |
| Mutes dobums          | 30%      | Parasti uz aukslējām vai smaganām   |
| Kuņģa un zarnu trakts | 40%      | Sāpes, asiņošana vai obstrukcija<br>• vairākumā gadījumu norit asimptomātiski<br>Vairākumā gadījumu pacientiem ir KS elementi uz ādas<br>• var attīstīties jebkurās stadijās  |
| Plaušas               | 20–50%   | Elpas trūkums, klepus, svilpojoša elpošana, asins spļaušana; iespējams plaušu parenhīmas bojājums, bronhu gļotādas bojājums, izsvīdums pleirā. Pleiras izsvīdums ir serozihemorāģisks, citoloģiska izmeklēšana ir negatīva. Krūškurvī rentgenoloģiski novēro difūzus vai mezglainus infiltrātus |

\* Saslimstības biežums HIV inficētiem pacientiem ar Kapoši sarkomu ar jebkuru anatomisku lokalizāciju (adaptēts no [9]).

\* Incidence in HIV-infected patients with Kaposi sarcoma with any anatomic localization.

Tabulā minētie simptomi var attīstīties arī HIV neinficētiem pacientiem. Dažreiz plaušu simptomi, kā klepus, dispnoja, hemoptīze, sāpes krūtī, pleiras izsvīdums, var būt grūti atšķirami no oportūnistiskās infekcijas.

Vismaz 1/3 pacientu attīstās sekundārās neoplāzijas, visbiežāk ne-Hodžkina limfoma[1].

Kapoši sarkoma jādiferencē no hemangiomas, dermatīta, dermohipodermālā vaskulīta, hemangiopericitomas un dermatofibrosarkomas [14].

## Diagnostika

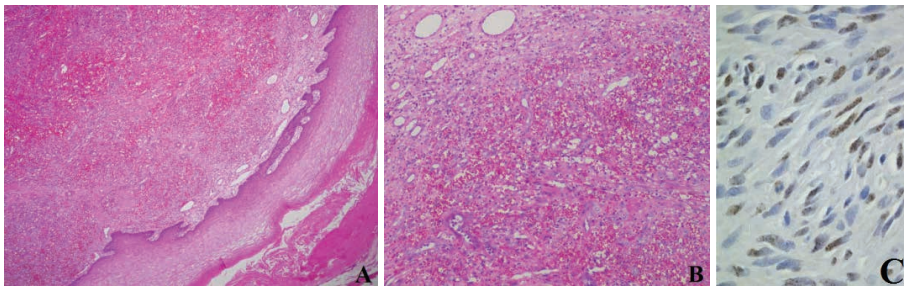
Par „zelta standartu” diagnozes noteikšanai uzskata veidojuma biopsiju, kur novēro vārpstveida atipisku endotēlijšūnu proliferāciju, haotisku angioģenēzi un dažāda lieluma asinsizplūdumu perēkļus (11.–13. attēls) [1].

Visiem pacientiem jāveic krūškurvja rentgenoloģiska izmeklēšana parenhimālā orgānu bojājumu un izsvīduma noteikšanai. Krūškurvja datortomogrāfija vai magnētiska rezonanse var sniegt precīzāku informāciju par parenhimāliem Kapoši sarkomas bojājumiem [5].

Plaušu KS diagnozi nosaka arī ar bronhoskopijas palīdzību, jo veidojumu biopsija var būt saistīta ar to asiņošanu. Bronhoskopijas laikā novēro paceltu (submukozu) ķiršsarkanu bojājumu. HHV-8 polimerāzes ķēdes reakcija tika piedāvāta gan kā jutīga, gan kā specifiska alternatīva [1, 5].

Gastrointestinālā (GI) trakta Kapoši sarkomas diagnozi vislabāk nosaka pēc biopsijas vai bojājuma endoskopiskā izmeklējuma. GI pazīmju vai simptomu trūkuma dēļ rutīnas gastrointestinālā endoskopija nav indicēta.

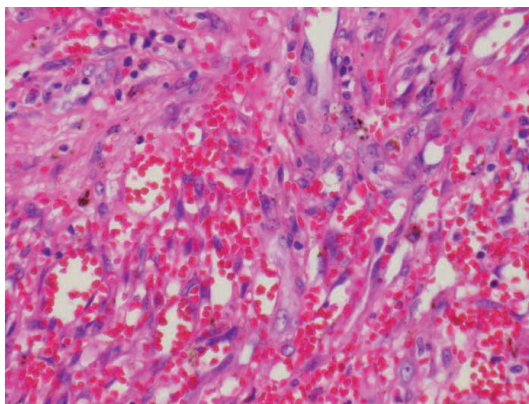
Imūnhistoķīmija, ja tiek lietotas antivielas pret Kapoši sarkomas herpesvīrusa saistītiem proteīniem (piem., ar latenci saistītais kodola antigēns, LANA-1) un/vai antivielas pret endoteliocītu proteīniem (piem., CD-31), var palīdzēt apstiprināt KS diagnozi, un šī metode ir īpaši noderīga, nosakot vaskulārā bojājuma izcelsmi ar atipisku histopatoloģiju [5].



**11. attēls. Nodulārā Kapoši sarkoma. A. Derma ir paplašināta blīva audzēja mezgla dēļ** ( $\times 20$ , H & E. LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras preparāts). **B. Relatīvi polimorfu vārpstveida atipisku šūnu perēkļi, kapilāri ar spraugveida dobumiem, pildītiem ar eritrocītiem** ( $\times 20$ , H & E. LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras preparāts). **C. Audzēja šūnu kodoli ir pozitīvi pret HHV-8** (imūnhistoķīmiska LNA-1 reakcija) [15]

*Figure 11. Nodular Kaposi sarcoma. A. Dermis is widened because of dense tumors nodule* ( $\times 20$ , H & E. Specimen of Pathology Department of Medicine faculty of the University of Latvia). *B. Nests of relatively polymorphic spindle-shaped atypical cells with slit-like capillaries full of erythrocyte* ( $\times 20$ , H & E. Specimen of Pathology Department of Medicine faculty of the University of Latvia). *C. The nuclei of tumor cells are positive for HHV-8* (immunohistochemical LNA-1 reaction) [15]

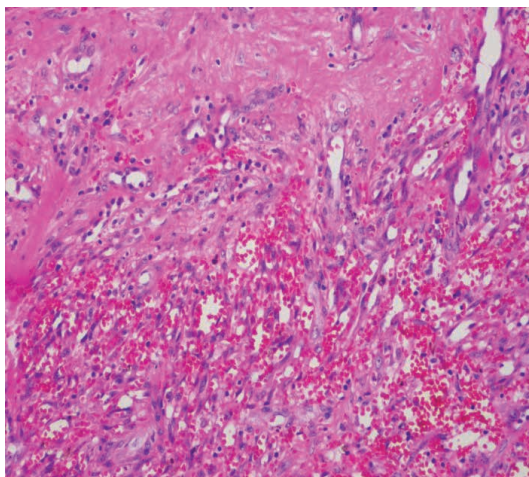




**12. attēls. Nodulāra Kapoši sarkoma. Asinsvadi izklāti ar vārpstveida atipiskām endotēlijšūnām. Daudz perivaskulāru asinsizplūdumu perēkļu.**

**Vietām asinsvadi kavernozi paplašināti. Stromā limfoplazmocitārais infiltrāts**  
(× 40, H & E. LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras preparāts)

*Figure 12. Nodular Kaposi sarcoma Spindle-shaped atypical endothelial cells line the interior of blood vessels. Lots of perivascular hemorrhage foci. In some places blood vessels cavernous expanded. Lymphocytes and plasma cells infiltration of stroma*  
(× 40, H & E. Specimen of Pathology, Department of Medicine faculty of the University of Latvia)



**13. attēls. Kapoši sarkomas regresija. Atipisko asinsvadu sakopojumu vietās veidojas sklerozes perēkļi. Novēro šķiedraino struktūru hialinozi. Limfocītu infiltrāti stromā**  
(× 40, H & E. LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras preparāts)

*Figure 13. Regression of Kaposi sarcoma. Sclerotic foci in atypical blood vessel aggregations. Note hyalinosis of fiber structures. Stromal lymphocyte infiltration*  
(× 40, H & E. Specimen of Pathology Department of Medicine faculty of the University of Latvia)

Citas izmeklēšanas metodes balstās uz klīnikas un iespējamām audzēja lokalizācijām: vēdera dobuma, retroperitoneālas telpas, limfmezglu, sirds USG; kaulu skintigrāfija; nieru CT; virsnieru MRI.

Skenēšana ar talliju vai galliju var palīdzēt diferencēt plaušu Kapoši sarkomu no plaušu infekcijām. Kapoši sarkomas gadījumā tipiski novēro tallija uzkrāšanos un gallija neuzkrāšanos audos. Infekcijas gadījumā tas ir otrādi.

Pacientiem ar HIV obligāti ir jānosaka CD4 limfocītu skaitu un HIV vīrusa slodzi, lai noteiktu imūnsupresijas pakāpi [1].

## Ārstēšanas pamatprincipi

Kapoši sarkomas ārstēšana ir vērsta uz simptomu atvieglināšanu, audzēja samazināšanu un slimības progresijas novēršanu.

Vairākumam slimnieku, ja ne visiem, kam ir ar AIDS saistīta Kapoši sarkoma, jāsaņem antiretrovirāla terapija. Efektīvs antiretrovirāls režīms ir saistīts gan ar AIDS asociēto Kapoši sarkomas sastopamības samazināšanu, gan ar traumēto perēkļu skaita un izmēra regresiju. ART efekti uz Kapoši sarkomu ir multifaktoriāli un ietver HIV replikācijas inhibīciju, samazinātu HIV-1 transaktivējoša Tat proteīna produkciju, imūnās atbildes uzlabošanos pret Kapoši sarkomas herpesvīrusu un, iespējams, tiešu proteāzes inhibitoru antiangiogēnisku aktivitāti [16].

## Lokālā ārstēšana – specifisko bojājumu vai bojājumu grupu ārstēšana

1. **Ķirurģija.** Dažos gadījumos, kad ir vienīgs simptomātisks bojājuma perēklis (piemēram, asiņošana vai berze pret apģērbiem), tikai ekscīzija var nodrošināt ilgstošu lokāla audzēja kontroli, bet jauni perēkļi parasti attīstās jau citās vietās [16].
2. **Staru terapija.** Visas Kapoši sarkomas formas, ieskaitot klasisko KS, ir ļoti jutīgas pret staru terapiju. Tā kā pastāv multifokāla slimība, HHV-8 persistence un jauno perēkļu veidošanās tendence neapstarotās vietās, nav vienprātības par staru terapijas kā terapeitiskās metodes vai optimālas staru tehnikas lietošanu. Solīdu perēkļu ārstēšana var prasīt vairāku blakus rajonu apstarošanu, kas var novest pie dozimetriskajām problēmām kontakta vietās [17–19].
3. **Krioterapija un lāzertterapija.** Ar AIDS saistītajā Kapoši sarkomas gadījumā dažreiz tiek lietota šķidra slāpekļa krioterapija (galvenokārt to izmanto dermatologi) mazo klasiskās KS bojājumu lokālai kontrolei. Efekts galvenokārt ir kosmētisks, un nav datu par šīs lokālās terapijas ietekmi uz ilgstošu slimības kontroli. Lāzertterapija var būt arī noderīga izvēlētajos gadījumos [20].
4. **Fotodinamiska terapija.** Lietojot topiskus vai sistēmiskus fotosensitizatorus, tiek panākta Kapoši sarkomas bojājumu fotosensitizācija [5].
5. **Intraperēkļaina terapija (intralesional chemotherapy).** Ķīmijterapijas laikā pašā audzējā ievada medikamentu (visbiežāk vinblastīnu, bet dažreiz bleomicīnu), kas noved pie ādas Kapoši sarkomas perēkļu lokālas regresijas. Dažos eksperimentos bija atklāts, ka tādas injekcijas var būt sāpīgas un var radīt lokālu rētošanu.

Elektroķīmijterapija izmanto mazu elektrisko strāvu (elektroporāciju, elektrodzinēja vielu ievadīšanas veids), paaugstinot šūnu caurlaidību zāļu vielām; šis paņēmiens pirmo reizi tika lietots, ievadot bleomicīnu [21].

#### 6. Topiska terapija.

- 0,1% *Alitretinoin* (9-cis-retīnskābe) gels ir FDA (*Food and Drug Administration*) atzīts Kapoši sarkomas, kas saistīta ar AIDS, terapijā, bet tā lietošana ir ierobežota klasiskās KS gadījumā [22, 23].
- Imikvimoda (*Imiquimod*) 5% krēms ir imūnmodulators ar stipru netiešu antivirālu aktivitāti. Šī mazmolekulārā sintētiskā molekula inducē citokīnu produkciju – INF- $\alpha$  [5, 24].

### Sistēmiskā ārstēšana

1. **Ķīmijterapija.** Plaši izplatītai, lielai vai ātri progresējošai Kapoši sarkomai, it īpaši, ja tā traucē orgānu funkcionēšanu vai ir saistīta ar mērenu vai smagu simptomātisku tūsku vai iekšējo orgānu bojājumu, ir indicēta sistēmiska ķīmijterapija. Kā ķīmijpreparātus lieto pegilēto liposomālu doksorubicīnu, vinblastīnu (vienu vai kombinācijā ar bleomicīnu), paklitakselu, orālu etoposidu, vinorelbinu un gemcitabīnu.

Kopējais šo medikamentu vai to kombināciju atbildes rādītājs ir pietiekami augsts (60–90%), un ārstēšana ir labi panesama arī gados veciem cilvēkiem. Vidējais atbildes ilguma periods ir no 4 mēnešiem līdz 2 gadiem [21, 25, 26].

2. **Imūnomodulatori.** Kapoši sarkomas ārstēšanā tiek izmantoti jauni aģenti, kuri ietver angiogēnēzes inhibitorus, tirozīnkināzes inhibitorus un matriksa metālproteināžu inhibitorus. Šajā gadījumā lieto rekombinanto interferonu alfa. Kaut gan IFN- $\alpha$  pretaudzēju mehānisms KS gadījumā nav pilnīgi zināms, tomēr ir novērots, ka tas var ietvert tiešus antiproliferatīvus efektus, antivirālus efektus, angiogēnēzes inhibīciju un saimnieka šūnu, un humorālas imūnas atbildes modulāciju. IFN- $\alpha$  zemas devas (no 1 līdz 3 milj. vienību, 5 dienas nedēļā) inducē pilnīgu KS regresiju 3 no 4 pacientiem un daļēju regresiju ceturtajam pacientam.

Līdzīgi IFN- $\alpha$ , talidomīdam ir antiangiogēni un imūnmodulējošie efekti. Šis preparāts ir aktīvs Kapoši sarkomas, kas saistīta ar AIDS, ārstēšanā. Talidomīda angiogēni efekti realizējas daļēji bFGF angiogēnēzes inhibīcijas ceļā.

Daži pētījumi ir pierādījuši, ka ķīmiski modificēts tetraciklīns-3 (*chemically modified tetracycline-3*, COL-3), kas ir matriksa metālproteināzes inhibitors, ir izdevīgāks, ārstējot Kapoši sarkomu, kas saistīta ar AIDS. Rapamicīns (*sirolimus*), PI3K/Akt/mTor ceļa inhibitors, ir efektīvs gan pēc transplantācijas, gan klasiskās KS ārstēšanā, un tagad tas tiek pētīts uz HIV-asociēto KS [8, 27–29].

### Secinājumi

- Kapoši sarkoma, kā pierādīts, nav tik reta onkoloģiska slimība.
- Antiretrovirāla terapija un ķīmijterapija samazina mirstības rādītāju HIV inficētiem cilvēkiem, kam ir histoloģiski pierādīta Kapoši sakorma.
- Agrīni diagnosticējot HIV infekciju un Kapoši sarkomu, ir iespējams panākt HIV infekcijas supresiju (nomākumu) un audzēja remisiju.

## Izmantotā literatūra

1. Rose, L. J. Kaposi Sarcoma. Apr 16, 2015.
2. Society, A. C. (2014). *Kaposi Sarcoma*, pp. 1-31.
3. Lee, A. J., *et al.* (2015). Gastrointestinal Kaposi's sarcoma: Case report and review of the literature. *World. J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 6(3), pp. 89-95.
4. Cancer. Net. Sarcoma – Kaposi: Statistics. (2014).
5. *Cancers in People with HIV and AIDS Progress and Challenges.* (2014). Springer.
6. Cotran, R. A. (2010). *Pathologic Basis of Disease.* 8<sup>th</sup> ed. Elsevier.
7. Kumar, V., Abbas, A. K. and Fausto, N. (2010). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* 8<sup>th</sup> ed. Elsevier.
8. Douglas, J. L., *et al.* (2010). Kaposi Sarcoma Pathogenesis: A Triad of Viral Infection, Oncogenesis and Chronic Inflammation. *Transl. Biomed.*, 1(2).
9. Рассохин, В. В., А. П. К. (2012). *Саркома Капоши. Диагностика и лечение.* Практическая онкология, 13(2), pp. 114-124.
10. Behrens, C. B. and Spach, D. H. (2015). Kaposi's Sarcoma, in *HIV Web Study.*
11. Jakob, L., *et al.* (2011). Non-AIDS associated Kaposi's sarcoma: clinical features and treatment outcome. *PLoS One*, 6(4), p. e18397.
12. Кнооп, К. J., *et al.* (2010). *The Atlas of Emergency Medicine.* 3<sup>rd</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., p. 1378.
13. Arul, A. S. K. J., *et al.* (2015). Oral Kaposi's sarcoma: Sole presentation in HIV seropositive patient. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(2), pp. 459-461.
14. Khalidova, K. and Nabiev, F. (2011). Clinical manifestation of Kaposi's sarcoma in HIV-infected boy. *Medical and Health Science Journal*, 7, pp. 133-137.
15. Grayson, W. and Pantanowitz, L. (2008). Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn. Pathol.*, 3, p. 31.
16. Weintraub, C. M. and Skudowitz, R. B. (2002). Excision of 1,674 classic Kaposi's sarcomas. *S. Afr. J. Surg.*, 40(2), p. 80.
17. Caccialanza, M., *et al.* (2008). Radiotherapy of classic and human immunodeficiency virus-related Kaposi's sarcoma: results in 1482 lesions. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.*, 22(3), pp. 297-302.
18. Hauerstock, D., Gerstein, W. and Vuong, T. (2009). Results of radiation therapy for treatment of classic Kaposi sarcoma. *J. Cutan. Med. Surg.*, 13(1), pp. 18-21.
19. Huang, K.M., *et al.* (2006). Radiotherapy of classic Kaposi's sarcoma in Taiwan, an area where classic Kaposi's sarcoma is not prevalent. *Anticancer Res.*, 26(6c), pp. 4659-4663.
20. Von Roenn, J. H. and Cianfrocca, M. (2001). Treatment of Kaposi's sarcoma. *Cancer Treat Res.*, 104, pp. 127-148.
21. Brambilla, L., *et al.* (2010). Intralesional vincristine as first-line therapy for nodular lesions in classic Kaposi sarcoma: a prospective study in 151 patients. *Br. J. Dermatol.*, 162(4), pp. 854-859.
22. Morganroth, G. S. (2002). Topical 0.1% alitretinoin gel for classic Kaposi sarcoma. *Arch. Dermatol.*, 138(4), pp. 542-543.
23. Rongioletti, F., Zaccaria, E. and Viglizzo, G. (2006). Failure of topical 0.1% alitretinoin gel for classic Kaposi sarcoma: first European experience. *Br. J. Dermatol.*, 155(4), pp. 856-857.
24. Celestin Schartz, N. E., *et al.* (2008). Imiquimod 5% cream for treatment of HIV-negative Kaposi's sarcoma skin lesions: A phase I to II, open-label trial in 17 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 58(4), pp. 585-591.
25. Brambilla, L., *et al.* (2001). Treatment of classical Kaposi's sarcoma with gemcitabine. *Dermatology*, 202(2), pp. 119-122.

26. Brambilla, L., *et al.* (2006). Combination of vinblastine and bleomycin as first line therapy in advanced classic Kaposi's sarcoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 20(9), pp. 1090-1094.
27. Kreuter, A., *et al.* (2005). Liposomal pegylated doxorubicin versus low-dose recombinant interferon Alfa-2a in the treatment of advanced classic Kaposi's sarcoma; retrospective analysis of three German centers. *Cancer Invest.*, 23(8), pp. 653-659.
28. Krown, S. E. (2007). AIDS-associated Kaposi's sarcoma: is there still a role for interferon alfa?, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 18(5-6), pp. 395-402.
29. Krown, S. E. (2001). Management of Kaposi sarcoma: the role of interferon and thalidomide, *Curr. Opin. Oncol.*, 13(5), pp. 374-381.

## Summary

*The aim of the current research was to underline that Kaposi sarcoma as acquired immunodeficiency indicator disease is not a rare phenomenon. The above-mentioned fact is confirmed by a study implemented by the Latvian Centre of Infectious Diseases, where during two years 14 cases of Kaposi sarcoma were verified histologically. Statistically significant correlation was found between the survival rate and the antiretroviral therapy and chemotherapy. The successful Kaposi sarcoma clinical case described in the article allows to predict prolonged survival due to early intervention into the progressing of disease.*

**Keywords:** *Kaposi sarcoma, Kaposi sarcoma herpesvirus, human immunodeficiency virus, acquired immunodeficiency syndrome, atypical spindle-shaped cells.*

## **Dermālo filleru *Restylane*, *Radiesse* un autologo taukaudu izraisīto lūpu audu reakciju strukturālās īpatnības**

### ***Structural peculiarities of lip tissue reactions caused by dermal fillers Restylane, Radiesse and autologous fat tissue***

**Agate Galuza,<sup>1</sup> Jurijs Markovs,<sup>1</sup> Eduards Jurševičs,<sup>2</sup>  
Džanna Krūmiņa,<sup>1</sup> Gundega Knipš<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Anatomijas un histoloģijas katedra  
O. Vācieša iela 4, Rīga, LV-1004

<sup>2</sup> Estētiskās medicīnas klīnika  
Dzirnavu iela 23, Rīga, LV-1010

E-pasts: [agate.galuza@gmail.com](mailto:agate.galuza@gmail.com)

Pēdējo gadu laikā strauji pieaudzis biodegradējamo kosmētisko ādas filleru injekciju skaits. Zināms, ka jebkurš ādas filleris var ierosināt agrīnas vai vēlīnas blakusparādības, taču nav precizēta imūnkompetento šūnu loma to attīstībā.

**Pētījuma mērķis un uzdevumi:** izvērtēt sejas audu histopatoloģiskās reakcijas pēc biodegradējamo kosmētisko filleru *Restylane* (hialuronskābe, HA – *hyaluronic acid*), *Radiesse* (kalcija hidroksilapatīts, CaHA) un autologo taukaudu injekcijām vēlīno blakusparādību attīstības laikā. Darba uzdevumi bija izpētīt CD68 pozitīvo makrofāgu lomu audu reakcijās uz kosmētisko dermālo filleru ievadīšanu un izanalizēt CD31 pozitīvās vēnulas ar augstu endotēliju hroniska iekaisuma gadījumā.

**Materiāli un metodes:** retrospektīvā pētījumā tika histoloģiski izmeklēti audi, kas iepriekš izņemti no pacientu lūpu ādas koriģējošo operāciju laikā komplikāciju attīstības dēļ 4–8 mēnešus pēc biodegradējamo filleru injekcijām lūpu kontūrplastikas nolūkā. Pētījumā iekļautas 12 pacientes ar sūdzībām par tūsku, lūpu kontūras neregularitāti, mezglīņiem lūpu gļotādā, ilgstošiem asinsizplūdumiem, kā arī 3 pacientes, kurām iepriekš nav tikuši ievadīti kosmētiskie filleri. Audi tika krāsoti ar hematoksilīnu-eozīnu pēc Gimzas metodes un imūnhistoķīmiski izmeklēti uz CD68, CD31 šūnu virsmas marķieriem.

**Rezultāti un secinājumi:** pētījumā noskaidrots, ka strukturālas pārmaiņas lūpu audos vēlīno blakusparādību gadījumā pēc biodegradējamo kosmētisko ādas filleru ievadīšanas var ierosināt granulomatoza iekaisuma attīstību. CD68 pozitīvas svešķermeņa gigantšūnas tika pierādītas visos 12 gadījumos. Tāpat strukturālas pārmaiņas, kas liecina par hronisku iekaisumu – limfoplazmocitāru infiltrātu, fibrozi, un CD31 pozitīvas vēnulas ar augstu endotēliju, kuras konstatēja arī gļotādā. Pēc *Radiesse* injekcijām novēroja CaHA mikrosfēras, kuras apņēma epiteloidie histiocīti, svešķermeņa gigantšūnas un limfocītisks infiltrāts. *Restylane* ievadīšanas gadījumā tika atrastas vakuolas saturošas gigantšūnas un palielināts tuklo šūnu



daudzums dermā, kas liecina par alergisku iekaisumu. Autologo taukaudu injekciju gadījumā konstatēja lipogranulomas, kas satur lielu daudzumu CD31 un CD68 pozitīvu lipofāgu un atsevišķas svešķermeņa gigantšūnas ap tauku pilieniem. Mēs uzskatām, ka, ievadot pārmerīgu taukaudu daudzumu, tiek traucēta to asins apgāde un, adipocītiem nekrotizējoties, papildus atbrīvojas brīvie lipīdi tauku pilienveidā, kas izraisa makrofāgu aktivāciju un fibrozi. Ja jebkura fillera daudzums pārsniedz atsevišķu makrofāgu spēju efektīvi tos fagocitēt, neskatoties uz biosaderību, attīstīsies svešķermeņa granuloma, tādēļ vēlams ievadīt minimālā efektīvā fillera daudzumu.

**Atslēgvārdi:** biodegradējamie filleri, kalcija hidroksilapatīts (CaHA), hialuronskābe (HA), autologie taukaudi, vēlīnās komplikācijas.

## Ievads

Dermālie filleri (ang. *filler* – pildviela) tiek izmantoti, lai atjaunotu mīksto audu zudumu, kā arī novērstu pastāvīgo krunku un kroku esamību. Pēdējo gadu laikā strauji pieaugusi kosmētisko dermālo filleru popularitāte. Pēc starptautiskiem datiem (*International Society of Aesthetic Plastic Surgery*), tādu pacientu skaits iepriekšējo divu gadu laikā, kas veikuši kosmētiskās injekcijas ar biodegradējamajiem filleriem, pārsniedz 3 miljonus. Biodegradējamie kosmētiskie ādas filleri tiek izmantoti salīdzinoši biežāk, un to injekcijas ir otrā biežākā (26,0% jeb 3 089 686) veiktā neķirurģiskā manipulācija pasaulē pēc botulīna toksīna injekcijām 2013. gadā [9]. Kopumā visbiežāk izmantotie biodegradējamie kosmētiskie filleri gan 2012., gan 2013. gadā bija hialuronskābe, kalcija hidroksilapatīts un autologie taukaudi [16, 17]. Nav pieejami dati par kosmētisko filleru izmantošanas biežumu Latvijā, taču zināms, ka kosmētisko filleru injekcijas tiek veiktas arī Latvijā.

Biodegradējamie filleri ir tādi kosmētiskie filleri, kas pēc ievadīšanas audos pakāpeniski tiek bioloģiski sadalīti, un pēc izcelsmes veida var būt gan bioloģiskie (HA, autologie taukaudi, liellopa un cilvēka kolagēns), gan sintētiskie (CaHA) filleri [21]. Īslaicīgie filleri (iedarbības ilgums līdz 1 gadam), kā hialuronskābe (HA), tiek izmantoti salīdzinoši biežāk, jo, tā kā ādas novecošana ir dinamisks process, neiesaka veikt permanentu korekciju [22]. Bioloģiskie filleri prasa atkārtotas injekcijas estētiskā efekta uzturēšanai. Savukārt sintētiskie polimēri, kas nav tik viegli fagocitējami (silikons, kalcija hidroksilapatīts – CaHa), var saglabāties pat vairākus gadus [3].

Lai gan kosmētisko filleru injekcijas tiek uzskatītas par relatīvi drošām ar zemu blakusparādību attīstības risku, tomēr jebkurš ādas filleris var ierosināt agrīnas (attīstās dažas dienas pēc injekcijas) vai vēlīnas (attīstās dažas nedēļas vai mēnešus pēc injekcijas) komplikācijas [4]. Komplikācijas atkarīgas gan no ievadītā materiāla īpašībām, gan injekciju tehnikas un ievades vietas. Ziņots, ka klīniski un atsevišķos gadījumos mikroskopiski ādas mezgliņi var tikt noturēti par iespējamu mīksto audu audzēju [21], turklāt pacientes var nesaistīt šos mezgliņus ar kosmētisko filleru injekcijām vairākus mēnešus pēc veiktās manipulācijas vai vērsties pie speciālista, kas nav primāri veicis injekcijas. Iespējamās aprakstītās blakusparādības var variēt no hipersensitivitātes un ādas mezgliņu attīstības līdz vaskulārai oklūzijai un audu nekrozei [4].

Neraugoties uz iepriekšējiem pētījumiem, paliek daudz neatbildētu jautājumu par imūnkompetento šūnu lomu blakusparādību attīstībā, turklāt visbiežāk iesaistīto

šūnu izcelsme tiek apstiprināta, balstoties tikai uz morfoloģiskiem novērojumiem. Lai samazinātu turpmākas komplikācijas nākotnē un atvieglotu vēlīno komplikāciju patomorfoloģisko diagnostiku, ir svarīgi izprast histopatoloģisko audu reakciju uz injicējamiem dermāliem filleriem.

## Pētījuma mērķis un uzdevumi

Darba mērķis bija izvērtēt lūpu audu histopatoloģiskās reakcijas pēc biodegradējamo kosmētisko filleru *Restylane* (hialuronskābe), *Radiesse* (kalcija hidroksilapatīts, CaHA) un autologo taukaudu injekcijām vēlīno blakusparādību attīstības laikā.

Darba uzdevumi:

1. Izpētīt CD68 pozitīvo makrofāgu lomu audu reakcijās uz kosmētisko dermālo filleru ievadīšanu.
2. Izanalizēt CD31 pozitīvās vēnulas ar augstu endotēliju hroniska iekaisuma gadījumā.

## Materiāli un metodes

Retrospektīvā pētījumā tika histoloģiski izmeklēti audi, kas iepriekš izņemti no pacientu lūpu ādas koriģējošo operāciju laikā. Minētās operācijas tika veiktas, jo pacienti nebija apmierināti ar sejas izskatu 4–8 mēnešus pēc biodegradējamo filleru (*Restylane*, *Radiesse*, autologie taukaudi) injekcijām lūpu kontūrplastikas nolūkā. Pētījumā tika iekļautas 12 patientes – sievietes vecumā no 46 līdz 59 gadiem (pēc *Restylane* injekcijām – 4 patientes, pēc *Radiesse* injekcijām – 5 patientes un pēc lipofilinga – 3 patientes). Klīniski patientes sūdzējās par ilgstošiem asinsizplūdumiem injekciju apvidū, kas saglabājušies kopš filleru ievadīšanas, lokālu tūsku, redzamu lūpu kontūras neregularitāti ar nesāpīgiem mezgliņiem lūpu gļotādā. Vienā gadījumā (pēc *Restylane* injekcijām) mezgliņi bijuši jutīgi.

Tāpat histoloģiski tika izmeklēti lūpu audi, kas iegūti pēc sejas operācijām, kas nav saistītas ar iepriekšēju kosmētisko filleru ievadīšanu. Kontroles grupā tika iekļautas 3 patientes vecumā no 46 līdz 59 gadiem.

Iegūtie audu gabaliņi tika fiksēti 48 stundas 10% formalīnā, pēc tam atūdeņoti un ieguldīti parafīnā. No blokiem pagatavoja 4 µm biezus griezumus, kurus izmeklēja imūnhistoķīmiski. Antigēna demaskēšanai izmantota sakarsēšanas metode mikroviļņu krāsnī 180 W, preparāti tika ievietoti citrāta bufera vannā ar pH 6,2 un inkubēti 30 min. Imūnhistoķīmiska krāsošana veikta, izmantojot biofīna avidīna metodi ar DAKO firmas LSAB kitu. Visas reakcijas veiktas istabas temperatūrā *Shandon* mitrajā kamerā. Preparāti tika inkubēti peroksidāzes bloķētājreaģentu klātbūtnē 10 min un skaloti TBS (*Tris-Buffered Saline*). Pēc tam 30 min inkubēti primāro antivielu CD68 un CD31 klātbūtnē. Pēc inkubācijas griezumus 5 min tika skaloti ar TBS un vēlreiz 30 min inkubēti ar biotinilēto sekundāro antivielu pret kazas IgG. Pēc preparātu atkārtotas skalošanas TBS tika veikta 30 min inkubācija ar trešo antivielu, kas bija iezīmēta ar mārūtku peroksidāzi. Tad 5 min veica vizualizācijas reakciju ar diaminobenzidīnu (DAB).

Audi krāsoti ar hematoksilīnu-eozīnu un pēc Gimzas metodes. Visi iegūtie audi no kontroles grupas tika krāsoti pēc Gimzas metodes. Histoloģiskie preparāti tika uzlikti uz segstikliņa, izpētīti un fotografēti ar mikroskopa LEICA DM 4000B

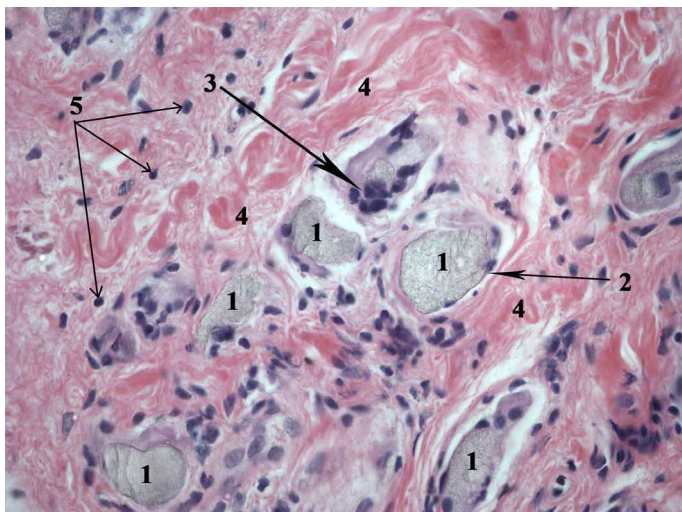


palīdzību. Lai izvērtētu tendences tuklo šūnu daudzuma izmaiņās, preparātos pēc *Restylane* un kontroles grupā tika skaitīts tuklo šūnu daudzums 4 redzes laukos 400 reīzu palielinājumā.

CD68 šūnu virsmas marķieris tika izmantots monocītu/makrofāgu identificēšanai un atrodams uz visām makrofagālas izcelsmes šūnām. CD31 ir endoteliocītu, kā arī imūnkompetento šūnu, piemēram, monocītu, marķieris.

## Rezultāti

Histoloģiski izmeklējot audus pēc kalcija hidroksilapatīta kosmētiskā fillera *Radiesse* injekcijām, tika konstatētas gaiši violetas līdz pelēkas dažādas formas kalcija hidroksilapatīta mikrosfēras ar neregulāru virsmu. Tās apņēma epiteloidie histiocīti (garenas eozinofilas šūnas iegareniem kodoliem) un daudzkodolainās svešķermeņa gigantsūnas (1. attēls). Redzams, ka mikrosfēras inkorporētas arī gigantsūnu citoplazmā, šūnas kodoli izvietoti perifērijā. Svešķermeņa materiālu apņēma saistaudu šķiedras, starp kurām vietām redzami limfocīti.



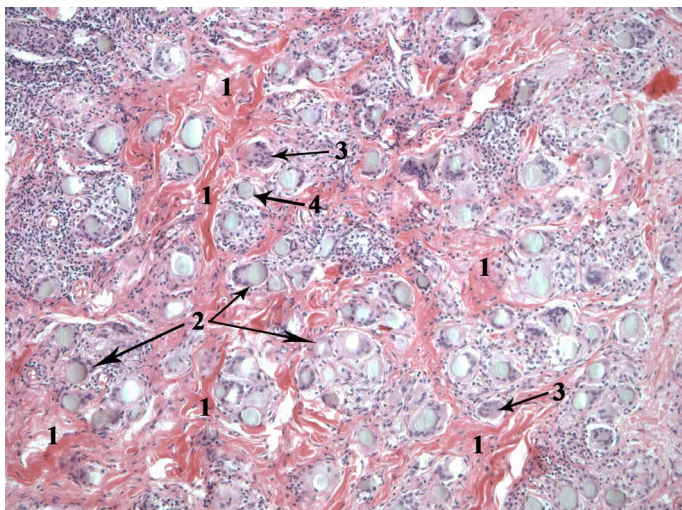
1. attēls. Granulomatozs iekaisums lūpu dermā pēc CaHA injekcijas.

1 – CaHa mikrosfēras; 2 – epiteloidie histiocīti; 3 – svešķermeņa gigantsūna;  
4 – saistaudu šķiedras; 5 – limfocīti. Hematoksilīns-eozīns, 400 reīzu palielinājums

*Figure 1. Granulomatous inflammation in dermis after injections of CaHA.*

1 – CaHa microspheres; 2 – epithelioid histiocytes; 3 – foreign body giant cell;  
4 – connective tissue; 5 – lymphocytes. Hematoxylin-eosin,  $\times 400$  magnification

Tika novērotas arī atsevišķas gigantsūnas, kas vēl nesatur CaHa mikrosfēras, tāpat epiteloidie histiocīti, kas apņēma CaHA mikrosfēras. Izteikts limfocītisks infiltrāts starp norobežotajām mikrosfēru grupām un minimāli arī starp saistaudu šķiedrām. Biezas saistaudu šķiedras (2. attēls) atdalīja gan kalcija hidroksilapatīta mikrosfēras, kuras galvenokārt sagrupētas pa divi un vairāk, gan svešķermeņa gigantsūnas ar CaHa mikrosfērām to citoplazmā.

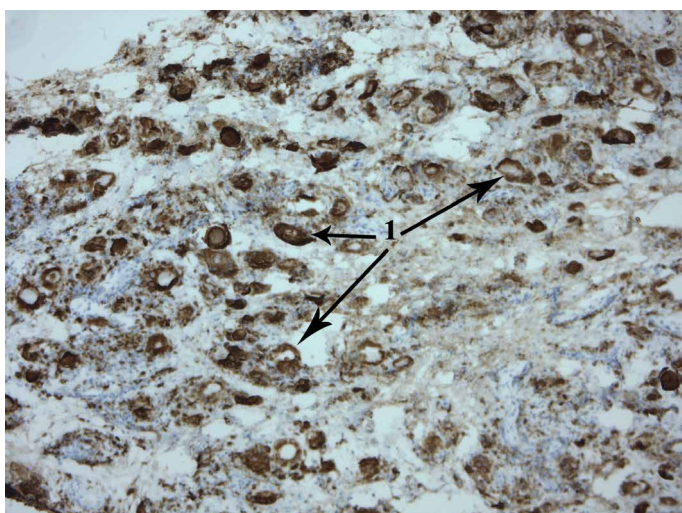


2. attēls. Dermalis fibroze granulomas apvidū pēc CaHA injekcijas.

- 1 – saistaudu šķiedras; 2 – svešķermeņa gigantsūnas ar CaHa mikrosfērām to citoplazmā;  
3 – svešķermeņa gigantsūnas, kas nesatur mikrosfēras; 4 – epiteloīdie histiocīti.  
Hematoxilīns-eozīns, 200 reižu palielinājums

Figure 2. Dermal fibrosis in the area of granuloma after injections of CaHA.

- 1 – connective tissue; 2 – foreign body giant cells with CaHa microspheres in cytoplasm;  
3 – foreign body giant cells without CaHa microspheres; 4 – epithelioid histiocytes.  
Hematoxylin-eosin, × 200 magnification



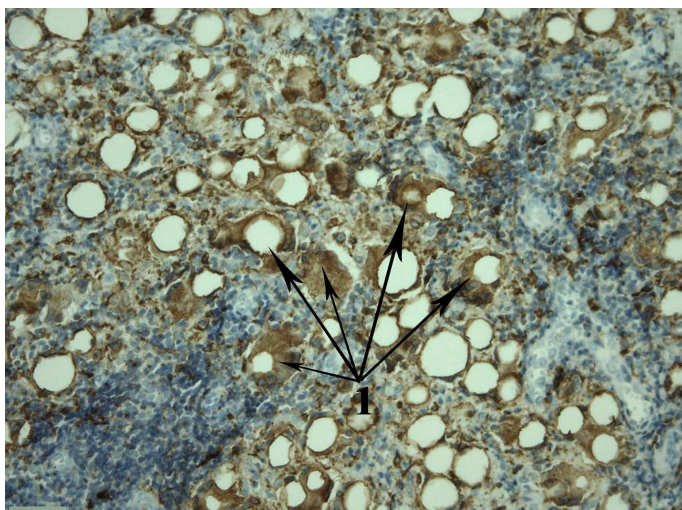
3. attēls. Granulomatous iekaisums lūpu dermā pēc Radiesse injekcijas, imūnhistoķīmiski krāsots uz CD68. 1 – CD68 pozitīvas svešķermeņa gigantsūnas, 200 reižu palielinājums

- Figure 3. Granulomatous inflammation in dermis after injections of Radiesse (CaHA), immunohistochemical staining for CD68. 1 – CD68 positive foreign body giant cells, × 200 magnification

Šāda histoloģiskā aina tika novērota visos piecos gadījumos pēc *Radiesse* izraisītu komplikāciju attīstības. Kopumā vizīteiktākā fibroze tika konstatēta tieši pēc CaHA injekciju ierosinātajām svešķermeņa granulomām.

Audi pēc *Radiesse* injekcijām tika izmeklēti arī imūnhistoķīmiski makrofāgu identificēšanai, izmantojot CD68 šūnu virsmas marķieri. Preparātos tika konstatētas CD68 pozitīvas multinukleārās svešķermeņa gigantšūnas. 3. attēlā redzamas CD68 pozitīvas multinukleārās svešķermeņa gigantšūnas (tumši brūns krāsojums) ar pelēkas līdz gaiši brūnas krāsas inkorporētām CaHA mikrosferulām to citoplazmā.

Imūnhistoķīmiski izmeklējot audus no komplikāciju attīstības vietas pēc hialuronskābes dermālā fillera *Restylane* injekcijas, tika novērots CD68 pozitīvs (tumši brūns krāsojums) bagātīgs multinukleāro gigantšūnu infiltrāts, kuru citoplazmā novēro lielas, gaišas vakuolas. Apkārt gigantšūnām arī bagātīgs limfocītisks infiltrāts (4. attēls).

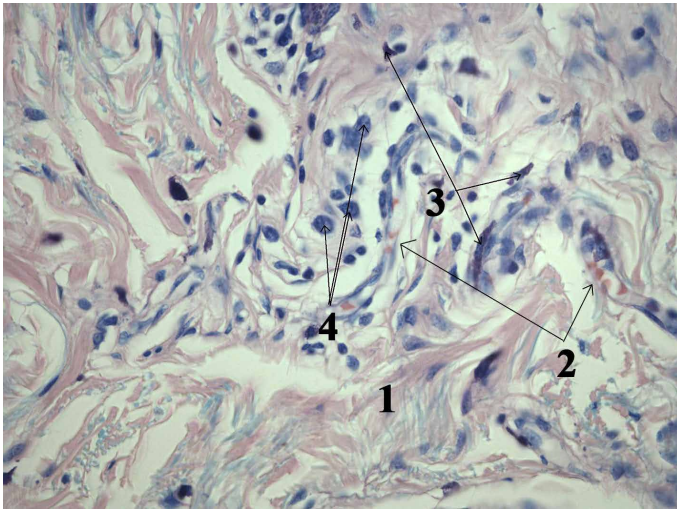


4. attēls. Apakšlūpas ādas granulomatozs iekaisums pēc *Restylane* injekcijas, imūnhistoķīmiski krāsots uz CD68. 1 – CD68 pozitīvas svešķermeņa gigantšūnas, 200 reižu palielinājums

Figure 4. Granulomatous inflammation in lower lip after injections of *Restylane*, immunohistochemical stainig for CD68. 1 – CD68 positive foreign body giant cells, × 200 magnification

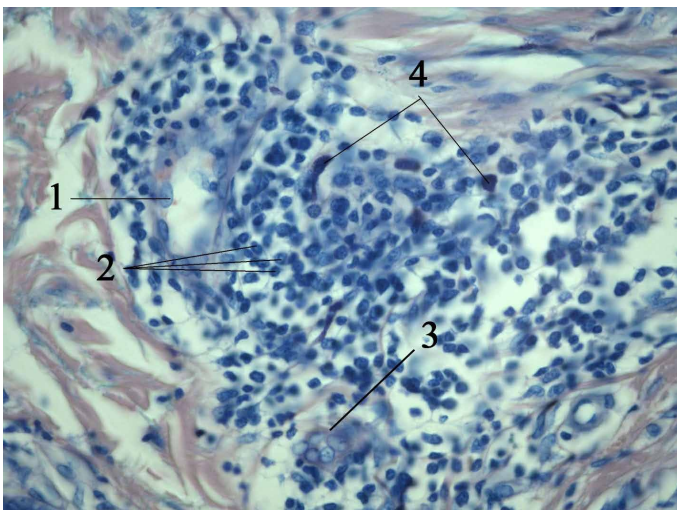
Izmeklējot audus lielākā palielinājumā, bija redzami (5. attēls) iekaisušās dermas saistaudi un asins kapilāri, starp kuriem atrodas tuklās šūnas ar bazofilu granulāru citoplazmu, un plazmocīti. Tika novērota tendence palielināties tuklo šūnu daudzumam, tādēļ audu paraugi pēc hialuronskābes ievadīšanas tika salīdzināti ar kontroles grupu. Audu paraugos pēc *Restylane* injekcijām tuklo šūnu daudzums bija 9–13 šūnas vienā redzes laukā 40 reižu palielinājumā (izmeklēti 4 redzes lauki katrā preparātā), kamēr kontroles grupā – 6–8 šūnas vienā redzes laukā. Šāda tendence visdrīzāk norāda uz alerģisku iekaisumu pēc HA injekcijām.





5. attēls. Plazmocīti un tuklās šūnas lūpu dermā pēc hialuronskābes injekcijas.  
 1 – dermas saistaudi; 2 – asins kapilāri; 3 – tuklās šūnas; 4 – plazmocīti.  
 Gimzas metode, 400 reižu palielinājums

Figure 5. *Plasmocytes and mast cells in dermis after injections of hyaluronic acid.*  
 1 – connective tissue; 2 – capillaries; 3 – mast cells; 4 – plasmocytes.  
 Giemsa × 400 magnification

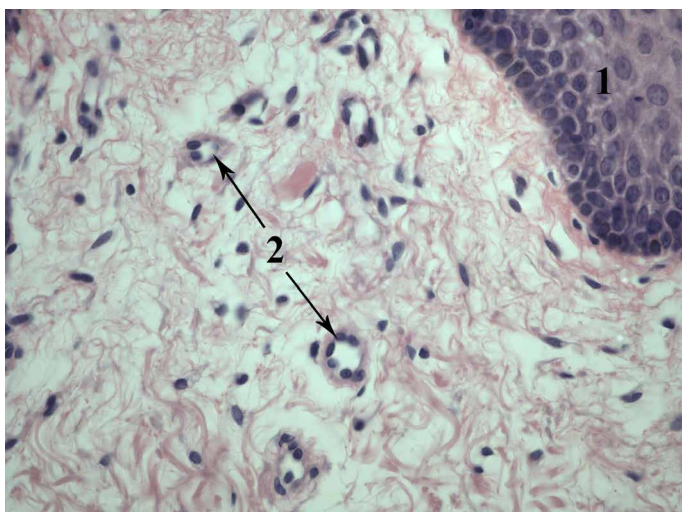


6. attēls. Vēnulas ar augstu endotēliju iekaisušā ādā pēc HA injekcijas.  
 1 – vēnula; 2 – limfohistiocitārs perivaskulārs infiltrāts; 3 – vēnula ar augstu endotēliju;  
 4 – tuklās šūnas. Gimzas metode, 400 reižu palielinājums

Figure 6. *High endothelial venules in inflamed skin after injections of HA.*  
 1 – venule; 2 – lymphohistiocytic perivascular infiltrate; 3 – high endothelial venule;  
 4 – mast cells. Giemsa, × 200 magnification

Dermā pēc HA injekcijām novēroja arī vēnulas ar augstu endotēliju (6. attēls). Kopumā vēnulas ar augstu endotēliju konstatēja tādu komplikāciju attīstības gadījumā, kuras ierosināja visi trīs kosmētiskie ādas filleri. Limfocītu migrāciju uz iekaisuma norises vietu kontrolē limfocītu – endotēlija šūnu mijiedarbība vietās, kur limfocīti izceļo no asinsrites uz audiem. Specializētās postkapilārās vēnulas ar augsto endotēliju redzamas kā vēnulas, kam ierastā saplacinātā endotēlija vietā ir augsts, kubiskajam epitēlijam līdzīgs epitēlijs. Apkārt vēnulām bagātīgs limfohistiocītisks infiltrāts, kas veidojas iekaisuma vietā.

Pētījumā konstatēts, ka vēnulas ar augsto endotēliju novēro ne tikai iekaisuma apvidū, bet arī lūpas gļotādas saistaudos. 7. attēlā redzams fragments no lūpas gļotādas daudzkārtainā plakanā epitēlija, zem tā irdenie saistaudi, kas satur vēnulas ar augsto endotēliju.



7. attēls. Vēnulas ar augsto endotēliju lūpas gļotādas saistaudos pēc HA injekcijas.

1 – daudzkārtainais plakanais epitēlijs; 2 – vēnulas ar augsto endotēliju.

Hematoxilīns-eozīns, 400 reižu palielinājums

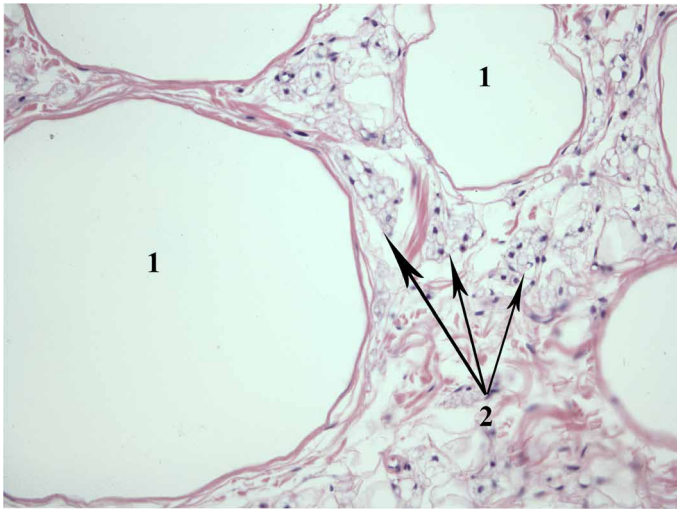
Figure 7. High endothelial venules in labial mucosa after injections of HA.

1 – stratified squamous epithelium; 2 – high endothelial venules.

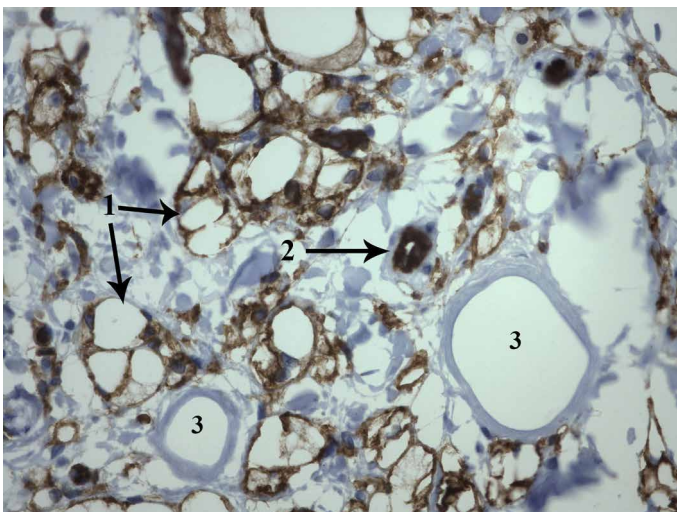
Hematoxylin-eosin, × 400 magnification

Izmeklējot audus pēc autologo taukaudu injekcijām, tika novēroti ekstracelulāro tauku pilieni, kas redzami kā ieapaļas formas lieli, cistiski veidojumi (8. attēls). Tauku pilienus apņem plāna saistaudu kapsula un lipofāgi. Šo makrofāgu citoplazmā atrodas fagocitētie tauku pilieni, kas, krāsojot ar hematoxilīnu-eozīnu, izskatās pēc vairākām ieapaļas līdž ovālas formas „tukšām telpām”.

Preparātos pēc autologo taukaudu injekcijām tika novērota izteikta lipofāgu infiltrācija, tie veidoja grupas ap tauku pilieniem. Tauku šūnu nekroze netika novērota.



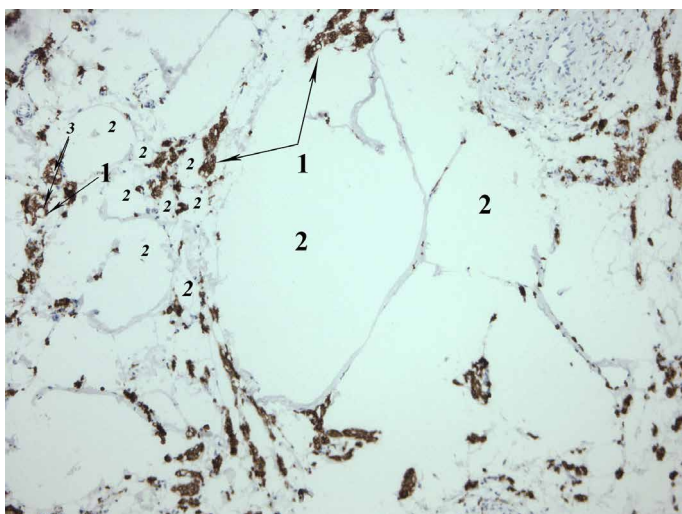
8. attēls. Lipogranuloma pēc autologo taukaudu injekcijām lūpu zemādā.  
1 – tauku pilieni; 2 – lipofāgi. Hematoksilīns-eozīns, 200 reižu palielinājums  
Figure 8. Lipogranuloma in labial hypodermis after injections of autologous fat.  
1 – lipid droplets; 2 – lipophages. Hematoxylin-eosin, × 200 magnification



9. attēls. Lipogranulomas CD31 pozitīvie lipofāgi, svešķermeņa gigantšūnas un  
vēnula ar augstu endotēliju. 1 – CD31 pozitīvas svešķermeņa gigantšūnas;  
2 – vēnula ar augstu endotēliju; 3 – tauku pilieni, 400 reižu palielinājums  
Figure 9. Lipogranuloma with CD31 positive lipophages, foreign body giant cells and  
high endothelial venules. 1 – CD31 positive foreign body giant cells;  
2 – high endothelial venule; 3 – lipid droplets, × 400 magnification

Izmeklējot imūnhistoķīmiski audus pēc autologo taukaudu injekcijām (9. attēls), tika identificēti CD31 pozitīvi lipofāgi (tumši brūns krāsojums), kas satur fagocitētos lipīdus, kuri vizuāli atgādina „tukšas” centrāli novietotas vakuolas to citoplazmā, kamēr makrofāgu kodoli atrodas perifēri. Atsevišķi lipofāgi saplūst kopā, veidojot svešķermeņa gigantšūnas, kuru skaits bija neliels, salīdzinot ar audiem pēc CaHA vai HA injekcijām. Tāpat tika konstatētas vēnulas ar augsto endotēliju (arī pozitīvi krāsojas uz CD31 marķiera).

Imūnhistoķīmiski identificējot CD68 pozitīvās šūnas, konstatēja, ka šūnas, kas apņēmu tauku pilienus, pēc savas izcelsmes ir makrofāgi, kuri fagocitējuši tauku pilienus, kļūstot par lipofāgiem. Lipogranulomas CD68 pozitīvie lipofāgi (tumši brūns krāsojums) apņēmu tauku pilienus ārpusšūnas matriciņā (10. attēls). Arī šo šūnu citoplazmā bija redzami fagocitēti tauku pilieni, kas izskatās kā caurspīdīgas vakuolas.

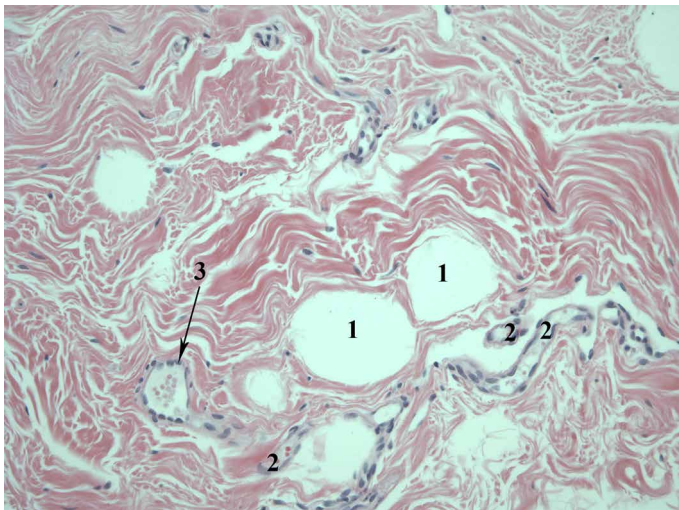


10. attēls. Lipogranuloma pēc autologo taukaudu injekcijām lūpu zemādā, imūnhistoķīmiski krāsojas uz CD68 marķiera. 1 – CD68 pozitīvi lipofāgi; 2 – dažāda izmēra tauku pilieni ārpusšūnas matriciņā; 3 – tauku ieslēgumi lipofāgu citoplazmā, 100 reižu palielinājums

Figure 10. Lipogranuloma in labial hypodermis after injections of autologous fat, immunohistochemical staining for CD68. 1 – CD68 positive lipophages; 2 – various sizes of lipid droplets in extracellular matrix; 3 – lipid droplets within lipophages, × 100 magnification

Atsevišķi lieli tauku pilieni tika novēroti starp dermas saistaudiem, kas atrodas blakus asins kapilāriem, kuru lūmenā redz eritrocītus. Jebkurš injicētais fillera materiāls var izraisīt spiedienu ne tikai uz blakusesošajiem asinsvadiem, bet arī uz limfātiskajiem kapilāriem vai limfvadiem, radot limfas atteces traucējumus. Lai gan konkrētajā preparātā (11. attēls) tauku pilieni nerada kapilāru kompresiju, tomēr tie atrodas tuvu kapilāriem un attēls uzskatāmi ilustrē, ka šāda komplikācijas attīstība ir ļoti iespējama gadījumā, ja blakusesošie tauku pilieni būtu lielāka izmēra.





11. attēls. Tauku pilieni asins kapilāru tuvumā pēc autologo taukaudu injekcijas.

1 – tauku pilieni; 2 – asins kapilāri; 3 – vēnula.

Hematoksilīns-eozīns, 200 reižu palielinājums

Figure 11. Free lipids close to blood capillary after injections of autologous fat.

1 – lipid droplets; 2 – blood capillaries; 3 – venule.

Hematoxylin-eosin, × 200 magnification

## Diskusija

Šajā pētījumā noskaidrots, ka vēlīnās blakusparādības pēc biodegradējamo kosmētisko ādas filleru ievadīšanas var ierosināt granulatozo iekaisuma attīstību. Medicīnas literatūras avotos minēts, ka svešķermeņa granulomas sastopamības biežums ir 0,01 – viens procents, turklāt tā var veidoties pēc jebkura dermālā fillera ievadīšanas vairākus mēnešus vai gadus pēc injekcijas [3]. Pētījumā svešķermeņa granuloma, kā arī aktivēto makrofāgu, kas nosaka šāda iekaisuma attīstību, virsmas marķieri (CD68, CD31) tika novēroti pēc visu trīs kosmētisko ādas filleru injicēšanas visos 12 gadījumos.

Zināms, ka svešķermeņa granuloma ir hroniska granulatozo iekaisuma perēklis, kas veidojas, lai izolētu svešķermeni, kura eliminācija no audiem ir apgrūtināta, kā arī novērstu tā migrāciju. Granulomatozo iekaisumu raksturo makrofāgu akumulācija ap fagocitējamo materiālu, tie transformējas epiteloīdajos histiocītos un var saplūst kopā, veidojot daudzkodolainas gigantšūnas [4]. Nav zināms, kādēļ pēc naturālo filleru injekcijas dažiem pacientiem izveidojas mezglveida granulomas, kuru izmēri pieaug [3], taču uzskata, ka svešķermeņa granulomas rašanās atkarīga gan no ievadītā fillera materiāla īpašībām, gan ievades apjoma, tehnikas un vietas izvēles [4, 21].

Izmeklējot audus pēc kalcija hidroksilapatīta kosmētiskā fillera *Radiesse* injicijām, tika konstatētas gaiši violetas līdz pelēkas dažādas formas CaHA mikrosfēras ar neregulāru virsmu. Tās apņēma epiteloīdie histiocīti un daudzkodolainās svešķermeņa gigantšūnas. Imūnhistoķīmiski izmeklējot šos pašus audus, tika pierādīts, ka šīs gigantšūnas ir CD68 pozitīvas, un tas apstiprina to makrofagālo izcelsmi. Tika novērots, ka mikrosfēras ir inkorporētas arī gigantšūnu citoplazmā, un tas norāda uz CaHA mikrosfēru fagocitozi. Izteikts limfocītisks infiltrāts tika



novērots starp norobežotajām mikrosfēru grupām un minimāli arī starp saistaudu šķiedrām. Kopumā vizuāli tika konstatēta tieši pēc CaHA injekciju ierosinātajām svešķermeņa granulomām. Līdzīgos apstākļos arī citos pētījumos tika atrasta svešķermeņa granulomas reakcija [3, 21].

Sintētiskā kalcija hidroksilapatīta mikrosfēru ķīmiskā uzbūve ir identiska ar CaHA, kas atrodams kaulaudos un zobos, tādēļ kaulu minerālu mikrosfēras neizraisa alerģiskas reakcijas [22]. Svešķermeņa granulomas izveidi CaHA ievadīšanas gadījumā saista tieši ar injekcijām lūpās [6]. Uzskata, ka semipermanentie filleri (iedarbības ilgums 1–2 gadi), kā, piemēram, CaHA, biežāk izraisa svešķermeņa granulomu virsmas neregularitātes dēļ [22] un veido atšķirīgu daļiņu izmēru un formu pēc injekcijas mīkstajos audos [7]. Vairāki autori uzsver, ka kalcija hidroksilapatītu nerekomendē ievadīt lūpu vermilajā zonā tieši biežo ādas mezgliņu attīstības dēļ [6, 20, 22]. Šajā pētījumā visi audu paraugi iegūti pēc kosmētisko filleru injekcijām tieši lūpu ādā, tajā skaitā CaHA, kas norāda uz injekcijas veicēja neatbilstošu fillera izvēli konkrētajam apvidum.

Imūnhistoķīmiski izmeklējot audus no komplikāciju attīstības vietas pēc hialuronskābes dermālā fillera *Restylane* injekcijām, bija redzams CD68 pozitīvs bagātīgs multinukleāro gigantšūnu infiltrāts ar lielām, gaišām vakuolām to citoplazmā. Mēs uzskatām, ka iepriekš minētās vakuolas satur hialuronskābes biodegradācijas produktus. Savukārt, ja hialuronskābes filleris audos atrodas neilgi, tas preparātos, kas krāsoti ar hematoksilīnu-eozīnu, izskatās pēc bazofila homogēna materiāla, kas var atrasties gan ekstracelulāri, gan arī makrofāgu citoplazmā [19]. Atsevišķos apvidos netika novērota epiteloīdo histiocītu transformācija daudzkodolainajās gigantšūnās, taču bija redzams izteikts CD68 pozitīvs histiocītu infiltrāts.

Pēc HA fillera *Restylane* injekcijām dermas saistaudos tika atrasta granulomatoza reakcija ar svešķermeņa gigantšūnām, ko apņēm limfocītisks infiltrāts ar atsevišķiem plazmocītiem, kā arī palielināts tuklo šūnu daudzums. Medicīnas literatūras avotos minētas hroniskas granulomatozas reakcijas ar eozinofilo leukocītu infiltrāciju tieši pēc HA filleru injekciju izraisītu komplikāciju attīstības [7, 19], taču tuklās šūnas šādos preparātos iepriekš nav aprakstītas. Lai gan tuklo šūnu daļību iekaisuma reakcijās galvenokārt saista ar agrīnu hipersensitivitāti sensitizētiem pacientiem [4], tomēr redzams, ka arī hroniska iekaisuma rezultātā pēc HA filleru ievadīšanas tiek veicināta to migrācija uz komplikāciju attīstības vietu, un tas norāda uz alerģisku iekaisumu.

Kaut gan HA ķīmiskā struktūra starp sugām ir līdzīga un no dzīvniekiem vai baktērijām iegūtā hialuronskābe netiek uzskatīta par imunogēnu [6, 20], tomēr glikozaminoglikāna daļa ir saistīta ar sugas specifiskiem proteīniem. Minēts, ka HA filleri var saturēt nelielu daudzumu šo proteīnu, kas ir potenciāli alerģēni. Tāpat uzskata, ka HA filleru ierosinātā imūnatbildē nozīme ir molekulu izmēram un stabilizācijas pakāpei [7]. Tā kā savā dabiskajā formā HA tiku eliminēta no audiem ātrāk nekā 1–2 dienu laikā, tiek izmantoti šķērssavienotāji HA stabilizācijai. Augsta stabilizācijas pakāpe samazina ievadītā materiāla biosaderību ar audiem [23], taču *Restylane* stabilizācijas pakāpe ir salīdzinoši neliela [5]. HA kosmētiskajos filleros ietilpst gan stabilizētā, gan nomodificētā hialuronskābe [23]. Noskaidrots, ka šī šķīstošā frakcija (nomodificētā HA) sastāv no mazas molekulārās masas polimēru ķēdēm [11], kas uzskatāmas par fragmentiem. Fragmenti aktīvā makrofāgus,

dendrītiskās šūnas, stimulē iekaisuma citokīnu TNF- $\alpha$ , IL-12 un matricisa metalloproteināžu gēnu transkripciju, kā arī veicina endotelioģitū proliferāciju [15].

Izmeklējot audus pēc autologo taukaidu injekcijām, tika novēroti ieapaļas formas lieli, cistiski veidojumi, kas sastāv no ekstracelulāriem taukiem, apņemtiem ar plānu saistaudu kapsulu. Ap tauku pilieniem tika novērots liels daudzums šūnu grupu, kuru citoplazmā redzami centrāli novietoti tauku ieslēgumi. Izmeklējot audus imūnhistoķīmiski, tika pierādīts, ka šīs šūnas ir CD68 un CD31 pozitīvi fagocitētus lipīdus saturoši makrofāgi jeb lipofāgi. Speciālās literatūras avotos minēts, ka taukaidu cilmes šūnas, kas atrodas ievadītajos taukajos un pašā ievades vietā, spēj diferencēties arī par adipocītiem [10]. Pētījumā imūnhistoķīmiski pierādīts, ka šīs konstatētās taukus saturošās šūnas pēc savas izcelsmes ir makrofāgi, nevis adipocīti, kas cēlušies no ievadītā fillera vai radušies cilmes šūnu diferenciācijas rezultātā. Atsevišķi lipofāgi veidoja arī daudzkodolainās gigantšūnas, turklāt ap lipogranulomām novēroja fibrozi. Arī medicīnas literatūras avotos minēta iespējama lipogranulomas attīstība pēc autologo taukaidu injekcijām [14].

Autologie taukaudi ir neimunogēni, jo iegūti no paša pacienta audiem [12, 20] un tiek uzskatīti par ideālu pildvielu mīksto audu defektiem [10, 13]. Autologie taukaudi, atšķirībā no daudziem citiem filleriem, ir dzīvi audi [8], taču adipocīti ir ļoti trausli un var tikt bojāti taukaidu iegūšanas vai pārstrādes procesā [20]. Adipocītiem plīstot, atbrīvojas brīvie lipīdi, kas tiek fagocitēti un var veicināt lokālu iekaisuma reakciju un svešķermeņa granulomas izveidi [1]. Lai atdalītu dzīvotspējīgos adipocītus no tādiem nevēlamiem komponentiem kā asinis, brīvie lipīdi un plīsušie adipocīti, lipoaspirāts pirms ievadīšanas tiek attīrīts [18, 24]. Ziņots, ka brīvos lipīdus histoloģiski atrod lipoaspirātos, neskatoties uz izmantoto sagatavošanas metodi. Norādīts, ka atsevišķus tauku pilienus starp saistaudiem un makrofāgos novēro arī biopsijās, kas iegūtas no lūpu apvidus pēc autologo taukaidu injekcijām bez klīniski novērotām komplikācijām [2]. Pēc tā var secināt, ka ekstracelulārie brīvie lipīdi atrodami jebkurā autologo taukaidu kosmētiskajā fillerī, taču lipogranulomas izveidē noteicošā loma ir to daudzumam. Ja ievadītā fillera daudzums kopā ar brīvajiem lipīdiem pārsniedz makrofāgu spēju efektīvi tos fagocitēt, attīstīsies svešķermeņa granuloma ar lielu daudzumu lipofāgu. Atsevišķi lipofāgi, nespējot lielo lipīdu daudzumu efektīvi likvidēt no ekstracelulārās telpas, var saplūst, veidojot svešķermeņa gigantšūnas.

Adipocītu izdzīvošanu ietekmē arī lokālā asins apgāde taukaidu ievades vietā [1, 13, 18]. Nelielas adipocītu grupas, kas vienmērīgi izplatītas injekciju vietā, spēs adekvātāk saņemt barības vielas difūzijas ceļā līdz jauno asinsvadu izveidei. Pašlaik lietotā injekciju metode, manuāli spiežot virzuli, kamēr injekciju adata tiek virzīta ārā no audiem (retrogrādi), atkarīga no procedūras veicēja. Tā kā nav iespējams manuāli injicēt absolūti vienādu taukaidu tilpumu katrā injekcijas reizē, taukaudiem ir tendence veidot kompakts grupas, kas var veicināt nekrozi šo sakopojumu centrā [8]. Tauku šūnu nekroze šajā pētījumā netika novērota. Visticamāk, 4–8 mēnešus pēc injekcijas veikšanas nekrotiskās tauku šūnas jau fagocitējuši makrofāgi, bet lielais daudzums ekstracelulāro brīvo lipīdu, kuru fagocitoze ir apgrūtināta, ierosina izteiktu makrofāgu infiltrāciju un to transformāciju par lipofāgiem. Tātad brīvie lipīdi ekstracelulārajā telpā var nonākt gan sākotnēji, nepietiekami attīrot tos no iegūtā lipoaspirāta, gan ievadītajiem adipocītiem nekrotizējoties nepietiekamas asinsapgādes dēļ, kuras traucējumu iespējamību palielina ievadīto taukaidu apjoms.

Izpētot audus no komplikāciju attīstības vietas pēc autologo taukaudu ievadīšanas, tika novēroti arī atsevišķi lieli tauku pilieni starp saistaudiem, kas atrodas blakus asins kapilāriem. Ziņots, ka viena no iespējamajām kosmētisko filleru izraisītajām komplikācijām ir vaskulāra oklūzija [7, 12]. Injicētais fillera materiāls var izraisīt spiedienu ne tikai uz blakusesošajiem asinsvadiem, bet arī uz limfātiskajiem kapilāriem vai limfvadiem, radot limfas attecēs traucējumus un tūsku. Konkrētajā audu paraugā bija uzskatāmi redzams, ka kapilāra kompresija ir ļoti iespējama komplikācija gadījumā, ja blakusesošās lipīdu kolekcijas būtu lielākas vai tiktu injicētas tuvāk kapilāra sienīgai. Tāpēc ir rekomendējama jebkura kosmētiskā fillera minimālā efektīvā daudzuma injekcija, lai izvairītos no svešķermeņa granulomas attīstības un mazinātu asinsvadu un limfvadu kompresijas risku. Kaut gan minēts, ka ieteicamais autologo taukaudu ievadīšanas daudzums lūpās ir 0,25–0,5 ml [20], nav vienotas taktikas autologo taukaudu ievadīšanā [18], kā arī nav atrodami pētījumi, kas salīdzinātu komplikāciju attīstības biežumu pēc ievadītā filleru daudzuma. Ņemot vērā, ka granulomatozas reakcijas attīstībā pastāv individuālas organisma īpatnības, nevar runāt par kādu konkrētu daudzumu, kas būtu „drošs” ievadīšanai bez potenciālas imūnatbildes.

Pētījumā visu trīs kosmētisko filleru komplikāciju attīstības gadījumā audos tika atrastas CD31 pozitīvas postkapilārās vēnulas ar augstu endotēliju. Apskatītajos medicīnas literatūras avotos citi autori nav pētījuši šīs vēnulas un to izplatību ādā kosmētisko ādas filleru ierosinātu vēlīno blakusparādību gadījumā. Zināms, ka šādas specializētas vēnulas kontrolē imūnkompetento šūnu migrāciju uz iekaisuma norises vietu un sastopamas hroniska iekaisuma gadījumā. Apkārt vēnulām bija redzams bagātīgs limfohistiocītisks infiltrāts. Šādas vēnulas tika atrastas ne tikai kosmētiskā fillera injekcijas vietā (dermā, zemādā), bet arī augstākos ādas slāņos, kā gļotāda. Tas liecina par hronisku iekaisuma atbildes reakciju visos ādas slāņos ar aktīvu limfocītu, plazmocītu un makrofāgu migrāciju pēc kosmētisko filleru izraisītas svešķermeņa granulomas attīstības.

## Secinājumi

1. Biodegradējamo filleru izmantošana var izraisīt nopietnas blakusparādības – ādas rētošanos, mezgliņus, ilgstošu asins izplūdumu, tūsku u. c., kuras var likvidēt tikai pēc operatīvas fillera izņemšanas no audiem.
2. Svešķermeņa granuloma lūpu audos var attīstīties arī pēc biodegradējamo un biosaderīgu kosmētisko ādas filleru ievadīšanas, ko konstatēja visos pētījumā iekļautajos gadījumos.
3. Vēlīno komplikāciju attīstības gadījumā pēc biodegradējamo filleru ievadīšanas novēro strukturālās izmaiņas dermā, zemādā un gļotādā, un tas liecina par hroniska iekaisuma attīstību: vēnulas ar augsto endotēliju, limfoplazmocitāru infiltrātu un fibrozi.
4. Granulomatozs iekaisums *Restylane* lietošanas gadījumā ir alergisks, par ko liecina palielināts tuklo šūnu daudzums mikropreparātos.
5. Lai gan autologie taukaudi iegūti no paša pacienta audiem, pēc to ievadīšanas var attīstīties lipogranulomas ar taukus saturošiem CD68 un CD31 pozitīviem lipofāgiem.
6. Granulomatozs iekaisums ar svešķermeņa gigantsūnu veidošanos pēc bioloģiski noārdāmo filleru injicēšanas attīstās tāpēc, ka makrofāgi nespēj efektīvi

eliminēt filleri no audiem. Tas skaidrojams ar ievadītā fillera pārsniegto apjomu. Jebkura kosmētiskā fillera ievadīšanas gadījumā rekomendējama minimālā efektīvā daudzuma injekcija sīko lūpas ādas grumbu izlīdzināšanai vai lūpu kontūrplastikas veikšanai.

## Izmantotā literatūra

1. Ansoorge, H., Garza, J. R., McCormack, M. C., Leamy, P., Roesch, S., Barere, A., Connor, J. (2014). Autologous fat processing via the Revolve system: quality and quantity of fat retention evaluated in an animal model. *Aesthet Surg J.*, 34(3), pp. 438-447.
2. Bertossi, D., Zancanaro, C., Trevisiol, L., Albanese, M., Ferrari, F., Nocini, P. F. (2003). Lipofilling of the lips: ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy of injected adipose tissue. *Arch Facial Plast Surg.*, 5, pp. 392-398.
3. Eversole, R., Tran, K., Hansen, D., Campbell, J. (2013). Lip augmentation dermal filler reactions, histopathologic features. *Head Neck Pathol.*, 7(3), pp. 241-249.
4. Funt, D., Pavicic, T. (2013). Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 6, pp. 295-316.
5. Gold, M. H. (2010). Soft Tissue Augmentation in Dermatology – 2009 Update. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, 3(1), pp. 2-10.
6. Goldberg, D. J. (2009). Breakthroughs in US dermal fillers for facial soft-tissue augmentation. *J. Cosmet. Laser. Ther.*, 11, pp. 240-247.
7. Haneke, E. (2014). Adverse effects of fillers and their histopathology. *Facial Plast Surg.*, 30(6), pp. 599-614.
8. Hetherington, H. E., Block, J. E. (2013). Facial fat grafting with a prototype injection control device. *Clin. Cosmet. and Investig. Dermatol.*, 6, pp. 201-209.
9. ISAPS global statistics 2013. New York: International Society of Aesthetic Plastic Surgery. Pieejams: <http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics> [skatīts 18.02.2015.].
10. Kølbe, S.-F. T., Fischer-Nielsen, A., Mathiasen, A. B., Elberg, J. J., Oliveri, R. S., Glovinski, P. V., Kastrop, J., Kirchhoff, M., Rasmussen, B. S., Talman, M. L., Thomsen, C., Dickmeiss, E., Drzewiecki, K. T. (2013). Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*, 382, pp. 1113-1120.
11. La Gatta, A., Schiraldi, C., Papa, A., De Rosa, M. (2011). Comparative analysis of commercial dermal fillers based on crosslinked hyaluronan: Physical characterization and in vitro enzymatic degradation. *Polymer Degradation and Stability.*, 96 (4), pp. 630-636.
12. Marwah, M., Kulkarni, A., Godse, K., Abhyankar, S., Patil, S., Nadkarni, N. (2013). Fat Ful'fill'ment: A Review of Autologous Fat Grafting. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, 6(3), pp. 132-138.
13. Moyer, H. R., Namnoum, J. D. (2014). Autologous Fat Transfer: The Progenitor Cell Response to Different Recipient Environments. *Aesthet. Surg. J.*, 34(6), pp. 932-940.
14. Park, H. E., Kim, H. T., Lee, C. H., Bae, J. H. (2014). Delayed lipogranuloma of the cheek following autologous fat injection: report of 2 cases. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7(9), pp. 6391-6394.
15. Petrey, A. C., de la Motte, C. A. (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol.*, 5, p. 101.
16. Plastic Surgery Statistics Report 2012. American Society of Plastic Surgeons, 2012. Pieejams: <http://www.plasticsurgery.org/Documents/news-resources/statistics/2012-Plastic-Surgery-Statistics/full-plastic-surgery-statistics-report.pdf> [skatīts 12.05.2015.].
17. Plastic Surgery Statistics Report 2013. American Society of Plastic Surgeons, 2013. Pieejams: <http://www.plasticsurgery.org/Documents/news-resources/statistics/2013-statistics/plastic-surgery-statistics-full-report-2013.pdf> [skatīts 12.05.2015.].

18. Pu, L. L. (2012). Towards more rationalized approach to autologous fat grafting. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 65(4), pp. 413-419.
19. Requena, L., Requena, C., Christensen, L., Zimmermann, U. S., Kutzner, H., Cerro-ni, L. (2011). Adverse reactions to injectable soft tissue fillers. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 64(1), pp. 1-34.
20. Sadick, N. S., Karcher, C., Palmisano, L. (2009). Cosmetic dermatology of the aging face. *Clinics in Dermatology.*, 27, pp. 3-12.
21. Shahrabi-Farahani, S., Lerman, M. A., Noonan, V., Kabani, S., Woo, S. B. (2014). Granulomatous foreign body reaction to dermal cosmetic fillers with intraoral migration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 117, pp. 105-110.
22. Sánchez-Carpintero, I., Candelas, D., Ruiz-Rodríguez, R. (2010). Dermal fillers: types, indications, and complications. *Actas Dermosifiliogr.*, 101(5), pp. 381-393.
23. Tezel, A., Fredrickson, G. H. (2008). The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J. Cosmet. Laser Ther.*, 10(1), pp. 35-42.
24. Zhu, M., Cohen, S. R., Hicok, K. C., Shanahan, R. K., Strem, B. M., Yu, J. C., Arm, D. M., Fraser, J. K. (2013). Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system. *Plast. Reconstr. Surg.*, 131(4), pp. 873-880.

## Summary

**Background:** Over the past years, there has been an increase in the number of biodegradable cosmetic dermal filler injections. Early or delayed side effects can occur with any dermal filler, but the role of immunocompetent cells in development of unfavourable results is not specified.

**Aims:** To evaluate the facial tissue histopathological reactions after injections of biodegradable cosmetic fillers Restylane (hyaluronic acid), Radiesse (calcium hydroxylapatite CaHA) and autologous fat during the development of late side effects.

**Materials and methods:** A retrospective study was dedicated to, histological examination of tissues obtained during corrective surgeries 4–8 months after biodegradable filler injections for lip contouring purposes. Research included 12 patients who complained about long-term bruising, swelling, lip contour irregularity and nodules in lip mucosa. Control group included 3 patients. Tissue sections were stained with hematoxylin – eosin, Giemsa and immunohistochemically investigated for CD68 and CD31.

**Results and conclusions:** The results showed that the use of biodegradable dermal fillers for lip augmentation is associated with long term side effects, ranging from chronic lymphoplasmacytic inflammatory reactions to foreign body-type granulomatous reactions, fibrosis and proliferation of high-endothelium venules. After injections of Radiesse, histology slides demonstrated CaHA microspheres surrounded by epithelioid histiocytes, FBGC, lymphocytic infiltrate and fibrous tissue. After injections of Restylane, FBGC with vacuoles and increased amount of mast cells were found in dermis, which indicates allergic nature of the inflammatory response. Following autologous fat (AF) injections, histological evaluation revealed lipogranulomas with numerous CD68 and CD31 positive lipophages and occasional FBGC around free lipids. We believe that the excess fat grafts can induce local circulatory disorders, necrosis-like adipocyte death, formation of oil cysts, macrophage accumulation and fibrosis. If any filler's quantity exceeds the ability of macrophages to efficiently eliminate it, despite the biocompatibility, foreign body reaction will occur. Therefore, administration of the minimum effective amount of the filler is recommended.

**Keywords:** biodegradable fillers, calcium hydroxylapatite CaHA, hyaluronic acid HA, autologous fat, delayed complications.

## Ādas ļaundabīgo audzēju profilaktisko pasākumu efektivitāte ambulatorajā praksē

### *Effectiveness of skin tumour prophylaxis in ambulatory practice*

**Inese Kolontaja-Zaube, Ināra Ančupāne, Aija Žileviča**

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: *kolontaja@zb.lv*

Ādas ļaundabīgie audzēji ir trešā Latvijā visbiežāk sastopamā reģistrētā ļaundabīgā slimība. Latvijā ar melanomu ik gadu saslimst aptuveni 150–200 cilvēku. Ādas ļaundabīgo audzēju skaitlisko pieaugumu var skaidrot gan ar precīzāku izmeklējumu pieejamību, gan iedzīvotāju izglītības līmeņa paaugstināšanos, pateicoties informācijai masu saziņas līdzekļos, kas mudina laikus atpazīt riskantos veidojumus un griezties pie ārsta, gan diemžēl arī ar nekontrolēta ultravioletā (UV) starojuma hronisku iedarbību uz ādu solāriju apmeklētājiem. Melanoma ir ādas vēzis, kas ātri metastazē un var progresēt pat dažu mēnešu laikā. Gadījumos, kad diagnosticētas ādas priekšvēža formas un īstenota savlaicīga ārstēšana, slimniekam būtiski tiek paaugstināta turpmākās dzīves kvalitāte.

Darba mērķis ir noskaidrot slimnieku izglītības līmeni attiecībā uz ādas vēža profilakses pasākumiem, kā arī noteikt ādas veidojumu riska pakāpi izlases veidā 78 slimniekiem. Raksta tapšanā izmantotas anketas, kuras aizpildīja 78 ambulatorie slimnieki. Šai pacientu grupai tika dermatoskopiski izmeklēti ādas veidojumi un analizēta to riska pakāpe (SCOR). Slimniece, kurai izmeklēšanas laikā tika noteikta histoloģiski apstiprināta melanoma, atļāva rakstā izmantot fotoattēlus.

Secinām, ka 5% gadījumu ir novēroti paaugstinātas riska grupas veidojumi (SCOR virs 5,0 punktiem dermatoskopijā), 2 pacientiem konstatēts ādas vēzis – melanoma (diagnoze apstiprināta histoloģiski), 2 pacientiem – bazaliomas. Apkopojot anketu datus par iedzīvotāju izglītības līmeni attiecībā uz UV starojuma radīto paaugstināto risku attīstīties ādas pigmentšūnu veidojumiem un ādas ļaundabīgajiem audzējiem, secinām, ka 88% aptaujāto pacientu ir informēti par UV starojuma radīto risku, taču, neskatoties uz to, joprojām ievērojama daļa – 46% – apmeklē solārijus un siltajā gadalaikā sauļo ādu, neizmantojot UV aizsargfiltrus.

Vēlamies uzsvērt, cik būtiski dermatologa un ģimenes ārsta praksē ir apskatīt visus ādas veidojumus ikvienam pacientam, kurš griežas pie ārsta ar jebkādam veselības problēmām. Ja ir konstatēti makroskopiski aizdomīgi veidojumi, pacientam ir jāiesaka griezties pie dermatologa un ar dermatoskopiju – neinvazīvu, nesāpīgu un ātri veicamu procedūru – padziļināti precizēt veidojuma dabu un riska pakāpi. Šādi profilaktiski pasākumi ir augsti efektīvi, to apstiprina arī ambulatorajā praksē apkopotie dati.

**Atslēgvārdi:** ādas vēzis, melanoma, dzīves kvalitāte, dermatoskopija, profilakse.



## Ievads

Ādas ļaundabīgie audzēji ir trešā Latvijā visbiežāk sastopamā reģistrētā ļaundabīgā slimība. Latvijā ar melanomu ik gadu saslimst aptuveni 150–200 cilvēku. Melanomas un citu ādas ļaundabīgo veidojumu attīstībai ir šādi riska faktori: ādas vēža gadījums ģimenē asins radniekam; liels iegūto atipisko dzimumzīmju skaits (virs 50); aktīva vai pasīva smēķēšana; nomākta imūnsistēma; anamnēzē diagnosticēta melanoma; gaiša āda, gaiši vai rudi mati, zilas acis (I vai II ādas fototips); bieža uzturēšanās saulē bez ultravioletiem aizsargfiltriem, pastāvīgi solārija apmeklējumi; ādas reakcija uz sauli: neiedegšana, bieža apdegšana; sieviešu dzimums (2 reizes lielāks risks) [1, 4, 6, 12, 14].

Pacientam nekavējoties jāgriežas pie speciālista, ja tiek novērota kāda no turpmāk minētajām pazīmēm: izmainās dzimumzīmes virsma, robežas, diametrs, krāsa; veidojuma virsmā parādās lobīšanās, mitrošana, asiņošana, krevēles veidošanās; jauns veidojums sāk strauji augt vai esošā veidojuma izmērs sāk strauji palielināties; pigmenta izplešanās apkārtējā ādā, krāsas izmaiņas veidojumā (parādās vairāk nekā 2 krāsas, īpaši bīstama ir pienaini zila nokrāsa, bālgani sārta nokrāsa), sajūtu izmaiņas, piemēram, nieze, jutīgums, sāpīgums; čūla, kura nesadzīst 3 nedēļu laikā [1, 4, 6, 7, 8, 9, 12].

Savlaicīga diagnostika un melanomas ķirurģiska izgriešana agrīnās saslimšanas stadijās nodrošina 95–97% izārstēšanos. Nereti cilvēki neapzinās savu ādas veidojumu riska pakāpi, jo nav bijuši motivēti lūgt speciālistam tos izmeklēt. Masu saziņas līdzekļos pēdējos gados aizvien palielinās informācijas apjoms par ādas ļaundabīgo audzēju profilakses pasākumiem un hroniska ultravioletā starojuma negatīvo ietekmi, kā arī iespējām neinvazīvi izmeklēt ādas veidojumus un apzināties to riska pakāpi un turpmāko rīcības plānu [1, 3, 5, 7, 9, 12, 14].

Raksta **mērķis** ir apkopot 78 ambulatoru slimnieku anketēšanas datus par izglītības līmeni attiecībā uz UV starojuma ietekmi ādas vēža attīstībā un noskaidrot ļaundabīgo un priekšvēža audzēju sastopamības biežumu šajā slimnieku grupā.

## Materiāli un metodes

78 ambulatori slimnieki aizpildīja anketas, kurās ietverti jautājumi, lai noskaidrotu, kādas ir slimnieku zināšanas par ultravioletā starojuma radīto risku attiecībā uz ādas ļaundabīgo audzēju attīstību, kā arī par iedzīvotāju paradumiem apmeklēt solārijus un sauļoties bez ultravioletā starojuma aizsargfiltru krēmiem. Slimniekiem, kuri aizpildīja anketas, neatkarīgi no tā, ar kādām sūdzībām viņi griezušies pie dermatologa, papildus tika piedāvāta iespēja bez maksas izmeklēt ādas veidojumus; tam piekrita visi slimnieki. Viena slimniece, kurai izmeklēšanas gaitā tika konstatēta ādas vēža forma melanoma, piekrita publicēt fotoattēlus un datus no viņas ambulatorās kartes.

## Rezultāti

Apkopojot datus no 78 pilnībā aizpildītām anketām, atklājām, ka 88% slimnieku ir dzirdējuši par ādas vēžu attīstības risku, ko rada ultravioletais starojums, taču joprojām liels skaits – 46% – aptaujāto apmeklē solāriju un siltajā gadalaikā sauļo

ādu, neizmantojot UV aizsargfiltrus. Dermatoskopiski izmeklējot 78 slimniekus, 5% gadījumu konstatēti paaugstināta riska grupas veidojumi (SCOR > 5,0 punkti dermatoskopijā), 2 slimniekiem konstatēts ādas vēzis melanoma (diagnoze apstiprināta histoloģiski) un 2 slimniekiem – bazaliomas.

Viena no izmeklētajām slimniecēm (iniciāli V. G., dzimšanas gads 1954) piekrita publicēt savas ambulatorās kartes datus un ādas veidojumu fotoattēlus. Slimniece griezusies pie dermatologa 2015. gada oktobrī ar sūdzībām, ka divus gadus ir bojāti kāju nagi, kuri ekonomisku apsvērumu dēļ nav izmeklēti un ārstēti. Slimību anamnēzē tiek uzrādīta arteriāla hipertensija, aptaukošanās un hiperholesterinēmija. Dzīves un darba anamnēzē slimniece atzīmē, ka strādā par apkopēju skolā, brīvajā laikā vasarās daudz sauļojas, alkoholu lieto reti, nesmēķē. Ģimenē datu par hroniskām vai onkoloģiskām saslimšanām nav. Objektīvi izmeklējot roku un kāju nagus, tiek konstatēta onihomikoze ar naga plātnītes pilnīgu bojājumu. Laboratoriski apstiprinās *Candida spp.* un pelējuma sēnes. Pēdu ādā ir objektīvi izteikta deskvamācija, starppirkstu ādā plaisas, mitrošana. Laboratoriski konstatēta mikroskopisko sēņu izraisīta pēdu mikoze. Sūdzības par izsitumiem uz ādas vai gļotādās paciente neuzrādīja. Veicot objektīvā stāvokļa pilnīgu apskati un izmeklējot pacientes visa ķermeņa ādu un gļotādas, tika konstatēta šāda atrade: ādas priekšvēža forma aktīniska keratoze (diagnoze apstiprināta dermatoskopiski), multipli seborejiskas keratozes (bez dermatoskopiska riska pazīmēm), multipli papilomas uz kakla, cirkšņos, padusēs, angiomas bez dermatoskopiska riska pazīmēm uz vēdera ādas, cirkšņu gludās ādas mikoze (laboratoriski konstatētas mikroskopiskās sēnītes cirkšņu ādā), galvas matainajā daļā seborejisks dermatīts, sejas ādā rozācija, uz augšdelma melanoma (apstiprināta histoloģiski).

Ādas un tās derivātu slimības, kas konstatētas slimniecei, kura griezusies pie dermatologa ar sūdzībām tikai par bojātiem kāju nagiem, pēc apskates un izmeklēšanas ir šādas: onihomikoze; pēdu mikoze; cirkšņu gludās ādas mikoze; seborejisks dermatīts; rozācija 3. stadijā; seborejiskas keratozes; aktīniska keratoze; angiomas; papilomas; *melanoma cutis brachii sinistra* (melanoma kreisā augšdelma ādā) – pT<sub>2b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>IIA stadija (histoloģijas slēdziens). Ar slimnieces atļauju pievienotas fotogrāfijas.



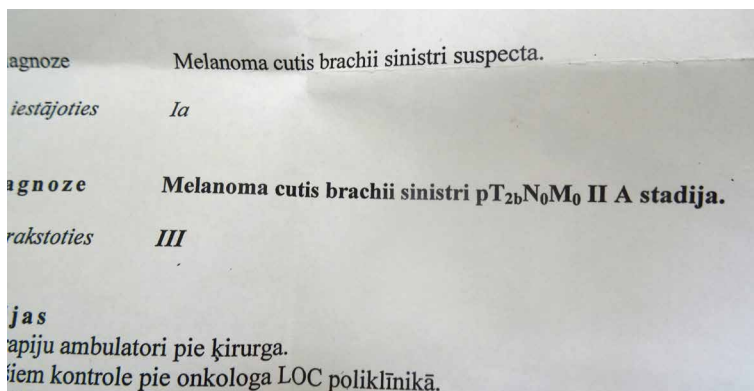
1. attēls. Makroskopiski melanoma uz augšdelma ādas

Figure 1. Melanoma on upper arm





2. attēls. Stāvoklis pēc melanomas radikālas ekscīzijas  
*Figure 2. Status after radical treatment*



3. attēls. Izoperētā veidojuma histoloģijas slēdziens  
*Figure 3. Histology conclusion*



4. attēls. Aktīniska keratoze, seborejiskas keratozes, angiomas  
*Figure 4. Actinic keratosis, seborrheic keratosis, angiomas*



5. attēls. **Multiplas papilomas (stāvoklis uzreiz pēc krioterapijas)**

*Figure 5. Papillomas*



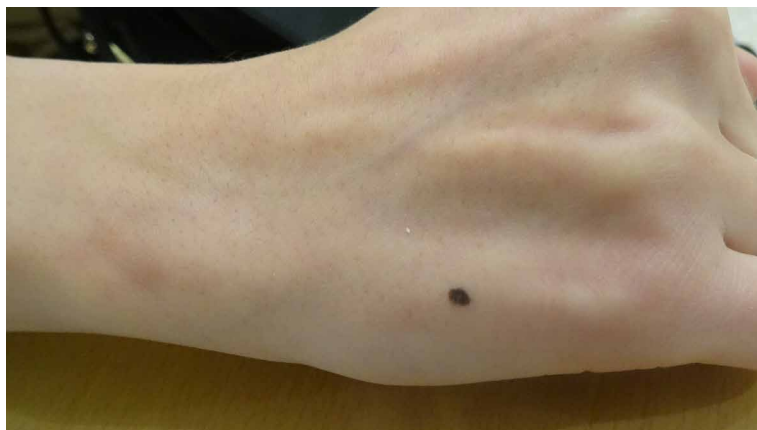
6. attēls. **Pēdu mikoze un onihomikoze**

*Figure 6 . Foot mycosis and onychomycosis*



7. attēls. **Progresējoša ādas melanoma**

*Figure 6. Progressing melanoma*



8. attēls. Augsta riska atipiska dzimumzīme

Figure 7. Atypical nevus of high risk

## Diskusija

Visiem slimniekiem neatkarīgi no tā, ar kādām sūdzībām viņi griežas pie ārsta, ir nepieciešams apskatīt ādas veidojumus. Katram slimniekam ir jāsniedz informācija par Latvijā un pasaulē paaugstināto ādas vēža risku un profilakses pasākumiem. Ādas priekšvēžu diagnostika un iedzīvotāju izglītošana ir primārs profilaktisks uzdevums [2, 5, 6, 9, 10, 15, 16, 18, 20]. Ādas vēža formām diagnozes apstiprina histoloģiski. Visi dermatoskopiski noteiktie augsta riska grupas veidojumi tiek nosūtīti uz ekscīziju un sekojošu histoloģisku diagnostiku. Laikus ārstējot ādas priekšvēžu formas, iespējams būtiski paaugstināt pacienta dzīves kvalitāti un ievērojami motivēt turpmākajā dzīvē ievērot ārsta sniegtās rekomendācijas, kā novērst faktorus, kas ietekmē ādas veidojumu risku. Slimnieki, kuri paši ir saskārušies ar diagnosticētām ādas priekšvēžu un vēžu formām, izglīto arī savus radniekus, paziņas un draugus un iesaka izmeklēties pie dermatologa. Savlaicīga riska grupas veidojumu diagnostika ir veiksmīgas terapijas pamats.

## Secinājumi

Iedzīvotāju zināšanu līmenis par ultravioletā starojuma kaitīgo ietekmi attiecībā uz ādas pigmenta veidojumu risku ir apmierinošs, proti, no 78 aptaujātajiem slimniekiem 88% atzīmēja, ka zina par ultravioletā starojuma radīto risku, taču 46% aptaujāto joprojām periodiski apmeklē solārijus un dabīgajā saulē neizmanto UV starojuma aizsargfiltrus. Izmeklējot šo slimnieku ādas veidojumus, tika atklātas 2 melanomas, 2 bazaliomas un 5% gadījumu – paaugstināta riska pigmenta veidojumi (SCOR virs 5 punktiem dermatoskopijā). Būtisks profilaktisks pasākums, kas izteikti paaugstinās dzīves kvalitāti, ir rutīnas praksē visu slimnieku neatkarīgi no sūdzībām, ar kādām viņi griežas pie speciālista, ādas veidojumu makroskopiska un nepieciešamības gadījumā dermatoskopiska izmeklēšana.

## Izmantotā literatūra

1. Kaufman, H. L. (2005). *The Melanoma Book: A Complete Guide to Prevention and Treatment, Including the Early Detection Self-Exam Body Map Paperback – Bargain Price*, pp. 1-20.
2. McClay, E. F., McClay, M.-E. T., Smith, J. (2010). *100 Questions & Answers about Melanoma & Other Skin Cancers*. Jones and Bartlett Publishers, pp. 1-3.
3. Policy statement – Ultraviolet radiation: A hazard to children and adolescents. (2011). American Academy of Pediatrics. *Pediatrics*, 127, pp. 588-597.
4. Melanoma of the skin. (2010). American Joint Committee on Cancer. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7<sup>th</sup> ed. New York: Springer, pp. 325-344.
5. Berman, B., Villa, A. M. (2005). Immune response modulators in the treatment of skin cancer. In: Rigel, D. S., Friedman, R. J., Dzubow, L. M., Reintgen, D. S., Bystry, J. C., Marks, R., eds. (2005). *Cancer of the Skin*. Philadelphia, Pa, Elsevier Saunders, pp. 499-513.
6. Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New Engl. J. Med.*, 353, pp. 2135-2147.
7. Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., et al. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: Evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.*, 26, pp. 5233-5239.
8. Wolchok, J., Flaherty, K. (2015). *Melanoma book. Not Just Skin Cancer*, pp. 20-46.
9. Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., et al. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.*, 367, pp. 1694-1703.
10. Kubica, A. W., Brewer, J. D. (2012). Melanoma in immunosuppressed patients. *Mayo Clin. Proc.*, 87(10), 991-1003.
11. Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., et al. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.*, 367, pp. 1694-1703.
12. El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., et al. (2009). A review of human carcinogens – part D: Radiation. *Lancet Oncol.*, 10, pp. 751-752.
13. *N. Engl. J. Med.* (2013). Melanoma, 369, pp. 134-144.
14. Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 367, pp. 107-114.
15. Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J. Clin.*, 62, pp. 30-67.
16. Leachman, S. A., Lowstuter, K., Wadge, L. M. (2005). Genetic testing for melanoma. In: Rigel, D. S., Friedman, R. J., Dzubow, L. M., Reintgen, D. S., Bystry, J. C., Marks, R., eds. *Cancer of the Skin*. Philadelphia, Pa, Elsevier Saunders, pp. 281-290.
17. Olsen, C. M., Carroll, H. J., Whiteman, D. C. (2010). Estimating the attributable fraction for melanoma: A meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int. J. Cancer.*, 127, pp. 2430-2445.
18. Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., et al. (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.*, 29, pp. 917-924.
19. Robert, C., Long, G. V., Brady B., et al. (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.*, 372, pp. 320-330.
20. Slingluff, C. L., Flaherty, K., Rosenberg, S. A., Read, P. W. (2011). Cutaneous melanoma. In: DeVita, V. T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S. A., eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1643-1691.

## Summary

*The skin cancers are the third most common type of cancer in Latvia, with approximately 150 to 200 new cases of melanoma each year. The increased frequency of melanoma cases is due to more efficient investigations, increased level of education, and, unfortunately, also to uncontrolled skin exposure to the ultraviolet radiation, such as solaria [1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 18]. The aim of the present publication is to show the importance of prophylaxis, as it can decrease the number of new melanoma cases. The data were obtained from 78 questionnaires asking patients to demonstrate their knowledge about the side effects of exposure to the ultraviolet radiation and frequency of the skin's exposure to ultraviolet radiation in the solaria or without using sunscreens in summer. The dermatoscopy results in 78 patients are also included. In a lot of cases, patients did not know about the risk group lesions localised on the body areas and difficult to observe on one's own. The melanoma is the skin cancer, which progresses rapidly and, unfortunately, produces metastasis in other organs [13, 14, 15, 16, 19, 20]. In cases, when a dermatologist diagnoses the atypical nevi with a high SCOR points in dermatoscopy, and those nevi are excised surgically, patient's life quality remains good [1, 4, 7, 9, 11, 12, 17]. One of the patients (initials VG, year of birth 1954) agreed to publish the data from her anamnesis and photos. The patient complained about damaged toe nails for two years. After a full skin investigation, ten diagnoses were identified, including melanoma cutis. Out of the dermatoscopy data obtained from the total of 78 patients, 5% of atypical nevi, two melanomas, and two basaliomas were confirmed. The questionnaires indicate that 88% of the respondents are well educated about the potential side effects of the ultraviolet radiation on the skin; however, 46% continue attending solaria and never apply UV sunscreens in summer. We would like to stress the importance of skin tumour prophylaxis in all patients that can be achieved with routine skin tumour investigations in the practices of family doctors and dermatologists.*

**Keywords:** skin tumour; melanoma, life quality, dermatoscopy, prophylaxis.

## **Nagu bojājumu klīnisko parametru izpēte vieglas, vidēji smagas un smagas psoriāzes slimniekiem ambulatorajā praksē**

### ***The clinical investigation of psoriatic onychia in outpatients with mild, moderate and severe skin psoriasis***

**Inese Kolontaja-Zaube, Ināra Ančupāne, Aija Žileviča**

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1586

E-pasts: [kolontaja@zb.lv](mailto:kolontaja@zb.lv)

Psoriāze ir viena no ambulatorajā praksē visbiežāk ārstētajām papulozajām zvīņainajām slimībām, kas var attīstīties jebkurā vecumā. Tās klīniskās izpausmes variē no vieglām līdz izteikti smagām formām. Psoriātisks nagu bojājums, kas skar roku nagus, negatīvi ietekmē pacientu dzīves kvalitāti. Ambulatorajā praksē novērots, ka ādas bojājuma smaguma pakāpe ne vienmēr ir saistīta ar nagu bojājumu. Pētījuma mērķis ir izpētīt klīniskajā praksē ārstēto psoriāzes slimnieku nagu bojājumu saistību ar ādas bojājumu smaguma pakāpi.

Pētījumā izmantoti dati no 29 slimnieku ambulatorajām kartītēm. Pētījuma metodes ir psoriāzes smaguma pakāpi izvērtējošie indeksi, proti, NAPSĪ (*nail psoriasis severity index* – nagu psoriāzes smaguma pakāpes indekss) un BSA (*body surface area* – ķermeņa laukuma indekss). Rezultātā 13 pacientiem tika konstatēta viegla vai vidēji smaga ādas psoriāze (BSA  $\leq$  10%) un 16 pacientiem – smaga ādas psoriāze (BSA  $>$  10%). Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *graph pad 4 prizma* programmu.

Pētāmajā grupā tika konstatēta statistiski ticama atšķirība starp ķermeņa virsmas laukuma indeksu vieglas vai vidēji smagas un smagas psoriāzes slimnieku grupā ( $p < 0,05$ ). Starp nagu psoriāzes smaguma pakāpes indeksiem vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes grupā statistiski ticamas atšķirības netika konstatētas ( $p > 0,05$ ). Pētāmajā grupā nagu bojājumu smaguma pakāpe ne vienmēr ir saistīta ar ādas bojājumu smaguma pakāpi. Gadījumos, kad psoriāzes ķermeņa virsmas laukuma indekss ataino vieglu formu, nagu bojājuma smaguma pakāpes indekss var būt augsts un var negatīvi ietekmēt slimnieka dzīves kvalitāti.

Psoriāzes nagu bojājumu ārstēšanas līdzekļu formas joprojām ir izpētes stadijā. To ārstēšanā lietotie ārīgie medikamenti ir krēmu, ziežu, gelu vai šķīdumu formā, kas negarantē to nokļūšanu naga plātnītē. Ambulatorajā praksē saskaramies ar grūtībām ārstēšanas veidu izvēlē slimniekiem ar smagu nagu psoriāzes pakāpi.

**Atslēgvārdi:** psoriāze, psoriātisks nagu bojājums, dzīves kvalitātes indekss.



## Ievads

Psoriāze ir viena no ambulatorajā praksē visbiežāk ārstētajām ādas zvīņainajām slimībām, kas var attīstīties jebkurā vecumā, un tās izpausmes var būt no vieglām līdz izteikti smagām [2, 3, 4, 6, 10]. Tā ir neskaidras etioloģijas slimība [1, 5, 7, 8]. Terapija ir patoģenētiska un ne vienmēr augsti efektīva, taču vairumā gadījumu spēj uzlabot slimnieku dzīves kvalitāti [1, 9, 10]. Psoriātisks roku nagu bojājums izteikti samazina slimnieku dzīves un darba kvalitāti [1, 3, 5]. Pacienti atzīmē, ka nagu bojājums ir bijis traucēklis atrast darbu, kas saistīts ar komunikāciju un apkalpošanas sfēru, un ierobežojis ekonomisko aktivitāti.

Pētījuma **mērķis** ir noskaidrot ambulatori ārstēto psoriāzes slimnieku nagu bojājuma smaguma pakāpi un tās saistību ar ādas bojājumu.

## Materiāli un metodes

Pētījumā izmantoti dati no 29 ambulatorajām kartītēm. Pacienti tika ārstēti ambulatori SIA „Veselība un estētika” laika posmā no 2012. līdz 2015. gadam. Visiem slimniekiem konstatēta ādas un nagu psoriāze. Nagu bojājums izvērtēts, izmantojot NAPSI un PGA (*physician global assessment* – ārsta vērtējums) indeksu; ādas bojājuma smaguma pakāpe izvērtēta, izmantojot BSA indeksu. Ķermeņa virsmas laukuma indekss aprēķināts pēc pacienta plauksta lieluma vienības, kas atbilst 1%. Nagu psoriāzes smaguma pakāpes indeksa noteikšanā nags tiek sadalīts ar horizontālu un vertikālu līniju četros kvadrantos. Katrā kvadrantā vērtēta naga pamatnes psoriāze (punktu skaits 0–4) un naga saknes psoriāze (punktu skaits 0–4). Jo augstāks ir punktu skaits, jo smagāka psoriāze [1, 3, 4, 9, 10].

Nagu pamatnes psoriāze tiek vērtēta pēc šādām pazīmēm: punktveida iespiedumi, leikonihijs (pienaini balti plankumi), sarkani plankumi naga mēnestiņā, rievjums, atbilstoši piešķirot punktus: 0 punkti – minēto pazīmju nav, 1 punkts – minētās pazīmes ir vienā kvadrantā, 2 punkti – minētās pazīmes ir divos kvadrantos, 3 punkti – minētās pazīmes ir trīs kvadrantos, 4 punkti – minētās pazīmes ir četros kvadrantos [1, 3, 4, 9, 10].

Naga saknes psoriāze tiek vērtēta pēc šādām pazīmēm – oniholīze (naga plātnītes atdalīšanās no naga gultnes), sazaratās hemorāģijas, zemnaga hiperkeratoze, eļļas plankumu klātbūtne jeb laša krāsas plankumainā dishromija. 0 punkti tiek piešķirti, ja minēto pazīmju nav, 1 punkts – ja minētās pazīmes ir vienā kvadrantā, 2 punkti – ja minētās pazīmes ir divos kvadrantos, 3 punkti – ja minētās pazīmes ir trīs kvadrantos, 4 punkti – ja minētās pazīmes ir četros kvadrantos. Kopējais punktu skaits veidojas, summējot naga gultnes un naga saknes psoriāzes punktus (0–8). Kopējais NAPSI punktu skaits visiem roku nagiem var būt no 0 līdz 80 [3, 4, 7, 8, 9, 10].

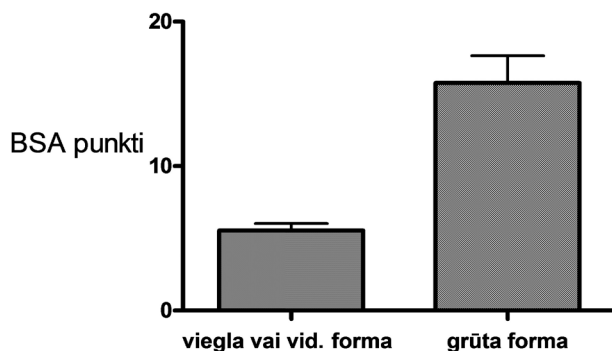
*Tabula. Nagu psoriāzes smaguma pakāpe ārsta vērtējumā (PGA)*

*Table. Medical assessment of nail psoriasis severity (Physician Global Assessment – PGA)*

| Bojājuma smaguma pakāpe | Naga bojājuma smaguma pakāpes raksturojums | Ārsta vērtējums par naga proksimālo pamatnes daļu   | Ārsta vērtējums par naga distālo pamatnes daļu   | Ārsta vērtējums par naga sakni (skartais laukums %)           |
|-------------------------|--|---|--|---|
| 0                       | Vesels nags                                | Leikonihijs (līdz diviem laukumiem) vai citi virsmas defekti, izņemot punktveida iespaidumus                                  | Leikonihijs (līdz diviem laukumiem) vai citi virsmas defekti, izņemot punktveida iespaidumus | Naga brīvā mala ir līdzena un pilnībā ieguļ distālajā bedrītē |
| 1                       | Gandrīz vesels nags                        | 1–5 punktveida iespaidumi vai leikonihijs, vai sarkanie plankumi  | 1–5 punktveida iespaidumi vai leikonihijs  | Oniholīze vai laša krāsas plankumi (līdz 10%)                 |
| 2                       | Viegla forma                               | 6–10 punktveida iespaidumi vai leikonihijs, vai sarkanie plankumi   | 6–10 punktveida iespaidumi vai leikonihijs   | Oniholīze vai laša krāsas plankumi (11–25%)                   |
| 3                       | Vidēji smaga forma                         | 11–20 punktveida iespaidumi vai leikonihijs, vai sarkanie plankumi  | 11–20 punktveida iespaidumi vai leikonihijs  | Oniholīze vai laša krāsas plankumi (26–50%)                   |
| 4                       | Smaga forma                                | Vairāk nekā 21 punktveida iespaidums vai leikonihijs, vai sarkanie plankumi, vai rievojums, saplūstot punktveida iespaidumiem | Vairāk nekā 21 punktveida iespaidums vai rievojums, saplūstot punktveida iespaidumiem        | Oniholīze vai laša krāsas plankumi (vairāk nekā 51%)          |

## Rezultāti

13 pacientiem konstatēta viegla vai vidēji smaga psoriāze (BSA  $\leq$  10%), savukārt 16 pacientiem – smagas formas psoriāze (BSA virs 10%). Nagu psoriāzes smaguma pakāpes (NAPSI) vidējais rādītājs vieglas un vidēji smagas ādas psoriāzes pacientu grupā ir 13,54 punkti, savukārt smagas ādas psoriāzes pacientu grupā – 14,81 punkti.



1. attēls. BSA vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes grupā

Figure 1. BSA in weak, moderate and severe skin psoriasis groups

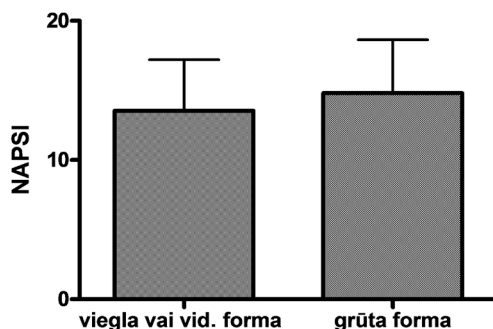
Tika konstatēta statistiski ticama atšķirība starp BSA indeksu vieglas vai vidēji smagas un smagas psoriāzes pacientu grupā ( $p < 0,05$ ).

Statistiskā analīze *GraphPad Prism 4* programmā:

Sapārotā t testa  $p$  vērtība aprēķināta  $p < 0,0001$ .

Ir konstatēta statistiski ticama atšķirība starp grupām ( $p < 0,05$ ).

Savukārt starp NAPSI indeksiem vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes grupā statistiski ticamas atšķirības netika konstatētas ( $p > 0,05$ ).



2. attēls. NPSI vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes grupā

Figure 2. NPSI in weak, moderate and severe skin psoriasis groups

Statistiskā analīze *GraphPad Prism 4* programmā. Sapārotā t testa  $p$  vērtība aprēķināta 0,8580, proti,  $p$  vērtība nav statistiski ticama, jo  $p > 0,05$ .

## Secinājums

Statistiski ticama atšķirība starp nagu psoriāzes smaguma pakāpi izvērtējošo indeksu (NAPSI) vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes slimnieku grupā netika konstatēta ( $p > 0,05$ ).

## Diskusija

Psoriāzes ādas smaguma pakāpe ir noteicošais faktors ārstēšanas veidu izvēlē. Lai izvērtētu skarto ķermeņa laukumu, izmanto ķermeņa laukuma indeksu (BSA). Nagu bojājumu smaguma pakāpes izvērtēšana pēc NAPSI skalas tiek izmantota galvenokārt klīniskos pētījumos, nevis ikdienas ambulatorajā ārsta darbā. To skaidro ar metodes sarežģītības pakāpi un iegūto datu apstrādes laiku [2, 4, 8, 10].

Pētījumā secināts, ka statistiski ticama atšķirība starp nagu psoriāzes smaguma pakāpi izvērtējošo indeksu vieglas vai vidēji smagas un smagas ādas psoriāzes slimnieku grupā netika konstatēta ( $p > 0,05$ ). Pētījumā tika izmantoti dati no 29 slimnieku ambulatorajām kartītēm. Turpmākajā darbā plānojam paaugstināt pētīto slimnieku skaitu. Pētīto slimnieku grupā gadījumos, kad ķermeņa laukuma virsmas indekss atspoguļo vieglu vai vidēji smagu ādas psoriātisko procesu un nav nepieciešama sistēmiska terapija ādas bojājumu ārstēšanā, nagu bojājums var būt smagas pakāpes un samazināt slimnieku dzīves kvalitāti.

Sobrīd Latvijā un pasaulē psoriātisku nagu bojājumu ārstēšanas formas ir izpētes stadijā un ambulatorajā praksē piemērotie ārīgie medikamenti ir krēmu, ziežu, gelu vai šķīdumu formā, kas negarantē to nokļūšanu naga pamatnē un saknē [1, 6, 9]. Aktīvās vielas, kuras izmanto psoriāzes ārīgajā ārstēšanā, piemēram, kalcipotriols, tiek pētītas laku formās, kas varētu nodrošināt to nokļūšanu naga pamatnē un saknē [1, 2, 4, 9].

Ambulatorajā praksē gadījumos, kad nagu bojājums ir smagas pakāpes un izteikti mazina slimnieka dzīves un darba kvalitāti, neskatoties uz to, ka ādas bojājums ir viegls vai vidēji smags, var rasties vajadzība apsvērt sistēmiskas ārstēšanas nepieciešamību. Naga pamatnes šūnu keratoģenēzes process nodrošina naga plātnītes vizuālo stāvokli [1, 5, 6, 7, 10]. 20% psoriāzes slimnieku ir novērots pozitīvs *Kebnera* fenomens – šūnu lokāla traumatizācija provocē psoriātisko procesu. Psoriāzes slimnieces atzina, ka manikīra procedūras nagiem veic pašrocīgi vai salonos, kas nav medicīniska profila iestādes. Tas varētu būt kā lokāls traumējošs faktors, kas īslaicīgi maskē defektu, bet vienlaikus provocē psoriātiskā nagu bojājuma progresēšanu.

Ņemot vērā psoriāzes sastopamības biežumu un pieaugumu populācijā, nepieciešams sabiedrību papildus izglītot par psoriātisko procesa provocējošiem faktoriem un profilakses pasākumiem [1, 4, 9]. Ir būtiski izstrādāt iedarbīgus ārīgās ārstēšanas medikamentus. Tas ļautu novērst blakņu risku, kas var rasties, medikamentu lietojot parenterāli. Šim nolūkam būtu nepieciešams izstrādāt aktīvo vielu preparātus, piemēram, kā kalcipotriols un imunosupresanti, tādās ārīgās darbības aplikāciju formās, kas nodrošinātu to nokļūšanu naga gultnē un saknē. Pasaulē tiek pētīta ārīgas darbības ārstniecisko vielu laku formu efektivitāte psoriātisko nagu bojājumu ārstēšanā [1, 10].

Tas atvieglo tu ārstēšanas veidu izvēli slimniekiem, kuriem skartais ķermeņa platības laukums ir vieglas vai vidēji smagas pakāpes un nav nepieciešama sistēmiska ārstēšana, savukārt nagu psoriātiskais bojājums ir smagas pakāpes. Slimniekiem ar smagas pakāpes psoriātisku nagu bojājumu dzīves kvalitāte ir izteikti zemāka, un nereti pacienti ir pakļauti emocionāli dziļām ciešanām vai depresijai, jo nav spējīgi konkurēt darba tirgū. Pacienti atzīmē, ka vairumā gadījumu ādas bojājumus var nosegt ar apģērbu, bet roku nagi smagu bojājumu gadījumos nav masķējami. Nags ataug vidēji 1–2 mm mēnesī, tādēļ ārstēšanas process ir laikietilpīgs.

Mūsu uzdevums, ārstējot psoriāzes slimniekus, ir izmantot iedarbīgākos ārstēšanas līdzekļus, vienlaikus mazinot iespējamo blakņu risku (tās saistītas ar medikamentu lietošanu) [3, 7, 9, 10]. Kā gandarījums ārstam un ieguvums pacientam ir slimnieka dzīves kvalitātes līmeņa būtisks paaugstinājums, pateicoties pareizai izmeklēšanai un mērķtiecīgai individuālas ārstēšanas formas izvēlei [2, 8].

## Izmantotā literatūra

1. Klaassen, K. M., van de Kerkhof, P. C., Bastiaens, M. T., Plusjé, L. G., Baran, R. L., Pasch, M. C. (2014). Scoring nail psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 70(6), pp. 1061-1066.
2. Beers, M. H., Porter, R. S. (2010). Merck Manual of Diagnosis and Therapy. 19<sup>th</sup> ed., pp. 50-102.
3. Bobonich, M., Nolen, M. (2010). *Dermatology for Advanced Practice Clinicians*. 1<sup>st</sup> ed., pp. 2-116.
4. Errichetti, E., Stinco, G. (2015). The practical usefulness of dermoscopy in general dermatology. *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, 150(5), pp. 533-546.
5. Rich, P., Scher, R. K. (2003). Nail Psoriasis Severity Index: a useful tool for evaluation of nail psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 49(2), pp. 206-212.
6. Mason, A. R., Mason, J., Cork, M. (2009). Topical treatments for chronic plaque psoriasis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, (2), CD005028.
7. Thomas, P., Habif, M. *Skin Disease: diagnosis and treatment*; 3<sup>rd</sup> ed., pp.15-134.
8. Nast, A., Jacobs, A., Rosumeck, S. and Werner, R. N. (2015). Efficacy and Safety of Systemic Long-Term Treatments for Moderate-to-Severe Psoriasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Investigative Dermatology* 135, pp. 2641-2648; doi:10.1038/jid.2015.206.
9. William, D. J., Berger, T., Elston, D. (2012). *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology*. 12<sup>th</sup> ed., pp. 20-156.
10. Wolff, K., Johnson, R. Saavedra, A. *Fitzpatrick's Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology*, 7<sup>th</sup> ed., pp. 102-908.

## Summary

*Psoriasis is a common disease in ambulatory practice in all age groups ranging from mild to severely complicated forms. The disease is idiopathic and genetic, and that plays the main role in the etiopathogenetic investigations [2, 3, 4, 6]. The therapy is based on pathogenesis and cannot completely cure the disease, however, in many cases it is possible to significantly improve the quality of life [1, 5, 10]. The finger nail psoriasis in a lot of cases has a negative impact on the quality of patient's life due to socioeconomic and employment challenges. There is no accepted local nail psoriasis treatment forms in Latvia. In the world, these remedies are being investigated.*

*The aim of the current research is to assess the severity of nail damage in outpatients treated at the doctor's practice „Health and aesthetics” during 2012–2015. The correlation*

between the damaged and healthy skin areas is calculated with the BSA (body surface area) index and the NAPSI (nail assessment psoriasis severity index) [3, 4, 5]. A 1% BSA is identical with the surface level of one patient's hand. The NAPSI is calculated after division of nail plate into 4 quadrants with horizontal and vertical lines. In each quadrant, the nail matrix (score from 0 to 4) and nail bed (score from 0 to 4) are calculated. A higher score in each quadrant indicates a more severe psoriasis [1, 2, 4, 6, 10].

The nail matrix psoriasis symptoms are nail pitting, leuconychia, red spots in lunula, and crumbling. The nail bed symptoms are onycholysis, spitted haemorrhages, oil drops or salmon patches, and hyperkeratosis. 0 points designate that there are no symptoms, 1 point – symptoms are present in one quadrant, 2 points – symptoms are present in 2 quadrants, 3 points – symptoms are present in 3 quadrants, and 4 points – symptoms are present in 4 quadrants. The total score is a summary of the bed and nail matrix scores (from 0 to 8). The total NAPSI score for both hands' fingernails can be 0 to 80 [7, 8, 9, 10]. The data has been obtained from 29 patients where 13 have mild or moderate form of skin psoriasis and 16 have severe forms. The NAPSI was calculated in each group. A statistically significant difference was identified between the BSA in mild or moderate and severe groups ( $p < 0,05$ ). A statistically significant difference between the NAPSI in mild or moderate and severe forms of skin psoriasis group was not identified ( $p > 0,05$ ).

The research emphasises the need for an individual care of those patients with severe NAPSI and mild to moderate BSA. The local therapy forms for psoriatic onychia are not approved and they are currently being researched. The local therapy for the skin lesions is available in the form of creams, ointments, gels, solutions and does not guarantee the penetration of the active ingredients into the nail plate. In the cases when the NAPSI index is high and the BSA index is low, the systemic treatment is open for discussion. In practice, in those cases when life quality is significantly reduced due to moderate to severe nail damage, the systemic therapy is administered to suppress the disease.

**Keywords:** psoriasis, NAPSI (nail assessment psoriasis severity index), BSA (body surface area), PASI (psoriasis assessment severity index), onychia psoriaticum.



## Vēža šūnu līniju producēto eksosomu uzņemšana un funkcionālie efekti mezenhimālajās cilmes šūnās

### *Uptake and functional effects of cancer cell line-produced exosomes in mesenchymal stem cells*

Ineta Popēna,<sup>1</sup> Kaspars Jēkabsons,<sup>1</sup> Artūrs Ābols,<sup>2</sup> Līga Saulīte,<sup>1</sup>  
Una Čonka,<sup>1</sup> Inga Kozlovska,<sup>1</sup> Elīna Zandberga,<sup>2</sup> Juris Stefanovičs,<sup>2</sup>  
Velta Ose-Klinklāva,<sup>2</sup> Ruta Muceniece,<sup>1</sup> Aija Linē,<sup>2</sup> Una Riekstiņa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
 Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

<sup>2</sup> Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs  
 Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1067

E-pasts: [ineta.popena@gmail.com](mailto:ineta.popena@gmail.com)

Eksosomas ir plazmas membrānā ietvertas vezikulas, kuras tiek izdalītas ekstracelulārajā vidē. Eksosomu funkcijas ir saistītas ar bioloģisko signālu pārneši starp šūnām, jo tās satur dažādas biomolekulas, arī DNS un RNS fragmentus, un ir atrodamas dažādos ķermeņa šķidrumos. Eksosomas izdala arī ļaundabīgo audzēju šūnas, un uzskata, ka ar to palīdzību tiek sagatavota metastātiskā niša audzēja izplatībai organismā. Mezenhimālajām cilmes šūnām (MCŠ) savukārt piemīt īpašības, kas ir līdzīgas audzēja stromas šūnu īpašībām, un pēc migrācijas uz audzēja lokalizācijas vietu tās var diferencēties par audzēja asociētiem fibroblastiem. Darba mērķis bija pētīt audzēju eksosomu uzņemšanu un funkcionālos efektus MCŠ, izmantojot no kolorektālā audzēja šūnu līnijām SW480 un SW620 iegūtas eksosomas. Fluorescences mikroskopijas dati uzrāda audzēja eksosomu uzņemšanu MCŠ citoplazmā, turklāt tika konstatēts, ka audzēja eksosomas inhibē MCŠ proliferāciju.

**Atslēgvārdi:** mezenhimālās cilmes šūnas, eksosomas, audzēju stromas šūnas.

## Īevads

Epiteliālie ļaundabīgie audzēji, pie kuriem pieder prostatas dziedzeris, krūts dziedzeris, kolorektālais vēzis u. c. karcinomas, veidoti no divām pamata struktūrām: pirmkārt, no parenhīmas jeb paša audzēja šūnu struktūrām un, otrkārt, no atbalsta struktūras stromas, kas ietver saistaudus un asinsvadus, kā arī dažādu veidu šūnas, kuras var iedalīt trīs pamatgrupās: infiltrējošas imūnkompetentās šūnas, ar vēzi saistītie fibroblasti un angioģēnas vaskulārās šūnas [1, 2].

Kā liecina daudzi pētījumi, stroma audzējiem ir vajadzīga, lai nodrošinātu ar nepieciešamajām barības vielām un aizvadītu metabolisma galaproduktus. Stromas šūnām ir svarīga nozīme audzēja augšanā un metastāžu veidošanā [3]. Saikne starp audzēju un šūnām, kas ir līdzīgas stromas fibroblastiem [4], var veicināt audzēja augšanu gan tiešā veidā [5], gan stimulējot angioģenēzi, kā arī veicināt metastāžu

veidošanos [6]. Tomēr līdz šim vēl nav pārliecinoši noskaidrota stromas fibroblastu izcelsme, un par vienu no to potenciālajiem priekštečiem uzskata mezenhimālās cilmes šūnas [3, 7]. Mezenhimālās cilmes šūnas (MCŠ) ir pieaugušu cilvēku šūnas, kas atrodamas daudzu audu un orgānu stromā, tostarp kaulu smadzenēs, taukaudos, ādā un zobu pulpā. Saskaņā ar Starptautiskās Šūnu terapijas biedrības definīciju MCŠ ir adherentas šūnas, kas ekspresē šūnu virsmas marķierus CD73, CD90 un CD105, savukārt neekspresē hematopoēzes marķierus CD14, HLA-DR, CD34 un CD45 un spēj diferencēties trīs mezenhimālajās šūnu līnijās — osteocītos, adipocītos un hondrocītos [8]. MCŠ ir multipotentas, kas nozīmē to, ka tās spēj ne tikai pārveidoties par mezenhimālas izcelsmes audiem, bet noteiktos apstākļos spēj arī diferencēties par miocītiem, neironiem un glijas šūnām [9]. Bez minētajiem MCŠ var būt ekspresēti arī citi virsmas marķieri, piemēram, CD44, CD71, Stro-1, SSEA4, kā arī transkripcijas faktori Oct4, Nanog un Sox2 [10, 21].

MCŠ fizioloģiskās funkcijas ietver migrāciju uz audu iekaisuma un/vai bojājuma vietām, kā arī audzējiem [10, 11]. Šo īpašību dēļ MCŠ plaši pēta reģeneratīvās medicīnas nolūkiem [12]. Ir pierādījumi, ka MCŠ piemīt audzēja stromas šūnām līdzīgas īpašības, jo pēc migrācijas uz audzēja lokalizācijas vietu tās var diferencēties par audzēja asociētiem fibroblastiem (*cancer-associated fibroblasts*, CAF) [13]. Domājams, ka audzēja šūnas „sazinās” ar MCŠ ar sekretoro faktoru starpniecību, un viena no hipotēzēm ir, ka šo funkciju pilda audzēju sekretētās ekstracelulārās vezikulas (EV).

Ekstracelulārās vezikulas ir membrānā ietvertas vezikulas, kuras tiek atbrīvotas no šūnas ekstracelulārajā vidē [14]. Tās sastopamas gan prokariotos, gan eukariotos, un to funkcija ir nodrošināt bioloģisko signālu pārneši starp šūnām, tā iesaistoties bioloģisko procesu regulācijā un ietekmējot mērķšūnu funkcijas. Izšķir trīs galvenos EV veidus – mikrovezikulas, eksosomas un apoptotiskie ķermenīši, kas atšķiras pēc izmēra, biogēnēzes, membrānas uzbūves un molekulārā satura. Mikrovezikulas, sauktas arī par ektosomām, ir 50 līdz 1000 nm diametrā lielas vezikulas, kas rodas, uz ārpusi izvīroties kādam plazmatiskās membrānas apgabalam, kas pēc tam atdalās no šūnas. Eksosomas ir pēc izmēra mazākās vezikulas (30–200 nm diametrā), un tās rodas endosomālā ceļā, multivezikulāro ķermenīšu membrānai ieliecoties uz iekšpusi. Tās izkļūst ārpusšūnas vidē, multivezikulārajiem ķermenīšiem saplūstot ar plazmatisko membrānu [15, 16]. Savukārt apoptotisko ķermenīšu izmēri variē no 50 nm līdz 5 μm, un tie ārpusšūnas vidē izdalās, notiekot šūnas apoptozei. Atsevišķa EV grupa ir gramnegatīvo baktēriju izdalītās ārējās membrānas vezikulas (*outer membrane vesicles*, OVM), kuras rodas, uz āru izvīroties šo baktēriju ārējai membrānai. Neskatoties uz atšķirībām dažādu EV biogēnēzē, vēl arvien nav pietiekami izpētīti dažādi marķieri, kurus varētu izmantot, lai tās atšķirtu.

Tā kā eksosomas ir sastopamas ķermeņa šķidrums, piemēram, asinīs, urīnā, siekalās un cerebrospinalajā šķidrumā, to pārnēsātajām molekulām ir nozīme dažādos organisma fizioloģiskajos procesos. Eksosomas var saturēt dažādas biomolekulu kategorijas – proteīnus, lipīdus un ogļhidrātus, kā arī DNS un RNS, tāpēc tās ir nozīmīga starpšūnu komunikācijas un informācijas pārnešanas sastāvdaļa un var ietekmēt mērķšūnas fenotipu [14, 17]. To saturs ir atkarīgs gan no izcelsmes šūnu veida, gan novietojuma un apkārtējās vides apstākļiem. Eksosomās esošā RNS

(mRNS, nekodējošās RNS, miRNS, *piwi-interacting* RNS, rRNS un tRNS fragmenti), kuru izmērs lielākoties ir < 700 nt, arī mRNS, nekodējošās RNS, miRNS, *piwi-interacting* RNS, rRNS un tRNS fragmenti, piedalās mērķšūnu gēnu ekspresijas regulācijā. Savukārt eksosomu proteīnu saturā dominē proteīnu veidi, kas saistīti ar citoskeletu, citosolu, karstuma šoku un plazmatisko membrānu, kā arī proteīni, kas saistīti ar vezikulu transportu un to izveidi. Eksosomu proteīni ir atšķirīgi glikolizēti, un tam ir svarīga nozīme eksosomu fizioloģijā. Uzskata, ka atsevišķi proteīni, kas saista glikānus, spēj novirzīt eksosomas uz to mērķšūnām un nosaka eksosomu spēju savstarpēji iedarboties ar mērķšūnām.

Eksosomu izplatīšanās procesos, kā arī to piesaistē pie mērķšūnām vai ārpusšūnu matricas svarīga nozīme ir ne tikai to virsmas receptoriem un ligandiem, bet arī mērķšūnas veidam [17]. Šūnas EV var uzņemt vairākos veidos – no klatrīna atkarīgās endocitozes, kaveolīna ierosinātās uzņemšanas (*caveolin-mediated uptake*), makropinocitozes, fagocitozes un *lipidraft* ierosinātās uzņemšanas ceļā [14]. Tomēr uzskata, ka EV uzņemšana šūnās lielākoties notiek fagocitozes ceļā. Tiešai EV un mērķšūnas membrānu saplūšanai nepieciešama vienāda to plūstamība, kas tām ir, ja pH ir 5,0. Tāpēc EV un šūnas plazmatiskās membrānas saplūšana ir visoptimālākā skābos vides apstākļos, kas ir raksturīgi audzējiem.

Darba **mērķis** bija noskaidrot kolorektālās karcinomas šūnu līniju SW480 un SW620 hipoksijas un normoksijas apstākļos izdalīto eksosomu iekļūšanu un funkcionālo ietekmi uz ādas mezenhimālajām cilmes šūnām (Ā-MCŠ).

## Materiāli un metodes

### MCŠ kultivēšana

Pētījumā izmantotās cilvēka Ā-MCŠ ņemtas no anonimizētas cilmes šūnu bankas saskaņā ar LU EKMI Medicīnas ētikas komitejas atļauju (izsniegta 04.06.2014.). Šūnas iegūtas no cilvēka ādas paraugiem, dermas slāņa [18]. Līdz izmantošanai šūnas uzglabātas sasaldētā veidā –80 °C temperatūrā kriovidē. Pēc atkausēšanas šūnas kultivēja šim nolūkam paredzētos polistirēna flakonos T25 vai T75 (*Sarstedt*) 37 °C temperatūrā inkubatorā (*Memmert*) ar kontrolētu CO<sub>2</sub> un mitruma līmeni (atbilstīgi 5% CO<sub>2</sub> un 95% RH), līdz tās sasniedza 90% konfluenci. Šūnu kultivēšanai izmantota barotne DMEM/F12 proporcijā 3 : 1 (*Invitrogen*), kas papildināta ar karstumā inaktivētu fetālo teļa serumu (10%) un antibiotiku piedevu (100 SV/ml penicilīna / 100 µg/ml streptomīcīna un 50 µg/ml gentamicīna). Šūnu morfoloģiju novēroja fāžu kontrasta mikroskopā *Evos XL* (AMG).

### Audzēja šūnu kultivēšana

Kolorektālā vēža šūnu līnijas SW480 un SW620 tika kultivētas DMEM barotnē (*Invitrogen*) ar 10% fetālo teļa serumu, 1% L-glutamīna (*Invitrogen*) un 1 × antibiotiku-antimikotiku (*Gibco*) piedevu. Eksosomu paraugu iegūšanas eksperimentiem šūnas tika pārsētas bezseruma DMEM/F12 barotnē (*Lonza*), kas papildināta ar 1% L-glutamīnu, 10 ng/ml bFGF (*eBioscience*), 20 ng/ml EGF (*R & D Systems*), 0,5 µg/ml hidrokortizolu (*Sigma*), 1 × B27 (*Thermo Fisher Scientific*) un

antibiotiku-antimikotiku piedevu. Šūnas tika pārsētas blīvumā  $10^6$  šūnas uz ml un audzētas kā multicelulāri sferoīdi 48 stundas. Pēc tam šūnu sfēras tika pārsētas svaigā 150 ml bezseruma barotnē un audzētas hipoksijā (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) vai normoksijā inkubatorā ar kontrolētu CO<sub>2</sub> un mitruma līmeni (*Memmert*) 48 stundas. Hipoksijas apstākļi tika nodrošināti, izmantojot hipoksijas kameru (*Billups-Rothenberg*), un apstiprināti imunocitoķīmiski, krāsojot ar anti-CAIX (*Abcam*) un anti-HIF1- $\alpha$  (*Abcam*) antivielām, kā aprakstīts iepriekš [19].

## MCŠ imūnfenotipēšana

Kultivētajām šūnām ar plūsmas citometrijas metodi noteica MCŠ marķieru CD73, CD90 un CD105 ekspresiju, kā arī hemopoēzes marķieru CD14, CD34 un CD45 ekspresiju. Šai analīzei marķētos 1,5 ml tilpuma centrifugēšanas stobriņos ievāca pa  $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  šūnu no katra analizējamā parauga. Kopējais reakcijas tilpums vienā stobriņā bija 100  $\mu$ l, un šo tilpumu veidoja PBS suspendētas šūnas un antivielas. Ā-MCŠ marķieru ekspresijas analīzei stobriņā pievienoja 20  $\mu$ l CD73 antivielas (CD73 PE, *BD Biosciences*), 10  $\mu$ l CD90 antivielas (CD90 FITC, *Dako*) un 10  $\mu$ l CD105 antivielas (CD105 APC, *BD Biosciences*) saskaņā ar ražotāju protokolus. Izotipu kontroles paraugā pievienoja 20  $\mu$ l IgG1 PE (*BD Biosciences*), 10  $\mu$ l IgG1 FITC (*Dako*) un 5  $\mu$ l IgG2A APC (*BD Biosciences*). Asinsrades marķieru noteikšanas paraugam pievienoja PE CD34 (*BD Biosciences*), FITC CD45 (*BD Biosciences*), APC CD14 (*BD Biosciences*) 20  $\mu$ l katru saskaņā ar ražotāja ieteikumu (*BD Biosciences*). Paraugus inkubēja ar antivielām 25–30 minūtes istabas temperatūrā tumsā. Pēc inkubēšanas paraugiem pievienoja 1 ml 1% FBS/PBS šķīduma un centrifugēja ar ātrumu 2000 apgr./min 5 minūtes, supernatantu pēc tam nolejot. Nogulsnes suspendēja 200  $\mu$ l PBS šķīduma un ar plūsmas citometrijas iekārtu *Guavaeasy Cyte 8 HT (Millipore)* veica marķieru ekspresijas analīzi, datu apstrādi izmantojot datorprogrammu *Express Pro*.

## Eksosomu-bagātināto EV frakciju iegūšana un raksturošana

Eksosomu-bagātināta EV frakcija tika iegūta no SW480 un SW620 šūnu kultūru barotnēm, veicot secīgus centrifugēšanas, filtrācijas un gelfiltrācijas soļus. Vispirms barotne tika centrifugēta 10 minūtes pie  $300 \times g$ , lai atbrīvotos no šūnām, tad 10 minūtes pie  $3000 \times g$ , lai atbrīvotos no šūnu atlikumiem. Pēc tam barotne tika filtrēta caur 0,2  $\mu$ m filtru (*Sarstedt*), lai atbrīvotos no mikrovezikulām un apoptotiskajiem ķermenīšiem, un koncentrēta, izmantojot *Amicon Ultra-15 NMWL 3,000 (Millipore)*. Lai atbrīvotos no proteīnu kompleksiem, lipoproteīniem un citiem lielmolekulāriem savienojumiem, barotne tika frakcionēta Sefarozes CL-6B (*GE Healthcare*) gelfiltrācijas kolonnās, kas izgatavotas, kā aprakstījis *Boing* u. c., 2013 [20]. Kā nesējvide tika izmantots caur 0,2  $\mu$ m filtrēts vienkārtīgs PBS buferis. No katra parauga tika savāktas 10 frakcijas, katra 300  $\mu$ l tilpumā. Katrā frakcijā tika noteikts daļiņu izmērs un aptuvena koncentrācija, izmantojot *Zetasizer Nano (Malvern)*, un proteīnu koncentrācija, izmantojot *Nano Drop (Thermo Scientific)*. Balstoties uz šiem datiem, frakcijas, kas satur daļiņas, kuru diametrs atbilst eksosomu izmēram, t. i., no 30 līdz 200 nm, tika apvienotas, iekonzentrētas, lietojot

*Amicon Ultra-0,5 NMWL 3,000 (Millipore)*, un raksturotas, izmantojot transmisijas elektronmikroskopiju (TEM). Lai veiktu TEM, eksosomas tika fiksētas uz *Formvar* pārklājuma vara sieta un iezīmētas ar 1% uranilacetāta šķīdumu (*Sigma*), un mikroskopētas, izmantojot transmisijas elektronmikroskopu JEM 1230.

Eksosomu kopējo proteīnu koncentrācija tika mērīta ar reaģentu komplektu *BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, ASV)* saskaņā ar ražotāja instrukciju. Kopējo RNS daudzumu eksosomu paraugos noteicām ar iekārtu *NanoQuant (Tecan)* atbilstoši ražotāju protokolam.

### **Audzēju eksosomu iezīmēšana ar *Bodipy TR Ceramide* un *Syto RNA Select***

Kolorektālo audzēju eksosomu iezīmēšanai tika izmantotas fluorescentās iezīmes *Bodipy TR Ceramide (Invitrogen)* vai *SYTO RNASelect (Thermo Fisher Scientific)*. Iezīmēšanai izmantoja iepriekš sagatavotos 1 mM krāsvielu šķīdumus DMSO, kas glabāti  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā tumsā. Krāsvielas pievienoja audzēju eksosomu suspensijai: reakcijas maisījuma tilpums bija 100  $\mu\text{l}$  un reakcijas maisījumā tika iegūta 10  $\mu\text{M}$  koncentrācija. Šādi sagatavotus paraugus 20 minūtes inkubēja tumsā  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Lai atbrīvotos no liekās neuzņemtās krāsvielas pēc inkubācijas, izmantoja gelfiltrācijas metodi: audzēju eksosomu reakcijas maisījumu centrifugēja ar 2000 apgr./min 2 minūtes, izmantojot attīrīšanas kolonnas (*Spin columns MW 3000, Invitrogen*). Centrifugējot iegūtais eluāts saturēja iezīmētās audzēju eksosomas, un to pievienoja adherentajām Ā-MCŠ.

### **Audzēju eksosomu uzņemšana Ā-MCŠ**

Iepriekš raksturotās Ā-MCŠ izsēja uz šūnu kultivēšanas 4-lauciņu priekšmetstikliņu platēm (*BD Biosciences*), izsēšanas blīvums  $2 \times 10^4$  šūnu uz vienu mililitru barotnes. Šūnu kultivēšanai izmantoja barotni DMEM/F12 proporcijā 3 : 1 (*Invitrogen*), kas papildināta ar 10% fetālā teļa seruma un antibiotiku piedevu (100  $\mu\text{g/ml}$  penicilīna /100 SV/ml streptomīcīna un 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicīna). MCŠ kultivēja  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā inkubatorā (*Memmert*) ar kontrolētu  $\text{CO}_2$  un mitruma līmeni (attiecīgi 5%  $\text{CO}_2$  un 95% RH), līdz tika sasniegta 50–70% konfluences (apm. pēc 48 h). Pēc tam šūnas trīs reizes skaloja ar barotni DMEM/F12 3 : 1 bez seruma piedevas, lai sagatavotu tās iezīmēto kolorektālo audzēju eksosomu pievienošanai. Katram lauciņam ar šūnām pievienoja 10  $\mu\text{l}$  suspensijas ar iezīmētajām kolorektālo audzēju eksosomām, ko atšķaidīja ar 0,5 ml minētās bezseruma barotnes. Šūnas ar reakcijas maisījumu inkubēja 1 h  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā tumsā. Pēc inkubācijas atsūca supernatantu, lauciņus ar šūnām trīs reizes skaloja ar buferšķīdumu PBS un fiksēja ar 0,3 ml 4% paraformaldehīda šķīdumu 20 min istabas temperatūrā. Pēc fiksēšanas no plātēm izveidoja priekšmetstikliņus, uzklāja ieslēgšanas vidi ar šūnu kodolu kontrastkrāsvielu DAPI (*ProLong Gold with DAPI, Life Technologies*), uzlika segstikliņus un novietoja tumšā vietā istabas temperatūrā uz 24 h. Pēc tam sagatavotos paraugus mikroskopēja ar fluorescences mikroskopu *Till Photonics* vai konfokālo mikroskopu *Nikon C2 (Nikon)*. Iegūtos attēlus apstrādāja datorprogrammās *Fiji* un *Live Acquisition Offline Analysis Software*.

## Ā-MCŠ proliferācijas noteikšana

MCŠ proliferācijas noteikšanai izmantoja CCK-8 komplektu, kas balstīts uz formazāna sāls šķīduma krāsas maiņu šūnas citoplazmas fermentu ietekmē (*Sigma Aldrich*). MCŠ izsēja uz 96 lauciņu plates, šūnu blīvums  $5 \times 10^3$  šūnas uz vienu lauciņu 100  $\mu$ l tilpumā DMEM/F12 3 : 1 barotnē ar 10% fetālā teļa seruma un antibiotiku piedevu (100  $\mu$ g/ml penicilīns / 100 SV/ml streptomīns un 50  $\mu$ g/ml gentamicīns). Pēc 24 h pievienoja kolorektālā audzēja šūnu līniju SW480 un SW620 eksosomas 480N, 480H, 620N, 620H (visas vienādotas pēc proteīnu koncentrācijas 238  $\mu$ g/ml) atšķaidījumā 1 : 50 un ar trīskāršu soli veica sērijveida atšķaidījumus. Visi paraugi bija triplikātos.

Šūnas inkubēja ar eksosomām 48 h, pēc tam pievienoja CCK-8 reaģentu un inkubēja 2 h saskaņā ar ražotāja instrukciju. Pēc inkubācijas nolasiya optiskā blīvuma (OB) izmaiņas pie 450 nm un aprēķināja šūnu skaitu, salīdzinot ar standartlīkni (*Magellan, Tecan*). Rezultātus grafikos attēloja ar OB vērtībām un pārrēķināja procentos, un tiem noteica statistisko ticamību. Datu apstrādei un statistiskajai analīzei izmantoja programmu *Graph Pad Prism 5*.

Lai noteiktu eksosomu efektu uz šūnu proliferāciju, papildus analizēja K-i67 marķiera ekspresiju. Šūnas izsēja 6 lauciņu platē (*Sartstedt*)  $4 \times 10^4$  šūnas lauciņā 2,5 ml tilpumā barotnē DMEM/F12 proporcijā 3 : 1 (*Invitrogen*), kas papildināta ar karstumā inaktivētu fetālo teļa serumu (10%) un antibiotiku piedevu (100 SV/ml penicilīna / 100  $\mu$ g/ml streptomīna un 50  $\mu$ g/ml gentamicīna). Pēc 24 h šūnām pievienoja 2  $\mu$ g lauciņā eksosomu un inkubēja 72 h 37 °C temperatūrā inkubatorā (*Memmert*) ar kontrolētu CO<sub>2</sub> un mitruma līmeni (attiecīgi 5% CO<sub>2</sub> un 95% RH). Pēc tam šūnas tripsinizēja, skaitīja un fiksēja -20 °C 70% etanolā un turēja -20 °C vairāk nekā 2 stundas (pēc Ki-67 FITC ražotāja instrukcijas (*BD Biosciences*)). Ki-67 FITC un izotipa kontroles IgG1 FITC iezīmēja pēc ražotāja instrukcijas (*BD Biosciences*). Paraugam ar  $5 \times 10^4$  šūnu attiecīgi pievienoja 10  $\mu$ l Ki-67 FITC vai IgG1 FITC antivielu. Paraugu kopā ar antivielu inkubēja 30 min istabas temperatūrā tumsā. Pēc tam paraugu skaloja ar 1 ml 1% fetālā teļa seruma/PBS skalošanas šķīdumu un centrifugēja 5 min pie 2000 apgr./min. Nolēja virsnogulšņu šķīdumu, pievienoja PBS līdz 200  $\mu$ l stobriņā un analizēja plūsmas citometriju ar iekārtu *Guava easycyte 8HT Express Pro* programmā. Analīzei savāca 10 000 šūnu no katra parauga.

## Rezultāti un diskusija

### MCŠ kultivēšana

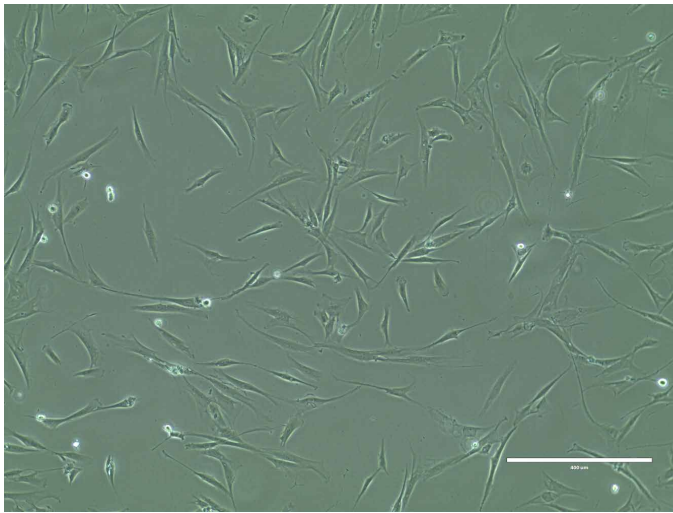
Barotnē DMEM/F12 ar 10% fetālo teļa serumu audzētas šūnas ir adherentas šūnas ar fibroblastiem līdzīgu morfoloģiju (1. A attēls). Šūnu augšanu var raksturot kā salīdzinoši lēnu – vidējais populācijas dubultošanās laiks ir 48 h, tāpēc, lai sasniegtu 90% konfluenci T75 flakonā, parasti bija nepieciešamas aptuveni 7 dienas.



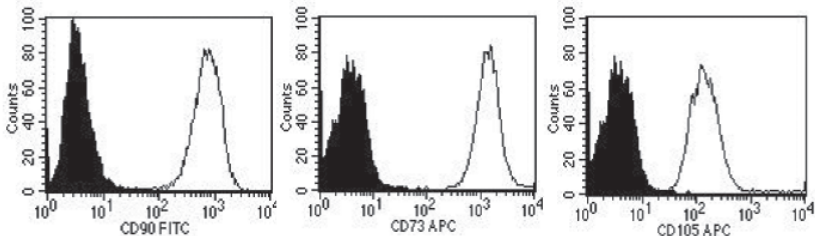
## MCŠ imūnfenotips

Cilvēka ādas šūnām analizēja mezenhimālo marķieru (CD73, CD90 un CD105) ekspresiju, hematopoēzes marķieru (CD14, CD45 un CD34) ekspresiju un atbilstošās izotipa kontroles, izmantojot plūsmas citometrijas metodi. Tā kā vairāk nekā 95% no šūnu populācijas bija pozitīvs šūnu virsmas marķieru CD90, CD73 un CD105 statuss un negatīvs hematopoēzes marķieru CD14, CD45 un CD34 statuss (1. B attēls), pētījumā izmantotās šūnas uzskatāmas par MCŠ saskaņā ar iepriekš publicētajiem datiem [18, 21].

A



B

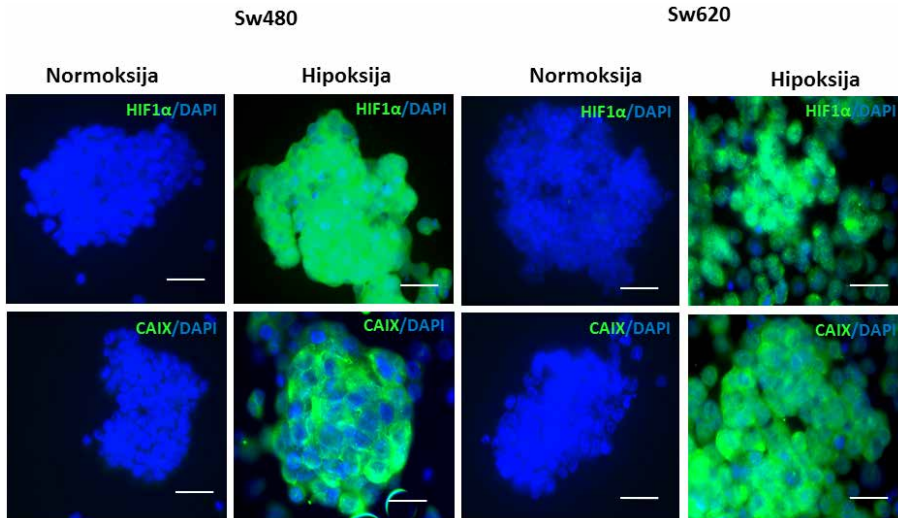


1. attēls. (A) Ā-MCŠ morfoloģija fāžu kontrasta mikroskopā. Garuma nogrieznis 400  $\mu\text{m}$ . (B) MCŠ marķieru CD90, CD73, CD105 ekspresija Ā-MCŠ  $\geq 95\%$  no šūnu populācijas. Pildītā histogramma norāda uz neiezīmētā Ā-MCŠ kontroli, tukšā histogramma – uz norādītā marķiera ekspresiju iezīmētā šūnu populācijā ( $n = 10$ )

Figure 1. (A) Dermal MSCs morphology by phase-contrast microscopy. Scale bar 400  $\mu\text{m}$ . (B) MSCs marker CD90, CD73, CD105 expression in dermal MSCs  $\geq 95\%$  of cell population. Filled histogram shows unlabeled dermal MSCs control, blank histogram shows expression of the marker in labeled cell population ( $n = 10$ )

## Audzēja šūnu kultivēšana

Kolorektālā vēža šūnu līnijas SW480 un SW620, kas sākotnēji ir iegūtas no viena pacienta primārā un metastatiskā audzēja, tika kultivētas bezseruma vidē kā multicelulāri sferoīdi normoksijas un hipoksijas apstākļos. Hipoksiskie apstākļi tika apstiprināti, nosakot divu hipoksijas inducētu enzīmu – ogļskābes anhidrāzes IX (CAIX) un hipoksijas inducētā faktora  $1\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) – ekspresiju šūnās. Imunocitoķīmiskās analīzes rezultāti parādīti 2. attēlā.



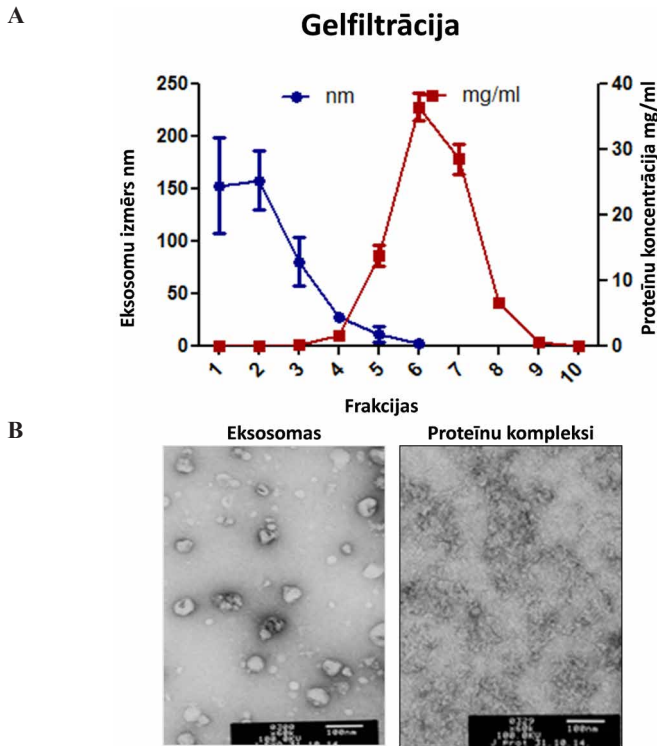
2. attēls. Hipoksijas marķieru CAIX un HIF1 $\alpha$  ekspresija SW480 un SW620 šūnās, kas kultivētas hipoksijas un normoksijas apstākļos. Garuma nogrieznis – 35  $\mu$ m

Figure 2. Expression of hypoxia markers CAIX and HIF1 $\alpha$  in SW480 and SW620 cells that were cultured in hypoxia and normoxia. Scale bar 35  $\mu$ m

## Audzēja eksosomu iegūšana un raksturošana

Eksosomu-bagātināta EV frakcija tika izolēta no SW480 un SW620 šūnu kultūru supernatanta, izmantojot centrifugācijas, filtrācijas un gelfiltrācijas soļus. Veicot gelfiltrāciju Sefarozes CL-6B kolonnās, tika savāktas 10 frakcijas (3. A attēls). Pamatojoties uz *Zetasizer Nano* nanodaļiņu izmēru mērījumiem, pirmās četras frakcijas tika apvienotas un iegūtie preparāti tika raksturoti, izmantojot TEM (4. A, B attēls), proteīnu un RNS koncentrāciju (tabula) mērījumus, un izmantoti tālākajiem funkcionālajiem pētījumiem MCŠ. TEM parādīja, ka šie preparāti satur EV, kuru diametrs ir robežās no 30 līdz 200 nm, kas atbilst eksosomu izmēriem (4. B attēls). No tā var secināt, ka iegūtie EV preparāti ir bagātināti ar eksosomām, taču tas neļauj apgalvot, ka tās ir tīras eksosomas bez mikrovezikulu un apoptotisko ķermeņiņu piemaisījuma.

Eksosomu paraugu proteīnu koncentrācijas mērījumi (apvienotajās frakcijās) tika izmantoti eksosomu daudzuma normalizēšanai tālākajos funkcionālajos eksperimentos.



3. attēls. (A) SW480 šūnu kultūras supernatanta frakcionēšana sefarozes CL-6B gelfiltrācijas kolonnā un iegūto frakciju mērījumi ar *Zetasizer Nano*, kā arī ar *NanoDrop* iegūtās proteīnu koncentrācijas. (B) Iegūto EV preparātu TEM attēls. Garuma nogrieznis attēlo mērogu 100 nm

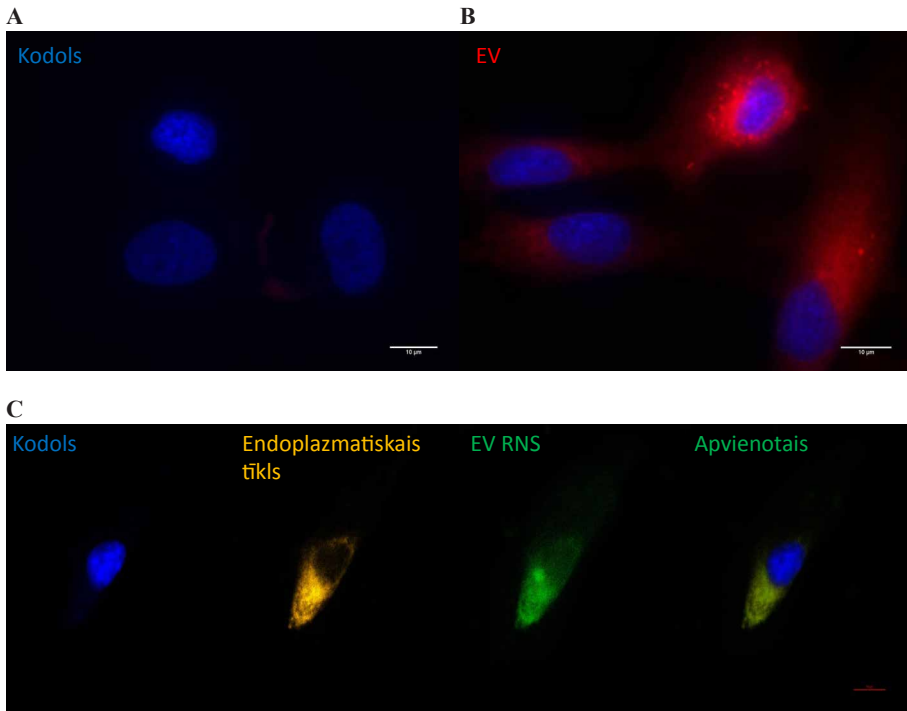
Figure 3. (A) Fractionation of SW480 cell culture supernatant in Sepharose CL-6B gelfiltration column and measurements of gained fractions on *Zetasizer Nano* as well as protein concentrations determined with *NanoDrop*. (B) TEM image of EV preparations. Scale bar 100 nm

Tabula. Proteīnu un RNS koncentrācija eksosomu paraugos  
Table. Protein and RNA concentrations in exosome samples

| Paraugs | Proteīnu koncentrācija (µg/ml) | RNS koncentrācija (ng/µl) |
|---------|--------------------------------|---------------------------|
| SW480 H | 329,2                          | 76,48                     |
| SW480 N | 238,0                          | 37,36                     |
| SW620 H | 520,0                          | 261,52                    |
| SW620 N | 477,0                          | 289,52                    |

## Audzēja eksosomu uzņemšana Ā-MCŠ

Lai noskaidrotu, vai no audzējiem izolētās eksosomas mijiedarbojas ar Ā-MCŠ, fluorescenti iezīmētas eksosomas 1 h inkubēja kopā ar MCŠ un pēc tam pārbaudīja intracelulāro uzņemšanu, izmantojot fluorescences mikroskopijas metodi. Fluorescences mikroskopijas dati uzrāda fluorescenti iezīmēto audzēja eksosomu internalizāciju MCŠ citoplazmā gan ar lipofīlo endoplazmatiskā tīkla iezīmi *Bodipy TR Ceramide*, gan ar RNS specifisko iezīmi *SYTO RNA select* (4. attēls).



4. attēls. Audzēja šūnu izdalīto eksosomu uzņemšana Ā-MCŠ. (A) Kontroles MCŠ ar kodola iezīmi DAPI (B) Ā-MCŠ ar *Bodipy TR Ceramide* iezīmētām audzēja eksosomām. (C) Ā-MCŠ ar *SYTO RNaselect* iezīmētām audzēja eksosomām un *Bodipy TR ceramide* iezīmētu endoplazmatisko tīklu. Garuma nogrieznis 10 μm

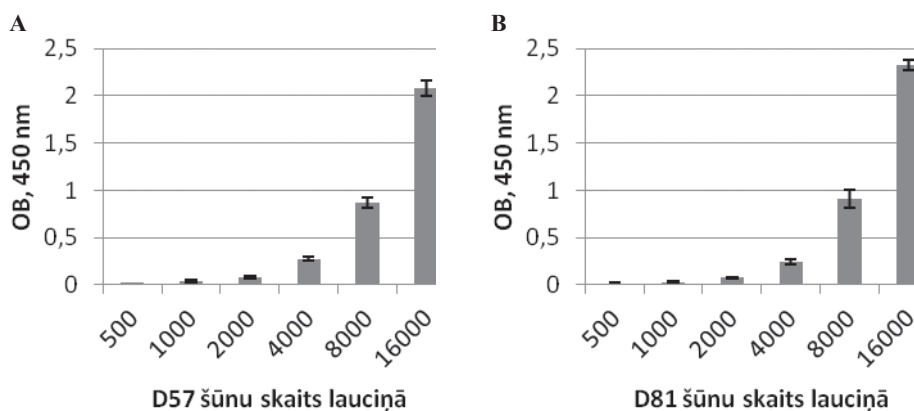
*Figure 4. Uptake of cancer cell-derived exosomes in d-MSCs. (A) Control MSCs with nuclear staining DAPI (B) D-MSCs with cancer cell-derived exosomes labeled with Bodipy TR Ceramide. (C) D-MSCs with SYTO RNaselect-labeled cancer cell-derived exosomes and Bodipy TR ceramide-labeled endoplasmic reticulum. Scale bar 10 μm*

Mūsu pētījumā veiktais novērojums, ka MCŠ uzņem audzēju šūnu – gan normoksijas, gan hipoksijas apstākļos kultivētu – izdalītās eksosomas, atbilst medicīnas literatūrā sastopamiem datiem par dažādu audzēju šūnu eksosomu uzņemšanu MCŠ, piemēram, Lindoso u. c. veiktajā pētījumā konstatēta nieru šūnu līnijas K1 izdalīto eksosomu uzņemšana cilvēka kaulu smadzeņu MCŠ [22]. Lielākā daļa līdz

šim veikto eksperimentu ar dažādām ļaundabīgo audzēju šūnu līnijām un dažādas izcelsmes MCŠ liecina, ka eksosomas tiek uzņemtas endocitozes ceļā [14], taču ziņas par precīzu endocitozes mehānismu vēl ir nepieciešams precizēt, jo dažādos pētījumos iegūtie rezultāti par to atšķiras. Piemēram, *T. Tian* u. c. 2104. gadā ziņoja, ka no audzēju šūnu līnijas iegūtu eksosomu uzņemšana mezenhimālajās cilmes šūnās notiek klatrīna medītētās endocitozes un makropinocitozes ceļā [23].

### Audzēju eksosomu ietekme uz MCŠ proliferāciju

Proliferācijas standartlīkne parādīja, ka šūnu skaita pieaugums ir adekvāti monitorējams ar optiskā blīvuma (OB) vērtībām. Šūnu līniju standartlīknes ir salīdzināmas (5. attēls). Izvēlētais šūnu daudzums  $5 \times 10^3$  šūnas lauciņā ir uzskatāms par optimālu proliferācijas eksperimenta veikšanai.

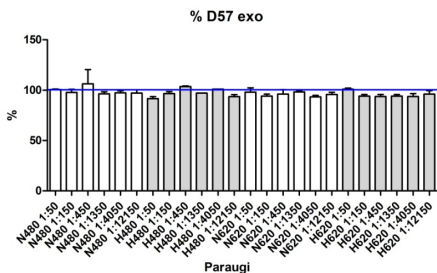


5. attēls. Ā-MCŠ D57 (A) un D81 (B) šūnu skaita attiecība pret OB proliferācijas standartlīknē

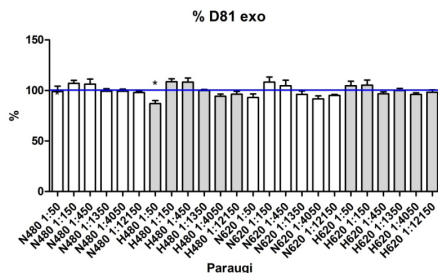
Figure 5. *D-MSCsD57 (A) and D81 (B) cell count according to OB of proliferation standard curve*

Eksperimentā iegūtās OB vērtības pārrēķināja šūnu skaitā, izmantojot standartlīkni. Pēc tam pārvērtā procentos un veica statistisko analīzi. Starp dažādu kolorektālā audzēja šūnu līniju eksosomu paraugiem nenovēroja atšķirīgus efektus. Vienīgi hipoksijā kultivētu SW480 šūnu eksosomas (H480) uzrādīja statistiski ticamu proliferāciju inhibējošu efektu D81 šūnās. Pārējās eksosomas neuzrādīja statistiski ticamu efektu uz šūnu proliferāciju (6. attēls).

A



B



6. attēls. Ā-MCŠ proliferācijas rādītāji pēc kolorektālās karcinomas šūnu līniju SW480 un SW620 eksosomu pievienošanas.

(A) D57 šūnu kultūras proliferācija. (B) D81 šūnu kultūras proliferācija.

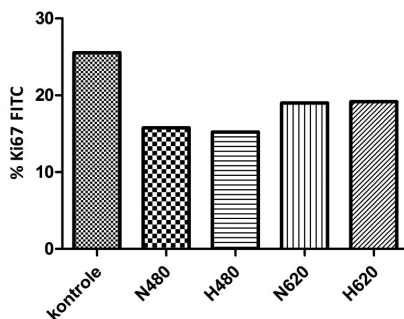
\*  $p < 0,05$  salīdzinājumā ar šūnu kontroli bez eksosomām (ANOVA, Tukey post test)

Figure 6. D-MS C proliferation values after treatment with exosomes derived from colorectal carcinoma cell lines SW480 and SW620.

(A) Proliferation in cell line D57. (B) Proliferation in cell line D81.

\*  $p < 0.05$  in comparison to cell control without exosomes (ANOVA, Tukey post test)

Šūnu proliferācijas marķiera Ki-67 ekspresija bija novērojama 25,54% Ā-MCŠ. Eksosomu pievienošana šūnu kultivēšanas laikā izraisīja Ki-67 pozitīvās jeb proliferējošās šūnu populācijas samazināšanos par aptuveni 10% no SW480 šūnām izdalīto eksosomu gadījumā un par 6,5% SW620 šūnu eksosomu gadījumā (7. attēls).



7. attēls. Šūnu proliferācijas marķiera Ki-67 ekspresija Ā-MCŠ D81 pēc SW480 un SW620 hipoksijas (H) un normoksijas (N) apstākļos sekretēto eksosomu pievienošanas

Figure 7. Expression of cell proliferation marker Ki-67 in d-MS Cs D81 after treatment with exosomes released by SW480 and SW620 culture dinhypoxia (H) and normoxia (N)

Ir publicēti daudzi pētījumi, kuros pierādīta stromas fibroblastu jeb audzēja asociētu fibroblastu (cancer-associated fibroblast, CAF) spēja veicināt audzēja progresēšanu – gan augšanu, gan metastāžu veidošanos [24, 25]. Piemēram, no prostatas audzēja Du145 šūnu līnijas iegūtas eksosomas veicināja fibroblastu pārveidošanos par proangiogēniem un proinvasīviem miofibroblastiem, kas atbalsta audzēja šūnu proliferāciju [26]. MCŠ proliferācijas samazināšanās varētu netieši liecināt par



diferenciācijas procesu, taču nepieciešami vēl papildu pētījumi, kas to apstiprinātu. Kopsavilkumā mūsu pētījuma rezultāti ļauj secināt, ka audzēja šūnu ekstracelulārās vezikulas, tai skaitā eksosomas, tiek uzņemtas mezenhimālajās cilmes šūnās un izraisa pārmaiņas to funkcijās. Turpmākos eksperimentos tiks noskaidrots, vai kolorektālā audzēja šūnu līniju ekstracelulāro vezikulu uzņemšana MCŠ veicina to diferenciāciju par audzēja asociētiem fibroblastiem.

## Secinājumi

1. No kolorektālās karcinomas šūnu līnijām SW480 un SW620 iegūtās eksosomas tiek uzņemtas cilvēka Ā-MCŠ.
2. No kolorektālās karcinomas šūnu līnijām SW480 un SW620 iegūtās eksosomas samazina proliferācijas fāzē esošo šūnu īpatsvaru Ā-MCŠ populācijā.

## Finansējums

Pētījums, kura izpildes gaitā iegūti šie rezultāti, ir saņēmis finansējumu no Norvēģijas finanšu instrumenta 2009.–2014. gadam saskaņā ar projektu „Prostatas vēža ekstracelulārās vezikulas: funkcionālā loma starpšūnu komunikācijā un klīniskais pielietojums” (*Cancer-derived extra cellular vesicles: function and clinical applications in prostat eancer*), līguma nr. NFI/R/2014/045.

## Izmantotā literatūra

1. Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, A. M. (1991). Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells*, 3, pp. 77-85.
2. Hanahan, D., Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumour Microenvironment. *Cancer Cell*, 21, pp. 309-322.
3. Jung, A. C., et al. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International Journal of Oncology*, 40, pp. 130-138.
4. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, pp. 646-674.
5. Polanska, U. M., Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts: Non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J. Cell. Physiol.*, 228, pp. 1651-1657.
6. Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., et al. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, pp. 557-563.
7. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumour growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL 12 secretion. *Cell*, 121, pp. 335-348.
8. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, pp. 315-317.
9. Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D., Miller, F. D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cell*, 23(6), pp. 727-737.

10. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007). Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, pp. 2739-2749. doi: 10.1634/stemcells.pp.
11. Marquez-Curtis, Leah, A., Janowska-Wieczorek, A. (2013). Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *Bio. Med. Research International* 561098. *PMC*.
12. Parekkadan, B., Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, 12, pp. 87-117.
13. Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humenuik, R., Medina, D. J., Akexe, G., Mesirov, J. P., Ganesan, S., Glod, J. W., Banerjee, D. (2008). Carcinoma-Associated Fibroblast-Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res.*, 68, pp. 4331-4339.
14. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., Francisco Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracell Vesicles*, 3, pp. 1-14.
15. György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., *et al.* (2011). Membrane Vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, pp. 2667-2688.
16. El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12(5), pp. 347-357. doi: 10.1038/nrd3978.
17. Yáñez-Mó, M., *et al.* (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracell. Vesicles*, 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. eCollection.
18. Riekstina, U., *et al.* (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), pp. 153-162.
19. Ivanova, L., Zandberga, E., Silina, K., Kalnina, Z., Abols, A., Endzelins, E., Vendina, I., Romanchikova, N., Hegmane, A., Trapencieris, P., Eglitis, J., Line, A. (2015). Prognostic relevance of carbonic anhydrase IX expression is distinct in various subtypes of breast cancer and its silencing suppresses self-renewal capacity of breast cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 75(2), pp. 235-46.
20. Boing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A., Sturk, A., Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 10. 3402/jev.v3.23430.
21. Riekstina, U., *et al.* (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews*, 5, pp. 378-386. doi:10.1007/s12015-009-9094-9.
22. Lindoso, R. S., Collino, F., Camussi, G. (2015). Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*, 6(10), pp. 7959-69.
23. Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., Xiao, Z. D. (2014). Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *J. Biol. Chem.*, 289(32), pp. 22258-22267. doi: 10.1074/jbc.M114.588046.
24. Luo, H., Tu, G., Liu, Z., Liu, M. (2015). Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett.*, 361(2), pp. 155-163. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.018.
25. Lin, Z. Y., Chuang, Y. H., Chuang, W. L. (2012). Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL2, CCL26, IL6 and LOXL2 genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother*, 66(7), pp. 525-529. doi:10.1016/j.biopha.2012.02.001.
26. Chowdhury, R., Webber, J. P., Gurney, M., Mason, M. D., Tabi, Z., Clayton, A. (2015). Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*, 6(2), pp. 715-731.

## Summary

*Exosomes are cell membrane-incorporated vesicles that are released in the extracellular space. Since exosomes contain different biological molecules including DNA and RNA fragments and are found in different body liquids, their functions are believed to be associated with biological signal transfer between cells. Exosomes are released also by cancer cells, and they are supposed to be involved in preparation of metastatic niche to promote tumour advancement in body. Mesenchymal stem cells (MSCs) possess tumour stroma-like properties, and they are capable of differentiation into cancer-associated fibroblasts after migration to tumour site. The aim of the work was to study the uptake and functional effects of cancer cell-derived exosomes into MSCs. Exosomes were derived from colorectal cancer cell lines SW480 and SW620. Fluorescence microscopy data show that cancer cell-derived exosomes are internalized in MSCs cytoplasm, and, furthermore, it was confirmed that exosomes inhibit proliferation of MSCs.*

**Keywords:** mesenchymal stem cells, exosomes, cancer stromal cells.

## Variability of peripheral arterial disease clinical signs in patients before indicated endovascular revascularization of popliteocrural segment

### *Perifēro artēriju slimības klīnisko izpausmju variabilitāte pacientiem pirms indicētas popliteokrurālā segmenta endovaskulāras revaskularizācijas*

*Aina Kratovska,<sup>1,2,3</sup> Jekaterina Safronova,<sup>3</sup> Vita Romanova,<sup>2</sup> Andrejs Bernšteins,<sup>1</sup> Patrīcija Ivanova,<sup>1,2,4</sup> Sanita Ponomarjova<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup> Riga East University Hospital, Department of Interventional Radiology  
Rīga, Hipokrata iela 2, LV-1038

<sup>2</sup> University of Latvia, Faculty of Medicine, Department of Surgery  
Raiņa bulv. 19, LV-1050

<sup>3</sup> Riga Stradins University, Faculty of Medicine  
Dzirčiema iela 16, Rīga, LV-1007

<sup>4</sup> Riga East University Hospital, Department of Vascular Surgery  
Hipokrata iela 2, LV-1038

Peripheral arterial disease (PAD) is the leading cause of lower limb amputation. The aim of the current study was to deduce the spectrum of PAD clinical signs in patients with arterial occlusive lesions limited to popliteocrural segment and indications for endovascular revascularization. The article is based on the analysis of clinical data of patients with popliteocrural lesions who underwent endovascular revascularization in year 2015 in our tertiary care hospital. All the 143 patients included in the researchment the category 3–6 of Rutherford classification according to PAD clinical signs: 1.4% – category 3, 13.25% – category 4, 45.79% – category 5, 40.14% – category 6. The results showed that only the patients with critical limb ischemia as the end stage of PAD were selected for endovascular treatment.

**Keywords:** Peripheral arterial disease, critical limb ischemia, endovascular revascularization, popliteocrural arterial segment.

## Introduction

Peripheral arterial disease (PAD) afflicts up to 20% of elderly population [4, 7]. PAD is the leading cause of lower limb amputation in Europe and United States of America. The symptoms of PAD may vary from asymptomatic status to critical limb ischemia (CLI). The average age of patients with CLI is approximately 68 years (95% CI 68.8 - 68.9) [4], the incidence and prevalence of PAD and CLI is generally higher in males than in females [2]. The stages of PAD are classified according to Rutherford classification (grade 1–6). Clinical symptoms of CLI vary from critical intermittent claudication of less than 50 meters to major ischemic tissue loss

and gangrene. Numerous articles focus on clinical manifestation and treatment of CLI in patients with non-specified location of atherosclerotic lesion in lower limb arteries, but only few [5] concentrate on a clinical profile of CLI in patients with hemodynamically significant arterial changes limited specifically to popliteocrural segment. According to recent CIRSE (*Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe*) Standards of Practice Guidelines, the indications for endovascular revascularization in patients with popliteocrural arterial occlusive disease are limited to CLI Rutherford category 4–6, not including IC [6]. In ACCF/AHA Guidelines it is stated that endovascular procedures are indicated for individuals with TASC type A iliac and femoropopliteal arterial lesions and lifestyle-limiting disability due to intermittent claudication, when clinical features suggest a reasonable likelihood of symptomatic improvement with endovascular intervention, and there has been an inadequate response to exercise or pharmacological therapy and/or there is a very favorable risk-benefit ratio [1]. Nevertheless, no definite recommendations or prohibition exist regarding endovascular treatment of IC combined with arterial occlusive disease limited to popliteocrural segment. Generally it is accepted that patients with IC and crural arterial occlusive disease should not be treated by any intervention. It reveals a slight disbalance in leading recommendations on clinical signs and symptoms of PAD that serve as indication for endovascular treatment initiation, especially regarding physically active individuals with a mild claudication and, consequently, a reduced quality of life.

The aim of our study was to deduce the spectrum of CLI clinical signs in patients, where hemodynamically significant arterial lesions were limited only to popliteocrural segment and indicated endovascular revascularization.

## Materials and methods

We retrospectively analyzed all the clinical and radiological data of patients who underwent endovascular recanalization of lower limb arteries in our tertiary care university hospital in year 2015. The inclusion criteria for this study were the following: 1) diagnosed PAD; 2) arterial occlusive disease limited to popliteocrural segment; 3) endovascular recanalization of popliteocrural arterial segment performed in year 2015. The age, gender, clinical signs of PAD according to Rutherford classification (Table 1) and the absence or presence of interdisciplinary meeting agreement on indications for endovascular treatment for every selected patient were analyzed.

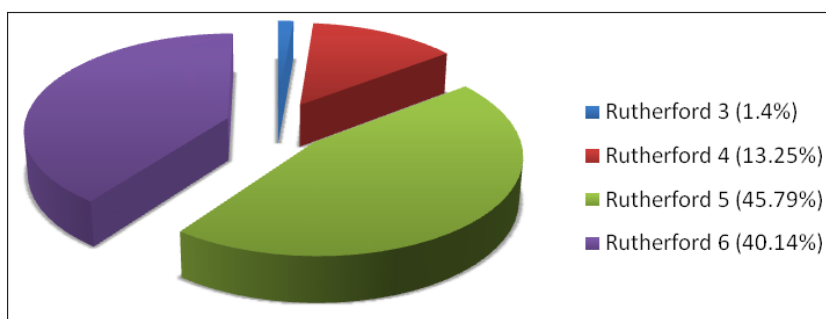
*Table 1. Rutherford classification [3]*

| Category | Clinical description  |
|----------|---|
| 0        | Asymptomatic  |
| 1        | Mild claudication   |
| 2        | Moderate claudication   |
| 3        | Severe claudication   |
| 4        | Ischemic rest pain  |
| 5        | Minor foot tissue loss; non-healing ulcer                         |
| 6        | Major tissue loss extending above transmetatarsal level; gangrene |

## Results

143 patients met the inclusion criteria and were selected for the study. 57% (n = 82) were female, the average age 75.97 years, 43% (n = 61) were male, the average age 67.70 years. All the selected patients had a positive intrahospital interdisciplinary agreement that each particular patient requires an endovascular revascularization due to CLI. All the included patients met the category 3–6 of the Rutherford classification according to PAD clinical signs: 1.4% (n = 2) had severe claudication (category 3), 13.25% (n = 19) had rest pain (category 4), 45.79% (n = 65) had a minor tissue loss/foot ulceration (category 5), 40.14% (n = 57) had a major foot tissue loss and/or gangrene (category 6), (Table 2).

*Table 2. PAD clinical sign variability according to Rutherford classification in patients before endovascular revascularization of popliteocrural segment*



## Discussion

The results of the study showed that gender profile of patients treated endovascularly for CLI differs from those generally described in the literature [2]: females were more frequently diagnosed for CLI and treated endovascularly than males. We believe that larger scale studies should be conducted regarding PAD and CLI distribution in the Latvian population. The median age of patients with PAD and CLI included into our study positively correlated with the data provided in literature. We also found that endovascular treatment decision of CLI and arterial occlusive disease in popliteocrural segment is strongly based on general guidelines [1, 6], with no interventional treatment performed in case of mild or moderate IC (Rutherford category 1–2).

Previously, it was stated that asymptomatic PAD and (IC) as moderate clinical presentation of PAD (Rutherford category 1–2) are slowly or non-progressive to CLI, therefore no interventional treatment of these patients is allowed by general guidelines. Nevertheless, the recent meta-analysis study has revealed that during the average follow-up in 6.3 years, approximately 7% of asymptomatic PAD patients progressed to IC, and 21% of IC patients were diagnosed as having CLI, with 4–27% undergoing amputations [7]. These data show that patients with a mild or moderate IC should be closely observed and educated about the best medical treatment of PAD and the importance of regular follow-up.



## Conclusion

The gender profile of our patients differed from that generally described in literature. In our tertiary care hospital, the patients with peripheral arterial occlusive changes limited to popliteocrural segment were treated by endovascular revascularization method only if they met clinical signs of CLI (mainly Rutherford category 4–6). No patients with mild or moderate claudication were treated with endovascular method and only a limited number of patients with severe claudication underwent an endovascular revascularization of popliteocrural segment.

## References

1. Anderson, J. L., Halperin, J. L., Albert, M., et al. (2013). Management of Patients with Peripheral Artery Disease (Compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA Guideline Recommendations). *Circulation*, 127, pp. 1425-1443.
2. Baser, O., Verpillat, P., Gabriel, S., et al. (2013). Prevalence, Incidence, and Outcomes of Critical Limb Ischemia in the US Medicare Population. *Vascular disease management*, 10(2), E26-E36.
3. Gardner, A. W., Afaq, A., et al. (2008). Management of Lower extremity peripheral arterial disease. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.*, 28(6), pp. 349-357.
4. Nehler, M. R., Duval, S., Zakharyan, A., et al. (2012). Incidence and Prevalence of Peripheral Artery Disease and Critical Limb Ischemia in an Insured National Population. *Circulation*, 126, A12761.
5. Park, S. W., Kim, J. S., Yun, I. J., et al. (2013). Clinical outcomes of endovascular treatments for critical limb ischemia with chronic total occlusive lesions limited to below-the-knee arteries. *Acta Radiol.*, 54(7), pp. 785-789.
6. van Overhagen, H., Spiliopoulos, S., Tsetis, D. (2013). CIRSE standarts of Practice guidelines. Below-the-knee Interventions. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, 36, pp. 302-311.
7. Sigvant, B., Lundin, F., Wahlberg, E. (2016). The Risk of Disease Progression in Peripheral Arterial Disease is Higher than Expected: A Meta-Analysis of Mortality and Disease Progression in Peripheral Arterial Disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 51(3), pp. 395-403, S1078-5884(15)00775-3. doi: 10.1016/j.ejvs.2015.10.022. [Electronic publication ahead of print].

## Kopsavilkums

*Perifēro artēriju slimība (PAS) ir galvenais apakšējo ekstremitāšu amputācijas iemesls. Pētījuma mērķis ir analizēt PAS klīnisko pazīmju variabilitāti pacientiem, kuriem popliteokrurālā arteriālā segmenta okluzīvo izmaiņu dēļ veikta endovaskulāra revaskularizācija. Pētījumā iekļauti PAS pacienti ar popliteokrurālā segmenta okluzīvām izmaiņām, kuriem 2015. gadā mūsu terciārās medicīnas aprūpes iestādē veikta endovaskulāra revaskularizācija un klīnisko datu retrospektīva analīze. Visiem 143 iekļautiem pacientiem tika konstatēta PAS atbilstība Rutherforda 3–6 kategorijai: 1,4% – 3. kategorija, 13,25% – 4. kategorija, 45,79% – 5. kategorija, 40,14% – 6. kategorija. Rezultātā konstatēts, ka endovaskulāra revaskularizācija tika realizēta tikai pacientiem ar kritisku kāju išēmiju, kas ir PAS beigu stadija.*

*Atslēgvārdi: perifēro artēriju slimība, kritiska kājas išēmija, endovaskulāra revaskularizācija, popliteokrurālais arteriālais segments.*

## Atbalsta vektora analīzes lietojums slimību diagnostikai ar elektronisko ožas sensoru

### *Application of support vector analysis in diagnostics with electronic olfactory sensor*

Madara Tirzīte,<sup>1</sup> Gunta Strazda,<sup>2, 3, 4</sup> Normunds Jurka,<sup>2, 3</sup>  
Immanuels Taivans,<sup>2, 3, 4</sup> Māris Bukovskis<sup>2, 3, 4</sup>

<sup>1</sup> Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas stacionārs „Gaiļezers”,  
2. pulmonoloģijas nodaļa

<sup>2</sup> Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas  
Plaušu slimību centrs

<sup>3</sup> Latvijas Universitātes  
Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūts

<sup>4</sup> Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: *madara.t@gmail.com*

Elektroniskais ožas sensors ir jauns diagnostisks rīks, iegūtie rezultāti ir objektīvi, un tiem ir augsta precizitāte, taču ir nepieciešama arī rūpīga datu apstrāde un jāizvēlas optimāls datu algoritmu modulis, lai datus varētu analizēt pēc iespējas precīzāk un lai iegūtu maksimāli ticamus rezultātus. Rakstā atspoguļoti pēdējo gadu pētījumu rezultāti par labākajiem datu apstrādes modeļiem (dati iegūti ar elektronisko ožas sensoru). Mūsu pētījuma dati rāda, ka, izmantojot atbalsta vektora analīzi, iegūta 98,8% jutība, paredzot plaušu vēža pacientus.

**Atslēgvārdi:** atbalsta vektora analīze, elektroniskais ožas sensors, elektroniskais deguns, datu analīze, plaušu vēzis.

Visā pasaulē ir aktuāla jaunu metožu un diagnostisku ierīču izveide, kā arī to ieviešana praksē. Novitātes diagnostikā ir aktuālas arī medicīnā. Viena no jaunākajām diagnostiskajām ierīcēm, kas tiek lietota dažādās medicīnas nozarēs, ir elektroniskais ožas sensors. Elektronisko ožas sensoru jeb elektronisko degunu var lietot dažādu infekciju etioloģisko aģentu verifikācijai gan pneimoloģijā, piemēram, tuberkulozes [1, 2] vai ar mākslīgo plaušu ventilāciju asociēto pneimoniju [3] gadījumos, gan otorinolaringoloģijā ausu, kakla, deguna infekciju gadījumos [4, 5], gan uroloģijā urīnceļu infekciju verifikēšanai [6]. Tāpat elektroniskais ožas sensors tiek lietots dažādu neinfekciozas etioloģijas slimību, piemēram, plaušu vēža [7], krūts vēža [8], bronhiālās astmas [9], hroniskas obstruktīvas plaušu slimības [10], akūta respiratorā distresa sindroma [11] un daudzu citu patoloģiju diagnostikā.

Pats elektroniskais deguns ir kompakta, maza, ērti lietojama ierīce, un apmācība tā lietošanā ir vienkārša un ātra. Ar elektronisko degunu iegūtie dati tiek iegūti

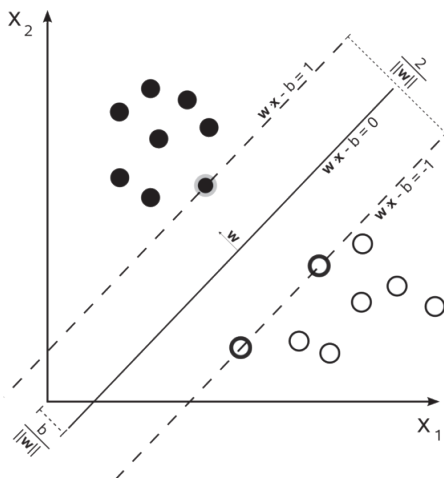
neinvazīvā ceļā, datus iegūt ir vienkārši un ātri, iegūtajiem datiem ir augsta precizitāte, tie ir viegli reproducējami. Rezultātus neietekmē tādi cilvēka faktori kā izpildītāja subjektivitāte [12].

Ar elektronisko degunu iegūto datu apstrāde notiek vairākos posmos. Pēc parauga nonākšanas ierīcē radušies signāli tiek vadīti uz pievienoto datoru, kur īpašā programmā notiek signāla priekšapstrāde, sensoru reakcijas maiņas identifikācija, raksturlielumu selekcija, klasterēšana un, visbeidzot, datu validācija. Datorprogrammā fiksētās sensoru pretestības pārmaiņas redzamas līkņu veidā. Katra līkne sastāv no daudziem punktiem, kas atspoguļo katra elektroniskā deguna sensora izmaiņas noteiktā laika posmā, sensoru var iepriekš manuāli uzstādīt un mainīt. Piemēram, ja elektroniskajam degunam ir 32 sensori, to elektriskās pretestības izmaiņas tiek fiksētas reizi sekundē, analīzes pieraksta ilgums ir 90 sekundes un rezultāti tiek atspoguļoti divdimensionālas līknes veidā uz  $xy$  asu sistēmas, tad vienas analīzes laikā tiek iegūtas 2880 skaitliskas vērtības, kas atspoguļo novietojumu uz  $x$  ass, un tikpat daudz vērtību, kas atspoguļo novietojumu uz  $y$  ass, tātad kopumā 5760 vērtības. Elektronisko degunu sensoru sniegto datu apstrāde ir sarežģīta, bez jau iepriekš minētajām vērtībām tiek noteikti arī citi parametri, piemēram, laukums zem līknes, līknes pieauguma ātrums, vektoru normalizēšanās ātrums un citi. Viena parauga analīzes rezultātā var iegūt pat vairākus desmitus tūkstošu vērtību [13].

Līdz ar to ir skaidra nepieciešamība pēc kompleksas datu apstrādes sistēmas, lai varētu pilnvērtīgi analizēt iegūtos datus. Šādiem nolūkiem lieto galveno komponentu analīzi, kas ir ātra, kompjuāterizēta metode, lai atpazītu un analizētu nepārraugāmus datu klasterus [12]. Viens no galveno komponentu analīzes veidiem ir atbalsta vektora analīze.

Atbalsta vektora analīze (arī saukta par atbalsta vektora tīklu) ir datu modeļu pārraugošs tīkls ar asociētiem algoritmiem, kas analizē klasificējamus datus. Vienlaikus tas ir arī viens no mašīnmācības (*machine learning*) jeb automatizētās datu klasifikācijas veidiem. Vispirms atbalsta vektora analīzē tiek veidoti paraugi un tiek norādīts, kā kurš paraugs būtu jāidentificē, un turpmāk atbalsta vektora analīzes gaitā tiek veidoti un realizēti algoritmi, kas datus iedala atbilstoši vienai vai otrai kategorijai. Atbalsta vektora analīze ir viens no binārās lineārās klasifikācijas rīkiem. Atbalsta vektora analīzes modelis ir parauga attēlošana tādā veidā, ka tas tiek kartēts tā, ka dažādu kategoriju paraugi tiek skaidri atdalīti atsevišķās grupās, līdz ar to jauniegūtie paraugi bez pārklāšanās tiek iedalīti kā atbilstoši vienai vai otrai grupai [14]. Jo lielāks ir attālums no sadales robežas līdz tuvākajam jebkuras klases datu punktam (funkcionālā robeža), jo mazāka ir ģeneralizācijas kļūda (1. attēls).

*Gromski* ar kolēģiem salīdzinājis dažādu datu apstrādes metožu efektivitāti, analizējot datus, kas iegūti ar elektronisko degunu. Vienu un to pašu datu analīzei tika izmantotas un salīdzinātas četras metodes – lineārā diskriminanta analīze, daļējā mazāko kvadrātu diskriminantu analīze, *random forests* analīze un atbalsta vektora analīze. Atbalsta vektora analīzei bija visaugstākā precizitāte (91,66%), kam cieši seko lineārā diskriminanta analīze (91,56%), līdz ar to šīs divas metodes tiek ieteiktas kā izvēles metodes, lai analizētu ar elektronisko degunu iegūtos datus ar augstāko precizitāti, sensitivitāti un specifiskumu [20].



Attēls. Atbalsta vektora analīzes princips

Figure. *The principle of support vector analysis*

(pieejams: [https://en.wikipedia.org/wiki/Support\\_vector\\_machine#/media/File:Svm\\_max\\_sep\\_hyperplane\\_with\\_margin.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Support_vector_machine#/media/File:Svm_max_sep_hyperplane_with_margin.png))

Atbalsta vektora analīze tiek izmantota, analizējot ar elektronisko degunu iegūtos paraugus dažādās medicīnas subspecialitātēs. Pneimologijā atbalsta vektora analīze tiek izmantota, lai atšķirtu pacientu ar plaušu vēzi izelpas gaisa paraugus no veselu kontroles indivīdu izelpas gaisa paraugiem. Machado un kolēģu veiktajā pētījumā atbalsta vektora analīze tika lietota 76 paraugu apstrādei, rezultātā dati rādīja, ka, izmantojot izvēlēto datu apstrādes metodi, iegūta 71,4% jutība un 91,9% specifiskums ar pozitīvo paredzošo vērtību 66,6% un negatīvo paredzošo vērtību 93,4% [15].

Atbalsta vektora analīzi datu apstrādei izmantojis arī Hockstein ar kolēģiem, analizējot izelpas paraugus ar elektronisko degunu intensīvās terapijas nodaļas pacientiem, kam, iespējams, bija pneimonija, kas saistīta ar mākslīgo plaušu ventilāciju. No 25 pārbaudītajiem paraugiem 13 paraugi bija no pacientiem, kam datortomogrāfiski tika pierādīta pneimonija. Ar atbalsta vektora analīzi veiktajā izelpas gaisa datu apstrādē pozitīvā paredzamā vērtība bija 80–91,6% atkarībā no izvēlēta algoritma modeļa [16].

Ar elektronisko degunu iegūto datu apstrāde, izmantojot atbalsta vektora analīzi, veikta arī, analizējot asins kultūru paraugus un ticami identificējot desmit dažādas baktēriju kultūras [17]. Tāpat atbalsta vektora analīze izmantota arī ar elektronisko degunu iegūto datu analīzei bakteriāla sinusīta diagnostikā. Salīdzinot tādu pacientu datus, kam ir bakteriāls sinusīts, ar kontroles grupas veselo pacientu datiem, atkarībā no izvēlēta algoritma modeļa 72–98,4% gadījumu paraugi tika klasificēti pareizi [18].

Atbalsta vektora analīze tiek izmantota ne tikai rezultātu, kas iegūti ar elektronisko degunu, apstrādei. 2016. gada janvārī publicēts pētījums, kur atbalsta vektora analīze veiksmīgi izmantota, lai atpazītu pacientus ar akūtu koronāru sindromu,

ņemot vērā to demogrāfiskos datus, riska faktoros, laboratoriskos rādītājus un vizuālās diagnostikas datus. Pētījumā tika salīdzināti 4 dažādi automatizētās datu klasifikācijas veidi – atbalsta vektora analīze, mākslīgais neirālais tīkls, *Naive Bayes* klasifikators un loģistiskās regresijas analīze –, un no minētajām metodēm atbalsta vektora analīzei bija visaugstākā precizitāte – 99,13% [21].

Atbalsta vektora analīze pierādīta kā labākā izvēles metode arī pētījumā, kur elektroniskais deguns lietots, lai pēc cilvēka ādas smaržas verificētu, vai pacients ir smēķējis parastās cigaretes vai arī marihuānu. Šajā pētījumā salīdzinātas divas datu analīzes metodes – principālkomponentu analīze ar diskriminantu analīzi un atbalsta vektora analīze. Ar atbalsta vektora analīzi tika panākti labāki rezultāti – 95% jutība un 90% specifiskums, kopumā iegūstot 92,5% precizitāti [22].

Atbalsta vektora analīze veiksmīgi un ar labiem rezultātiem lietota arī elektroniskā deguna paraugu pētījumos, lai diagnosticētu galvas un kakla vēzi, atkarībā no lietotā algoritma ar atbalsta vektora analīzi panākta 95–100% precizitāte [23].

Kā redzams no iepriekšējiem pētījumiem, ar atbalsta vektora analīzi iegūtie rezultāti atšķiras atkarībā no izvēlēta klasifikācijas modeļa. 2015. gadā tika apkopoti dažādu autoru veiktie pētījumi ar elektronisko degunu un tajos iegūtie dati, kas analizēti, izmantojot atbalsta vektora analīzi. Rezultātā tika analizēts, kādi būtu vēlamākie izvēles datu salīdzināšanas algoritmu modeļi, lai iegūtu rezultātus ar lielāko ticamību. Par ticamākajiem modeļiem tika atzīmēts līknes pieauguma ātrums, līknes krituma ātrums, maksimālā vērtība un citi modeļi. Tiek arī rosināts jauns atbalsta vektora analīzes apakšmodelis – kustīgā loga funkcionēšanas kapacitāte (*moving window function capturing*), kad analizējamo datu apjomā ar līkni tiek atdalīts nošķirts laukums – „logs”, kas tiek izmantots kā datu filtrs. Šim „logam” var mainīt tā platumu, pozīciju, formu, to var pārbīdīt laikā, modelējot vēlamāko novietojumu [19].

Arī Latvijas Universitātē veicām pētniecisku darbu, izmantojot elektronisko degunu, un rezultātus apstrādājām ar atbalsta vektora metodi. Analizējām izelpas gaisa paraugus pacientiem ar plaušu vēzi un kontroles grupas veselīgiem pacientiem. Mūsu iegūtie rezultāti parādīja, ka, izmantojot atbalsta vektora analīzi, plaušu vēzi var sekmīgi diferencēt, sekmības rādītāji atšķiras atkarībā no izvēlēta datu klasifikācijas algoritmu modeļa. Salīdzinot analizētos plaušu vēža pacientus ar kontroles grupas pacientiem un par elektroniskā deguna datu apstrādes metodi izvēloties atbalsta vektora analīzi ar lineāru kodolanalīzi, no 166 plaušu vēža pacientiem 164 (98,8%) tika pareizi klasificēti kā plaušu vēža pacienti (tabula).

**Tabula. Ar atbalsta vektora analīzi iegūtie dati.**

PPV – pozitīvā paredzamā vērtība, NPV – negatīvā paredzamā vērtība

*Table. Data obtained with the use of support vector analysis.*

*PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value*

|          | Vēzis  | Kontrole     |      |     |
|----------|--------|--------------|------|-----|
| Vēzis    | 164    | 15           | 91.6 | PPV |
| Kontrole | 2      | 64           | 97.0 | NPV |
|          | 98.8   | 81.0         |      |     |
|          | Jutība | Specifiskums |      |     |

Arī mūsu pētījuma rezultāti uzrāda, ka, ieviešot elektronisko degunu plašākai lietošanai, atbalsta vektora analīze ir efektīva datu apstrādes metode ar augstu ticamību. To izmantojot, var iegūt analizējamo datu klasifikāciju grupās ar augstu precizitātes līmeni. Pilnveidojot datu algoritmu moduļus, ko var izmantot, lietojot atbalsta vektora analīzi ar elektronisko degunu iegūto datu apstrādē, var iegūt diagnostisku rīku ar ļoti augstu ticamību, kas ir tuvu ideālai.

## Izmantotā literatūra

1. Pavlou, A. K., Magan, N., Jones, J. M., Brown, J., Klatser, P., Turner, A. P. (2004). Detection of Mycobacterium Tuberculosis (TB) in Vitro and in Situ Using an Electronic Nose in Combination with a Neural Network System. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(3), pp. 538-544.
2. Phillips, M., Basa-Dalay, V., Bothamley, G., Cataneo, R. N., Lam, P. K., Natividad, M. P. R., Schmitt, P., Wai, J. (2010). Breath Biomarkers of Active Pulmonary Tuberculosis. *Tuberculosis*, 90(2), pp. 145-151.
3. Morehead, R. S., Pinto, S. J. (2000). Ventilator-associated pneumonia. *Arch. Int. Med.*, 160, pp. 1926-1936.
4. Lai, S. Y., Deffenderfer, O. F., Hanson, W., Phillips, M. P., Thaler, E. R. (2002). Identification of Upper Respiratory Bacterial Pathogens with the Electronic Nose. *Laryngoscope*, 112(6), pp. 975-979.
5. Shykhon, M. E., Morgan, D. W., Dutta, R., Hines, E. L., Gardner, J. W. (2004). Clinical Evaluation of the Electronic Nose in the Diagnosis of Ear, Nose and Throat Infection: A Preliminary Study. *The Journal of Laryngology & Otology*, 118(9), pp. 706-709.
6. Pavlou, A. K., Magan, N., McNulty, C., Jones, J. M., Sharp, D., Brown, J., Turner, A. P. F. (2002). Use of an Electronic Nose System for Diagnoses of Urinary Tract Infections. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(10), pp. 893-899.
7. Machado, R. F., Laskowski, D., Deffenderfer, O., Burch, T., Zheng, S., Mazzone, P. J., Mekhail, T., Jennings, C., Stoller, J. K., Pyle, J., Duncan, J., Dweik, R. D., Erzurum, S. C. (2005). Detection of Lung Cancer by Sensor Array Analyses of Exhaled Breath. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 171(11), pp. 1286-1291.
8. Phillips, M., Cataneo, R. N., Ditkoff, B. A., Fisher, P., Greenberg, J., Gunawardena, R., Kwon, C. S., Rahbari-Oskoui, F., Wong, C. (2003). Volatiles Markers of Breast Cancer in the Breath. *The Breast Journal*, 9(3), pp. 184-191.
9. Dragonieri, S., Schot, R., Mertens, B. J., Le, S. C., Gauw, S. A., Spanevello, A., Resta, O., Willard, N., Vink, T., Rabe, K., Bel, E., Sterk, P. (2007). An Electronic Nose in the Discrimination of Patients with Asthma and Controls. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(4), pp. 856-862.
10. Fens, N., Zwinderman, A. H., van der Schee, M. P., de Nijs, S. B., Dijkers, E., Roldaan, A. C., Cheung, D., Bel, E. H., Sterk, P. J. (2009). Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 180(11), pp. 1076-1082.
11. Bos, L. D., Schultz, M. J., Sterk, P. J. (2014). Exhaled breath profiling for diagnosing acute respiratory distress syndrome. *BMC Pulm. Med.*, Available at: <http://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-14-72> [accessed 18.04.2016].
12. Chen, S., Wang, Y., Choi, S. (2013). Applications and Technology of Electronic Nose for Clinical Diagnosis. *OJAB*, 2, pp. 39-50.
13. García-González, D. L., Aparicio, R. (2002). Sensors: From Biosensors to the Electronic Nose. *Grasas y Aceites*, 53(1), pp. 96-114.
14. Cortes, C., Vapnik, V. (1995). Support-vector networks. *Machine Learning*, 20(3), pp. 273-297.



15. Machado, R. F., Laskowski, D., Deffenderfer, O., Burch, T., Zheng, S., Mazzone, P. J., Mekhail, T., Jennings, C., Stoller, J. K., Pyle, J., Duncan, J., Dweik, R. D., Erzurum, S. C. (2005). Detection of Lung Cancer by Sensor Array Analyses of Exhaled Breath. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 171(11), pp. 1286-1291.
16. Hockstein, N. G., Thaler, E. R., Torigian, D., Miller, W. T. Jr., Deffenderfer, O., Hanson, C. W. (2004). Diagnosis of Pneumonia with an Electronic Nose: Correlation of Vapor Signature with Chest Computed Tomography Scan Findings. *The Laryngoscope*, 114(10), pp. 1701-1705.
17. Trincavelli, M., Coradeschi, S., Loutfi, A., Söderquist, B., Thunberg, P. (2010). Direct identification of bacteria in blood culture samples using an electronic nose. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 57(12), pp. 2884-2890.
18. Thaler, E. R., Hanson, C. W. (2006). Use of an electronic nose to diagnose bacterial sinusitis. *Am. J. Rhinol.*, 20(2), pp. 170-172.
19. Guo, X., Peng, C., Zhang, S., Yan, J., Duan, S., Wang, L., Jia, P., Tian, F. (2015). A Novel Feature Extraction Approach Using Window Function Capturing and QPSO-SVM for Enhancing Electronic Nose Performance. *Sensors*, 15, pp. 15198-15217.
20. Gromski, P. S., Correa, E., Vaughan, A. A., Wedge, D. C., Turner, M. L., Goodacre, R. (2014). A comparison of different chemometrics approaches for the robust classification of electronic nose data. *Anal Bioanal. Chem.*, 406(29), pp. 7581-7590.
21. Berikol, G. B., Yildiz, O., Özcan, I. T. (2016). Diagnosis of Acute Coronary Syndrome with a Support Vector Machine. *J. Med. Syst.*, 40(4), p. 84.
22. Voss, A., Witt, K., Kaschowitz, T., Poitz, W., Ebert, A., Roser, P., Bär, K. J. (2014). Detecting cannabis use on the human skin surface via an electronic nose system. *Sensors*, 14(7), pp. 13256-13272.
23. Hakim, M., Billan, S., Tisch, U., Peng, G., Dvorkind, I., Marom, O., Abdah-Bortnyak, R., Kuten, A., Haick, H. (2011). Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath. *Br. J. Cancer*, 104(10), pp. 1649-1655.

## Summary

*Artificial olfactory sensor (electronic nose or e-nose) is a novel diagnostic tool, the data obtained are objective and with a high accuracy. Nevertheless, conscientious and thoughtful data procession and optimal data algorithm modules are needed for precise data analysis to obtain results with maximal validity. The article presents the results from the latest studies regarding the best processing models of data acquired with the electronic nose. The results of our study show that by means of a support vector machine we have achieved 98,8% sensitivity in predicting the likelihood of lung cancer in patients.*

**Keywords:** support vector machine, artificial smell sensor, electronic nose, data analysis, lung cancer.

## **Sarkopēnija un miosteatoze datortomogrāfijas izmeklējuma papildu mērījumos hroniska pankreatīta slimniekiem un to ietekme uz slimības gaitu**

### ***Prevalence of sarcopenia and miosteatosis according to additional measurements of computer tomography imaging in chronic pancreatitis patients and influence on the course of disease***

**Imanta Ozola-Zālīte,<sup>1</sup> Jeļena Ivanova,<sup>1</sup>  
Agnese Ūdre,<sup>2</sup> Anda Viksna,<sup>2</sup> Aldis Puķītis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Gastroenteroloģijas, hepatoloģijas un uzturterapijas centrs,  
Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca  
Pilsonu iela 13, Rīga, LV-1002

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: [ozola.zalite@gmail.com](mailto:ozola.zalite@gmail.com); [jelena.ivanova@stradini.lv](mailto:jelena.ivanova@stradini.lv); [pukitis@latnet.lv](mailto:pukitis@latnet.lv)

<sup>2</sup>Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte  
Raiņa bulv. 19, Rīga, LV-1050

E-pasts: [agnesealt@gmail.com](mailto:agnesealt@gmail.com); [anda.viksna@gmail.com](mailto:anda.viksna@gmail.com)

Hronisks pankreatīts ir hroniska iekaisīga aizkuņģa dziedzera slimība, kurai ar laiku progresējot var attīstīties gan eksokrīna, gan endokrīna aizkuņģa dziedzera mazspēja. Pētījuma mērķis bija izvērtēt hroniska pankreatīta pacientiem sarkopēniju jeb muskuļu zudumu un miosteatozi un to korelāciju ar slimības gaitu. Medicīnas literatūrā datu par sarkopēniju un miosteatozi hroniska pankreatīta gadījumā nav. Pētījumos par sarkopēniju un citām hroniskām vai onkoloģiskām slimībām, piemēram, hronisku obstruktīvu plaušu slimību, aizkuņģa dziedzera vēzi, ārstējot sarkopēniju, ir iegūstams arī uzlabojums slimības gaitā.

Pētījums bija prospektīvs kohorta pilota pētījums, kurš veikts Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā no 2015. gada marta līdz 2015. gada decembrim. Sarkopēnijas un miosteatozes izvērtēšanai izmantoja datortomogrāfijas (DT) izmeklējumus. DT attēlus analizēja ar standarta *ImageJ v1.49q* programmu (*National Institutes of Health*). Trešais jostas skriemelis (L3) tika izvēlēts kā standarta orientieris mērījumu veikšanai. Šī līmeņa attēla aksiālajos griezumos mērīja muskuļu, viscerālo, zemādas un intramuskulāro taukaudu laukumu.

Pētījumā bija iekļauti 18 pacienti – 13 vīrieši, 5 sievietes. Vidējais vecums bija 48 gadi. Vidēji hroniska pankreatīta diagnoze pacientiem bija zināma 10 gadus (laika intervāls no 1 līdz 29 gadiem). Vērtējot pacientu morfoloģiskās izmaiņas aizkuņģa dziedzerī pēc datortomogrāfijas attēliem (saskaņā ar Kembridžas klasifikāciju), 12 pacientiem tās bija ievērojamas, četriem pacientiem vidējas, diviem vieglas un vienam šaubīgas. Kopumā pēc

M-MANNHEIM klasifikācijas smaguma indeksa viegls hronisks pankreatīts bija diviem pacientiem, mērens – 14 pacientiem, ar progresējošu gaitu – vienam, smags – vienam.

Pēc iegūtajiem datiem varēja secināt, ka sarkopēnija ir bieži novērojama pacientiem ar hronisku pankreatītu, t. i., 44% pacientu bija sarkopēnija. Miosteatoze bija vairāk novērojama pacientiem ar paaugstinātu ķermeņa masas indeksu (ĶMI). Tajā pašā laikā šiem pacientiem vairāk raksturīga ir sarkopēniska adipozitāte nekā sarkopēnija samazināta ķermeņa svara gadījumā (sarkopēnija bija 86% pacientu ar paaugstinātu ĶMI). Pacientiem ar sarkopēniju vairāk izteikts bija sāpju sindroms ( $p = 0,24$ ), retāk sastopami paasinājumi ar nepieciešamību ārstēties stacionārā ( $p = 0,04$ ), mazāk ievērojamu izmaiņu datortomogrāfijas izmeklējumā pēc Kembridžas klasifikācijas ( $p = 0,06$ ).

**Atslēgvārdi:** hronisks pankreatīts, sarkopēnija, miosteatoze, sarkopēniska adipozitāte, datortomogrāfija.

## Ievads

Hronisks pankreatīts ir hroniska iekaisīga aizkuņģa dziedzera slimība, kurai visbiežāk sastopamie etioloģiskie faktori ir žultsakmeņu slimība un hroniska alkohola lietošana. Ar laiku, slimībai progresējot, var attīstīties gan eksokrīna, gan endokrīna aizkuņģa dziedzera mazspēja, kas noved līdz dažādām metaboliskām izmaiņām un malnutricijas. Tomēr slimības radīta malnutricija var būt saistāma gan ar eksokrīnas mazspējas izraisītu malabsorbciju, gan pastiprinātu metabolo aktivitāti slimības iekaisuma smaguma pakāpes dēļ. Kopumā zināms, ka samazināts pacienta barojums pasliktina slimības iznākumu, tomēr nav pietiekošu pierādījumu hroniska pankreatīta gadījumā. Ir vairāki pētījumi, kas parāda osteoporozes un tās ārstēšanas efektivitāti hroniska pankreatīta dēļ, tāpat arī makroelementu un mikroelementu zudumu ārstēšanas rezultātus hroniska pankreatīta gadījumā [1, 2].

Medicīnas literatūrā apraksta samazinātu muskuļu un tauku masu eksokrīnas mazspējas gadījumā, tomēr pētījumu par pacientu barojuma izmaiņām un slimības gaitas korelāciju nav. Ir atrodami pierādījumi par paaugstinātu mirstību smaga pankreatīta gadījumā, tā saistāma par lipotoksicitāti [3]. Nav datu par miosteatozes izplatību un tās ietekmi uz hroniska pankreatīta pacientu slimības smagumu.

Datortomogrāfijas (DT) izmeklējums ir uzskatāms par nozīmīgu diagnostisku metodi ķermeņa uzbūves novērtēšanai. Datortomogrāfija ir būtiska arī hroniska pankreatīta diagnostikā un aizkuņģa dziedzera stāvokļa aprakstīšanai slimības gaitas laikā, līdz ar to tā ir indicēta visiem aizkuņģa dziedzera pacientiem.

DT ir metode, kura ļauj tieši novērtēt vēdera iekšējo orgānu tauku apmēru un aprēķināt segmentāru un kopēju muskuļu masu, kā arī novērtēt tauku infiltrāciju muskuļos, kas ietekmē muskuļu kvalitāti un spēku [4, 5].

Pastāv spēcīga korelācija starp skeleta muskuļu un taukaudu laukumu trešā jostas skriemeļa līmeņa attēlos un kopējo organisma muskuļaudu un taukaudu masu [4–6]. Izmantojot datortomogrāfijas attēlu, trešā jostas skriemeļa līmenī var noteikt sarkopēniju pat tad, ja pacientam nav novērots svara zudums vai steatoreja, kas būtu raksturīga eksokrīnas mazspēja gadījumā. Sarkopēnija var būt kā norāde agrīnai eksokrīnai mazspējai pacientiem bez specifiskām sūdzībām vai negatīviem rezultātiem eksokrīnas mazspējas funkcionālajos testos.

Pētījuma rezultāti sniegtu iespēju uzlabot hroniska pankreatīta pacientu terapiju. Piemēram, pierādīta sarkopēnija var dot papildu indikāciju lielākām devām

enzīmu terapijā un olbaltumvielu produktu papildu lietošanai. Tāpat arī terapijā rekomendācijas fiziskām aktivitātēm un rehabilitācijai var uzlabot hroniska pankreatīta klīnisko stāvokli.

## Mērķis

Pētījuma mērķis ir izvērtēt hroniska pankreatīta pacientu sarkopēnijas un miosteatozes izplatību. Tāpat arī izvērtēt sarkopēnijas un taukaudu izvietojuma (ķermeņa uzbūvē) korelāciju ar hroniska pankreatīta slimības gaitu (etioloģisko faktoru, slimības ilgumu, ķermeņa masas indeksu, sāpju sindromu, paasinājumu pakāpi, slimības smagumu pēc CT datiem, aizkuņģa dziedzera endokrīno funkciju), izmantojot ķermeņa konstitūcijas analīzei papildu mērījumus datortomogrāfijas izmeklējumā.

## Materiāli un metodes

Pētījums ir prospektīvs kohorta pilota pētījums, kurš veikts Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Gastroenteroloģijas, hepatoloģijas un uzturterapijas centrā no 2015. gada marta līdz 2015. gada decembrim.

Pacientu iekļaušanas kritēriji:

1. Pacienta piekrišana piedalīties pētījumā.
2. Vecums lielāks par 18 gadiem neatkarīgi no dzimuma.
3. Veikts datortomogrāfijas izmeklējums.
4. Pacientam ir apstiprināta hroniska pankreatīta diagnoze (izmantojot attēldiagnostikas metodes – datortomogrāfiju, endoskopisko retrogrādo holangiogrāfiju, magnētisko rezonansi saskaņā ar Kembridžas klasifikāciju (1. tabula), endoskopisko ultrasonogrāfiju saskaņā ar Rosmountas kritērijiem) un veikta datortomogrāfija, un ir pieejami klīniskie parametri mēneša intervālā no veiktās datortomogrāfijas.

Katra pacienta gadījumā datu apkopošanai tika aizpildīta iepriekš izstrādāta anketa. Anketa izveidota pēc medicīnas literatūrā ievērojamāko pētījumu datiem.

Hronisks pankreatīts bija definēts kā progresīva iekaisīga aizkuņģa dziedzera slimība, kuras gaitā notiek endokrīnās un eksokrīnās funkcijas pasliktināšanās vai to zudums. Diagnozei bija jābūt apstiprinātai ar vienu no attēldiagnostikas metodēm: ultrasonogrāfiju, datortomogrāfiju, magnētisko rezonansi, endoskopisko sonogrāfiju vai endoskopisko retrogrādo holangiogrāfiju [7, 8]. Hroniska pankreatīta pacientiem endokrīnās funkcijas izvērtēšanai veica glikozes metabolisma traucējumu diagnostiku – noteica glikozes līmeni asins plazmā tukšā dūšā (kā robeža uzskatīta 7,0 mmol). Ja tā bija paaugstināta, noteikts HbA1c (kā robeža  $\geq 6,5\%$ ) un C peptīdu, kā arī hiperglikēmijas gadījumā noteikts HOMA-IR indekss, lai noteiktu insulīna rezistenci. Ja pacientam jau iepriekš bija zināms cukura diabēts, tā tips bija pierādīts iepriekš vai tas tika identificēts, iekļaujot pacientu pētījumā.

## 1. tabula. Kembridžas klasifikācijas attēldiagnostikas izmeklējumam [8]

Table 1. Summary of Cambridge classification for imaging techniques [8]

| Pakāpes         | ERHP <sup>1</sup>   | DT/MRHP <sup>2</sup>   |
|-----------------|---|--|
| 0 (neizmainīts) | Nav patoloģisku izmaiņu ar pilnībā vizualizējamu aizkuņģa dziedzera vadu  | Nav izmaiņu  |
| 1 (šaubīgas)    | Mazāk nekā trīs izmainītu sānu vadu, neizmainīts galvenais aizkuņģa dziedzera vads  | Nav nosakāmas izmaiņas DT/MRHP ar šī brīža pieejamām metodēm   |
| 2 (vieglas)     | Trīs un vairāk izmainītu sānu vadu, neizmainīts galvenais aizkuņģa dziedzera vads   | Divas vai vairāk izmaiņu no šādām izmaiņām: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aizkuņģa dziedzera ķermeņa daļā aizkuņģa dziedzera vads 2–4 mm</li> <li>• Nedaudz palielināts aizkuņģa dziedzeris</li> <li>• Heterogēna parenhīmas struktūra</li> <li>• Mazas cistiskas izmaiņas (&lt; 10 mm)</li> <li>• Vadu irregularitāte</li> <li>• Trīs un vairāk izmainītu sānu vadu</li> </ul> |
| 3 (vidējas)     | Trīs un vairāk izmainītu sānu vadu, izmainīts galvenais aizkuņģa dziedzera vads   | Viss minētais kā pie vieglas pakāpes plus izmainīts galvenais aizkuņģa dziedzera vads (> 4 mm)   |
| 4 (ievērojamas) | Kā pie vidējas pakāpes plus viens vai vairāki no minētajiem: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistiska struktūra &gt;10 mm</li> <li>• Kalcifikāti parenhīmā</li> <li>• Intraduktāli pildījuma defekti (kaļķa akmeņi)</li> <li>• Vadu striktūras</li> <li>• Smaga vadu irregularitāte</li> <li>• Blakus orgānu iesaiste</li> </ul> | Viena no izmaiņām pie vieglas un vidējas pakāpes plus viens vai vairāki no minētajiem: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistiska struktūra &gt;10 mm</li> <li>• Kalcifikāti parenhīmā</li> <li>• Intraduktāli pildījuma defekti (kaļķa akmeņi)</li> <li>• Vadu striktūras</li> <li>• Smaga vadu irregularitāte</li> <li>• Blakus orgānu iesaiste</li> </ul>                        |

<sup>1</sup> ERHP – endoskopiska retrogrāda hoangiogrāfija<sup>2</sup> MRHP – magnētiskās rezonanses holangiopankreatogrāfija

Hroniska pankreatīta smaguma pakāpes klasifikācijai izmantoja M-MANNHEIM klasifikāciju [9] (2. tabula).

M-MANNHEIM smaguma pakāpes:

A: viegls 0–5 punkti,

B: mērens 6–10 punkti,

C: progresējošs 11–15 punkti,

D: smags 16–20 punkti,

E: smags paasinājums > 20 punkti.

## 2. tabula. M-MANNHEIM klasifikācija hroniska pankreatīta smaguma pakāpei [9]

Table 2. M-MANNHEIM classification of chronic pancreatitis severity [9]

| Kliniskās pazīmes  | Punkti |
|--|--------|
| <b>Pacientu atzīmētās sāpes</b>  |        |
| Nav sāpju bez jebkādas terapijas (pacientam nav nepieciešami pretsāpju medikamenti)  | 0      |
| Atkārtots (rekurents) akūts pankreatīts (pacientam laika posmos starp akūta pankreatīta lēkmēm nav sāpju)  | 1      |
| Nav sāpju, lietojot pretsāpju medikamentus (pacientam nav sāpju, lietojot pretsāpju medikamentus vai pēc endoskopiskas ārstēšanas)   | 2      |
| Intermitējošas sāpes (pacientam ir intermitējošas epizodes bez sāpēm ar terapiju vai bez tās; papildus iespējamas akūta pankreatīta lēkmes)  | 3      |
| Nepārtrauktas sāpes (pacientam nav epizožu bez sāpēm ar terapiju vai bez tās; papildus iespējamas akūta pankreatīta lēkmes)  | 4      |
| <b>Sāpju terapija</b>  |        |
| Medikamentus nelieto   | 0      |
| Lieto neopioīdu medikamentus vai vieglus opioīdus (WHO solis 1 vai 2)  | 1      |
| Lieto stipros opioīdus (WHO solis 3) vai endoskopiska ārstēšana  | 2      |
| <b>Ķirurģiska ārstēšana</b>  |        |
| Jebkāda veida ķirurģiska ārstēšana neatkarīgi no indikācijām   | 4      |
| <b>Eksokrīna mazspēja</b>  |        |
| Nav eksokrīnas mazspējas   | 0      |
| Viegla, vidēja vai nepierādīta eksokrīna mazspēja bez enzīmu terapijas nepieciešamības (iekļaujot arī pacienta sūdzības par intermitējošām caurejām)   | 1      |
| Pierādīta eksokrīna mazspēja (pēc eksokrīnās funkcijas testiem) vai ievērojama eksokrīna mazspēja, izvērtējot, ir steatoreja vai tās nav (> 7 g tauku / 24 h), un enzīmu aizstājterapijas efektivitāte ārstēšanā | 2      |
| <b>Endokrīna funkcija</b>  |        |
| Nav cukura diabēta   | 0      |
| Ir cukura diabēts  | 4      |
| <b>Morfoloģiskās izmaiņas aizkuņģa dziedzērī pēc attēldiagnostikas izmeklējumiem (Kembridžas klasifikācija) (1. tabula)</b>  |        |
| Neizmainīts  | 0      |
| Šaubīgas   | 1      |
| Vieglas  | 2      |
| Vidējas  | 3      |
| Ievērojamas  | 4      |
| <b>Smagas orgānu sistēmu komplikācijas</b>   |        |
| Komplikāciju nav   | 0      |
| Reversablas komplikācijas  | 2      |
| Nereversablas komplikācijas  | 4      |

**Pacientu izslēgšanas kritēriji:**

- Jaunāks par 18 gadiem.
- Nav pieejams datortomogrāfijas izmeklējums.
- Pacients nepiekrīt piedalīties.



DT attēlu analīzei izmantoja standarta *ImageJ vl.49q* programmu (*National Institutes of Health*). Trešais jostas skriemelis (L3) tika izvēlēts kā standarta orientieris mērījumu veikšanai. Izraudzījās trešā jostas skriemeļa līmeņa attēla aksiālus griezumus, pēc kuriem noteica muskuļu, viscerālo, zemādas un intramuskulāro taukaudu laukumu. Muskuļi tika izvērtēti, pamatojoties uz to anatomiskām īpatnībām un struktūru. Skeleta muskuļu Hounsfielda vienību diapazons (HU) bija ņemts no 150 līdz 29. Savukārt taukaudu HU diapazons: -150 līdz -50 viscerāliem taukaudiem, -190 līdz -30 subkutāniem taukaudiem un intramuskulāriem taukaudiem. Katram pacientam tika iezīmēti šķērssvītrotie muskuļi (*m. psoas major*, *m. erector spinae*, *m. quadrates lumborum*, *m. obliquus externus abdominis*, *m. obliquus internus abdominis*, *m. transverses abdominis*, *m. rectus abdominis*) un aprēķināta šo muskuļu šķērsriezuma laukuma (cm<sup>2</sup>) summa un vidējā aritmētiskā vērtība divos secīgos attēlos. Līdzīgi arī ar taukaudiem. Attiecība starp iegūto skeleta muskulatūras laukumu L3 skriemeļa līmenī un pacienta ķermeņa laukumu ir skeleta muskuļu indekss L3 (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>). Pēc līdzīga principa aprēķināti arī kopējo, zemādas un viscerālo taukaudu indeksi. Vīriešiem < 52,4 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> un sievietēm < 38,5 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> skeleta muskuļa indekss tika uzskatīts par sarkopēniju. Šie rādītāji atbilst sarkopēnijas definīcijai – kā stāvoklis, kurā muskuļu masa ir mazāka nekā tās vidējā vērtība veseliem viena vecuma un dzimuma pieaugušajiem.

Katram pacientam noteica svaru un augumu, lai aprēķinātu ĶMI (svars (kg)/augums<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)), un izmantoja klasifikāciju pēc Pasaules Veselības organizācijas kategorijām: samazināts svars, ĶMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>; normāls svars 18,5 kg/m<sup>2</sup> ≤ ĶMI < 24,9 kg/m<sup>2</sup>; liekais svars 25 kg/m<sup>2</sup> ≤ ĶMI < 29,9 kg/m<sup>2</sup>; aptaukošanās ĶMI > 30 kg/m<sup>2</sup>.

Ķermeņa virsmas laukuma (BSA) aprēķināja, izmantojot *Mosteller* formulu: BSA (m<sup>2</sup>) = (augstums (cm) × svars (kg) / 3600) [10].

Katrs pacienta gadījums bija anonimizēts un apzīmēts ar gadījuma specifisku kodu. Tāpat arī DT attēli bija anonimizēti, DT darba stacijā saglabājot nepieciešamos attēlu griezumus. Rezultātu statistiskā analīze tika veikta, izmantojot SPSS 20.0 programmu.

## Rezultāti

Pētījumā bija iekļauti 18 pacienti – 13 vīrieši, 5 sievietes. Vidējais vecums bija 48 gadi intervālā no 30 līdz 82 gadiem. 12 gadījumos etioloģiskais faktors bija alkohols, divos – žultsakmeņu slimība, četri bija ideopātiski hroniski pankreatīti. Pacientu pētījumā iekļaušanas etapā divi saņēma endoskopisku procedūru, viens ķirurģisku drenāžas procedūru, pārējie – konservatīvu medikamentozu ārstēšanu. Vidēji hroniska pankreatīta diagnoze pacientiem bija zināma 10 gadus (laika intervāls no 1 līdz 29 gadiem). Ambulatorā terapijā 12 pacienti regulāri saņēma pretsāpju medikamentus. Enzīmu aizstājterapiju regulāri ikdienā lietoja 11 pacienti.

Regulāra alkohola lietošana bija zināma 11 pacientiem, smēķēšana vidēji viena paņiā dienā ar vidējo smēķēšanas ilgumu 22 gadi bija zināma 10 pacientiem.

Cukura diabēts šajā pacientu grupā bija četriem pacientiem – diviem bija 2. tipa (viens pacients saņēma insulīna terapiju), vienam – 1. tipa, vienam – 3c tipa diabēts. Cukura diabēts pacientiem bija zināms jau iepriekš, pirms pacienta iekļaušanas pētījumā (3. tabula).

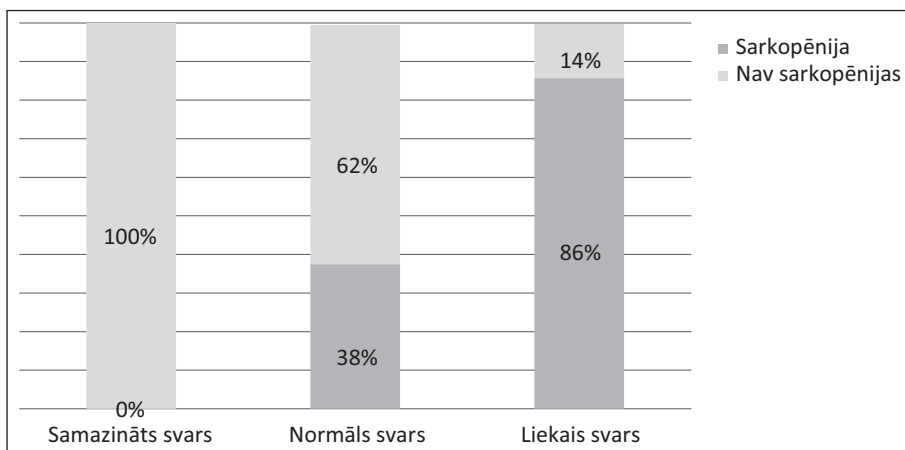
3. tabula. Hroniska pankreatīta pacientu ķermeņa uzbūves analīze pēc datortomogrāfijas izmeklējumu mērījumiem

Table 3. Body composition analysis of chronic pancreatitis patients according to CT measures

| Pacientu dati   |                   |             |     |
|---|-------------------|-------------|-----|
| Vecums (gadi)   | Vidējais          | 49          |     |
|   | SD                | 13,5        |     |
|   | Intervāls         | 30–82       |     |
| Svars (kg)  | Vidējais          | 70          |     |
|   | SD                | 13,311      |     |
|   | Intervāls         | 46–92       |     |
| ĶMI (kg/m <sup>2</sup> )  | Vidējais          | 23,75       |     |
|   | SD                | 3,44        |     |
|   | Intervāls         | 17,1–27,47  |     |
|   | Samazināts svars  | 3           | 17% |
|   | Normāls svars     | 8           | 44% |
|   | Liekais svars     | 6           | 33% |
|   | Adipozitāte       | 1           | 6%  |
| Dzimums   | Vīrieši           | 13          | 72% |
|   | Sievietes         | 5           | 28% |
| Sarkopēnija   | Kopumā            | 8           | 44% |
|   | <b>Vīriešiem</b>  |             |     |
|   | Sarkopēnija       | 6           | 46% |
|   | <b>Sievietēm</b>  |             |     |
|   | Sarkopēnija       | 2           | 40% |
| Intramuskulārie taukaudi (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )     | Vidējais rādītājs | 7,02        |     |
|   | SD                | 3,73        |     |
|   | Intervāls         | 1,8–16,7    |     |
| Skeleta muskulatūras indekss (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ) | Vidējais rādītājs | 48,43       |     |
|   | SD                | 11,85       |     |
|   | Intervāls         | 26,5–69,91  |     |
| Kopējais taukaudu indekss (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )    | Vidējais rādītājs | 51,06       |     |
|   | SD                | 25,33       |     |
|   | Intervāls         | 10,37–95,37 |     |
| Zemādas taukaudu indekss (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )     | Vidējais          | 29,1        |     |
|   | SD                | 16,6        |     |
|   | Intervāls         | 1,57–61,54  |     |
| Viscerālo taukaudu indekss (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )   | Vidējais          | 21,6        |     |
|   | SD                | 12,91       |     |
|   | Intervāls         | 4,26–54,21  |     |

Viegla anēmija pēc laboratoriskajām asins analīzēm bija trīs pacientiem. Albūmīna vidējais rādītājs pacientu grupai bija 39,67 g/l (intervālā 25–48 g/l), kopējais olbaltums 67 g/l (intervālā 61–73 g/l).

Vidēji  $\text{KMI}$  rādītājs bija  $23,75 \text{ kg/cm}^2$ , samazināts svars bija 17%, normāls svars 44%, palielināts svars 33%, adipozitāte 6% pacientu. No visiem pacientiem 44% bija atrodama sarkopēnija, visvairāk – pacientu grupā ar normālu svaru (38%), pacientiem ar lieko svaru – 14% (attēls). Vidējais skeleta muskulatūras indekss bija  $48,43 \text{ (cm}^2/\text{m}^2)$ , kopējais taukaidu indekss  $51,06 \text{ (cm}^2/\text{m}^2)$  (3. tabula).



*Attēls. Sarkopēnijas izplatība dažādās svara grupās pēc ķermeņa masas indeksa*  
*Figure. Prevalence of sarcopenia by weight groups according to body mass index*

Vērtējot pacientu morfoloģiskās izmaiņas aizkuņģa dziedzerī pēc DT attēliem (saskaņā ar Kembridžas klasifikāciju), 12 pacientiem tās bija ievērojamas, četriem pacientiem vidējas, diviem vieglas un vienam šaubīgas.

Kopumā pēc M-MANNHEIM klasifikācijas smaguma indeksa viegls hronisks pankreatīts bija diviem pacientiem, mērens 14 pacientiem, viens progresējošs, viens – smags hronisks pankreatīts (4. tabula).

Pārsona korelācijas koeficients starp ķermeņa masas indeksu un intramuskulāro taukaidu laukumu bija  $r = 0,314$  ( $p = 0,204$ ), kas vērtējama kā vāja korelācija.

Rēķinot atsevišķi korelācijas koeficientu pacientu grupai ar sarkopēniju pēc datortomogrāfijas datiem starp ķermeņa masas indeksu un intramuskulāro taukaidu laukumu, tas bija  $r = 0,697$  ( $p = 0,05$ ), kas vērtējama kā spēcīga korelācija.

Intramuskulāro taukaidu laukuma attiecība pret kopējo ķermeņa laukumu pacientu grupā ar sarkopēniju bija 2,3, bez sarkopēnijas 1,9 ( $p = 0,37$ ). Procentuāli intramuskulāro taukaidu daudzums no kopējā taukaidu daudzuma pacientu grupā ar sarkopēniju bija 5%, bez sarkopēnijas 6% ( $p = 0,14$ ).

4. tabula. Hroniska pankreatīta pacienti ar sarkopēniju un bez tās  
Table 4. Chronic pancreatitis with/without sarcopenia

|   |                                | Ir sarkopēnija (DT) | Nav sarkopēnijas (DT) | <i>p</i> vērtība |
|---|--------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Ķermeņa masas indekss                                     | Vidējais                       | 23,3                | 24,1                  | 0,4              |
|   | Pazemināts svars ( <i>n</i> )  | 0                   | 3                     | 0,92             |
|   | Normāls svars ( <i>n</i> )     | 3                   | 5                     |                  |
|   | Palielināts svars ( <i>n</i> ) | 5                   | 2                     |                  |
| Etioloģija  | Biliārs ( <i>n</i> )           | 1                   | 1                     | 0,94             |
|   | Alkohola ( <i>n</i> )          | 5                   | 7                     |                  |
|   | Ideopātisks ( <i>n</i> )       | 2                   | 2                     |                  |
| Sāpju sindroms (pēc M-MANNHEIM klasifikācijas)            | 0                              | 0                   | 2                     | 0,24             |
|   | 1                              | 3                   | 6                     |                  |
|   | 2                              | 2                   | 1                     |                  |
|   | 3                              | 3                   | 1                     |                  |
|   | 4                              | 0                   | 0                     |                  |
| HP ilgums   | Vidējais (gadi)                | 10                  | 10                    | 0,55             |
| HP paasinājumu skaits                                     | Vidējais (reizes)              | 3                   | 8                     | 0,04             |
| Morfoloģiskās izmaiņas DT (pēc Kembridžas klasifikācijas) | Šaubīgas ( <i>n</i> )          | 0                   | 1                     | 0,06             |
|   | Vieglas ( <i>n</i> )           | 0                   | 1                     |                  |
|   | Vidējas ( <i>n</i> )           | 4                   | 0                     |                  |
|   | Ievērojamas ( <i>n</i> )       | 4                   | 8                     |                  |
| Cukura diabēts  |                                | 1                   | 3                     | 0,37             |
| HP smaguma indekss pēc M-MANNHEIM klasifikācijas          | Vieglis ( <i>n</i> )           | 0                   | 2                     | 0,42             |
|   | Mērens ( <i>n</i> )            | 8                   | 6                     |                  |
|   | Progresējošs ( <i>n</i> )      | 0                   | 1                     |                  |
|   | Smags ( <i>n</i> )             | 0                   | 1                     |                  |
| Intramuskulārie taukaudi (DT)                             | Vidējais (cm <sup>2</sup> )    | 7,2                 | 7,11                  | 0,96             |

## Diskusija

Lai arī pētījumā iekļautā pacientu grupa līdz šim ir maza, ir novērojamas dažas iezīmes, pētot sarkopēniju un hronisku pankreatītu.

Lielākajai daļai pacientu etioloģiskais faktors bija hroniska alkohola lietošana, tikai sešiem pacientiem attiecīgi tas bija žultsakmeņu slimības dēļ vai ideopātisks. Neskatoties uz jau iegūto hronisko slimību, 11 pacienti turpināja lietot alkoholu un 10 pacienti bija aktīvi smēķētāji.

Hroniska pankreatīta diagnoze šiem pacientiem bija zināma ļoti dažādus laika posmus, t. i., no viena gada līdz 29 gadiem, tomēr lielākajai daļai pacientu pēc Kembridžas klasifikācijas (1. tabula) aizkuņģa dziedzera izmaiņas datortomogrāfijā bija ievērojamas. Tajā pašā laikā, apkopojot slimības gaitas datus pēc M-MANNHEIM klasifikācijas (2. tabula), lielākoties pacientiem bija atrasts vieglas vai mērenas pakāpes hronisks pankreatīts, tikai vienam bija progresējošs un vienam smagas norises pankreatīts.

Gandrīz pusei (44%) pacientu ar hronisku pankreatītu bija sarkopēnija. 17% visu pētījumā iekļauto pacientu bija samazināts svars pēc ķermeņa masas indeksa aprēķina, tomēr nevienam šajā grupā nebija novērojama sarkopēnija. Jāņem gan vērā, ka šajā grupā bija salīdzinoši maz pacientu – tikai trīs. Turpretī 38% pacientu ar normālu svaru sarkopēnija bija, ar lieko svaru tā bija pat 86% pacientu no visas šīs grupas. Līdz ar to var secināt, ka pacientiem ar normālu vai pat paaugstinātu ķermeņa masas indeksu nevar izslēgt ķermeņa masas zudumu sarkopēnijas dēļ vai sarkopēnisku adipozitāti. Ķermeņa uzbūves analīze, izmantojot datortomogrāfijas izmeklējumus, var būt ļoti noderīga metode, ņemot vērā ķermeņa masas indeksa nepietiekamo informāciju hroniska pankreatīta pacientiem.

Lielākā daļa pacientu (11 pacienti jeb 61%) ikdienā lietoja enzīmu aizstājterapiju, kas liek pārdomāt šīs terapijas efektivitāti un nepieciešamu korekciju devu izvēlē. Iespējams sniegt atbalstu šo pacientu ārstēšanā, arī iesakot, piemēram, papildus lietot olbaltumvielu produktus.

Vērtējot intramuskulāro taukaudu daudzumu hroniska pankreatīta pacientiem pēc līdz šim pētījumā iegūtajiem datiem, kopīgas iezīmes dažādās pacientu grupās neizdevās iegūt. To daudzums, vērtējot gan pret kopējo ķermeņa laukumu, gan pret kopējo taukaudu laukumu pacientu grupā ar sarkopēniju un bez sarkopēnijas, būtiski neatšķiras, tomēr nav iegūti arī statistiski ticami rezultāti ( $p = 0,37$  un  $0,14$ ). Tajā pašā laikā iegūta spēcīga korelācija starp ķermeņa masas indeksu sarkopēnijas pacientiem un intramuskulāro taukaudu daudzumu ( $r = 0,697$ ;  $p = 0,05$ ). Jāņem vērā, ka šajā pacientu grupā nav neviena ar samazinātu svaru, līdz ar to, iespējams, spēcīgā korelācija zināmā mērā ir saistāma ar kopējo taukaudu daudzumu vai ir uzskatāma kā papildu norāde uz sarkopēnisku adipozitāti. Tomēr var secināt, ka miosteatoze hroniska pankreatīta pacientiem ir novērojama, lai arī šajā pētījumā nebija iespējams iegūt ticamus rezultātus par tās ietekmi uz slimības gaitu.

Lai izvērtētu pacientu muskuļu un taukaudu attiecības, var izmantot arī citas metodes, kā, piemēram, bioimpedanci, duālās enerģijas rentgenstaru absorbcimetriju vai magnētisko rezonansi [11]. Tomēr katrai metodei ir savi plusi un mīnusi. Piemēram, ķermeņa bioelektriskā impedance ir vienkārša, ļoti pieņemama pacientiem un viegli veicama. Audu spēja vadīt elektrisko strāvu saistīta ar organismā esošo augsto ūdens koncentrāciju un tajā esošajiem elektrolītiem. Bioelektriskā pilnas pretestības metode ir veids, kā analizēt ķermeņa struktūru ar ķermeņa pretestības mērījumiem, kad cauri tiek vadīta neliela maiņstrāva. Šī metode balstās uz atzinumu, ka izolators ir tauki, jo nesatur ūdeni, un vadītājs ir beztauku masa. Muskuļi ir bagāti ar ūdeni, tāpēc bioimpedances metode ļauj aprēķināt muskuļu masu kopumā. Tomēr tai ir būtisks trūkums, jo muskuļu masas mērījumus var izmainīt, piemēram, tūsku klātbūtnē [11].

Līdzīgi kā var veikt jostas trešā skriemeļa līmenī mērījumus datortomogrāfijas izmeklējumā, tos var veikt arī magnētiskās rezonanses attēlos. Šīm metodēm nepieciešams specializēts personāls, īpašas programmas un samērā daudz laika [11]. Ikdienas darbā ņemamas vērā arī izmeklējumu izmaksas un pieejamība. Tomēr, ja pacientam ir veikta magnētiskā rezonanse, mērījumu datu precizitāte ir līdzvērtīga abām attēldiagnostikas metodēm – gan nosakot sarkopēniju, gan intramuskulāros taukaudus [12, 13].

Kā tika uzskatīts pirms apmēram 20 gadiem, taukaudi cilvēka ķermenī darbojas ne jau kā inerta noliktava liekajām kalorijām, svarīga ir tikai enerģija homeostāzei; taukaudi izdala un sintezē ļoti dažādus hormonus, proinflatorus citokīnus, un darbojas autokrīni, parakrīni un endokrīni, skarot gan sirdi, gan muskuļoskeletālo sistēmu, gan centrālo nervu sistēmu, gan vielmaiņu [14–17]. Tomēr ne visiem taukaudiem atkarībā no to lokalizācijas ir vienādas funkcijas [15, 18]. Taukaudi, kas lokalizējas ekstopiskās vietās ārpus zemādas audiem, kā, piemēram, muskuļos, aknās un vēdera dobumā, ir saistāmi ar hronisku iekaisumu [19–22], traucētu glikozes toleranci, insulīna rezistenci un 2. tipa cukura diabēta attīstīšanās risku [23–32], paaugstinātu kopējo holesterīnu [27, 34–35] un samazinātu spēku [36–38].

Intramuskulāri taukaudi lielākā daudzumā ir atrasti pacientiem ar, piemēram, hroniskām muguras sāpēm (taukaudi paraspinaļajos muskuļos) [39–40], HIV pacientiem (lokomotoros muskuļos) [41], pacientiem ar diabētu [25] un hronisku obstruktīvu plaušu slimību [42]. Par hronisku pankreatītu un intramuskulārajiem taukaudiem medicīnas literatūrā informācija nav atrodamā.

Kopumā pēc šīs literatūras datiem, ķermeņa masas indeksam pieaugot, pieaug arī intramuskulārie taukaudi [29, 43]. Tomēr ir pētījumi, kuri, pat ņemot vērā ķermeņa masas indeksu kā ietekmējošu faktoru, ir pierādījuši, ka intramuskulārie taukaudi ir stingrs prognostisks faktors traucētai glikozes tolerancei un insulīna rezistencei gan gados jauniem, gan veciem pacientiem [25, 44]. Tas norāda, ka šie metabolie traucējumi nav tikai vien adipozitātes dēļ. Diemžēl mazais pacientu skaits šajā pētījumā vēl nedod iespēju analizēt hroniska pankreatīta, glikozes metabolisma izmaiņas un intramuskulāro taukaudu daudzuma korelāciju, tomēr, jādomā, šīs lokalizācijas taukaudu esamība varētu paātrināt diabēta attīstību hroniska pankreatīta pacientiem.

Lai arī intramuskulāro taukaudu mērījumi veikti daudzos pētījumos, to nedara rutīnas darbā, un standartizētu normu klīniskos attēldiagnostikas pētījumos līdz šim nav bijis [24–25, 46–48]. Līdz ar to arī grūti definēt, kāds tieši intramuskulāro taukaudu daudzums būtu un kāds nebūtu uzskatāms par miosteatozi. Pirmo reizi intramuskulāros taukaudus datortomogrāfijas attēlu mērījumos aprakstīja *Kelley* u. c. 1991. gadā [49].

Lai iegūtu nozīmīgas kopsakarības starp sarkopēniju, intramuskulāriem taukaudiem jeb miosteatozi un hroniska pankreatīta gaitu, ir jāturpina iekļaut pacientus pētījumā. Tomēr šobrīd sarkopēniska adipozitāte hroniskiem pankreatīta pacientiem ir atrodamā samērā bieži, un tas norāda uz ķermeņa uzbūves izvērtēšanas nozīmīgumu, ņemot vērā iespējamās ārstēšanas korekcijas gan enzīmu terapijā, gan uzturā, gan arī fizisku aktivitāšu un rehabilitācijas plānošanā.

## Secinājumi

1. Sarkopēnija ir samērā bieži novērojama pacientiem ar hronisku pankreatītu – šajā pētījumā 44% hroniska pankreatīta pacientu bija sarkopēnija.
2. Hroniska pankreatīta pacientiem vairāk raksturīga ir sarkopēniska adipozitāte (sarkopēnija bija 86% pacientu ar paaugstinātu ķermeņa masas indeksu).
3. Pacientiem ar sarkopēniju novēro spēcīgu korelāciju starp ķermeņa masas indeksu un intramuskulāro taukaudu daudzumu ( $r = 0,697$ ;  $p = 0,05$ ).



4. Šiem pacientiem bija vairāk izteikts sāpju sindroms ( $p = 0,24$ ), retāk sastopami paasinājumi ar nepieciešamību ārstēties slimnīcā ( $p = 0,04$ ); mazāk ir pacientu ar ievērojamām izmaiņām datortomogrāfijas izmeklējumā pēc Kembridžas klasifikācijas ( $p = 0,06$ ). Tomēr nepieciešama lielāka pacientu grupa, lai iegūtu vairāk statistiski ticamu datu slimības gaitas korelācijai ar ķermeņa masas uzbūvi.

## Izmantotā literatūra

1. Duggan, S., O'Sullivan, M., Feehan, S., Ridgway, P., Conlon, K. (2010). Nutrition treatment of deficiency and malnutrition in chronic pancreatitis: a review. *Nutr. Clin. Pract.*, 25, pp. 362-370.
2. Haaber, A. B., Rosenfalck, A. M., Hansen, B., Hilsted, J., Larsen, S. (2000). Bone mineral metabolism, bone mineral density, and body composition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency. *Int. J. Pancreatol.*, 27, pp. 21-27.
3. Acharya, C., Navina, S., Singh, V. P. (2014). Role of pancreatic fat in the outcomes of pancreatitis. *Pancreatology*, 14(5), pp. 403-408.
4. Shen, W., Punyanitya, M., Wang, Z. M., et al. (2004). Total body skeletal muscle and adipose tissue volumes: estimation from a single abdominal cross-sectional image. *J. Appl. Physiol.*, 97, pp. 2333-2338.
5. Gomez-Perez, S. L., Haus, J. M., Sheean, P., et al. (2016). Measuring Abdominal Circumference and Skeletal Muscle From a Single Cross-Sectional Computed Tomography Image: A Step-by-Step Guide for Clinicians Using National Institutes of Health Image J. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 40(3), pp. 308-318.
6. Mourtzakis, M., Prado, C. M., Lieffers, J. R., et al. (2008). A practical and precise approach to quantification of body composition in cancer patients using computed tomography images acquired during routine care. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 33(5), pp. 997-1006.
7. Sarner, M., Cotton, P. B. (1984). Classification of pancreatitis. *Gut.*, 25(7), pp. 756-759.
8. Schreyer, A. G., Jung, M., Riemann, J. F., et al. (2014). S3 Guideline for Chronic Pancreatitis – Diagnosis, Classification and Therapy for the Radiologist, *Fortschr. Röntgenstr.*, 186(11), pp. 1002-1008
9. Schneider, A., Löhr, J. M., Singer, M. V. (2007). The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J. Gastroenterol.*, 42, pp. 101-119.
10. Prado, C. M. M., Lieffers, J. R., McCargar, L. J., et al. (2008). Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.*, 9, pp. 629-635.
11. Rubbieri, G., Mossello, E., Di Bari, M. (2014). Techniques for the diagnosis of sarcopenia. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, 11(3), pp. 181-184.
12. Klopfenstein, B. J., Kim, M. S., Krisky, C. M., et al. (2012). Comparison of 3 T MRI and CT for the measurement of visceral and subcutaneous adipose tissue in humans. *The British Journal of Radiology*, 85(1018), pp. e826-e830.
13. Mitsiopoulos, N., Baumgartner, R. N., Heymsfield, S. B., Lyons, S. B., Gallagher, D., Ross, R. (1998). Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography. *Journal of Applied Physiology*, 85(1), pp. 115-122.
14. Addison, O., Marcus, R. L., LaStayo, P. C., Ryan, A. S. (2014). Intermuscular Fat: A Review of the Consequences and Causes. *International Journal of Endocrinology*, Vol. 2014 (2014), Article ID 309570, 11 pages.
15. Stehno-Bittel, L. (2008). Intricacies of fat. *Physical Therapy*, 88(11), pp. 1265-1278.

16. Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Hochberg, Z. (2007). Endocrinology of adipose tissue – an update. *Hormone and Metabolic Research*, 39(5), pp. 314-321.
17. Sepe, A., Tchkonja, T., Thomou, T., Zamboni, M., Kirkland, J. L. (2010). Aging and regional differences in fat cell progenitors – a mini-review. *Gerontology*, 57(1), pp. 66-75.
18. Wronska, A., Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiologica*, 205 (2), pp. 194-208.
19. Beasley, L. E., Koster, A., Newman, A. B., et al. (2009). Inflammation and race and gender differences in computerized tomography measured adipose depots. *Obesity*, 17(5), pp. 1062-1069.
20. Cartier, A., Cote, M., Lemieux, I., et al. (2009). Age-related differences in inflammatory markers in men: contribution of visceral adiposity. *Metabolism*, 58(10), pp. 1452-1458.
21. Koster, A., Stenholm, S., Alley, D. E., et al. (2010). Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity*, 18, (12), pp. 2354-2361.
22. Addison, O., LaStayo, P. C., Dibble, L. E., Marcus, R. L. (2011). Inflammation, aging, and adiposity: implications for physical therapists. *Journal of Geriatric Physical Therapy*, 35(2), pp. 86-94.
23. Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., Simoneau, J. A., Kelley, D. E. (1997). Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes*, 46(10), pp. 1579-1585.
24. Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., Kelley, D. E. (2000). Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(4), pp. 885-892.
25. Goodpaster, B. H., Krishnaswami, S., Resnick, H., et al. (2003). Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care*, 26(2), pp. 372-379.
26. Yim, J. E., Heshka, S., Albu, J., et al. (2007). Intermuscular adipose tissue rivals visceral adipose tissue in independent associations with cardiovascular risk. *International Journal of Obesity*, 31(9), pp. 1400-1405.
27. Ryan, A. S., Nicklas, B. J. (1999). Age-related changes in fat deposition in mid-thigh muscle in women: relationships with metabolic cardiovascular disease risk factors. *International Journal of Obesity*, 23(2), pp. 126-132.
28. Prior, S. J., Joseph, L. J., Brandauer, J., Katznel, L. I., Hagberg, J. M., Ryan, A. S. (2007). Reduction in mid-thigh low-density muscle with aerobic exercise training and weight loss impacts glucose tolerance in older men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), pp. 880-886.
29. Dubé, M. C., Lemieux, S., Piché, M. E., et al. (2011). The contribution of visceral adiposity and mid-thigh fat-rich muscle to the metabolic profile in postmenopausal women. *Obesity*, 19(5), pp. 953-959.
30. Ryan, A. S., Buscemi, A., Forrester, L., Hafer-Macko, C. F., Ivey, F. M., Atrophy and intramuscular fat in specific muscles of the thigh: associated weakness and hyperinsulinemia in stroke survivors. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 25(9), pp. 865-872.
31. Miljkovic-Gacic, I., Gordon, C. L., Goodpaster, B. H., et al. (2008). Adipose tissue infiltration in skeletal muscle: age patterns and association with diabetes among men of African ancestry. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), pp. 1590-1595.
32. Leskinen, T., Sipilä, S., Alen, M., et al. (2009). Leisure-time physical activity and high-risk fat: a longitudinal population-based twin study. *International Journal of Obesity*, 33(11), pp. 1211-1218.
33. Leskinen, T., Sipilä, S., Kaprio, J., Kainulainen, H., Alen, M., Kujala, U. M. (2013). Physically active vs. inactive lifestyle, muscle properties, and glucose homeostasis in middle-aged and older twins. *Age*, 35( 5), pp. 1917-1926.

34. Yim, J. E., Heshka, J., Albu, J. B., Heymsfield, S., Gallagher, D. (2008). Femoral-gluteal subcutaneous and intermuscular adipose tissues have independent and opposing relationships with CVD risk. *Journal of Applied Physiology*, 104(3), pp. 700-707.
35. Durheim, M. T., Slentz, C. A., Bateman, L. A., Mabe, S. K., Kraus, W. E. (2008). Relationships between exercise-induced reductions in thigh intermuscular adipose tissue, changes in lipoprotein particle size, and visceral adiposity. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 295(2), pp. E407-E412.
36. Tuttle, L. J., Sinacore, D. R., Mueller, M. J. (2012). Intermuscular adipose tissue is muscle specific and associated with poor functional performance. *Journal of Aging Research*, vol. 2012, Article ID 172957.
37. Yoshida, Y., Marcus, R. L., Lastayo, P. C., Intramuscular adipose tissue and central activation in older adults. *Muscle & Nerve*, 46(5), pp. 813-816.
38. Hilton, T. N., Tuttle, L. J., Bohnert, K. L., Mueller, M. J., Sinacore, D. R., Excessive adipose tissue infiltration in skeletal muscle in individuals with obesity, diabetes mellitus, and peripheral neuropathy: association with performance and function. *Physical Therapy*, 88(11), pp. 1336-1344.
39. Hicks, G. E., Simonsick, E. M., Harris, T. B., et al. (2005). Cross-sectional associations between trunk muscle composition, back pain, and physical function in the health, aging and body composition study. *Journals of Gerontology A*, 60(7), pp. 882-887.
40. Hicks, G. E., Simonsick, E. M., Harris, T. B., et al. (2005). Trunk muscle composition as a predictor of reduced functional capacity in the health, aging and body composition study: the moderating role of back pain. *Journals of Gerontology A*, 60(11), pp. 1420-1424.
41. Torriani, M., Hadigan, C., Jensen, M. E., Grinspoon, S. (2003). Psoas muscle attenuation measurement with computed tomography indicates intramuscular fat accumulation in patients with the HIV-lipodystrophy syndrome. *Journal of Applied Physiology*, 95(3), pp. 1005-1010.
42. Roig, M., Eng, J. J., MacIntyre, D. L., Road, D. J., Reid, W. D. (2011). Deficits in muscle strength, mass, quality, and mobility in people with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, 31(2), pp. 120-124.
43. Gallagher, D., Kuznia, P., Heshka, S., et al. (2005). Adipose tissue in muscle: a novel depot similar in size to visceral adipose tissue. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(4), pp. 903-910.
44. Albu, J. B., Kovera, A. J., Allen, L., et al. (2005). Independent association of insulin resistance with larger amounts of intermuscular adipose tissue and a greater acute insulin response to glucose in African American than in white nondiabetic women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), pp. 1210-1217.
45. Delmonico, M. J., Harris, T. B., Visser, M., et al. (2009). Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration, *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), pp. 1579-1585.
46. Ryan, A. S., Nicklas, B. J. (2004). Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care*, 27(7), pp. 1699-1705.
47. Ryan, A. S., Nicklas, B. J., Berman, D. M., Dennis, K. E. (2000). Dietary restriction and walking reduce fat deposition in the mid-thigh in obese older women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), pp. 708-713.
48. Ryan, A. S., Ortmeier, H. K., Sorkin, J. D. (2012). Exercise with calorie restriction improves insulin sensitivity and glycogen synthase activity in obese postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 302(1), pp. E145-E152.
49. Kelley, D. E., Slasky, B. S., Janosky, J. (1991). Skeletal muscle density: effects of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54(3), pp. 509-515.

## Summary

*Chronic pancreatitis is a chronic inflammatory disease of the pancreas, which eventually progresses to both exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and leads to a variety of metabolic abnormalities and malnutrition. The aim of the study was to evaluate the prevalence of sarcopenia and miosteatosis, analyzed by additional measures of computed tomography (CT) imaging scans in chronic pancreatitis patients, as well as the correlation with the course of the disease.*

*The study was a prospective cohort pilot study carried out in the Pauls Stradins Clinical University Hospital from March 2015 to December 2015. Chronic pancreatitis severity was evaluated according to the M-MANNHEIM classification. Body constitution was analyzed according to additional measurements of CT examinations. ImageJ v1.49q standard program (National Institutes of Health) for CT image analysis was used for the purpose. The third lumbar vertebra (L3) was selected as the standard landmark for measurements of these image-level axial cuts. Muscular, visceral, subcutaneous and intramuscular adipose tissue areas were measured. A ratio between an area of skeletal muscle L3 vertebra level and the patient's body surface area was the skeletal muscle index ( $\text{cm}^2/\text{m}^2$ ). Following a similar principle, we also calculated the total, subcutaneous and visceral fat indexes.*

*The study included 18 patients whose average age was 48 years. Assessing patient's morphological changes in the pancreas by CT images (according to the Cambridge classification), it was found that 12 patients had significant, four patients – moderate, two – slight changes, and one was uncertain. Overall, after the M-MANNHEIM severity classification, two patients had a mild chronic pancreatitis, it was increased in 14 patients, one had an advanced, and one – a severe chronic pancreatitis.*

*According to the obtained data, sarcopenia was found quite often in patients with a chronic pancreatitis, that is, 44% of patients had sarcopenia. Most often, these patients had sarcopenic obesity, none had reduced total body weight (sarcopenia was found in 86% of patients with an increased body mass index).*

*Although a strong correlation was not found between body mass index and intramuscular fat tissue ( $r = 0.314$ ;  $p = 0.204$ ), a strong correlation was observed between the body mass index in sarcopenic patients and the intramuscular fat tissue volume ( $r = 0.697$ ;  $p = 0.05$ ). The patients with sarcopenia had a more pronounced pain syndrome ( $p = 0.24$ ), with less frequent exacerbations, when it was necessary to be treated in hospital ( $p = 0.04$ ), a lesser number of patients had significant changes in the CT exam at Cambridge classification ( $p = 0.06$ ) in comparison with the patients with no sarcopenia.*

**Keywords:** *chronic pancreatitis, sarcopenia, intramuscular fat tissue, miosteatosis, computed tomography.*