

Strani	159–307
159	▶ Uvodnik
161	▶ Preizkušanje občutljivosti za toploto in hlad kot dodatna preiskava v presejalnem testu za diabetično nogo – Vilma Urbančič - Rovan, Aleš Pražnikar, Mira Slak, Melita Hohnjec
169	▶ Ocena pookluzivne reaktivne hiperemije pri bolnikih s hipotirozo – Maša Gergar, Ana Mihor, Simona Gaberšček, Helena Lenasi
185	▶ Anatomija štirih jetrnih sistemov in delitev jeter na funkcionalne enote – Raja Gošnak Dahmane, Marija Hribernik
193	▶ Kognitivne sposobnosti po ishemični možganski kapi – Marjan Zaletel, Simon Brezovar, Luka Valčič
205	▶ Diferencialna diagnoza bolečine v križu pri otrocih in mladostnikih – Gregor Rečnik
213	▶ Molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov – Irena Zupanič Pajnič
235	▶ Sladkorna bolezen tipa 1 in zdravljenje z inzulinsko črpalko v otroštvu in mladostniških letih – Nataša Bratina, Tadej Battelino
245	▶ Chédiak-Higashijev sindrom – Simona Perčič, Alojz Ihan
255	▶ Histaminski receptor tipa 3 – od gena do terapevtske tarče – Lovro Žiberna, Damijana Mojca Jurič
271	▶ Zdravstvo proti nalezljivim boleznim skozi čas – Zvonka Zupanič Slavec, Ksenija Slavec
281	▶ Diagnostični izzivi
285	▶ Poročila
293	▶ Novice
303	▶ Seznam diplomantov

Uvodnik

Verjetno je vsakdo med nami občutil tisto posebno grenko-sladko nostalgijo, ki nam za kratek čas ukrade miselni tok stresa in skrbi ter nas popelje v preteklost. Spomini oživijo, zdi se nam, kot bi se dogodek, pa čeprav izpred mnogo let, pripetil včeraj. Ko sem pred kratkim vstopal na avtobus in se ozrl po sedečih sopotnikih, ki so na svojih mobilnih telefonih zatopljeni igrali vsak svojo igro za preganjanje dolgega med vožnjo, sem se spomnil na svoje otroštvo in na takrat vseprisotno prenosno igralno konzolo Game Boy in nešteto preživetih ur ob podiranju rekordov iger, ki smo si jih med seboj izmenjevali s kasetami. Tehnološki napredek je proizvodnjo konzole upokojil istega leta, kot je bilo zaključeno sekvenciranje človeškega genoma. Desetletje pozneje je pred vami druga letošnja številka revije *Medicinski razgledi*.

Iz grenko-sladke nostalgije me je predramil ženski glas iz zvočnikov v avtobusu, ki je povedal, da smo prispeli na postajališče, na katerem izstopim. Ob tem dogodku se mi je porodila ideja, ki je prerasla v letošnji tematski dogodek, ki ga bomo organizirali v sklopu Dnevor Medicinskih razgledov 2013 v torek, 19. in sredo, 20. novembra letos. Prvi dan se bo odvil simpozij z naslovom *Uporaba informacijskih tehnologij v vsakodnevni medicinski praksi*, na katerem vam bomo v pestrem in raznolikem programu predstavili mnogo obstoječih aplikacij za mobilne telefone, spletnih orodij in portalov ter specialnih baz podatkov, ki bodo pritegnile zanimanje tako zdravnika kot tudi študenta medicine. Poudarek smo dali programskim rešitvam slovenskih avtorjev, v program pa smo vključili tudi teme, ki zadevajo informatiko v slovenskem javnem zdravstvu. Nekatere rešitve bodo predstavljene tudi v živo, vabimo pa vas, da s seboj prinesete tudi svoje prenosnike, tablice ali pametne mobilne telefone ter predstavljene rešitve preizkusite na svoji napravi – za povezano v internet in električno napajanje bo

poskrbljeno. Drugi dan dogodka je tudi letos posvečen že tradicionalnemu Študentskemu medicinskemu raziskovalnemu kongresu, ki pa v letošnji izvedbi utegne doseči nadgradnjo, ki naj do dorečenih podrobnosti ostane presenečenje. Vljudno vas vabimo, da se udeležite letošnjih Dnevor Medicinskih razgledov, za podrobnejše informacije o dogodku pa vas vabimo, da pozorno spremljate uradno spletno stran <http://www.medrazgl.si/>, Facebook stran <https://www.facebook.com/medrazgl>, Twitter stran <https://twitter.com/MedRazgl> in plakate v prostorih fakultete ter v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

V duhu letošnjega simpozija pa pripravljamo tudi novo uradno spletno stran Medicinskih razgledov, ki bo luč sveta ugledala v poletnih mesecih. Sočasno pa prenavljamo naš informacijski sistem, na katerem temelji tudi naša podatkovna baza naročnikov. Ker želimo biti v koraku s časom, vas prosimo, da nam z vašega e-poštnega naslova pošljete svoje naročniške podatke (ime in priimek ter naslov, na katerega prejimate revijo) na narocniki@medrazgl.si, da bo naša komunikacija v zvezi z urejanjem vašega naročniškega razmerja potekala še hitreje in bolj nemoteno, na vašo željo pa vas bomo tudi obveščali o prihajajočih številkah revije, publikacijah v naši založbi in dogodkih v naši organizaciji.

Vsaka sprememba prinese nov zagon in spremembe so gonilo napredka. Spremembe so kot edina stalnica neizogibne in prav je, da jih sprejmemo in tako pustimo prosto pot novemu. Želimo si, da bi vam z omenjenim dogodkom in drugimi spremembami ponudili kakovostne in zanimive vsebine, ki so že od samega začetka paradni konj Medicinskih razgledov.

Ob izidu pričujoče številke pa vam želimo veliko bralnih užitev!

Jernej Drobež,
glavni urednik

Vilma Urbančič - Rovan¹, Aleš Praznikar², Mira Slak³, Melita Hohnjec⁴

Preizkušanje občutljivosti za toploto in hlad kot dodatna preiskava v presejalnem testu za diabetično nogo

Testing of Warm/Cold Sensation as an Additional Procedure in the Diabetic Foot Screening Test

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: diabetična noga, presejanje, občutljivost za dotik, občutljivost za vibracijo, občutljivost za toploto in hlad

IZHODIŠČA. Za preprečevanje diabetične gangrene je zelo pomembno zgodnje odkrivanje bolnikov, ki so ogroženi za nastanek razjede na nogi. Patofiziologija razjede na diabetični nogi je kompleksna, najpomembnejša etiopatogenetska dejavnika sta nevropatija in motnje arterijske prekrvitve. Ogrožene bolnike odkrivamo s sistematičnim presejanjem. Presejanje na nevropatijo je usmerjeno v oceno senzorične funkcije, po mednarodnih priporočilih je smiselna uporaba več kot ene metode. Najpogosteje uporabljeni metodi sta preizkušanje občutljivosti za dotik s standardiziranim 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom in občutljivosti za vibracijo s 128-Hz glasbenimi vilicami. Tip Therm[®] je pripomoček za ugotavljanje motenj občutljivosti za toploto in hlad. Raziskovali smo povezanost med rezultati treh naštetih presejalnih metod. METODE. Pri 725 sladkornih bolnikih brez predhodnih amputacij (394 moških, 331 žensk, povprečna starost 62,1 ± 12,9 let) smo opravili presejanje na nevropatijo z 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom, 128-Hz glasbenimi vilicami in instrumentom Tip Therm[®]. Povezanost med presejalnimi metodami smo preverjali s Pearsonovim preizkusom primerjave porazdelitev χ^2 , povezanost med starostjo in motnjami občutljivosti pa s t-testom za neodvisne vzorce. REZULTATI. Izgubo občutljivosti za dotik z 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom smo ugotovili pri 86 (11,9%), izgubo občutljivosti za vibracijo pri 192 (26,5%) in nezmožnost razlikovanja med toplim in hladnim pri 337 (46,5%) bolnikih. Med rezultati presejalnih metod smo dokazali statistično značilne razlike (vsi $p < 0,05$), a tudi statistično značilno povezanost (vsi $p = 0,000$). Med bolniki z motnjami občutljivosti in tistimi brez njih smo ugotovili statistično značilne razlike v starosti. ZAKLJUČKI. Desetgramski Semmes-Weinsteinov monofilament, 128-Hz glasbene vilice in Tip Therm[®] so primerne presejalne metode za ugotavljanje motenj občutljivosti. Z njihovo sočasno uporabo odkrijemo več ogroženih bolnikov, kot bi jih z uporabo ene same. Motnje občutljivosti za toploto in hlad so bile v opazovani skupini značilno pogostejše od motenj občutljivosti za dotik in vibracijo.

¹ Doc. dr. Vilma Urbančič - Rovan, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana; vilma.urbancic@kclj.si

² Asist. dr. Aleš Praznikar, dr. med., Nevrološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Mira Slak, m. s., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

⁴ Melita Hohnjec, m. s., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: diabetic foot, screening, light touch sensation, vibration sensation, warm/cold sensation

BACKGROUND. Early detection of patients who are at risk for the development of a foot ulcer is crucial in the prevention of diabetic gangrene. The pathophysiology of diabetic foot ulceration is complex and its most important etiopathogenetic factors are neuropathy and impaired arterial blood supply. Systematic screening is necessary to identify patients at risk. Evaluation of sensory function is the cornerstone of screening for neuropathy. According to international recommendations, more than one method should be used. The most commonly used methods are light touch sensation testing with the standardized 10 g Semmes-Weinstein monofilament and vibration sensation testing with a 128 Hz tuning fork. Tip Therm® is an instrument for the detection of impaired warm/cold sensation. The objective of the study was to investigate the association between different screening methods. **METHODS.** Neuropathy screening with 10 g Semmes-Weinstein monofilament, 128 Hz tuning fork and Tip Therm® testing was performed in 725 diabetic patients (394 men and 331 women, average age 62.1 ± 12.9 years) without previous amputation. The association between the screening methods was tested with the Pearson chi-square test for fit of distribution. The relationship between age and sensory impairment was also evaluated using the independent samples t-test. **RESULTS.** Ten gram Semmes-Weinstein monofilament testing revealed loss of protective sensation in 86 (11.9%) patients, loss of vibration sensation was detected in 192 (26.5%) patients and the inability to discriminate warm/cold in 337 (46.5%) patients. Statistically significant differences were demonstrated between the results of the screening methods (all $p < 0.05$), but there was also a statistically significant association between them (all $p = 0.000$). The patients with and without sensory impairment differed statistically significantly with respect to age. **CONCLUSIONS.** Ten gram Semmes-Weinstein monofilament, 128 Hz tuning fork and Tip Therm® are suitable methods for screening for sensory impairment and their simultaneous use increases the likelihood of detection of sensory nerve damage. In the observed group, an inability to discriminate between warm and cold was more prevalent than problems with light touch or vibration sensation.

IZHODIŠČA

Diabetična noga je najpogostejši razlog za netravmatsko amputacijo spodnjih udov. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo (SB) je amputacija 15-krat več kot pri osebah brez nje. Zapleti v zvezi z nogo pomenijo veliko medicinsko, psihosocialno in ekonomsko breme. V veliki meri jih lahko preprečimo z zgodnjim odkrivanjem tistih bolnikov, ki so ogroženi za nastanek razjede na nogi, in z ustreznim ukrepanjem (1).

Poglavitni dejavniki tveganja za nastanek razjede na nogi in gangrene so: okvara živčevja (nevropatija), motnje arterijske prekrvitve, poškodbe in okužba (2). Pri večini amputa-

cij nog pri bolnikih s SB je začetni dogodek razjeda na nogi. Velika večina razjed na diabetični nogi je nevropatičnega tipa in nastane na plantarni strani stopala oz. na blazinicah prstov. Pri diabetični senzorični nevropatiji je okvarjena občutljivost za vibracijo, dotik, bolečino, toplo/hladno in propriocepcijo. Okvara se razvije postopoma, zato bolnik nanjo ni pozoren in se je ne zaveda, saj je prizadeta okončina »gluha in slepa« za dražljaje, ki pri zdravi osebi sicer izzovejo občutek neugodja ali bolečine. Tako se neredko zgodi, da ob preventivnem pregledu slučajno odkrijemo veliko razjedo, ki je bolnik sam prej niti ne omeni (slika 1) (3).



Slika 1. Bolnik s senzorično nevropatijo in nebolečo razjedo velikosti 10×10 cm na spodnjem delu goleni.

Glede na domača in mednarodna priporočila je treba vsakemu bolniku s SB vsaj enkrat letno pregledati noge (1, 4, 5). Pregled nog oz. presejalni test obsega usmerjeno anamnezo, oceno deformacij, oceno prekrvitve in oceno občutljivosti kože. Namen presejalnega testa za diabetično nogo ni niti postavljanje diagnoze nevropatije niti diagnoze periferne žilne bolezni, ampak želimo z njim v populaciji bolnikov s SB aktivno poiskati tiste, ki so ogroženi za nastanek razjede na nogi. To so v prvi vrsti bolniki z motnjami občutljivosti, motnjami arterijske prekrvitve in tisti, ki so v preteklosti že imeli razjedo na nogi. Dokončna potrditev suma na nevropatijo in periferne žilne bolezni presega okvirje presejalnega testa.

Po veljavnih priporočilih mora biti v presejalni test vključena najmanj ena preiskava za ugotavljanje nevropatije. Najpogosteje uporabljani preiskavi sta preizkušanje občutljivosti za dotik s standardiziranim 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom (SWM) in testiranje občutljivosti za vibracijo s 128-Hz glasbenimi vilicami (GV) (slika 2). Dodatne presejalne metode so testiranje občutljivosti za bolečino, izzivanje tetivnih refleksov in merjenje praga občutljivosti

za vibracijo z bioteziometrom (6–9). Z uporabo več kot ene metode je občutljivost za odkrivanje diabetične distalne simetrične motorične in senzorične polinevropatije več kot 87 % (10–13).



Slika 2. Preizkus občutljivosti za dotik s standardiziranim 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom.



Slika 3. Tip Therm® – pripomoček za ugotavljanje občutljivosti za toploto/hladno.

Ziegler in sodelavci so pokazali, da je oslABLJENA občutljivost za toploto in hlad najpomembnejši zgodnji simptom distalne simetrične polinevropatije (14). Tip Therm® je enostavno in poceni diagnostično orodje za ugotavljanje motenj občutljivosti za toploto in hlad (slika 3). Sestavljen je iz dveh delov – kovinskega in plastičnega. Kovina in plastika izzoveta različne občutke toplote na površini kože, čeprav ju imamo na enaki (sobni) temperaturi: zaradi večje prevodnosti za toploto potegne kovinski del iz kože več toplote kot plastični, zato ga zdrav preiskovanec občuti kot hladnejšega v primerjavi s plastičnim. Ker posredujejo zaznavo toplote in hladu druga živčna vlakna kot zaznavo dotika in vibracije, dobimo s tem dodatne informacije o stanju perifernega živčevja (13, 15).

V Diabetološki ambulanti Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana izvajamo od leta 1996 dalje redni letni presejalni pregled nog po protokolu, ki ga je leta 1995 sprejela Delovna skupina za diabetično nogo (16, 17). Izvid beležimo na standardnem obrazcu Presejalni test in hranimo v elektronski obliki v Excelovi datoteki (18).

V letu 2010 smo v standardni nabor preiskav dodali k testiranju občutljivosti za dotik s SWM še testiranje občutljivosti za vibracijo z GV in testiranje občutljivosti za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm®. Domnevali smo, da bomo z instrumentom Tip Therm® odkrili motnje občutljivosti pogosteje kot s SWM ali GV. V ta namen smo z retrospektivno analizo podatkov, zbranih pri rednem ambulantnem delu v prvih 12 mesecih soča-

sne uporabe vseh treh naštetih metod, želeli testirati mere povezanosti med posameznimi presejalnimi metodami in oceniti smiselnost razširjenega nabora preiskav.

METODE

V raziskavo smo vključili 725 bolnikov s SB brez predhodnih amputacij (394 moških in 331 žensk, povprečna starost $62,1 \pm 12,9$ let), ki so bili pregledani v obdobju med 1. 1. 2010 in 31. 12. 2010. Pri vseh smo opravili presejalni pregled nog po standardnem protokolu. Za oceno senzoričnega živčevja smo opravili testiranje občutljivosti za dotik s SWM, občutljivosti za vibracijo z GV in občutljivosti za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm®.

Testiranje občutljivosti za dotik s SWM smo izvajali na desetih točkah na vsaki nogi. Monofilament je najlonska nitka, ki je nameščena na držalo. Pod pravim kotom jo naslonimo na kožo in pritisnemo, da se upogne, pritisk vzdržujemo 1,5–2 sekundi. Pacient odgovori z »da«, ko začuti dotik z monofilamentom. Izgubo občutljivosti smo opredelili kot nezaznavanje dotika z monofilamentom na štirih ali več točkah na testirani nogi. Občutljivost za vibracijo smo testirali na obeh nožnih palcih. Občutljivost za toploto in hlad smo testirali po navodilih proizvajalca tako, da smo se z obema topima koncema instrumenta Tip Therm® v neenakomernih intervalih dotikali blazinice bolnikovega palca in ob tem bolnika, ki je med preiskavo mižal, spraševali, kaj čuti (19).

Podatke smo vnesli v obstoječo ambulantno Excelovo datoteko. Za statistično analizo smo uporabili paket SPSS (angl. *Statistical Package for Social Sciences*) za Windows 10.1.0. Za oceno primerljivosti rezultatov med levo in desno stranjo smo uporabili McNemarjev preizkus primerjave deležev dveh odvisnih vzorcev, za primerjavo rezultatov presejalnih metod pa paroma Pearsonov preizkus primerjave porazdelitev χ^2 . Pri vseh opazovanih spremenljivkah smo preverili tudi, ali se preiskovanci z ohranjeno občutljivostjo in tisti z izgubo le-te razlikujejo po povprečni starosti. V ta namen smo izvedli preizkuse skupin za neodvisne vzorce. Kot statistično pomembne smo šteli vrednosti $p < 0,05$.

REZULTATI

Ugotovitve pri testiranju občutljivosti s SWM, občutljivosti za vibracijo z GV in občutljivosti za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm® prikazujeta slika 4 in tabela 1.

Tabela 2 prikazuje primerjavo porazdelitve rezultatov posameznih preiskovalnih metod. Delež bolnikov z motnjami občutljivosti za toploto in hlad je bil statistično značilno večji od deleža bolnikov z motnjami občutljivosti za vibracijo in deleža bolnikov z izgubo občutljivosti za dotik, delež bolnikov z motnjami občutljivosti za vibracijo pa je bil prav tako statistično značilno večji od deleža bolnikov z izgubo občutljivosti za dotik.

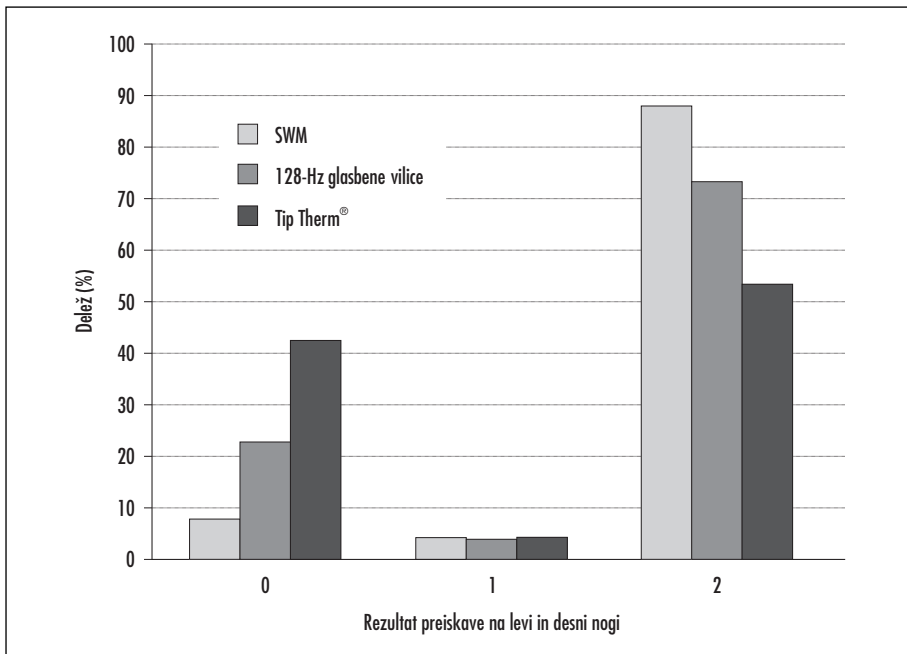
Mero povezanosti med posameznimi preiskovalnimi metodami prikazuje tabela 3. Ugotovili smo značilno povezanost med rezultati testiranja s SWM in GV kot tudi med SWM in Tip Therm® ter GV in Tip Therm®.

Med skupinama z izgubo občutljivosti za dotik, vibracijo ter toploto in hlad in brez nje smo dokazali statistično značilne razlike v starosti (tabela 4).

RAZPRAVA

Zapleti z nogo se lahko pojavijo pri vsakem bolniku, ki ima SB, tudi če se zdravi le z dieto in ima krvni sladkor dobro urejen. Zmanjšanje števila amputacij spada med temeljne cilje oskrbe bolnikov s SB. Doseči ga je mogoče le z načrtno obravnavo, pri kateri je na prvem mestu zgodnje odkrivanje tistih bolnikov, ki so ogroženi za nastanek razjede na nogi. V redni letni pregled nog pri bolnikih s SB – presejalni test – mora biti nujno vključena vsaj ena preiskava za ugotavljanje nevropatije.

Najpogosteje uporabljeni preiskavi sta preizkušanje občutljivosti za dotik s SWM in testiranje občutljivosti za vibracijo z GV. Preizkus z GV ima pri odkrivanju ogroženih bolnikov majhno napovedno vrednost, saj na njegov rezultat vplivata način izvedbe in preiskovančeva starost (20–23). Preiskava z bioteziometrom je zanesljivejša, vendar še vedno precej manj kot testiranje občutljivosti s SWM, ki je hkrati kar 30-krat cenejši. Izzivnost tetivnih refleksov je težko objektivno vrednotiti, poleg



Slika 4. Rezultati testiranja občutljivosti za dotik s standardiziranim 10-gramskim Semmes-Weinsteinovim monofilamentom, občutljivosti za vibracijo s 128-Hz glasbenimi vilicami in občutljivosti za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm®. 0 – ne čuti na obeh nogah, 1 – čuti na eni in ne čuti na drugi nogi, 2 – čuti na obeh nogah, SWM – standardizirani 10-gramski Semmes-Weinsteinov monofilament.

Tabela 1. Testiranje občutljivosti za dotik, vibracijo ter za toploto in hlad. SWM – standardizirani 10-gramski Semmes-Weinsteinov monofilament, GV – 128-Hz glasbene vilice, *p* – vrednost *p* (McNemarjev test), *sn* – statistično nepomembno.

Metoda	Normalen izvid	Izguba občutljivosti	<i>p</i> (McNemarjev test)
SWM (levo)	659 (90,9%)	66 (9,1%)	0,185 (sn)
SWM (desno)	651 (89,8%)	74 (10,2%)	
GV (levo)	543 (74,9%)	182 (25,1%)	0,248 (sn)
GV (desno)	550 (75,9%)	175 (24,1%)	
Tip Therm® (levo)	404 (55,7%)	320 (44,1%)	0,711 (sn)
Tip Therm® (desno)	401 (55,3%)	323 (44,6%)	

Tabela 2. Primerjava porazdelitve rezultatov posameznih preiskovalnih metod. SWM – standardizirani 10-gramski Semmes-Weinsteinov monofilament, GV – 128-Hz glasbene vilice, *p* – vrednost *p* (Pearsonov preizkus primerjave porazdelitev χ^2).

Metode	Pearsonov preizkus primerjave porazdelitev χ^2	<i>p</i>
SWM levo/GV levo	224,298	0,000
SWM desno/GV desno	153,521	0,000
SWM levo/Tip Therm® levo	1.077,672	0,000
SWM desno/Tip Therm® desno	935,146	0,000
GV levo/Tip Therm® levo	107,187	0,000
GV desno/Tip Therm® desno	123,007	0,000

166

Tabela 3. Mera povezanosti med posameznimi preiskovalnimi metodami. SWM – standardizirani 10-gramski Semmes-Weinsteinov monofilament, GV – 128-Hz glasbene vilice, *p* – vrednost *p* (Pearsonov preizkus primerjave porazdelitev χ^2).

Metode	Pearsonov preizkus primerjave porazdelitev χ^2	<i>p</i>
SWM levo/GV levo	114,464	0,000
SWM desno/GV desno	171,180	0,000
SWM levo/Tip Therm® levo	62,176	0,000
SWM desno/Tip Therm® desno	64,287	0,000
GV levo/Tip Therm® levo	102,216	0,000
GV desno/Tip Therm® desno	106,118	0,000

Tabela 4. Rezultati presejalnih preiskav glede na starost preiskovancev. SWM – standardizirani 10-gramski Semmes-Weinsteinov monofilament, GV – 128-Hz glasbene vilice, 0 – izguba občutljivosti, 1 – normalna občutljivost, 50 – standardni odklon, *p* – vrednost *p*.

Metoda	Starost (povprečna starost \pm 50)		<i>p</i>
	0	1	
SWM levo	65,98 \pm 11,51	61,76 \pm 12,96	0,011
SWM desno	67,41 \pm 12,07	61,55 \pm 12,85	0,000
GV levo	67,98 \pm 11,04	60,18 \pm 12,88	0,000
GV desno	67,79 \pm 11,18	60,34 \pm 12,88	0,000
Tip Therm® levo	64,60 \pm 11,61	60,22 \pm 13,53	0,000
Tip Therm® desno	64,73 \pm 11,64	60,08 \pm 13,48	0,000

tega pa so Ahilovi refleksi pogosto ugasli tudi pri starejših ljudeh, ki nimajo SB (10). S starostjo se dokazano zviša tudi prag za občutljivost na bolečino in temperaturo (14). S temi argumenti smo v letu 1995 kot presejalno preiskavo za odkrivanje nevropatije izbrali preizkus s SWM.

Sonnville in sodelavci so v letih 1992–1995 v Amsterdamu raziskovali prevalenco razjede na nogi in dejavnike tveganja za njihov nastanek v populaciji 609 bolnikov s SB, ki so jih obravnavali zdravniki splošne prakse. Prisotnost distalne simetrične senzorične nevropatije so ocenjevali na podlagi izzivnosti tetivnih refleksov (patelarnega in Ahilovega), občutljivosti za vibracijo z GV in občutljivosti za dotik s SWM. Motnjo občutljivosti so opredelili kot izgubo občutka za dotik na dveh ali več izmed osmih testiranih točk. Pri bolnikih brez razjede na nogi so ugotovili motnje občutljivosti za dotik s SWM pri 13,0%, motnje občutljivosti za vibracijo pa pri 26,1%. Tudi pri bolnikih z razjedo so bile motnje občutljivosti za vibracijo pogostejše od motenj občutljivosti za dotik (42,5% in 29,9%) (24). Ti rezultati se dobro ujemajo z rezultati naše raziskave, v kateri smo motnje občutljivosti za vibracijo odkrili pri 26,5% bolnikov, motnje občutljivosti za dotik s SWM pa le pri 11,9%.

Glede na rezultate metaanalize treh prospektivnih kliničnih raziskav, ki so jo objavili Singh, Armstrong in Lipsky leta 2005, je pri odkrivanju bolnikov, ogroženih za nastanek razjede na nogi, občutljivost preiskave s SWM 66–91%, specifičnost pa 34–86% (25). Po drugi strani pa v Mednarodnem dogovoru o diabetičnem stopalu lahko preberemo opozorilo, da ni z dokazi podprtih podatkov o tem, na katerih točkah na stopalu bi morali izvesti preizkus z monofilamentom (4).

Viswanathan in sodelavci so leta 2002 objavili rezultate raziskave, v kateri so primerjali občutljivost za dotik s SWM, prag občutljivosti za vibracijo z bioteziometrom in občutljivost za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm® (13). V raziskavo so vključili 910 bolnikov s SB. Izmed 241 bolnikov, ki niso čutili dotika s SWM, so le štirje (1,7%)

normalno čutili Tip Therm®. Nasprotno pa jih izmed 669 bolnikov, ki so normalno čutili SWM, kar 53 (7,9%) ni čutilo instrumenta Tip Therm®. Izmed 298 bolnikov, ki so imeli nevropatijo glede na izvid preiskave z bioteziometrom, jih je normalno čutilo Tip Therm® 8 (2,7%). Vsi tisti, ki glede na rezultat preiskave z bioteziometrom niso imeli nevropatije, so Tip Therm® normalno čutili.

V naši skupini, ki je bila nekoliko manjša v primerjavi z Viswanathanovo (725 bolnikov), je bil delež bolnikov z motnjami občutljivosti za toploto in hlad bistveno višji, kar 46,5%. Med bolniki z normalnim izvidom občutljivosti za dotik s SWM jih je imelo kar 39,5% motnjo občutljivosti za toploto in hlad.

Periferna diabetična nevropatija pri bolnikih s SB tipa 2 je večinoma simetrična in razlik med levo in desno stranjo ne pričakujemo, niso pa izključene. Prav zato smo naredili primerjavo med ugotovitvami na levi in desni nogi. Odsotnost razlik je bila pričakovana in nam je bila posredna potrditev dobre ponovljivosti ter pravilne izvedbe testa.

ZAKLJUČKI

SWM, GV in Tip Therm® so preprosti, poceni in za uporabo enostavni pripomočki za preseganje na okvare senzoričnega živčevja. Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami edine doslej objavljene raziskave o kvalitativnem ocenjevanju občutljivosti za toploto in hlad z instrumentom Tip Therm®, vendar so bile v naši skupini motnje občutljivosti za toploto in hlad pri bolnikih z ohranjeno občutljivostjo za dotik s SWM še mnogo pogostejše. Analizo bi bilo zato vsekakor smiselno ponoviti na večjem številu bolnikov. Vsekakor pa menimo, da je preizkušanje občutljivosti za toploto in hlad dobrodošla dodatna preiskava za učinkovitejše odkrivanje bolnikov s SB z zvečanim tveganjem za nastanek razjede na nogi.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se prof.dr. Jožetu Rovanu za pomoč in nasvete pri statistični analizi podatkov.

LITERATURA

1. Urbančič-Rovan V, Lejko Zupanc T. Diabetična noga. In: Mrevlje F, Medvešček M eds. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2 pri odraslih osebah. 2nd ed. Ljubljana: Diabetološko združenje Slovenije; 2011. p. 50–60.
2. Urbančič-Rovan V. Causes of diabetic foot lesions. *Lancet*. 2005; 366 (9498): 1675–6.
3. Urbančič-Rovan V. Diabetična noga – definicija, etiopatogeneza in klinična slika. In: Urbančič-Rovan V, Koselj M, Triller C, eds. Oskrba diabetičnega stopala: priročnik za medicinske sestre in zdravstvene tehnike. 3rd ed. Ljubljana: Združenje endokrinologov Slovenije pri Slovenskem zdravniškem društvu; 2008. p. 25–53.
4. International Consensus on the Diabetic Foot 2011. [CD-ROM]. IWGDF/Consultative section of IDF; 2011.
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2011. *Diabetes Care*. 2011; 34 (Suppl 1): S11–61.
6. Pham H, Armstrong DG, Harvey C, et al. Screening techniques to identify people at high risk for diabetic foot ulceration: a prospective multicenter trial. *Diabetes Care*. 2000; 23 (5): 606–11.
7. Pacaud D, Singer D, McConnell B, et al. Assessment of screening practices for peripheral neuropathy in people with diabetes. *Can J Diabetes Care*. 1999; 22: 21–5.
8. Rith-Najarian SJ, Stolusky T, Gohdes DM. Identifying diabetic patients at high risk for lower-extremity amputation in a primary health care setting. A prospective evaluation of simple screening criteria. *Diabetes Care*. 1992; 15 (10): 1386–9.
9. Klenerman L, McCabe C, Cogley D, et al. Screening for patients at risk of diabetic foot ulceration in a general diabetic outpatient clinic. *Diabetic Med*. 1996; 13 (6): 561–3.
10. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005; 28 (4): 956–62.
11. Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, et al. The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med*. 2002; 19: 377–84.
12. Perkins BA, Olalaye D, Zimman B, et al. Simple screening tests for peripheral neuropathy in the diabetes clinic. *Diabetes Care*. 2001; 24: 250–6.
13. Viswanathan V, Snehaltha C, Seena R, et al. Early recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception. *Postgrad Med J*. 2002; 78 (923): 541–2.
14. Ziegler D, Mayer D, Gries FA, et al. Evaluation of thermal, pain, and vibration sensation thresholds in newly diagnosed type 1 diabetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988; 51 (11): 1420–4.
15. Bharara M, Cobb JE, Claremont DJ. Thermography and thermometry in the assessment of diabetic neuropathic foot: a case for furthering the role of thermal techniques. *Int J Low Extrem Wounds*. 2006; 5 (4): 250–60.
16. Urbančič V, Slak M: pregled diabetičnega stopala [internet]. Ljubljana: Diabetološko združenje Slovenije, Združenje endokrinologov Slovenije; c2012 [citirano 2012 Mar 3]. Dosegljivo na: <http://www.endodiab.si/priporocila/diabeticna-noga/>
17. Diabetološko združenje Slovenije, Zveza endokrinologov Slovenije: pregled diabetičnega stopala [internet]. Ljubljana: Diabetološko združenje Slovenije, Združenje endokrinologov Slovenije; c2002 [citirano 2012 Mar 3]. Dosegljivo na: <http://www.endodiab.si/priporocila/diabeticna-noga/pregled-stopala.dot>
18. Diabetološko združenje Slovenije, Zveza endokrinologov Slovenije: obrazec [internet]. Ljubljana: Diabetološko združenje Slovenije, Združenje endokrinologov Slovenije; c2012 [citirano 2012 Mar 3]. Dosegljivo na: <http://www.endodiab.si/priporocila/diabeticna-noga/obrazec.pdf>
19. Tip Therm – The Original Product Information [internet]. c2012 [citirano 2012 Apr 22]. Dosegljivo na: <http://www.tip-therm.com/?p=16>
20. The Proprioceptive Sensations. In: Campbell WW, ed. DeJong's The Neurologic Examination. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 444–9.
21. Peters EW, Bienfait HM, de Visser M, et al. The reliability of assessment of vibration sense. *Acta Neurol Scand*. 2003; 107 (4): 293–8.
22. Kaplan FS, Nixon JE, Reitz M, et al. Age-related changes in proprioception and sensation of joint position. *Acta Orthop Scand*. 1985; 56 (1): 72–4.
23. Thomson FJ, Masson EA, Boulton AJ. The clinical diagnosis of sensory neuropathy in elderly people. *Diabet Med*. 1993; 10 (9): 843–6.
24. De Sonnaville JJ, Colly LP, Wijkel D, et al. The prevalence and determinants of foot ulceration in type II diabetic patients in a primary health care setting. *Diabetes Res Clin Pract*. 1997; 35: 149–56.
25. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*. 2005; 293 (2): 217–28.

Maša Gergar^{1*}, Ana Mihor^{2*}, Simona Gaberšček³, Helena Lenasi⁴

Ocena pookluzivne reaktivne hiperemije pri bolnikih s hipotirozo

Evaluation of Postocclusive Reactive Hyperemia in Patients with Hypothyroidism

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: hipotiroza, mikrožilje kože, funkcija endotelija, pookluzivna reaktivna hiperemija, laserska doplerska metoda

IZHODIŠČA. S pojmom hipotiroza označujemo sklop kliničnih, patofizioloških in biokemičnih ugotovitev, ki so posledica nezadostne sinteze ščitničnih hormonov. Hipotiroza poveča tveganje za srčno-žilna obolenja, ki se v predimptomatski fazi lahko izrazijo s spremembami na mikrožilju. Pri bolnikih s hipotirozo smo želeli odkriti morebitne spremembe v delovanju mikrožilja kože, kar lahko nudi vpogled v funkcijo endotelija. Pričakovali smo spremenjeno reaktivnost mikrocirkulacije kože na račun zmanjšane endotelijsko odvisne vazodilatacije. **METODE.** Z uporabo laserske doplerske metode smo ocenjevali pretoke krvi na reprezentativnih mestih (volarna stran podlakti ter blazinica sredinca) pri bolnikih s hipotirozo (N = 13) in pri zdravih (N = 15). Za oceno reaktivnosti smo kot provokacijski test uporabili triminutni zažem leve nadlaktne arterije, s katerim ocenimo pookluzivno reaktivno hiperemijo. Hkrati smo merili tudi temperaturo kože merilnih mest, trikanalni EKG ter s pomočjo *finapress* metode sistolični in diastolični krvni tlak na digitalnih arterijah prstanca desnice. **REZULTATI.** Pretoki, izmerjeni z lasersko doplersko metodo v mirovanju, arterijski tlak na digitalnih arterijah ter frekvenca srca so bili primerljivi med skupinama. Trajanje pookluzivne reaktivne hiperemije na blazini prsta je bilo značilno daljše pri bolnikih ($p < 0,05$), pri ploščini pod krivuljo pookluzivne reaktivne hiperemije pa smo opazili trend povečanja pri bolnikih na obeh merilnih mestih. **ZAKLJUČKI.** Sklepamo, da pri hipotirozi najverjetneje pride do težko zaznavnih funkcionalnih sprememb mikrožilja kože, ki so lahko posledica spremenjene reaktivnosti endotelija. Parametri pookluzivne reaktivne hiperemije pri bolnikih s hipotirozo nakazujejo povečano vazodilatatorno sposobnost v primerjavi z zdravimi, kar ni v skladu z našo hipotezo. Rezultati pa so v skladu s študijami o povečani vazodilatatorni sposobnosti žilja pri visokih vrednostih serumskega tirotropina, neodvisno od ravni ščitničnih hormonov.

^{1*} Maša Gergar, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; masa.gergar@gmail.com

^{2*} Ana Mihor, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Doc. dr. Simona Gaberšček, dr. med., Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

⁴ Doc. dr. Helena Lenasi, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

* Avtorici si delita mesto prvega avtorja.

ABSTRACT

KEY WORDS: hypothyroidism, skin microvascular system, endothelial function, postocclusive reactive hyperemia, laser Doppler flowmetry

BACKGROUND. Hypothyroidism is a condition in which clinical, pathophysiological and biochemical changes are found due to thyroid hormone deficiency. Hypothyroidism is associated with an increased risk of cardiovascular diseases and an impairment of microvascular function before manifest clinical signs. Our research aimed to detect potential changes in skin microvascular function in patients with hypothyroidism which may be indicative of endothelial dysfunction. We hypothesized that hypothyroidism causes alterations in skin microvascular reactivity due to a decrease in vasodilator capacity. **METHODS.** Using laser Doppler flowmetry we measured skin blood flow in two representative measuring sites (volar aspect of the forearm and the finger pulp) in patients with hypothyroidism (N = 13) and healthy controls (N = 15). Skin microvascular reactivity was evaluated by inducing postocclusive reactive hyperemia obtained by a three-minute occlusion of the left brachial artery. Throughout the experiment, we measured skin temperature at the measuring sites. Simultaneously, a three-channel ECG was recorded, as well as systolic and diastolic blood pressure of *aa. digitales* in the fourth finger of the right hand using finapres device. **RESULTS.** Baseline laser Doppler flowmetry, blood pressure of *aa. digitales* and heart rate were comparable between both groups. The duration of postocclusive reactive hyperemia at the finger pulp was significantly ($p < 0.05$) longer in the group of patients. We also noticed a trend toward an increase in area under the postocclusive reactive hyperemia curve in patients. **CONCLUSIONS.** Results suggest that hypothyroidism induces hardly detectable functional changes in skin microcirculation, possibly due to altered endothelial function. Postocclusive reactive hyperemia parameters of patients indicate an increased vasodilator capacity compared to healthy subjects, which is in contrast with our hypothesis. Yet, our results speak in favour of isolated effects of elevated serum thyroid stimulating hormone.

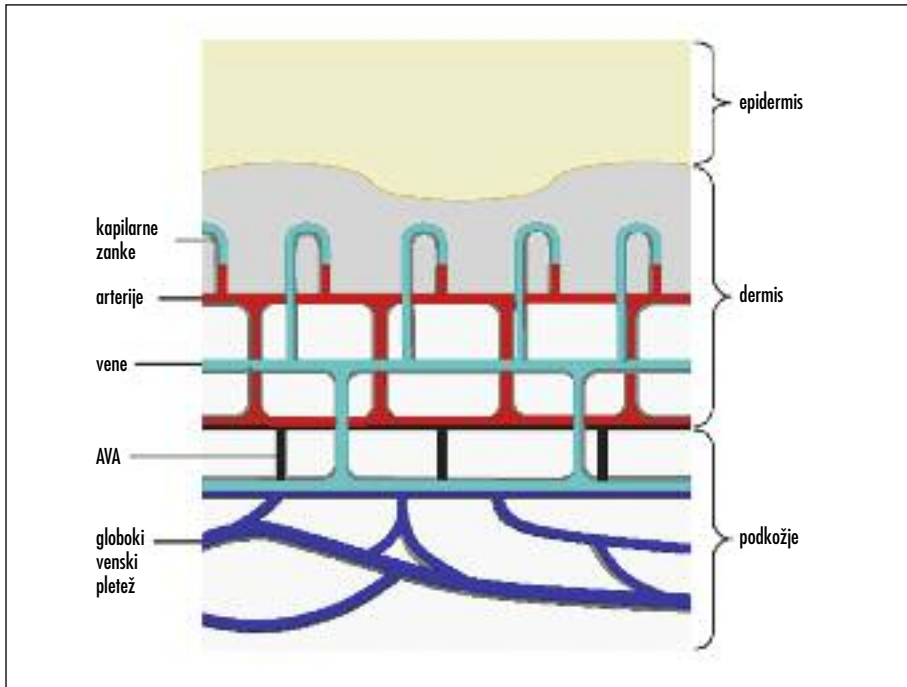
UVOD

Mikrocirkulacija kože je v zadnjih letih postala dostopen in reprezentativen žilni model za raziskovanje fiziološke in patološke mikrocirkulacije (1). Spremembe mikrožilja kože lahko nudijo vpogled v generalizirano stanje mikrožilja, zato so uporabne za preučevanje žilnih mehanizmov pri različnih bolezenskih stanjih, kot so hiperholesterolemija, hipertenzija, periferna žilna bolezen, koronarna žilna bolezen, sladkorna bolezen tipa 2, ledvične bolezni in tudi bolezni ščitnice (2–5). Hkrati pa nam minimalno invazivne metode za oceno odzivnosti mikrožilja kože omogočajo odkrivanje predkliničnih sprememb mikrocirkulacije pri populaciji, ki nosi visoko tveganje za srčno-žilno obolenje (6, 7).

Mikrocirkulacija kože

Mikrocirkulacija predstavlja kompleks žil med arterijskim in venskim sistemom s premerom do 300 μm . To so arteriole, kapilare, venule in prekapilarne zapiralke (sfinktri) (8, 9).

Najpomembnejši funkciji mikrocirkulacije kože sta prehrana kožnega tkiva in uravnavanje telesne temperature (10). Drobnost žilje kože delimo glede na funkcijo na dva pretoka: nutritivni, ki omogoča prehranjevanje kože in znaša v mirovanju le 20% celokupnega pretoka, ter termoregulacijski, ki omogoča izmenjavo toplote med telesom in okolico. Ti dve različni funkciji pogojujeta dve različni strukturi kožnega mikrožilja. Nutritivni pretok sestavljajo nutritivne arterije, kapilare in vene. Termoregulacijski pretok pa sestoji pretežno



Slika 1. Struktura mikrožilja kože na blazini prsta. AVA – arteriovenske anastomoze.

iz podkožnega venskega pleteža, ki lahko zadrži veliko količino krvi. V nekaterih predelih so v termoregulacijski nadzor vključene tudi arteriovenske anastomoze (AVA), ki neposredno povezujejo arterije z venskimi pleteži (10). AVA so najpomembnejša posebnost mikrocirkulacije kože. Nahajajo se na akralnih predelih kože brez dlak (volarna stran dlani, blazinice prstov, stopala, ustnice, nos, ušesa). To so predeli, ki so največkrat izpostavljeni mrazu. AVA pa so redke na predelih, poraščenih z dlako (npr. hrbtišče roke, volarna stran podlakti), kjer prevladuje nutritivno žilje (11). Zaradi dvojnosti v strukturi mikrožilja je pri oceni mikrocirkulacije kože treba zajeti obe reprezentativni mesti na koži. Na sliki 1 je prikazana struktura mikrožilja kože na blazini prsta, kjer so prisotne AVA.

Uravnavanje pretoka v koži poteka na več ravneh; ker je pretok skozi kožo namenjen predvsem uravnavanju telesne temperature, to funkcijo pa nadzoruje simpatični živčni sistem, pri nadzoru pretoka skozi kožo prevladuje živčni refleksni nadzor. Na mikrocirkulacijo pa vplivajo tudi lokalni in humoralni

dejavniki. Pretok skozi kožo je torej uravnavan preko centralnih in lokalnih mehanizmov (12, 13). Pri uravnavanju mikrožilja kože preko lokalnih mehanizmov verjetno najpomembnejšo vlogo igra endotelij s sproščanjem vazodilatatorjev in vazokonstriktorjev.

Endotelij in vazodilatacija

Endotelij aktivno prispeva k uravnavanju žilnega tonusa z izločanjem vazoaktivnih snovi, sodeluje pri vnetju, angiogenezi, trombozi in uravnavanju žilne prepustnosti. Ker je okvara teh funkcij eden najpomembnejših zgodnjih dejavnikov v procesu aterogeneze, je ocena funkcije endotelija pomembna tudi s kliničnega vidika (14).

Endotelij pod vplivom različnih humoralnih in hemodinamskih dražljajev sprošča številne vazoaktivne snovi, ki lokalno uravnavajo žilni tonus. Okrnjenost endotelijske funkcije z neravnotežjem med vazokonstriktornimi in vazodilatatornimi snovmi poruši homeostazo in predstavlja eno najzgodnejših sprememb v patogenezi srčno-žilnih bolezni (15). Med pomembne vazodilatatorje sodi

jo dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI₂) in endotelijski hiperpolarizirajoči dejavnik (angl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF). Ker te vazoaktivne snovi delujejo na gladkomišične celice žil in torej vzdržujejo žilni tonus, govorimo o endotelijsko odvisni vazodilataciji.

V endotelijskih celicah nastaja NO s pretvorbo L-arginina v citrulin s pomočjo encima endotelijske sintaze NO (angl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS). Aktivacijo eNOS in sproščanje NO povzročijo agonisti receptorjev na endotelijski celici, in sicer histamin, acetilholin, adrenalin, noradrenalin, vazopresin, bradikinin, adenozin difosfat, trombin, serotonin in ženski spolni hormoni ter mehanski dražljaji (strižna sila toka krvi, pulziranje žilne stene) (15). Nedavne raziskave kažejo, da sta funkcija endotelija in posledično žilna reaktivnost pri hipertirozi in hipotirozi spremenjeni (4, 16, 17).

Ščitnični hormoni in hipotiroza

Ščitnica je endokrini žleza, ki preko hormonov trijodtironina (T₃) in tiroksina (T₄) uravnava presnovno aktivnost organizma ter vpliva na rast in razvoj celic in organov (18). Bolezni ščitnice spadajo med najpogostejše endokrine motnje. Vzdrževanje primerne funkcije ščitnice ima zato izjemen biološki, medicinski in socialni pomen (18).

Sproščanje T₃ in T₄ iz ščitnice nadzira os hipotalamus-hipofiza-ščitnica, s čimer se vzdržuje stalna serumska koncentracija prostih ščitničnih hormonov (19). V obliki T₄ je 93 % sproščenega ščitničnega hormona in le 7 % predstavlja T₃, vendar se v tkivih večina T₄ s pomočjo encimov dejodaz dejodira v T₃, ki predstavlja aktivno obliko hormona (19). Pomembna je torej predvsem serumska koncentracija prostega T₃.

Strukturne ali funkcionalne napake v hormonski osi povzročijo pri hipotirozi nezadostno proizvodnjo ščitničnih hormonov. Hipotiroza se pri odraslih izrazi z različnimi kombinacijami simptomov: utrujenost, mišedem, apatičnost, mentalna upočasnjenost, zmanjšana toleranca za mraz, povečanje telesne teže, hripavost, zaprtje, bradikardija, redko perikardialni izliv (20). Najdemo tudi nekatere neznačilne znake, kot so povišana serumska koncentracija holesterola in skelet-

nomišične kreatin-kinaze (21). Za hipotirozo je značilna povišana serumska vrednost tirotropina (angl. *thyroid-stimulating hormone*, TSH), medtem ko so vrednosti prostih ščitničnih hormonov v mejah normale ali znižane.

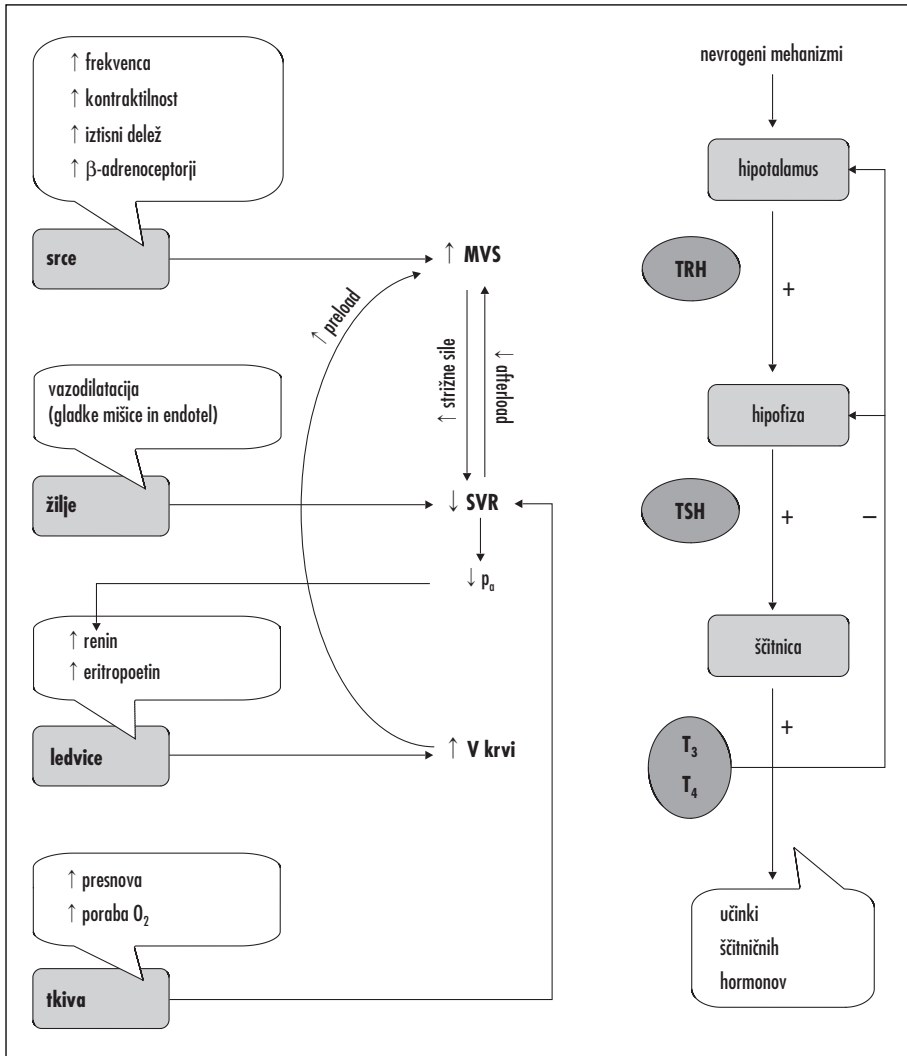
Učinki ščitničnih hormonov na srčno-žilni sistem

Vpliv ščitničnih hormonov na srčno-žilni sistem je posledica genomskih in negenomskih učinkov T₃ (21). Prikazuje ga slika 2.

Medtem ko je vpliv T₃ na srce dobro raziskan, pa je malo podatkov o vplivu T₃ na žilje, še posebej na mikrocirkulacijo in endotelijsko funkcijo. Nedavne raziskave kažejo pri hipertirozi povečano žilno reaktivnost zaradi povečane endotelijsko odvisne vazodilatacije, pri hipotirozi pa okvaro endotelijske funkcije (4, 16, 17). Pri dolgotrajni hipertirozi ugotavljajo povečano žilno reaktivnost, posredovano z acetilholinom, in povečano bazalno tvorbo NO. Občutljivost gladkih mišic na NO ni spremenjena, torej je vpletena le endotelijska komponenta reaktivnosti (16). Na splošno dokazujejo do sedaj zbrani podatki vlogo T₃ pri nadzoru endotelijske funkcije in žilne homeostaze na dolgi rok, vendar je prav tako nekaj podatkov, ki govorijo o akutnih, neposrednih (negenomskih) učinkih T₃ na endotelij. Ugotovili so na primer akuten padec žilne upornosti po infuziji T₃ do hipertirotičnega stanja, kar pripisujejo mehanizmu, odvisnemu od endotelija (22). Natančni mehanizmi kroničnega in akutnega delovanja T₃ na endotelij še niso dognani. Endotelij proizvaja tri vazodilatatorje, ki bi lahko bili tarča delovanja T₃: NO, PGI₂ in EDHF (23). Izsledki študij kažejo na večjo vlogo NO v uporovnih žilah ter EDHF v mikrocirkulaciji (24).

Vpliv hipotiroze na srčno-žilni sistem

Pri pomanjkanju T₃ so spremembe srčno-žilnega sistema nasprotne spremembam zaradi povišanega T₃ pri hipertirozi. To pomeni, da se zmanjšajo utripni volumen, krčljivost in frekvenca srca, zato se zmanjša minutni volumen srca, medtem ko se sistemska žilna upornost ter krvni tlak povečata (21, 25). Nekateri ugotavljajo pri bolnikih s hipotirozo pospešen nastanek ateroskleroze, kar pove-



Slika 2. Shema sproščanja in delovanja ščitničnih hormonov na srčno-žilni sistem. TRH – tiroiberin (angl. thyrotropin-releasing hormone), TSH – tirotropin (angl. thyroid-stimulating hormone), T₃ – trijodtironin, T₄ – tiroksin, MVS – minutni volumen srca, SVR – sistemska žilna upornost (angl. systemic vascular resistance), p_a – arterijski tlak, V – volumen.

zujejo z višjimi vrednostmi holesterola in krvnega tlaka, novejša raziskava pa pripisujejo večjo vlogo pri nastanku in razvoju ateroskleroze okvari endotelija zaradi pomanjkanja ščitničnih hormonov (26, 27).

Za našo raziskavo so pomembni vplivi pomanjkanja T₃ na endotelijsko komponento žilne reaktivnosti v kožni mikrocirkulaciji. Mehanizmi še niso povsem pojasnjeni. Prevladuje hipoteza o zmanjšani endotelijsko odvi-

sni vazodilataciji pri hipotirozi. Večina ugotovitev temelji na raziskovanju večjih uporovnih žil. Ker je endotelij del žilne stene celotnega srčno-žilnega sistema, verjetno velja podobno tudi za mikrocirkulacijo kože.

NAMEN IN HIPOTEZA

Pri bolnikih s hipotirozo smo želeli odkriti morebitne spremembe v delovanju mikroži-

lja kože. Primerjali smo reaktivnost mikrocirkulacije kože pri bolnikih s hipotirozo in zdravih. Za oceno reaktivnosti mikrožilja smo izbrali zažem brahialne arterije, s katerim ocenjujemo pookluzivno reaktivno hiperemijo (PRH), in s tem lokalno pogojene mehanizme žilne reaktivnosti. Pričakovali smo, da bo pri bolnikih s hipotirozo reaktivnost mikrocirkulacije manjša kot pri zdravih. Nedavni izsledki namreč dokazujejo okvaro endotelija in gladkomišičnih celic pri hipotirozi, kar se lahko kaže s spremenjeno žilno reaktivnostjo. Predpostavljali smo, da bodo imeli bolniki zmanjšano od endotelija odvisno vazodilatacijo, kar lahko posredno ocenimo s pomočjo kazalcev PRH. Želeli smo tudi opredeliti uporabnost naše raziskave kot pomožnega kliničnega orodja za zgodnje odkrivanje hipotiroze.

METODE

Preiskovanci

Vzorec 28 prostovoljcev smo razdelili v dve skupini. Prvo so sestavljali bolniki, ki so imeli novoodkrita hipotirozo različne etiologije. Med njimi je bilo deset žensk in trije moški (srednja starost $44,5 \pm 4,5$ let), od tega dva redna in en občasni kadilec. Dva bolnika sta prejela redno terapijo (Crestor®, Claritine®), ki ne vpliva pomembno na predmet naše študije, medtem ko je eden že prejemal nadomestno hormonsko terapijo (Euthyrox®), vendar je bil še vedno izrazito hipotirotičen.

Drugo, kontrolno skupino je sestavljalo 11 žensk in 4 moški (srednja starost $33,9 \pm 2,5$ let), med katerimi sta dva prejela redno terapijo (Sulfasalazin®, Cipralax®), ki ne vpliva pomembno na naše rezultate. Vsi so bili nekadilci. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Metode za oceno mikrocirkulacije kože in njene reaktivnosti

Z lasersko doplersko (LD) metodo merimo pretoke v kožni mikrocirkulaciji. Poleg bazalnih pretokov nas zanima predvsem odzivnost mikrožilja kože po standardnih provokacijskih testih, saj je primerjava odzivnosti bolj občutljiva ocena okvare mikrožilja kot primerjava bazalnih pretokov. Za prikaz morebitne razlike odzivnosti mikrožilja kože pri zdravih in

bolnikih s hipotirozo smo izbrali zažem arterije. Gre za neinvaziven provokacijski manever, s katerim lahko ocenjujemo funkcijo endotelija.

Laserska doplerska metoda za merjenje pretokov v koži

Gre za semikvantitativno metodo merjenja pretoka v koži. Temelji na Dopplerjevem premiku, ki je sprememba valovne dolžine svetlobnega žarka po odboju od gibajočih se tkivnih elementov, zlasti znotrajžilnih eritrocitov (28). LD-merilnik pošlje preko sonde, pritrjene na kožo, šibek laserski žarek določene valovne dolžine približno 1 mm v globino kože (29–31). V tkivu se žarki od negibajočih delcev odbijejo z nespremenjeno valovno dolžino, pri odboju od gibajočih delcev pa pride do Dopplerjevega premika. Delež vrnjenih žarkov, ki kaže Dopplerjev premik, je sorazmeren volumskemu deležu oz. številu premikajočih se eritrocitov, medtem ko je velikost spremembe valovne dolžine sorazmerna njihovi hitrosti (29–32). Zmnožek števila in hitrosti eritrocitov je sorazmeren pretoku v preiskovanem volumnu tkiva in je izražen v arbitrarnih perfuzijskih enotah (PE).

Uporabili smo LD-merilnik pretokov Periflux 4001 Master/4002 Satellite podjetja Perimed (Järfälla, Švedska). Valovna dolžina je bila 780 nm. LD-sonde smo z obližem pričvrstili na dve reprezentativni mesti kože in jih med meritvami nismo premikali. Zajem podatkov je bil 500/s. Sočasno smo jih shranjevali na osebni računalnik za nadaljnjo analizo. S kožnim termometrom Peritemp PF4005 podjetja Perimed, ki smo ga namestili med kožo in nosilec LD-sonde, smo hkrati s pretokom merili tudi temperaturo kože.

Pookluzivna reaktivna hiperemija

Za oceno žilne reaktivnosti, ki je kazalec funkcije endotelija, uporabimo PRH (7, 33, 34). K tej metodi v večji meri prispevajo lokalni dejavniki, zato je dober pokazatelj stanja perifernega žilja (28). PRH enostavno izzovemo s kratkotrajnim zažemom brahialne arterije, po sprostitvi katerega se v koži pojavi strm dvig pretoka (reaktivna hiperemija), ki nato v drugi fazi pada proti vrednostim pred zažemom (35). Pomen tega pojava je plačilo pre-

snovnega dolga, ki je nastal med zažemom zaradi prekinitev pretoka (36). V grobem lahko pojav pripišemo miogenim in metaboličnim mehanizmom. Pri kratkotrajnem zažemu prevladuje hiter miogeni mehanizem, pri daljši zapori pa prevlada presnovni mehanizem, ki ga pripisujemo vplivu nakopičenih lokalnih presnovkov in mediatorjev (laktat, ogljikov dioksid, vodikov ion) (35). Pri slednjem sodeluje tudi endotelijsko odvisna vazodilatacija (7, 34). Med najpomembnejšimi metaboličnimi mediatorji je NO (30). Pri boleznih, kjer je endotelij poškodovan, je endotelijsko odvisna vazodilatacija okrnjena in so parametri PRH spremenjeni (37).

Za analizo odziva žilja po popustitvi zažema smo določili naslednje parametre:

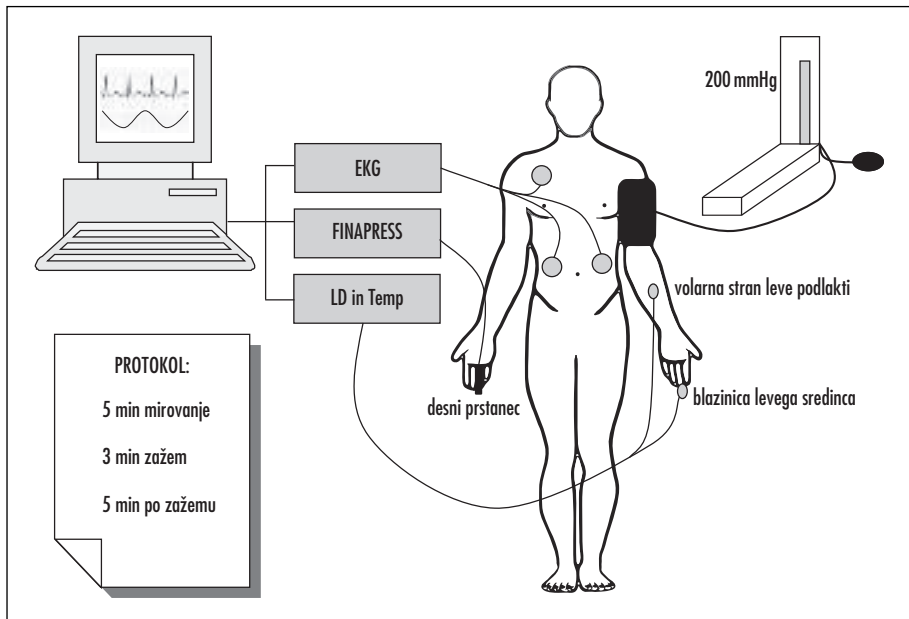
- maksimalni pretok po popustitvi zažema (LD_{max}),
- absolutni prirastek pretoka ($LD_{amplituda}$), ki se izračuna kot razlika med LD_{max} in $LD_{pretokom}$ v mirovanju (LD_{basal}),
- relativni prirastek ($LD_{relativni_prirastek}$), ki se izračuna kot $LD_{amplituda}/LD_{basal}$,
- čas od popustitve zažema do LD_{max} (t_{peak}),
- čas od popustitve zažema do povrnitve bazalnih vrednosti $LD_{pretoka}$ (t_{dur}) in

- ploščina/površina pod krivuljo PRH (angl. *area under the curve, AUC*), ki smo jo izračunali po formuli: $\sum LD_n - (n \cdot LD_{basal})$, kjer n predstavlja število na 0,1 s zajetih vrednosti $LD_{pretoka}$ znotraj t_{dur} .

Protokol meritev

Protokol smo določili glede na podatke, zbrane v preteklih študijah (33, 34, 38). Meritve so potekale na Inštitutu za fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v laboratoriju s stalno sobno temperaturo (24–25 °C) med 9. in 13. uro v zimsko-pomladnem obdobju, vsaj 20 minut po aklimatizaciji v ležečem položaju. Preiskovanci so med meritvami mirno ležali in niso govorili. Pred začetkom in po koncu preiskave smo jim izmerili arterijski tlak po Riva-Rocciju. Shematični prikaz protokola meritev je prikazan na sliki 3.

Preiskovancem smo zaželi brahialno arterijo na levi roki. Uporabili smo manšeto za merjenje krvnega tlaka, ki smo jo namestili na levo nadlaket, 3 cm nad komolčno kotanjo. Prvo LD -sondo smo namestili na blazinico sredinca leve roke, kjer prevladuje funkcionalno, z AVA bogato žilje, drugo pa na volarno stran leve podlakti, kjer prevladuje nutritiv-



Slika 3. Shematični prikaz protokola meritev. LD – laserska doplerska metoda, Temp – temperatura.

ni pretok, pri čemer smo pazili, da smo se izognili večjim povrhnjim venam. Hkrati smo na teh mestih merili temperaturo kože. Na prsni koš preiskovancev smo namestili trikanalni EKG. Z aparatom Finapres® BP monitor (Ohmeda 2300, Englewood, Združene države Amerike) smo na digitalnih arterijah prstanca desnice ves čas meritve spremljali sistolični in diastolični krvni tlak ter srčno frekvenco. Preiskavo smo začeli s petminutnim merjenjem LD-pretoka v mirovanju, nato smo za tri minute napihili manšeto do suprasistolicične vrednosti 200 mmHg. LD-pretok smo spremljali še pet minut po povolitvi zažema.

Laboratorijske krvne preiskave

Merili smo serumsko koncentracijo TSH, prostega T_4 (pT_4) in prostega T_3 (pT_3). Meritve so potekale v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana s testi TSH3-Ultra, fT_4 in fT_3 na analizatorju ADVIA Centaur (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Metoda določanja je kemiluminiscenčna, imunometrična in kompetitivna.

Statistična obdelava podatkov

Srednje vrednosti LD-pretoka, sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka, frekvence in temperature kože v mirovanju smo izračunali s pomočjo programske opreme Nevrokard (Medistar, Slovenija) iz povprečja petminutnega posnetka pred zažemom. Parametre PRH smo določili s pomočjo programske opreme Nevrokard (Medistar, Slovenija).

Absolutne in relativne vrednosti smo pri skupinah preiskovancev primerjali s Studentovim neparnim t-testom. Če porazdelitev ni bila normalna, smo uporabili Mann-Whitneyjev test. Za primerjavo podatkov znotraj skupin smo uporabili parni t-test. Vsi podatki so izraženi kot srednje vrednosti \pm standardna napaka (SN).

REZULTATI

Značilnosti preiskovancev

Tabela 1 prikazuje splošne podatke o preiskovancih v obeh skupinah. Med skupinama so bile statistično značilne razlike v starosti ter sistoličnem in diastoličnem tlaku (vsi $p < 0,05$).

V tabeli 2 so navedeni podatki o serumskih vrednostih TSH, pT_3 in pT_4 v obeh sku-

Tabela 1. Splošni podatki o preiskovancih. Podane so srednje vrednosti \pm standardna napaka. p_{sistol} , $p_{diastol}$ – sistolični in diastolični tlak na brahialni arteriji po metodi Riva-Rocci, N – število preiskovancev, SN – standardna napaka.

	Bolniki s hipotirozo (N = 13)	Zdravi (N = 15)
Starost (leta)	44,5 \pm 4,5 ^a	33,9 \pm 2,5
Telesna višina (cm)	166,6 \pm 1,2	170,1 \pm 1,5
Telesna teža (kg)	64,8 \pm 3,0	70,3 \pm 3,2
p_{sistol} (mmHg)	131,7 \pm 4,3 ^a	117,6 \pm 3,1
$p_{diastol}$ (mmHg)	83,2 \pm 2,8 ^a	76,1 \pm 1,7

^a $p < 0,05$

Tabela 2. Podatki o serumski koncentraciji TSH, pT_3 in pT_4 ter njihove referenčne vrednosti. Podane so srednje vrednosti \pm standardna napaka. S-TSH – koncentracija serumskega tirotropina, S- pT_3 – koncentracija serumskega trijodotironina, S- pT_4 – koncentracija serumskega tetrajodotironina, N – število preiskovancev, SN – standardna napaka.

	Bolniki s hipotirozo (N = 13)	Zdravi (N = 15)	Referenčne vrednosti
S-TSH (mE/L)	39,05 \pm 15,22	1,97 \pm 0,35 ^a	0,35–5,5
S- pT_3 (pmol/L)	3,95 \pm 0,20	4,82 \pm 0,11 ^a	3,5–6,5
S- pT_4 (pmol/L)	9,22 \pm 0,71	14,21 \pm 0,47 ^a	11,5–22,7

^a $p < 0,001$

Tabela 3. Podatki o vrednostih merjenih parametrov v mirovanju obeh skupin. Podane so srednje vrednosti \pm standardna napaka. LD_{basal} – LD-pretok kože obeh merilnih mest v mirovanju, PE – perfuzijske enote, T_{basal} – temperatura kože obeh merilnih mest v mirovanju, 1. mesto – blazinica prsta levega sredinca, 2. mesto – volarna stran leve podlakti, p_{sistol} , $p_{diastol}$ – sistolični in diastolični tlak na digitalnih arterijah prstanca desnice, N – število preiskovancev.

	Bolniki s hipotirozo (N = 13)		Zdravi (N = 15)	
	1. mesto	2. mesto	1. mesto	2. mesto
LD_{basal} (PE)	237 \pm 42	7,3 \pm 0,7 ^a	201 \pm 27	8,1 \pm 1,1 ^a
T_{basal} (°C)	31,5 \pm 1,1	33 \pm 0,2	33,2 \pm 0,6	32,8 \pm 0,4
p_{sistol} (mmHg)	120,7 \pm 7,2		113,5 \pm 8,8	
$p_{diastol}$ (mmHg)	79,1 \pm 5,9		77,5 \pm 4,1	
Srčna frekvenca (s ⁻¹)	67,6 \pm 3,3		63,2 \pm 2,1	

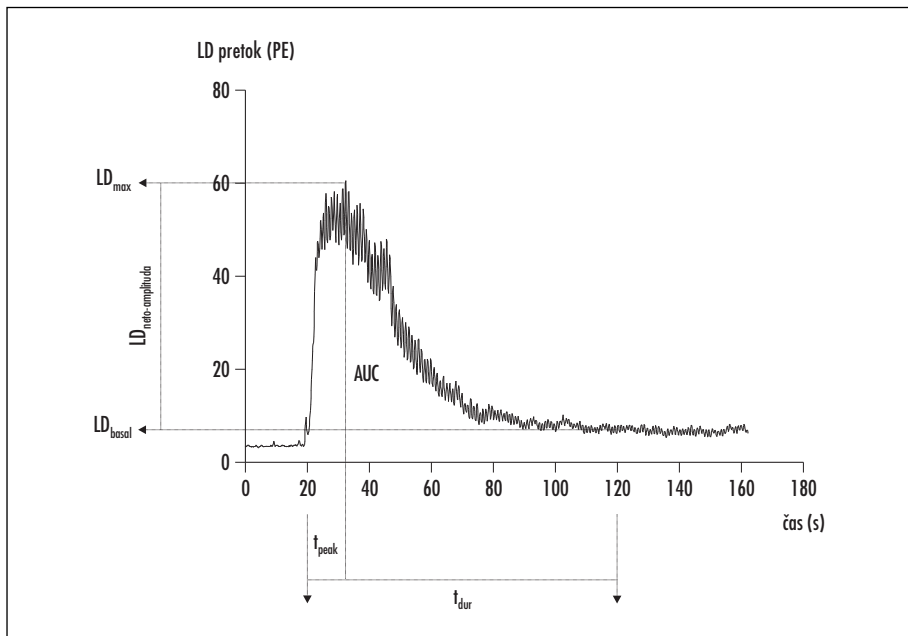
^a $p < 0,0001$ (razlika med 1. in 2. mestom)

pinah ter njihove referenčne vrednosti. Med skupinama so bile statistično značilne razlike v vrednostih serumskega TSH, pT_3 in pT_4 (vsi $p < 0,001$).

Vrednosti v mirovanju

V mirovanju smo ocenjevali LD-pretok in temperaturo kože na obeh merilnih mestih,

sistolični in diastolični tlak na digitalnih arterijah (lat. *aa. digitales*) prstanca desnice in srčno frekvenco (dobljeno z analizo intervala R-R EKG-posnetka). Vrednosti predstavljamo v tabeli 3. Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik. Znotraj skupin pa je bila statistično značilna razlika v LD-pretokih



Slika 4. Nativni posnetek LD-pretoka na volarni strani leve podlakti po popustitvi zažema brahialne arterije pri enem od zdravih preiskovancev. LD_{basal} – LD-pretok v mirovanju pred zažemom, LD_{max} – največji LD-pretok po popustitvi zažema, $LD_{netto-amplituda}$ – prirastek pretoka, t_{peak} – čas od popustitve zažema do LD_{max} , t_{dur} – čas od popustitve zažema do vzpostavitve LD_{basal} , AUC – ploščina pod krivuljo pookluzivne reaktivne hiperemije (angl. area under the curve), PE – perfuzijske enote.

v mirovanju med obema merilnima mestoma ($p < 0,0001$).

Pookluzivna reaktivna hiperemija

Popustitev zažema je povzročila statistično značilen porast LD-pretoka nad bazalnim na obeh merilnih mestih znotraj obeh skupin ($p < 0,0001$). Tipičen potek LD-pretokov ter prikaz parametrov PRH po popustitvi zažema prikazuje slika 4.

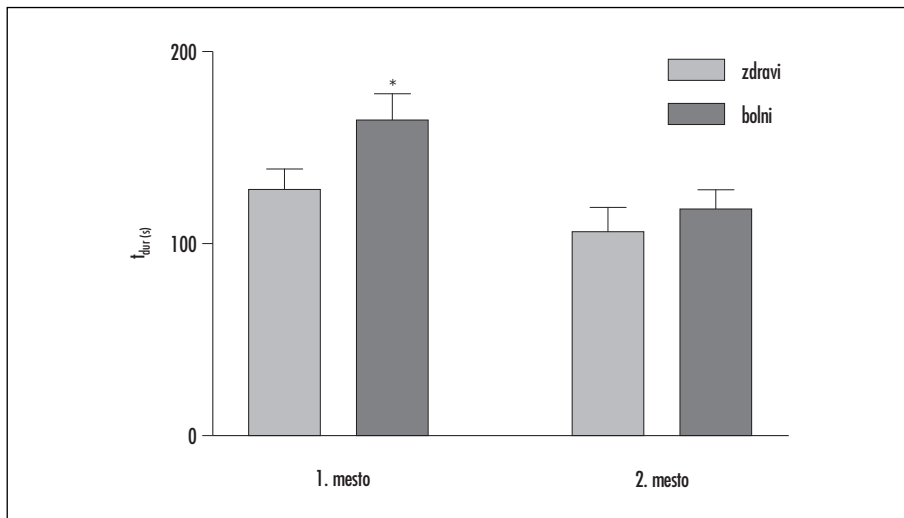
Tabela 4, slika 5 in slika 6 prikazuje vrednosti parametrov PRH na obeh merilnih mestih pri skupini zdravih in bolnih preiskovancev.

Med skupinama je bila statistično značilna razlika le pri t_{dur} blazinice levega sredinca ($p < 0,05$), pri ostalih parametrih PRH obeh na merilnih mestih pa med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik, vendar je bil opazen trend večje AUC pri bolnikih. Prav tako ni bilo statističnih razlik med skupinama in znotraj obeh skupin v vrednostih

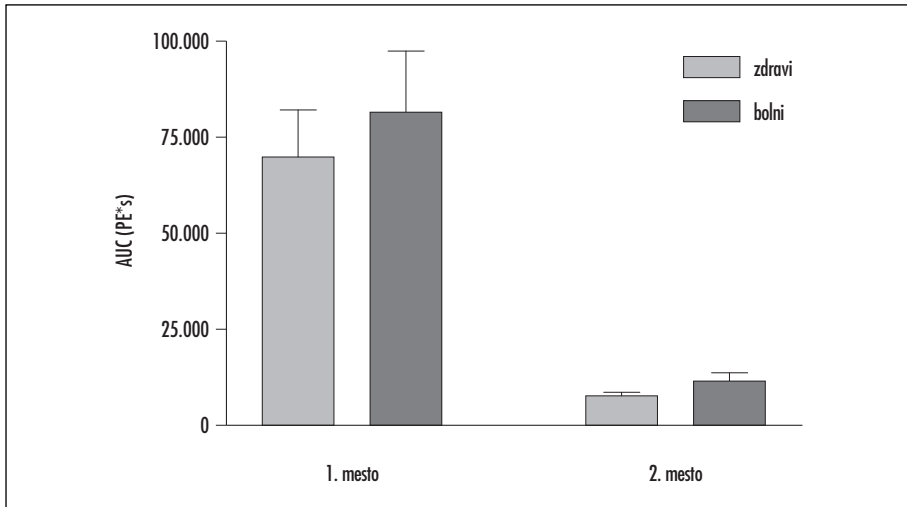
Tabela 4. Vrednosti nekaterih parametrov pookluzivne reaktivne hiperemije 1. in 2. merilnega mesta pri zdravih in bolnih. Podane so srednje vrednosti \pm standardna napaka. 1. mesto – blazinica prsta levega sredinca, 2. mesto – volarna stran leve podlakti, LD_{basal} – LD pretok v mirovanju pred zažemom, LD_{max} – največji LD-pretok po popustitvi zažema, $LD_{relativni_prirastek} = (LD_{max} - LD_{basal}) / LD_{basal}$, $LD_{amplituda}$ – prirastek pretoka, t_{peak} – čas od popustitve zažema do LD_{max} , N – število preiskovancev, PE – perfuzijske enote.

	1. mesto		2. mesto	
	Bolniki s hipotirozo (N = 13)	Zdravi (N = 15)	Bolniki s hipotirozo (N = 13)	Zdravi (N = 15)
LD_{basal} (PE)	237 \pm 42	201 \pm 27	7,3 \pm 0,7	8,1 \pm 1,1
LD_{max} (PE)	357,2 \pm 30,5 ^a	368,3 \pm 26,7 ^a	48,4 \pm 8,4 ^a	46,7 \pm 3,7 ^a
$LD_{amplituda}$ (PE)	134,5 \pm 18,5	165,5 \pm 24,1	41,1 \pm 7,9	38,6 \pm 3,4
$LD_{relativni_prirastek}$ (%)	287,2 \pm 160	145,7 \pm 39	557,8 \pm 70,3	545,8 \pm 50,7
t_{peak} (s)	41,9 \pm 6,3	31,7 \pm 5,3	14,5 \pm 0,6	11,4 \pm 1

^a $p < 0,0001$ (razlika med LD_{basal} in LD_{max} obeh merilnih mest znotraj obeh skupin)



Slika 5. Čas od popustitve zažema leve brahialne arterije do vzpostavitve LD pretoka v mirovanju pred zažemom na 1. in 2. merilnem mestu pri zdravih in bolnih. Podatki so predstavljeni kot srednje vrednosti \pm standardna napaka. 1. mesto – blazinica prsta levega sredinca, 2. mesto – volarna stran leve podlakti, * – $p < 0,05$, t_{dur} – čas od popustitve zažema do vzpostavitve LD_{basal} .



Slika 6. Ploščina pod krivuljo pookluzivne reaktivne hiperemije 1. in 2. meritnega mesta pri zdravih in bolnih. Podatki so predstavljeni kot srednje vrednosti \pm standardna napaka. 1. mesto – blazinica prsta levega sredinca, 2. mesto – volarna stran leve podlakti, AUC – ploščina pod krivuljo (angl. area under the curve), PE – perfuzijske enote.

temperature kože, tlaka na digitalnih arterijah in srčne frekvence pred, med in po zažemu.

RAZPRAVLJANJE

Želeli smo ugotoviti vpliv hipotiroze na reaktivnost mikrožilja kože, zato smo opazovali dve skupini preiskovancev: zdrave osebe in bolnike s hipotirozo. Pričakovali smo spremenjeno odzivnost mikrožilja kože pri bolnikih s hipotirozo. Glede na razlike v statusu ščitničnih hormonov med obema skupinama je bil izbor preiskovancev ustrezen. Pri bolnikih s hipotirozo smo v primerjavi z zdravimi opazili razlike v nekaterih parametrih PRH, ki lahko kažejo na povečano vazodilatatorno sposobnost mikrožilja kože.

Značilnosti preiskovancev in vrednosti v mirovanju

Pri bolnikih s hipotirozo smo ugotovili statistično značilno višje vrednosti krvnega tlaka, izmerjenega po metodi Riva-Rocci na brahialni arteriji na začetku meritve po aklimatizaciji. Hkrati pa smo ves čas meritve s *finapress* aparatom na digitalnih arterijah prstanca desnice spremljali sistolični in diastolični krvni tlak ter srčno frekvenco. S to metodo pa razlike v tlaku med skupinama niso bile sta-

tistično značilne. Tudi pri primerjavi vrednosti srčne frekvence med skupinama nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Prav tako med skupinama nismo ugotovili statistično značilnih razlik v bazalnih LD-pretokih in temperaturi kože na blazinici prsta roke in volarne strani podlakti. Pri bolnikih s hipotirozo bi pričakovali nižji LD-pretok in temperaturo kože v mirovanju kot pri zdravih. Ščitnični hormoni namreč zmanjšajo gladkomišični tonus prevodnih in uporovnih arteriol ter vzdržujejo bazalno razpoložljivost NO v endotelijskih celicah, kar oboje privede do vazodilatacije in s tem padca sistemske žilne upornosti (angl. *systemic vascular resistance*, SVR) (16, 39). Zato pri pomanjkanju ščitničnih hormonov opažajo porast SVR in nižje bazalne pretoke v koži ter nižjo temperaturo kože (5, 25). Razlog za odstopanje naših rezultatov je lahko velika prostorska variabilnost LD-metode, torej bi lahko minimalne razlike v postavitvi LD-sonde povzročile velike razlike v LD-pretokih. Drugi razlog je lahko, da je bilo v skupini bolnikov več pomenopavzalnih žensk. Pri predmenopavzalnih ženskah so namreč dokazali nižje bazalne pretoke v koži prstov kot pri moških ali pomenopavzalnih ženskah, za kar naj bi bili odgovorni ženski spolni hormoni (40).

Čeprav ni bilo statistično značilnih razlik v bazalnih LD-pretokih, smo pri rezultatih opazili obraten trend od pričakovanega, torej da imajo bolniki s hipotirozo nekoliko večje povprečne vrednosti pretokov v mirovanju. Možno razlago nudijo nedavne raziskave, ki ugotavljajo neposreden vpliv TSH na povečanje endotelijsko odvisne vazodilatacije v uporovnih in prevodnih arterijah. Ta vpliv je neodvisen od ščitničnih hormonov (41, 42). Pri bolnikih po tiroidektomiji so opazili znatno povečano bazalno razpoložljivost NO po dodajanju humanega rekombinantnega TSH (angl. *recombinant human thyroid-stimulating hormone*, rhTSH) (42). Ker je večina naših bolnikov imela povišan serumski TSH, pT₃ pa v spodnjem območju normalnih vrednosti, lahko sklepamo, da bazalni pretoki v mirovanju pri bolnikih kažejo trend povečanja v primerjavi z zdravimi na račun povišanega TSH, hkrati pa se vpliv pomanjkanja ščitničnih hormonov na endotelij ni izrazil, saj ni bil znaten.

Pookluzivna reaktivna hiperemija

Pri bolnikih s hipotirozo smo glede na rezultate nekaterih raziskav pričakovali podaljšanje časa do maksimalnega pretoka pri PRH ter znižanje vrednosti nekaterih (če ne vseh) standardnih parametrov PRH na obeh merilnih mestih, vendar so bile naše ugotovitve nasprotno (17, 43–45). Statistično značilno podaljšan t_{dur} in trend večje AUC v skupini bolnikov lahko kažeta na povečano vazodilatatorno sposobnost mikrožilja pri bolnikih, ki jo lahko delno pripišemo endoteliju. Nakazano večjo vazodilatatorno sposobnost bolnikov s hipotirozo si lahko razložimo s povišanimi serumskimi vrednostmi TSH in serumskimi vrednostmi pT₃ blizu normale. Le en bolnik je imel izrazito znižan serumski pT₃.

Dokazano je, da imajo endotelijske celice receptorje za TSH (41, 46, 47). Vprašanje je, ali ima vezava TSH na te receptorje v resnici kakšen fiziološki pomen. Pri *in vitro* raziskavah na kulturah človeških endotelijskih celic so ugotovili hiter porast koncentracije NO in padec koncentracije vazokonstriktorja endotelina po izpostavljenosti visokim koncentracijam TSH (48). Poleg tega več *in vitro* ter *in vivo* študij dokazuje, da TSH spodbuja proizvodnjo vnetnih citokinov tumorje nekro-

tizirajočega dejavnika (angl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) in interleukina-6 (IL-6), ki povzročita vazodilatacijo, odvisno od endotelija (49, 50). Te ugotovitve nasprotujejo vlogi TSH kot pospeševalca aterogeneze ter mu, nasprotno, pripisujejo vlogo v vzdrževanju žilne homeostaze. Napoli in sodelavci navajajo hiter in dolgotrajen neposreden učinek rhTSH, neodvisen od T₃, na endotelijsko odvisno vazodilatacijo. Ugotavljajo namreč, da je po intraarterijski infuziji rhTSH žilna reaktivnost na acetilholin večja. Menijo, da vazodilatacija zaradi vpliva TSH ni posledica sistemskih hemodinamskih sprememb, saj so hemodinamski parametri med preiskavo ostali nespremenjeni (46).

Možno je torej, da je v naši raziskavi trend povečane reaktivnosti žilja bolnikov pri PRH posledica neposrednega vpliva TSH na endotelij, saj so imeli naši bolniki pT₃ v spodnjem območju normalnih vrednosti, TSH pa je bil znatno povišan. Tudi mi med provokacijo nismo opazili statističnih razlik v krvnem tlaku, merjenem na digitalnih arterijah, in srčni frekvenci znotraj skupin in med skupinama. Vendar težko primerjamo rezultate naše študije z zgoraj omenjenimi, ker so slednje temeljile na raziskovanju prevodnih in uporovnih arterij z uporabo drugačnih metod, zato ne smemo prehitro sklepati, da podobno velja za mikrožilje kože.

Najverjetneje med skupinama nismo našli statistično značilnih razlik v ostalih parametrih PRH, ker sprememb sploh ni bilo ali pa so bile spremembe v reaktivnosti mikrožilja tako majhne, da jih s funkcijskim testom nismo zaznali. Druga, prav tako verjetna možnost pa je, da je do okvar endotelija vendarle prišlo. Ugotovili so, da se pri boleznih, ki okvarijo endotelij in torej zmanjšajo razpoložljivost NO, v zgodnji fazi okvare kompenzatorno poveča sproščanje ostalih vazodilatatorjev, med katerimi glavno vlogo igra EDHF. To dokazujejo raziskave na živalskih modelih in na ljudeh (51, 52).

Rezultati naše raziskave niso v skladu s številnimi ostalimi. Z metodo pletizmografije za merjenje pretokov v podlakti so pri bolnikih s hipotirozo ugotovili znižano endotelijsko odvisno vazodilatacijo po infuziji acetilholina (43). Z uporabo ultrazvočne tehnike so pri bolnikih s subklinično hipotirozo merili pretok brahialne arterije po predhodnem zaže-

mu le-te in ugotovili zmanjšano odzivnost endotelija (17). Pri ženskah s hipotirozo so z metodo pletizmografije preiskovali odzivnost uporovnih arterij v koži podlakti in ugotovili značilno premosorazmerno povezanost med trajanjem PRH in serumskimi ščitničnimi hormoni (44). Naši rezultati lahko odstopajo od zgoraj navedenih, ker so pri slednjih preiskovali prevodne arterije (lat. *a. brachialis*) ali uporovne arterije, nas pa je zanimala predvsem mikrocirkulacija kože, kjer so regulacija pretoka in metode merjenja pretokov drugačne.

Po drugi strani obstajajo nejasnosti glede vpliva T_3 na vazodilatatorno sposobnost žilja. Pri podganah s hipertirozo so namreč v nasprotju z drugimi raziskovalci ugotovili zmanjšano vazodilatatorno sposobnost aorte (53). Ugotovitev bi bila lahko v prid našim rezultatom, vendar pa jo težko posplošimo na mikrožilje človeka.

Prednosti in slabosti naše raziskave

Koža je lahko dostopen organ ter omogoča oceno mikrožilja z neinvazivnimi metodami (7). Prav tako nam lahko omogoča vpogled v generalizirano stanje mikrožilja (2, 13). Hkrati pa na kožno mikrocirkulacijo vplivajo živčni, humoralni ter lokalni dejavniki, in ni metode, ki bi izolirano ocenjevala prispevek posameznih dejavnikov, kar predstavlja omejitev pri vrednotenju rezultatov (54).

Največja pomanjkljivost naše študije je heterogenost med skupinama glede starosti. Skupina bolnih je bila namreč statistično značilno starejša. Vendar bi v skladu z ugotovitvami o zmanjšani endotelijsko odvisni vazodilataciji pri staranju pričakovali, da bi bile razlike v parametrih PRH med starostno homogenima skupinama bolnih in zdravih še večje.

Slabost naše študije je tudi, da sta bili skupini verjetno heterogeni glede ravni ženskih spolnih hormonov. Nihanju spolnih hormonov, ki je prisotno pri ženskah, bi se lahko izognili, če bi bili vsi preiskovanci moškega spola. Skupino bolnikov s hipotirozo so sicer sestavljale pretežno ženske v pomenopavzalnem obdobju, vendar je bilo v skupini zdravih veliko predmenopavzalnih žensk.

Prednosti in slabosti najdemo tudi v uporabljenih metodah. Glavne prednosti LD-me-

tode so neinvazivnost, preprostost uporabe ter zajem izključno povrhnjega dela kože brez globlje ležečih tkiv. Ima tudi nekaj pomanjkljivosti, saj je zaradi anatomije in fiziologije mikrocirkulacije kože precej prostorsko in časovno variabilna, poleg tega pa ne meri absolutnih vrednosti pretoka (11, 29–32). Pomanjkljivostim se izognemo z uporabo provokacijskih testov, s katerimi merimo relativne spremembe pretoka, kar omogoča primerljivost (7, 29). Pomanjkljivosti PRH so, da z njo težko zaznamo majhne okvare mikrožilja, da je precej variabilna in da je ocena funkcije endotelija le posredna, saj gre na lokalni ravni za kompleksno prepletanje metaboličnih kot tudi miogenih mehanizmov. Kljub temu se metoda pogosto uporablja, saj je neinvazivna in omogoča oceno lokalno pogojenih mehanizmov (7, 28, 30, 33, 34). Nenazadnje moramo poudariti, da bi za večjo zanesljivost rezultatov potrebovali večje število preiskovancev.

ZAKLJUČKI

Želeli smo primerjati reaktivnost mikrožilja kože pri bolnikih z novoodkriti hipotirozo in zdravih prostovoljcih. Reaktivnost smo ocenjevali s standardnim provokacijskim testom (triminutni zažem brahialne arterije), s katerim ocenjujemo predvsem lokalno pogojene mehanizme žilne reaktivnosti.

Bolniki so imeli značilno višje serumske koncentracije TSH kot zdravi in nižje koncentracije pT_3 in pT_4 , vendar so bile vrednosti pT_3 znotraj območja normalnih vrednosti. Omenjene vrednosti lahko opredelimo kot blago hipotirozo.

Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik v bazalnih LD-pretokih, srčni frekvenci ali arterijskem tlaku, izmerjenem na digitalnih arterijah. Nasprotno so imeli bolniki višje vrednosti arterijskega tlaka, izmerjenega na brahialni arteriji ($p < 0,05$).

Dokazali smo statistično značilno podaljšan čas trajanja PRH na blazinici prsta ($p < 0,05$) in nakazano višje vrednosti AUC, kar potrjuje našo hipotezo o spremenjeni lokalno pogojeni reaktivnosti mikrožilja kože pri bolnikih. Vendar omenjene spremembe kažejo na povečano vazodilatatorno sposobnost, kar ni v skladu s predpostavko o endotelijski disfunkciji pri bolnikih. Rezultati pa so v skla-

du s študijami o povečani vazodilatatorni sposobnosti žilja pri visokih vrednostih serumskega TSH, neodvisno od ravni pT_3 in pT_4 .

Sklepamo, da pride pri blagi hipotirozi do minimalnih, težko zaznavnih funkcionalnih

sprememb v mikrožilju kože, ki so lahko posledica spremenjene reaktivnosti endotelija. Dodatne raziskave so potrebne za osvetlitev mehanizmov spremenjene reaktivnosti in uporabo metode v klinične namene.

LITERATURA

1. Abularrage CJ, Sidawy AN, Aidinian G, et al. Evaluation of the microcirculation in vascular disease. *J Vasc Surg*. 2005; 42 (3): 574–81.
2. Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol*. 2008; 105 (1): 370–2.
3. Kahn F, Litchfield SJ, Stonebridge PA, et al. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vasc Med*. 1999; 4 (4): 233–8.
4. Lekakis J, Papamichael C, Alevizaki M, et al. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilation is impaired in subjects with hypothyroidism, borderline hypothyroidism, and high-normal serum thyrotropin (TSH) values. *Thyroid*. 1997; 7 (3): 411–4.
5. Weiss M, Milman B, Rosen B, et al. Quantitation of thyroid hormone effect on skin perfusion by laser Doppler flowmetry. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76 (3): 680–2.
6. Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Therap*. 2006; 111 (1): 81–98.
7. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, et al. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27 (9): 503–8.
8. Poredoš P. Struktura mikrocirkulacije. *Med Razgl*. 1996; 35 Suppl 2: 1–8.
9. Braverman IM. The cutaneous microcirculation: ultrastructure and microanatomical organization. *Microcirculation*. 1997; 4 (3): 329–40.
10. Rowell LB, ed. *Human cardiovascular control*. 1st ed. New York: Oxford University Press; 1993.
11. Gardner-Medwin JM, Taylor JY, Macdonald IA, et al. An investigation into variability in microvascular skin blood flow and the responses to transdermal delivery of acetylcholine at different sites in the forearm and hand. *Br J Clin Pharmacol*. 1997; 43 (4): 391–7.
12. Johnson JM, Kellogg DL Jr. Local thermal control of the human cutaneous circulation. *J Appl Physiol*. 2010; 109 (4): 1229–38.
13. Minson CT. Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *J Appl Physiol*. 2010; 109 (4): 1239–46.
14. Adams MR. Clinical assessment of endothelial function. *Endothelium*. 2006; 13 (6): 367–74.
15. Vanhoutte PM, Scott-Burden T. The endothelium in health and disease. *Tex Heart Inst J*. 1994; 21 (1): 62–7.
16. Napoli R, Biondi B, Guardasole V, et al. Impact of hyperthyroidism and its correction on vascular reactivity in humans. *Circulation*. 2001; 104 (25): 3076–80.
17. Cikim AS, Oflaz H, Ozbey N, et al. Evaluation of endothelial function in subclinical hypothyroidism and subclinical hyperthyroidism. *Thyroid*. 2004; 14 (8): 605–9.
18. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001; 81 (3): 1097–142.
19. Guyton AC, Hall JE, eds. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
20. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al., eds. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
21. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001; 344 (7): 501–9.
22. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, et al. Acute effects of triiodothyronine on endothelial function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92 (1): 250–4.
23. Büessemaker E, Popp R, Fisslthaler B, et al. Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery. *Cardiovasc Res*. 2003; 59 (1): 181–8.

24. Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (17): 9747–52.
25. Toft AD, Boon NA. Thyroid disease and the heart. *Heart*. 2000; 84 (4): 455–60.
26. Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's *The Thyroid: a fundamental and clinical text*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
27. Hak AE, Pols HAP, Visser TJ, et al. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: The Rotterdam Study. *Ann Intern Med*. 2000; 132 (4): 270–8.
28. Maver J. Vpliv centralnih in lokalnih dejavnikov na odzivnost drobnega žilja kože pri normotonikih, družinsko obremenjenih s hipertenzijo [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001.
29. Agache PG, Dupond AS. Recent advances in non-invasive assessment of human skin blood flow. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1994; 185: 47–51.
30. Lenasi H. Vpliv redne telesne aktivnosti na vazodilatacijsko odzivnost mikrožilja v koži [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001.
31. Finderle Ž. Merjenje pretokov v mikrocirkulaciji z laser-Doplerskimi merilci. *Med Razgl*. 1992; 31 Suppl 1: 23–7.
32. Tenland T, ed. *On laser Doppler flowmetry, methods and microvascular applications*. Linköping: VTT-Gräfska; 1982.
33. Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Dependence of human forearm skin postocclusive reactive hyperemia on occlusion time. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004; 50 (1): 73–8.
34. Yvonne-Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Method optimization on the use of postocclusive hyperemia model to assess microvascular function. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008; 38 (2): 119–33.
35. Berne RM, Levy MN, eds. *Principles of physiology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby Inc.; 2000.
36. Starc V. Regulacija mikrocirkulacije. *Med Razgl*. 1992; 31 Suppl 1: 1–15.
37. Gidlöf A, Lewis DH, Hammersen F. The effect of prolonged total ischemia on the ultrastructure of human skeletal muscle capillaries. A morphometric analysis. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1988; 7 (1): 67–86.
38. Bornmyr S, Castenfors J, Evander E, et al. Effect of local cold provocation on systolic blood pressure and skin blood flow in the finger. *Clin Physiol*. 2001; 21 (5): 570–5.
39. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, et al. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154 (2): 197–212.
40. Bollinger A, Schlumpf M. Finger blood flow in healthy subjects of different age and sex and in patients with Raynaud's disease. *Acta Chir Scand Suppl*. 1974; 465: 42–7.
41. Napoli R, Biondi B, Guardasole V, et al. Enhancement of vascular endothelial function by recombinant human thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93 (5): 1959–63.
42. Giusti M, Valenti S, Guazzini B, et al. Circulating nitric oxide is modulated by recombinant human TSH administration during monitoring of thyroid cancer remnant. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26 (12): 1192–7.
43. Taddei S, Caraccio N, Virdis A, et al. Impaired endothelium dependent vasodilation in subclinical hypothyroidism. Beneficial effect of levothyroxine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (8): 3731–7.
44. Dagne AG, Lekakis JP, Protogerou AD, et al. Abnormal endothelial function in female patients with hypothyroidism and borderline thyroid function. *Int J Cardiol*. 2007; 114 (3): 332–8.
45. Pazos-Moura CC, Moura EG, Breitenbach M, et al. Nailfold capillaroscopy in hypothyroidism and hyperthyroidism: blood flow velocity during rest and postocclusive reactive hyperemia. *Angiology*. 1998; 49 (6): 471–6.
46. Napoli R, Apuzzi V, Bosso G, et al. Recombinant human thyrotropin enhances endothelial-mediated vasodilation of conduit arteries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94 (3): 1012–6.
47. Milgrom E, de Roux N, Ghinea N, et al. Gonadotropin and thyrotropin receptors. *Horm Res*. 1997; 48 Suppl 4: 33–7.
48. Donnini D, Ambesi-Impiombato FS, Curcio F. Thyrotropin stimulates production of procoagulant and vasodilative factors in human aortic endothelial cells. *Thyroid*. 2003; 13 (6): 5117–521.
49. Wang HC, Drago J, Zhou Q, et al. An intrinsic thyrotropin-mediated pathway of TNF-alpha production by bone marrow cells. *Blood*. 2003; 101 (1): 119–23.
50. Dardano A, Ghiadoni L, Plantiga Y, et al. Recombinant human thyrotropin reduces endothelium-dependent vasodilation in patients monitored for differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91 (10): 4175–8.
51. Gaubert ML, Siguado-Roussel D, Tartas M, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol*. 2007; 585 (Pt 2): 617–26.
52. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279 (2): H459–65.
53. Lockette W, Otsuka Y, Hirt E. The endothelium and cyclic guanosine monophosphate in hyperthyroid-induced hypertension. *Agents Actions Suppl*. 1987; 22: 125–32.
54. Štruel M. Posebnosti kožne mikrocirkulacije. *Med Razgl*. 1996; 35 Suppl 2: 31–8.

Raja Gošnak Dahmane¹, Marija Hribernik²

Anatomija štirih jetrnih sistemov in delitev jeter na funkcionalne enote

Anatomy of Four Liver Systems and Liver Division into Functional Units

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: jetera, funkcionalna anatomija, jetrna sekcija, jetrni segment

Funkcionalna anatomija jeter temelji na razporeditvi štirih sistemov znotraj jeter: portalnega in arterijskega ter sistema žolčnih vodov in jetrnih ven. Na osnovi znotrajhepatičnega poteka in vejitve sistemov razdelimo jetra na levo in desno polovico, štiri sekcije oz. na osem segmentov. Vsaka enota ima svoj portalni pedikel, ki ga sestavljajo veja portalne vene in jetrne arterije ter žolčni vod. Vsaka polovica jeter, sekcija oz. segment je zato samostojna funkcionalna enota. Četrty jetrni sistem, sistem jetrnih ven, poteka proti spodnji votli veni in ima drugačno smer kot portalni pedikli. Glavne jetrne vene potekajo v intersekcijskih ravninah in zagotavljajo vensko drenažo iz dveh sosednjih sekcij. Poznavanje funkcionalne anatomije jeter, ki vključuje delitev jeter na segmente in sekcije, je osnova za natančno lokalizacijo patološkega procesa v jetrih, za varno kirurško terapijo in radiološke posege.

ABSTRACT

KEY WORDS: liver, functional anatomy, liver section, liver segment

Functional anatomy of the liver is based on three-dimensional arrangement of four liver systems – portal, arterial, biliary and the system of hepatic veins. On the basis of the intrahepatic course and branching pattern of the systems, the liver is divided into the left and right hemiliver, four sections or eight segments. Each liver unit has its own portal pedicle, composed of portal, arterial and biliary branch and is therefore functionally independent. The fourth liver system is the system of hepatic veins which run towards the inferior vena cava in other direction than the portal pedicle. The main hepatic veins follow the intersectional planes and provide venous drainage for the two adjacent sections. Knowledge of the liver functional anatomy, including liver division into segments and sections, is the basis for accurate localization of pathological process in the liver and safe surgical treatment and radiological intervention.

¹ Doc. dr. Raja Gošnak Dahmane, dr. med., Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana; raja.dahmane@guest.arnes.si

² Izr. prof. dr. Marija Hribernik, dr. med., Inštitut za anatomijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Klasična morfološka anatomija natančno opisuje površinske značilnosti jeter: desno in levo sagitalno brazdo (*fissura sagittalis dextra et sinistra*) z vsebino, jetrne vezi, odtise sosednjih organov in strukture v jetrni lini (*porta hepatis*). Meja med desnim in levim jetrnim režnjem (*lobus hepaticus dexter et sinister*) poteka na diafragmalni ploskvi po jetrnem falciformnem ligamentu (*ligamentum falciforme hepatis*), na visceralni pa po levi sagitalni brazdi. Desni jetrni reženji je večji od levega, ker mu pripadata kvadratni in repati reženji (*lobus quadratus et lobus caudatus*), ki ležita desno od leve sagitalne brazde (slika 1). Najpogostejše je opisan le izvenhepatični potek jetrnih žil in žolčnih vodov, kar pa je premalo natančna osnova za sodobne kirurške posege na jetrih.

ŠTIRJE »VOTLI« JETRNI SISTEMI IN DELITEV JETER

V preteklosti so posegi na jetrih kirurgom vzbujali strah, ker so jetra obravnavali kot »gobo, napolnjeno s krvjo«. Skozi jetra namreč potekajo poleg limfnega še štirje »votli« sistemi: dva aferentna – portalni in arterijski – ter dva eferentna – sistem jetrnih ven in žolčni sistem. Raziskave Hjortsjöja, Healeyja in Schroyja ter Couinauda so pripeljale do novih spoznanj o poteku in razporeditvi štirih sistemov znotraj jeter ter tako do funkcionalne anatomije jeter, ki je omogočila razvoj anatomsko naravnane jetrne kirurgije (1–3). Danes uporabljamo za prikaz notranje anatomije jeter predvsem zelo natančne morfološke preiskovalne metode (računalniška tomografija, pregled z ultrazvokom in magnetnoresonančno slikanje). Moderna jetrna kirurgija temelji na funkcionalni anatomiji in s tem na delitvi jeter na podenote na osnovi vejitve jetrnih žil in žolčnih vodov. Poznavanje poteka, medsebojnega odnosa in različic vseh štirih jetrnih sistemov omogoča varne, anatomsko naravnane resekcije jeter z ohranitvijo čim več funkcionalnega tkiva in ob čim manjši izgubi krvi.

Na osnovi vejitve in poteka žil ter žolčnih vodov razdelimo jetra na funkcionalno samostojne enote: na levo in desno polovico, nada-

lje na štiri sekcije in končno na osem segmentov. V nadaljevanju prispevka je poimenovane jetrnih enot skladno s Terminologijo jetrne anatomije in resekcij Brisbane 2000 (angl. *The Brisbane 2000 Terminology of Liver Anatomy and Resections*) (2–4).

Portalni pedikel

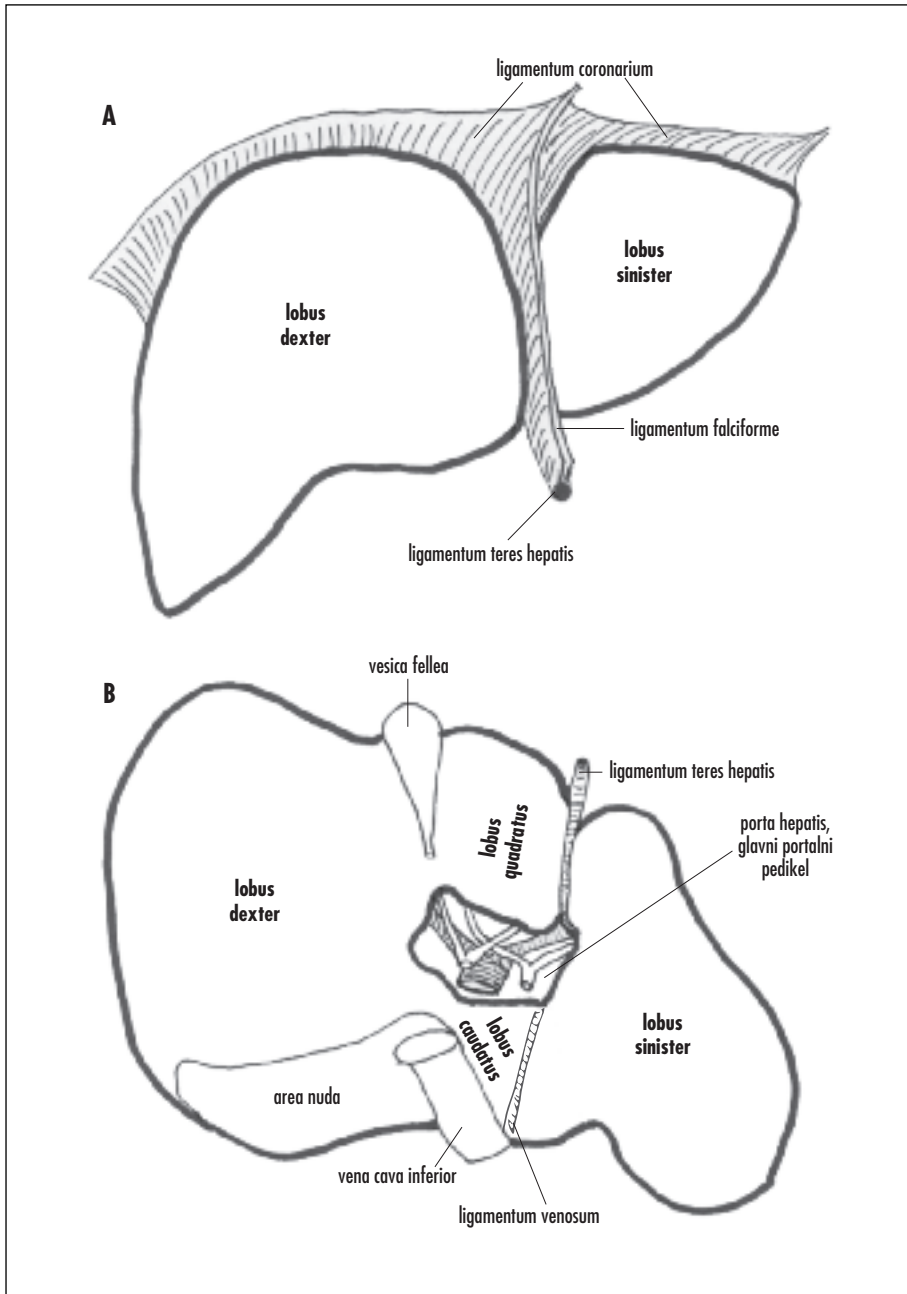
Portalni pedikel je trias struktur, ki ga sestavljajo veje portalne vene (*vena portae hepatis*), jetrne arterije, pritoki žolčnih vodov in mezgovnice (slika 2 – mezgovnice na sliki niso vidne). Portalni pedikel vstopa v vsako jetrno enoto in ji zagotavlja funkcionalno samostojnost. Skozi jetrno lino (*porta hepatis*) vstopa v jetra glavni portalni pedikel, ki ga sestavljajo portalna vena, jetrna arterija (*arteria hepatica propria*) in skupni jetrni vod (*ductus hepaticus communis*). Glavni portalni pedikel se deli na levi in desni portalni pedikel, vsak za svojo polovico jeter. Levi in desni portalni pedikel se nadalje razdelita vsak na dva sekciska portalna pedikla za štiri jetrne sekcije. Vsak sekciski portalni pedikel oskrbuje svojo jetrno sekcijo in se praviloma deli na dva segmentna portalna pedikla. Segmentni portalni pedikel vstopa v jetrni segment, ki je osnovna in hkrati najmanjša funkcionalno samostojna jetrna enota.

Znotraj segmenta se strukture portalnega pedikla nadalje delijo in potekajo praviloma skupaj in skladno. Neskladnost v poteku portalnega, arterijskega in žolčnega sistema se pogostejše pojavi na nivoju sekcijskega ali glavnega portalnega pedikla.

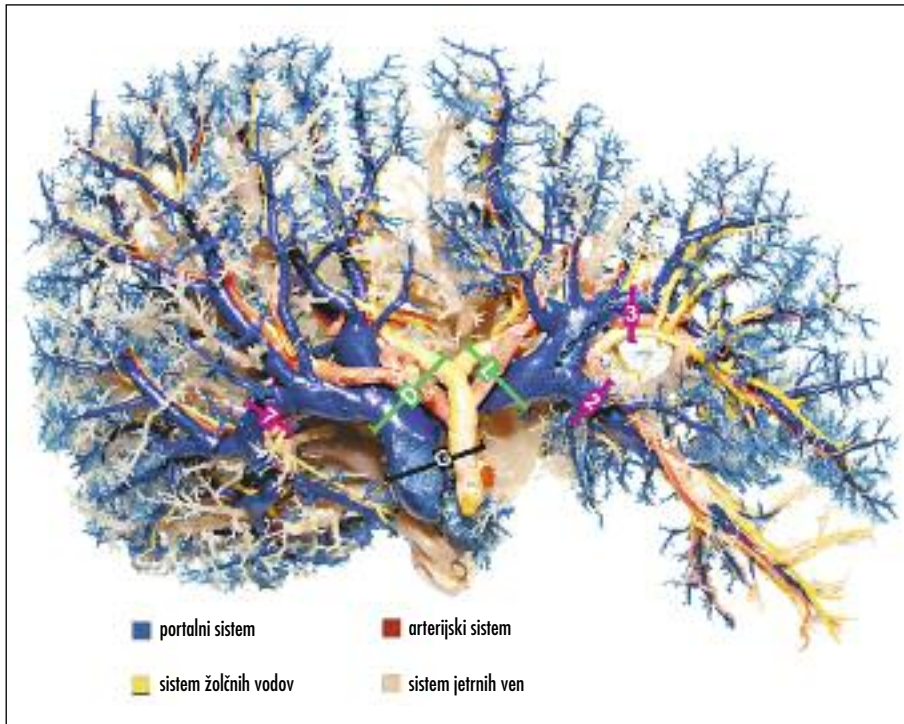
Sistem jetrnih ven

Vsaka jetrna enota potrebuje za funkcionalno samostojnost še četrti »votli« sistem, sistem jetrnih ven, ki ima drugačen potek kot portalni pedikli. Jetrne vene ne vstopajo v jetrno enoto (npr. jetrni segment) skupaj s portalnim pediklom, pač pa potekajo med jetrnimi enotami ter se na koncu združijo v dve ali tri glavne jetrne vene, ki se vlivajo v spodnjo votlo veno (*vena cava inferior*).

Od ravni hepatoduodenalnega ligamenta (*ligamentum hepatoduodenale*) preko jetrne line pa do segmentne ravni se dokaj pogosto pojavljajo različice poteka in vejitve portalnega, arterijskega in žolčnega sistema. Prav tako



Slika 1. Klasična anatomska delitev in strukture na površini jeter. A – Diafragmalna ploskev. Jetrni falciformni ligament (*ligamentum falciforme hepatis*) razmejuje desni (*lobus dexter*) in levi (*lobus sinister*) jetrni reženi. B – Visceralna ploskev. V levi sagitalni brazdi (*fissura sagittalis sinistra*), ki razmejuje desni in levi jetrni reženi, je spredaj okrogla jetrna vez (*ligamentum teres hepatis*) in zadaj venski ligament (*ligamentum venosum*). V desni sagitalni brazdi (*fissura sagittalis dextra*) leži spredaj žolčnik (*vesica fellea*), zadaj pa poteka spodnja votla vena (*vena cava inferior*). Skozi jetrno lino (*porta hepatis*) vstopa glavni portalni pedikel s portalno veno (*vena portae hepatis*) na sredini, levo ob njej je jetrna arterija (*arteria hepatica propria*), desno pa skupni jetrni vod (*ductus hepaticus communis*).



Slika 2. Portalni pedikli na korazijskem preparatu jetrnih žil in žolčnih vodov. G – glavni portalni pedikel, D – desni portalni pedikel, L – levi portalni pedikel, 2, 3, 3 – segmentni portalni pedikli za 2., 3. in 7. jetrni segment.

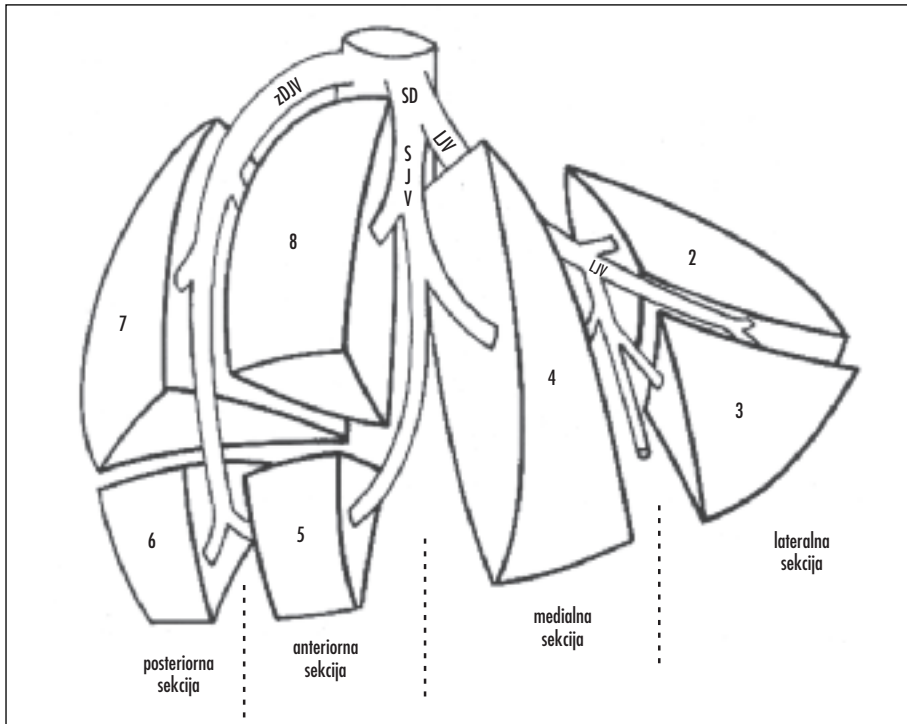
so dokaj pogoste različice jetrnih ven. V nadaljevanju je opisan prevladujoči način poteka in vejitve vseh štirih jetrnih sistemov.

JETRNE VENE IN FUNKCIONALNE ENOTE

Sistem jetrnih ven se pričenja s centralno veno (*vena centralis*), ki je v središču jetrnega režnjiča (*lobulus*). Od ravni centralne vene do spodnje votle vene se vene postopno združujejo. Venozna kri odteka iz jeter po treh glavnih jetrnih venah (*venae hepaticae*): po zgornji desni, srednji in levi jetrni veni. Srednja in leva jetrna vena se tik pred zlitjem v spodnjo votlo veno pogosto združita v skupno deblo. Poleg glavnih so vedno prisotne še kratke (subhepatične) vene, ki vodijo neposredno v spodnjo votlo veno, pogosto pa se v spodnjo votlo veno vlija tudi spodnja desna jetrna vena. Glavne jetrne vene predstavljajo osnovo za delitev jeter na levo in desno polovico

oz. na sekcije in zagotavljajo vensko drenažo dvema sosednjima sekcijama (slika 3).

Ravnina, ki poteka v osi srednje jetrne vene, od diafragmalne površine jeter skozi sredino žolčnika do spodnje votle vene, deli jetra na desno in levo polovico oz. poteka posteriorno med 4. in 8. segmentom ter anteriorno med 4. in 5. segmentom. Meja med obema polovicama na površini jeter ni vidna. Ravnina, ki poteka v osi zgornje desne jetrne vene, od diafragmalne površine jeter do spodnje votle vene, predstavlja mejo med desno posteriorno in desno anteriorno sekcijo oz. poteka zgoraj (zadaj) med 7. in 8. segmentom ter spodaj (spredaj) med 5. in 6. segmentom. Tudi ta meja na jetrni površini ni vidna. Leva jetrna vena razmejuje levo lateralno od leve medialne sekcije le v zgornjem (zadnjem) delu jeter, nato pa poteka v levi lateralni sekciji. Levi jetrni sekciji sta sicer razmejeni z levo sagitalno brazdo oz. s falciformnim ligamentom, pod katerim lahko poteka vena, ki



Slika 3. Potek jetrnih ven ter delitev jeter na sekcije in segmente. zDJV – zgornja desna jetrna vena, SJV – srednja jetrna vena, LJV – leva jetrna vena, SD – skupno debló, 2–8 – jetrni segmenti. Prvi jetrni segment in portalni pedikli na sliki niso prikazani zaradi preglednosti.

se vlija v levo jetrno veno ali skupno debló leve in srednje jetrne vene.

PORTALNI SISTEM

Portalna vena nastane z združitvijo zgornje mezenterične vene (*vena mesenterica superior*) in lienalne vene (*vena lienalis*). Do jetrne line poteka v hepatoduodenalnem ligamentu, skupaj z jetrno arterijo in glavnim žolčnim vodom. V jetrni lini se praviloma deli na desno in levo vejo, za desno in levo polovico jeter. Desna veja se nadalje deli na anteriorno in posteriorno sekcijsko vejo. Anteriorna sekcijska veja se deli na segmentne veje za 5. in 8. segment, posteriorna sekcijska veja pa na segmentne veje za 6. in 7. segment. V desni polovici jeter v nasprotju z levo polovico potekajo veje portalne vene praviloma skladno z arterijskim in žolčnim sistemom.

Leva veja portalne vene, ki je bila delno vključena v fetalni krvni obtok, ima nekoliko drugačen potek. Od jetrne line do leve sagi-

talne brazde poteka v frontalni ravnini (horizontalni oz. transverzalni del), nato ostro zavije navzpred in poteka v globini leve sagitalne brazde proti sprednjemu jetrnemu robu (umbilikalni del). Od zavoja oz. prehoda med obema deloma poteka navzad proti spodnji votli veni venski ligament (*ligamentum venosum*), ki predstavlja obliterirani venski duktus (*ductus venosus*). V fetalnem obdobju venski duktus povezuje levo vejo portalne vene s spodnjo votlo veno. Portalne veje za segmente leve polovice jeter se praviloma odcepijo iz umbilikalnega dela. Prva je veja za 2. segment, ki se odcepi nekoliko distalno od venskega ligamenta in poteka posterolateralno. Vene za 3. in 4. segment se najpogosteje odcepijo kot šop vej na koncu umbilikalnega dela – veje za 3. segment potekajo anterolateralno, veje za 4. segment pa antero- in posteromedialno. V levi polovici jeter, predvsem na sekcijski ravni vejitve, portalni sistem ne poteka skladno z arterijskim in žolčnim sistemom.

Čeprav so bile Couinaudove raziskave jetrnih sistemov ključne za razvoj moderne jetrne kirurgije, pa je s kirurškega vidika njegova delitev jeter na funkcionalne enote, ki temelji na vejitvi portalne vene, manj primerna (3). Po Couinaudu je leva polovica jeter razdeljena na lateralno sekcijo, ki obsega le 2. segment in medialno sekcijo, ki obsega 3. in 4. segment. Lateralna sekcija, ki jo napaja segmentna portalna veja za 2. segment, je tako bistveno manjša (približno ena četrtnina leve polovice jeter) od medialne sekcije, ki jo napaja preostali umbilikalni del leve portalne vene. Kirurško uporabnejša je delitev jeter na osnovi združevanja in poteka žolčnih vodov, ki sta jo predlagala Healey in Schroy (2).

ŽOLČNI SISTEM IN DELITEV NA FUNKCIONALNE ENOTE

Jetrne celice izločajo žolč v drobne žolčne kapilare, ki se postopno združujejo v vedno večje žolčne vode, na koncu pa se izoblikuje skupni jetrni vod (*ductus hepaticus communis*), ki izstopa iz jeter skozi jetrno lino. Iz vsakega jetrnega segmenta izstopa en, lahko pa tudi dva ali redko več segmentnih žolčnih vodov.

V desni polovici jeter se segmentna voda iz 5. in 8. segmenta združita v anteriorni sekcijski vod, segmentna voda iz 6. in 7. segmenta pa v posteriorni sekcijski vod. Oba desna sekcijška voda se združita v desni jetrni vod. Žolčni vodi v desni polovici jeter praviloma potekajo skladno s portalnim in arterijskim sistemom.

V levi polovici jeter žolčni vodi potekajo skladno le z arterijskim, ne pa tudi s portalnim sistemom. Voda iz 2. in 3. segmenta se v področju leve sagitalne brazde združita v skupni (sekcijski) vod, ki se mu v distalnem poteku pridruži še en, lahko pa tudi več vodov iz 4. segmenta. S pridružitvijo slednjega oz. slednjih nastane levi jetrni vod. Levi in desni jetrni vod se v jetrni lini združita v skupni jetrni vod. Ker iz 2. in 3. segmenta praviloma izhaja en skupni (sekcijski) vod, sestavljata omenjena segmenta eno enoto – levo lateralno sekcijo. Četrty segment, ki je približno enako velik kot 2. in 3. segment skupaj, pa predstavlja drugo enoto – levo medialno sekcijo.

V desni polovici jeter torej potekata portalni in žolčni sistem praviloma skladno,

v levi polovici pa se njuna poteka razlikujeta. S kirurškega vidika predstavlja v levi polovici jeter žolčni sistem boljšo osnovo za delitev na funkcionalne enote, zato temelji delitev celih jeter na funkcionalne enote na poteku in združevanju žolčnih vodov.

ARTERIJSKI SISTEM

Iz celiakalnega trunkusa (*truncus coeliacus*) izvira kot ena od treh vej skupna jetrna arterija (*arteria hepatica communis*). Njena končna veja je jetrna arterija, ki oskrbuje jetra z arterijsko krvjo. V jetrni lini se razveji na levo in desno vejo. V desni polovici jeter poteka nadaljnja vejitev na sekcijske in segmentne veje skladno z vejitvijo portalnega in žolčnega sistema, v levi polovici jeter pa le skladno z žolčnim sistemom.

DELITEV JETER IN POIMENOVANJE JETRNH ENOT

V preteklosti so bili strokovnjaki s področja jetrne kirurgije zelo neenotni glede delitve jeter na funkcionalne enote in tudi poimenovanje posameznih jetrnih enot je bilo zelo različno. Ena skupina je zagovarjala Couinaudovo terminologijo in delitev jeter, ki temelji na vejitvi portalnega sistema. Druga skupina je zagovarjala delitev jeter na osnovi združevanja žolčnih vodov, ki sta jo predlagala Healey in Schroy, in iz te delitve izhajajo terminologijo (2). Ker iz poimenovanja jetrnih enot (anatomska terminologija) izhaja poimenovanje resekcij posameznih delov jeter (kirurška terminologija), je bilo zaradi sporazumevanja med jetrnimi kirurgi nujno poenotenje anatomske in kirurške terminologije. Leta 2000 je v avstralskem mestu Brisbane Terminološki odbor IHPBA (angl. *International Hepato-Pancreato-Biliary Association*), ki ga je sestavljalo osem svetovno uveljavljenih jetrnih kirurgov, predlagal poenoteno Terminologijo jetrne anatomije in resekcij Brisbane 2000 (4). Poenotena terminologija temelji predvsem na delitvi jeter na osnovi združevanja žolčnih vodov, delno pa tudi upošteva Couinaudovo terminologijo.

Jetra torej razdelimo na levo in desno polovico, nadalje na štiri sekcije in končno na

osem segmentov. Delitev jeter na funkcionalne enote s poenoteno terminologijo za posamezne jetrne enote je prikazana na sliki 3 (4).

Delitev prvega reda - dve polovici jeter

Jetra so razdeljena na desno in levo polovico s sredinsko jetrno ravnino, ki poteka skozi ležišče žolčnika in žleb spodnje votle vene (Cantilova črta). Meja med polovicama na površini jeter ni vidna, ker pa poteka v osi srednje jetrne vene, jo lahko med operativnim posegom prikažemo z ultrazvočno preiskavo.

Delitev drugega reda - štiri sekcije

Desna polovica jeter je razdeljena z desno intersekcijsko ravnino na anteriorno in posteriorno sekcijo. Meja med desnima sekcijama na površini jeter ni vidna, lahko pa jo prikažemo z ultrazvočno preiskavo, ker poteka v osi zgornje desne jetrne vene. Leva polovica jeter je razdeljena z levo intersekcijsko ravnino na medialno in lateralno sekcijo. Meja med levo lateralno in levo medialno sekcijo je dobro vidna tako na diafragmalni, saj jo tvori falciformni ligament, kot tudi na visceralni površini jeter, kjer jo tvori leva sagitalna brazda.

Delitev tretjega reda - osem segmentov

Vsaka jetrna sekcija, z izjemo leve medialne sekcije, je razdeljena z intersegmentno ravnino na dva segmenta. Meje med segmenti na površini jeter niso vidne. Desna anteriorna sekcija je razdeljena na 5. in 8. segment,

desna posteriorna sekcija pa na 6. in 7. segment. Leva lateralna sekcija je razdeljena na 2. in 3. segment. Leve medialne sekcije ne delimo na dva segmenta, ker delitev nima prave osnove v poteku žolčnih vodov. Pri delitvi tretjega reda poimenujemo levo medialno sekcijo 4. segment. Del leve polovice jeter med sredinsko jetrno črto in levo sagitalno brazdo oz. falciformnim ligamentom lahko torej poimenujemo na dva načina: leva medialna sekcija ali 4. segment.

Prvi segment je del jeter, ki leži pred spodnjo votlo veno in ga v klasični morfološki anatomiji imenujemo *lobus* in *processus caudatus*. Ima vse lastnosti funkcionalno samostojne enote tako kot drugi jetrni segmenti, vendar ga običajno opisujemo ločeno – glede na potek žil in žolčnih vodov namreč delno pripada levi in delno desni polovici jeter. Žile za ta del jeter izvirajo iz bifurkacije portalne vene in iz anastomoznega arterijskega pleteža v jetrni lini, žolčni vodi pa se vlivajo v desni in levi jetrni vod. Venska kri iz tega predela odteka po kratkih jetrnih venah navzad v spodnjo votlo veno.

ZAKLJUČEK

Funkcionalna anatomija jeter temelji na poteku votlih jetrnih sistemov, ki predstavljajo osnovo za delitev jeter na sekcije in segmente. Poznavanje funkcionalne anatomije je nujno za anatomsko orientirane kirurške posege na jetrih, ki zagotavljajo manjšo izgubo krvi pri operacijah, manj pooperativnih zapletov in ohranitev čim več funkcionalnega jetrnega tkiva.

LITERATURA

1. Hjortsjö CH. Die Anatomie der intrahepatischen Gallengänge beim Menschen, mittels röntgen und injektionstechnik studiert nebst Beiträgen zur Kenntnis der inneren Lebertopographie [doktorsko delo]. Lund; 1948.
2. Healey JE, Schroy PC. Anatomy of the biliary ducts within the human liver. Arch Surg. 1953; 66: 599-616.
3. Couinaud C. Le foie. Etudes anatomiques et chirurgicales. Paris: Masson; 1957.
4. Strasberg SM, Belghiti J, Clavien PA, et al. The Brisbane 2000 terminology of liver anatomy and resections. HPB Surg. 2000; 2: 333-9.

Marjan Zaletel¹, Simon Brezovar², Luka Valčič³

Kognitivne sposobnosti po ishemični možganski kapi

Cognitive Impairment after Ischemic Stroke

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kognitivne sposobnosti, možganska kap, koncept pičle prekrvavitve, slikovne tehnike, demenca

Možganska kap zaradi vpliva na kognitivne sposobnosti ostaja najpogostejši vzrok smrtnosti in zmanjšane zmoglosti na svetu. Po preboleli možganski kapi lahko bolniki fizično dobro okrevaajo, a se kljub temu zaradi izpada kognitivnih sposobnosti ne morejo vrniti na delo ali živeti samostojno. Izpad kognitivnih sposobnosti zavzema vse oblike med dvema skrajnostma, prvo predstavlja izpad posamične kognitivne sposobnosti, ki je vezana na lokaliziran možganski infarkt ali hipoperfuzijo tkiva ob področju infarkta. Drugo skrajnost pa predstavlja globalen izpad kognitivnih sposobnosti, ki je pogosto povezan s klinično neizraženo žilno boleznijo, kot so okvara bele možganovine ali klinično neizraženi možganski infarkti. Preučevanje izpadov kognitivnih sposobnosti, ki se pojavijo zaradi možganske kapi, je zapleteno zaradi razlik v posameznih opredelitvah izpadov kognitivnih sposobnosti in dejstva, da bolnikom pred kapjo ocene kognitivnih sposobnosti ne opravimo. Ker možganska kap vpliva tudi na povezave med posameznimi področji možganov, ki so odgovorna za izvajanje kognitivnih sposobnosti, te povezave pa se nahajajo v beli možganovini, lahko z novimi slikovnimi tehnikami, kot sta traktografija in prikaz magnetizacijskega prenosa, s katerimi ocenjujemo prej omenjene subklinične bolezni, pripomoremo k boljši oceni po možganski kapi nastalega izpada kognitivnih sposobnosti. Ker se raziskave čedalje bolj osredotočajo na vlogo tistih dejavnikov tveganja za razvoj demence, ki jih lahko preprečimo, je vloga možganske kapi pri razvoju izpada kognitivnih dejavnosti in nastanka demence lahko nov dejavnik, ki ga moramo skrbno obravnavati.

ABSTRACT

KEY WORDS: cognition, ischemic stroke, misery perfusion, imaging techniques, dementia

Stroke is the primary cause of morbidity and disability throughout the world, mainly because of its effect on cognitive functions. After stroke, individuals can recover from physical disability, but might be unable to return to their previous occupation or independent living because of cognitive impairments. Cognitive dysfunction encompasses all deficits, which range from local ones resulting directly from the area of infarction or from hypoperfusion of the adjacent tissue, to more global cognitive impairment that is usually related to other underlying subclinical cerebrovascular disease, such as white matter disease or subclinical infarcts. Research

¹ Izr. prof. dr. Marjan Zaletel, dr. med., Klinični oddelek za vaskularno nevrologijo in intenzivno nevrološko terapijo, Nevrološka klinika, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za nevrologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana; marjan.zaletel@kclj.si

² Simon Brezovar, univ. dipl. psih., Služba za nevror rehabilitacijo, Nevrološka klinika, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Luka Valčič, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

of cognitive dysfunction after stroke is complicated because of its varying definitions and lack of cognitive function measurement before stroke. Additionally, stroke can affect white matter connectivity, so newer imaging techniques, such as diffusion tensor imaging and magnetisation transfer imaging, which can be used to assess subclinical damage are important tools for better assessment of cognitive dysfunction following stroke. Recent and current studies are increasingly focused on the role of preventable risk factors in the development of dementia. Since stroke is one such preventable risk factor, its role is a new issue that requires attention and treatment.

UVOD

Možganska kap je vodilni vzrok smrtnosti na svetu. Posledice možganske kapi se ne kažejo zgolj v motoričnih izpadih, temveč tudi v upadu kognitivnih sposobnosti (KS). Po ishemični možganski kapi (IMK) se pri bolnikih najpogosteje pojavljata afazija (oslabljena ali izgubljena zmožnost notranje govornice) in sindrom zanemarjenja nasprotnostranske polovice telesa. Afazija se pojavi pri 15–66% bolnikov po IMK. Delež afazij je odvisen od tega, katero populacijo preučujemo in kakšne govorne teste uporabimo. Afazija se tipično pojavi po IMK v dominantni polobli možganov, ki je običajno na levi strani (1, 2). Enako kot afazija se po IMK v dominantni polobli lahko pojavi ideomotorična apraksija, pri kateri gre za nesposobnost opravljanja namenskih gibov pri ohranjeni motoriki. Če gre za IMK v nedominantni polobli možganov, se podobno pogosto kot afazija v dominantni tu pojavlja sindrom zanemarjenja nasprotnostranske polovice telesa. Natančneje, sindrom zanemarjenja najdemo pri 40% bolnikov po IMK v desni možganski polobli (3). Ostali izpadi KS, ki nastanejo kot posledica IMK ali hipoperfuzije, so okvara delovnega spomina, pozornosti, učenja, računanja, vidne zaznave in okvara izvršilnih sposobnosti (kot so sprejemanje odločitev, načrtovanje, organizacija, reševanje problemov) (3).

Podrobno oceno KS redko napravimo takoj po IMK. Raziskave, ki proučujejo KS ob nastanku IMK, kažejo na to, da se KS spreminjajo sočasno z možganskim krvnim pretokom v prizadetem področju (4–7). V subakutnem in kroničnem obdobju po možganski kapi je raziskovanje KS omejeno, ker nimamo splo-

šnih opredelitev, kaj sestavlja IMK in kako izpad KS določimo. Če proučimo raziskave, ki obravnavajo dobro klinično izražene IMK, lahko ugotovimo, da velikokrat podcenjujejo obseg možganskožilne okvare. To se pojavi zato, ker je imelo lahko veliko bolnikov s klinično izraženo ali neizraženimi IMK v preteklosti več subkliničnih možganskih infarktov, ki so povzročili okvaro bele možganovine. V nasprotju s prej omenjenimi raziskavami pa veliko raziskav žilne demence vključuje IMK, ki je ali ni bila klinično izražena (8). Znano je, da je IMK pomemben vzrok demence, ki ga lahko preprečimo. Zato bi morali bolje razumeti patofiziološke mehanizme, s katerimi sta IMK in demenca povezani.

KOGNITIVNE SPOSOBNOSTI V AKUTNEM OBDOBJU ISHEMIČNE MOŽGANSKE KAPI

Akutno obdobje IMK zajema vse dogodke znotraj 24 ur od nastanka kapi. Glede na mesto nastanka IMK v možganih lahko le-ta povzroči afazijo, sindrom zanemarjanja, apraksijo, izgubo senzorične polovice telesa, izgubo vidnega polja in hemiparezo. Jedro ishemičnega področja si lahko prikažemo z magnetnoresonančnim slikanjem (angl. *magnetic resonance imaging*, MRI), ki je difuzijsko obtežena (angl. *diffusion weighted imaging*, DWI) (6).

Glede na prizadetost KS, ki ga povzroči IMK, lahko sklepamo na njen izvor (vzrok), glede na prizadet podtip KS pa na poškodovano strukturo v možganih (kot primer lahko vzamemo govor, ki je kognitivna sposobnost,

kot podtip pa vzamemo razumevanje govora, skladnjo povedi itd.). Primer vzročne povezave nastanka je lahko prizadetost govornih središč in središč za obdelavo prostorskih informacij. Ker so omenjena središča (govor in prostorske informacije) v možganski skorji, je za IMK, ki nastane zaradi srčne embolije, bolj verjetno, da povzroči afazijo ali sindrom zanemarjenja. Razlog je v tem, da emboli z izvorom v srcu pogosteje, kot se to dogaja pri drugih vrstah možganske kapi, potujejo do stikov sive in bele možganovine ali do področja spodnjih vej srednje možganske arterije (2–9). Glede na tip govornega primanjkljaja (npr. okvara razumevanja, nezmožnost pravilne skladnje povedi, izgovorjave, branja, črkovanja ali poimenovanja) in vrste zanemarjenja (tj. ali bolnik zanemari predmete v levi polovici vidnega polja ali levo polovico prostora) pa lahko sklepamo na lokalizacijo ishemičnega področja v možganih (10–12). IMK, ki zajame hipokampus, lahko povzroči tudi prehodno globalno amnezijo, a to se zgodi le redko (12).

Izpad KS pri akutni IMK nastane zaradi infarkta področja možganov, ki omogoča izvajanje določene KS, in zaradi nezadostne prekrvavitve sosednjih področij infarkta. Koncept, ki opisuje neusklajenost med zmanjšanim možganskim pretokom krvi in povečanjem ekstrakcije kisika iz krvi v povirju distalno od zapore večje arterije, imenujemo koncept pičle prekrvavitve (angl. *misery perfusion*) in je bil prvič opisan v začetku leta 1980 (13). Ostale raziskave so dodatno dokazale, da nezadostno prekravljeno možgansko tkivo lahko postane slabše delujoče in da ponovna vzpostavitev regionalnega možganskega krvnega pretoka (npr. z intravensko alteplazo) lahko izboljša prekrvavitev tega področja in s tem KS v akutni fazi IMK (14). Specifično za bolnike s hemiprostorskim sindromom zanemarjenja je, da imajo lahko nezadostno prekrvavitev v področju desne možganske poloble, kljub temu da niso utrpeli infarkta možganske skorje (4). Podobno se pri bolnikih s hipoperfuzijo leve možganske poloble lahko pojavi afazija, ki se po ponovni vzpostavitvi regionalnega možganskega krvnega pretoka izboljša (15). Te rezultate so ugotovili tako z računalniško tomografijo (angl. *computed tomography*, CT) kot tudi z MRI (16, 17). Poleg tega je stopnja nezadost-

ne prekrvavitve, ki je določena z zamikom v času med vršnimi vrednostmi pretoka kontrasta z MRI, prilagojenim za spremljanje možganskih pretokov (angl. *perfusion-weighted imaging*, PWI), povezana s stopnjo izraženosti sindroma zanemarjanja in afazije. Slednje nadalje dokazuje vzročno povezanost med hipoperfuzijo in upadom KS (5, 18). Prej naštetih raziskave skupaj z dokazi, da ponovna vzpostavitev pretoka v z ishemijo prizadeto območje izboljša stanje upada KS, podpirajo hipotezo, da področja hipoperfuzije na PWI ne predstavljajo samo benigne oligemije, ampak tudi prizadeto tkivo. Hujša stopnja od lokalizirane hipoperfuzije ali infarkta, ki je vzrok upada KS, je globalni kognitivni izpad, ki vključuje poslabšanje spomina, pozornosti, izvršilnih funkcij in vidnoprostorskih sposobnosti (19–21). Ta vzorec upada KS je podoben tistemu, ki je opisan pri žilnem upadu KS, kar nakazuje, da so mnogi od teh zgodnjih primanjkljajev pomembni pri kasnejšem razvoju demence (20). Pogostnost katereregakoli upada KS v prvih nekaj tednih po IMK obravnava več raziskav, ki so ugotovile, da je delež katereregakoli upada KS nad 70%. Veliko zgodaj nastalih upadov KS se po akutni IMK izboljša v nekaj tednih ali mesecih po dogodku (21).

KOGNITIVNE SPOSOBNOSTI V SUBAKUTNEM OBDOBJU

V subakutnem časovnem okviru, ki ga opredelimo kot obdobje treh mesecev po možganski kapi, je ocenjeni delež bolnikov, ki imajo upad KS, med 50% in 90% (22, 23). Te razlike v deležih lahko delno razložimo z razlikami v populacijskih raziskavah in obstojem podvrsti IMK. Kot primer lahko vzamemo raziskavo, ki so jo opravili Jaillard in sodelavci (23). V raziskavo so vključili predvsem bolnike s kardioemboličnimi možganskimi infarkti in infarkti zaradi zapore večjih žil, ki pa so imeli manj lakunarnih možganskih infarktov. Poleg tega so uporabljali dokaj nepopolno opredelitev upada KS. Nys in sodelavci so izpade KS opredelili ločeno od podvrste možganske kapi (20). Dokazali so, da ima upad KS manj kot 50% bolnikov s subkortikalno IMK. Za primerjavo so pri bolnikih s kortikalno IMK upad KS ugotovili pri 74% bolnikov.

Ker se številni izpadi KS, ki nastanejo kot posledica IMK, v prvih nekaj tednih ali mesecih izboljšujejo, raziskave, ki ocenjujejo KS nekaj mesecev po IMK, niso povsem verodostojne. Nekaj izboljšanja KS lahko pripišemo rekanalizaciji, nekaj možganski plastičnosti, nekaj izboljšanja pa je posledica prenosa izvrševanja kognitivne funkcije iz prizadetega območja na sosednja področja iste ali sosednje možganske poloble (24). Na področjih hipoperfuzije v možganskem tkivu izven jedra infarkta, kjer nastane upad KS zaradi t. i. difuzijsko-perfuzijskega neskladja, se ponavadi večina KS popolnoma povrne tri mesece po možganski kapi (25).

Čeprav zdravljenje upada KS po kapi ni predmet tega pregleda, se zavedamo, da je rehabilitacija pomemben sestavni del izboljšanja upadov KS v obdobju od akutnega do subakutnega obdobja. V nedavni raziskavi, ki jo je opravil Lazar s sodelavci, so ugotovili, da je tudi najmanjša govorna rehabilitacija pri osebah z afazijo po možganski kapi povezana z do 70 % okrevanjem govorne dejavnosti (26).

INDIVIDUALNE RAZLIKE MED UPADI KOGNITIVNIH SPOSOBNOSTI

Na splošno velja, da je višja starost pomemben dejavnik slabšega funkcionalnega in kognitivnega izida po IMK (20, 27–29). Eden izmed razlogov je lahko dejstvo, da imajo starejši posamezniki, ki zbolijo za IMK, pogosto še druge pridružene bolezni. Tako lahko zasledimo, da je bolezen drobnega možganskega žilja (angl. *cerebrovascular small vessel disease*) pri starejših odgovorna za nastanek 20 % klinično neizraženih ishemij, ki jih lahko ugotovimo samo s slikovnimi diagnostičnimi metodami, odstotek klinično izraženih ishemij, ki nastanejo kot posledica prej omenjene bolezni, pa znaša 25 %. V obeh primerih pa nastala ishemija povzroči subkortikalno ishemično bolezen, ki je najpogostejša in najbolj homogena oblika upada KS zaradi žilne bolezni (30–32).

Za višjo starost je bilo tudi dokazano, da je pomemben napovedni dejavnik razvoja demence ali motnje KS v kroničnem obdobju po IMK (33). Pri starejših bolnikih v akut-

nem obdobju IMK so lahko pogostejši tudi specifični upadi KS. Več raziskav je npr. pokazalo, da je hemiprostorsko zanemarjanje pogostejše pri starejših kot pri mlajših bolnikih (3, 34). Posebnost te oblike sindroma zanemarjanja je tudi, da pri njej ne zasledimo povezave med velikostjo prizadetega področja možganske skorje in njenim pogostejšim nastankom (35). Za afazijo, ki se pojavi po IMK, se zdi, da je pogostejša pri starejših in da se z vsakim letom starosti tveganje za njen razvoj poveča za 3 % (2). Obravnavanje starosti kot napovednega dejavnika za upad KS po IMK je v prvi vrsti omejeno z večjo verjetnostjo slabše kognitivne zmožnosti že pred nastankom IMK in s pogostejšim pojavom kardioemboličnih IMK, ki so posledica atrijske fibrilacije. Ta vrsta IMK pogosteje od drugih vrst IMK privede do ishemije možganske skorje in s tem do okvare govora ali do sindroma zanemarjenja. Poleg tega pa se moramo zavedati, da klinična slika upada KS po IMK ni vedno samo enostavna posledica lokacije IMK ali lokacije območja hipoperfuzije. Dokazano je, da poleg starosti obstajajo še demografski in drugi zdravstveni dejavniki, ki prav tako vplivajo na stopnjo izpada KS pri posamezniku.

Razlika med spoloma v upadih KS je lahko posledica razlik mehanizmov, ki pri moških in ženskah povzročijo IMK. Ženske imajo ponavadi več kardioemboličnih IMK, medtem ko pri moških prevladujejo lakunarni možganski infarkti. Navedeno dejstvo bi lahko pojasnilo pogostejše pojavljanje upadov KS pri ženskah (20). Poleg tega ženske pogosteje kot moški doživijo IMK pri višji starosti, kar pomeni, da so bile lahko njihove KS pred možgansko kapjo zaradi višje starosti slabše kot pri moških (36).

Med ostalimi dejavniki, ki so povezani s slabšo sposobnostjo KS po IMK, sta tudi povišana telesna temperatura in hiperglikemija. Vendar se na večino ocen, ki preučujejo vpliv teh dejavnikov na KS, ne moremo zanesiti, ker se lahko pojavijo kot posledica obsežne IMK ali kot posledica manj obsežne IMK v njeni akutni fazi. Poleg tega so si podatki o vplivu hiperglikemije na KS nasprotujoči (20, 37). Naslednji dejavnik, za katerega se zdi, da je pomemben pri določanju stopnje specifičnih upadov KS v času IMK, je določanje

ravni hemoglobina. Tako nizke kot visoke koncentracije hemoglobina so povezane s slabšo zmogljivostjo na testih za prisotnost sindroma zanamernjanja (38).

Ostali dejavniki, ki so bili povezani z večjim tveganjem za zgodnje upade KS po IMK, so še epileptični napadi, že prebolele možganske kapi in slabša kognitivna sposobnost pred nastankom IMK (39, 40). Izhodiščno stanje KS posameznika, ki je verjetno zelo pomemben dejavnik pri določanju prisotnosti ali stopnje upada KS, je praktično nemogoče izmeriti. Zato je natančna retrospektivna ocena KS posameznika pred IMK pristranska (41). Nevropsihološka diagnostika, ki vključuje primerjanje bolnikovih rezultatov na preizkusih KS s posamezniki iste starosti in izobrazbe, lahko pokaže na kognitivni upad le posredno. Še posebej velik problem se pojavi pri nevropsiholoških preizkusih, katerih norme niso korigirane na izobrazbo. Pri dobro izobraženem bolniku z IMK, ki izkazuje v kognitivnem funkcioniranju izrazito odstopanje od normative skupine, lahko z relativno gotovostjo zaključimo, da je upad KS znaten. V večjih težavah se najdemo pri bolnikih z nižjo izobrazbo, pri katerih je stanje KS že premorbidno nižje. Zavedati se moramo torej, da imajo mnogi bolniki z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni nekatere upade KS že pred nastopom možganske kapi (42).

Naslednji pomemben dejavnik pri oceni stanja KS v akutnem obdobju po možganski kapi je učinek zdravlil. Pri nekaterih hospitaliziranih bolnikih se lahko pojavi nemir ali celo delirij, zato jih moramo zdraviti s sedativi, ki lahko poslabšajo njihove KS. Ostala nepsihoaktivna zdravila imajo pri uporabi v kombinaciji z drugimi zdravili pogosto sedativne stranske učinke, še posebno pri starejših bolnikih (43). Poleg tega so tisti bolniki, ki imajo demenco že pred nastopom IMK, najbolj izpostavljeni tveganju za nastanek delirija ali poslabšanja funkcije njihovih KS. To še dodatno otežuje merjenje upada KS po IMK (44). V metaanalizi KS pred nastopom IMK je bilo pri 14 % bolnikov ugotovljeno, da imajo demenco (45).

Pri razumevanju individualnih razlik v upadu KS nam je lahko v veliko pomoč koncept kognitivne rezerve, ki ga je pred slabim

desetletjem predstavil Stern na primeru bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo, lahko pa nam pomaga tudi pri razumevanju upada KS po IMK (46). Kognitivna rezerva se nanaša na »intenziteto možganske patologije, ki je potrebna za klinično izraženo simptomatiko«. Z drugimi besedami, pri bolnikih z enako intenziteto možganskožilne patologije lahko zaradi različnih kognitivnih rezerv pričakujemo različne stopnje upada KS. Stern omenja naslednje dejavnike, ki pripomorejo k večji kognitivni rezervi: življenjski slog, fizična aktivnost, leta izobrazbe in mentalna aktivnost.

SLIKOVNE TEHNIKE

Zdi se, da na tveganje za razvoj upada KS po IMK vplivajo tako značilnosti poteka posamezne vrste IMK kot tudi okvara bele možganovine in možganske skorje. Za IMK, ki zajame večje področje, se zdi, da je povezana z večjo verjetnostjo razvoja upada KS (20). A vendar še ne vemo, ali je to značilnost, ki je posledica dejanske velikosti okvarjenega področja, ali pa samo posledica dejstva, da IMK, ki zajame večje področje možganov, bolj verjetno prizadene tudi skorjo in ostala področja možganov, ki skrbijo za KS. Razlog je ta, da sta velikost in lokacija med seboj neodvisni značilnosti IMK. Nekatere raziskave so celo ovrgle povezavo med upadi KS, kot je afazija, in velikostjo ishemičnega področja pri možganski kapi, spet druge pa so poročale o višji stopnji upada KS pri osebah s kapjo v področju srednje možganske arterije ter tako podprle hipotezo o povezavi med velikostjo IMK in upadom KS (20, 47, 48).

Čeprav je prej prevladovalo mišljenje, da lakunarni infarkti ne vplivajo na KS pri bolnikih brez demence, novejša raziskava kažejo, da bi lahko tudi en sam lakunarni infarkt zlasti ob sočasni levkoaraijozi, dolgoročno poslabšal KS (49–51). V nekaterih primerih pride pri lakunarnem infarktu do takšne okvare, da so simptomi enaki tistim, ki se pojavijo v subakutnem obdobju IMK. Kljub vsemu pa prevalenca upada KS v obdobju po infarktu ne narašča (52).

Druge raziskave, ki ne podpirajo povezave med lakunarnimi infarkti, velikostjo možganskega infarkta in upadom KS, poročajo, da

se tveganje za razvoj tudi samo zmerne upada KS eno leto po enem prebolelem lakunarnem infarktu ne poveča (53). Ena od možnih razlag za nasprotujoče si ugotovitve je, da je upad KS pri nekaterih bolnikih z lakunarno kapjo posledica sočasne hipoperfuzije skorje, ki pri slikanju bolnika v akutni fazi IMK ni bila očitna. Druga razlaga pa nakazuje na možnost, da bolniki z lakunarno kapjo v drugih raziskavah niso imeli hipoperfuzije možganske skorje, zato se je njihov upad KS razlikoval od upadov KS pri bolnikih v drugih raziskavah (53).

Vpliv že obstoječih patoloških sprememb v možganih na upad KS v akutnem obdobju po IMK ni jasen. Nekatera poročila pri bolnikih z upadom KS navajajo lokalizirana področja možganske atrofije v srednjem in temporalnem girusu ter obsežnejše območje hiperintenzivne bele možganovine kot pri bolnikih brez kognitivne okvare (54, 55). Vendar pa obstajajo tudi raziskave, ki ne navajajo pomembnih razlik med bolniki z ali brez upada KS po IMK ob sočasni prisotnosti ali odsotnosti možganske atrofije, subkliničnih infarktov ali okvar bele možganovine (20, 39). Analize teh povezav omejuje odsotnost ocen KS bolnikov pred nastopom IMK. Bolniki z več boleznimi bele možganovine in večjo atrofijo imajo bolj verjetno že na začetku slabšo KS in prav to je lahko razlog za razmišljanje o povezavi med upadom KS in IMK. Razlike v začetni KS lahko pojasnijo tudi razlike v pogostosti upadov KS pri posameznikih z znotrajmožgansko krvavitvijo in z ishemično možgansko kapjo (20). Med bolniki z znotrajmožgansko krvavitvijo so tudi tisti z možgansko amiloidno angiopatijo, od katerih imajo mnogi že pred možgansko kapjo upad KS, ki je lahko nastal zaradi nevrodegenerativnih sprememb, lahko pa nastane sočasno z možgansko kapjo. Naslednja je skupina bolnikov z okvarami bele možganovine in na koncu še bolniki z mikrokrvavitvami (56).

Novejše tehnike slikanja, kot sta traktografija (angl. *diffusion tensor imaging*, DTI) in prikaz magnetizacijskega prenosa (angl. *magnetization transfer imaging*, MTI), se kažejo kot dobra pomoč pri identifikaciji posameznikov z mikrostrukturnimi nepravilnostmi bele možganovine. Prav ti bolniki imajo večje tveganje

za nastanek upada KS. Zaenkrat so te tehnike še v fazi raziskav (57, 58).

AKUTNI UKREPI

Čeprav se v tem članku posegom za specifično odpravljanje in izboljšanje upadov KS ne bomo posebej posvetili, se moramo zavedati, da mnogo posegov, ki jih napravimo v akutni fazi IMK, vpliva na izpade KS. Za intravenusko alteplazo je npr. dokazano, da zmanjšuje invalidnost po IMK, vendar pa ni nobenih dokazov, da alteplaza izboljšuje KS v obdobju po IMK (59, 60). Alteplaza naj bi pripomogla k izboljšanju KS v akutnem obdobju po IMK, a vendar ta učinek opazimo samo pri nekaterih bolnikih (14, 15). Reperfuzija možganske skorje z začasnim povečanjem krvnega tlaka pri bolnikih z zožitvijo večjih arterij, pri manjši skupini bolnikov, ki so brez večjih dejavnikov tveganja za srčne bolezni, v akutni fazi IMK kot tudi v kasnejšem poteku, omogoča izboljšanje KS. To dejstvo kaže na to, da ima reperfuzija možganske skorje učinke na KS (61).

DEMENCA IN OSTALI POZNI IZPADI KOGNITIVNIH SPOSOBNOSTI

Večina upadov KS, ki nastanejo zaradi IMK, se razreši takoj po izteku subakutne faze. Poročilo navaja, da je več kot 25 (83%) od 36 bolnikov z začetnimi primanjkljaji v verbalnem spominu in 14 (78%) od 18 bolnikov s primanjkljaji na področju vidnoprostorskih sposobnosti okrevale v obdobju šestih mesecev po IMK. Ostale domene KS so se popravile nekoliko kasneje (22). V drugi raziskavi je 43 (54%) od 80 bolnikov po enem letu še vedno imelo primanjkljaj pozornosti, vendar so bili primanjkljaji v izvršilnih funkcijah, govoru in dolgoročnem spominu v primerjavi z akutnim obdobjem manjši (21). Moramo se zavedati, da se kljub vzpodbudnim podatkom nekaterim bolnikom KS s časom poslabšujejo, čeprav nimajo klinično jasno izraženih ishemičnih dogodkov (62).

Po nastanku IMK se s časom povečuje verjetnost, da bo bolnik doživel drugo možganskožilno okvaro, klinično ali subklinično, ki bo dodatno prispevala k poslabšanju njego-

vih KS. Za bolnike, ki so preživeli več IMK, se zdi, da imajo večje tveganje za upad KS kot bolniki, ki so preboleli samo eno IMK (28, 45). Poleg tega so bolniki z več IMK bolj dovzetni za subklinične oblike možganskih infarktov. Uspešnost na testih hitrosti obdelave informacij, spomina in izvršilnih sposobnosti je slabša pri osebah, ki so prebolele več IMK (63).

Za IMK je bilo v epidemioloških raziskavah in pri obdukcijah ugotovljeno, da je močan dejavnik tveganja za razvoj demence, vendar kot dejavnik tveganja ni vezana na specifično vrsto demence, temveč vpliva na posamičen izpad KS (64, 65). Tudi pri teh raziskavah se je pokazala povezanost med IMK in upadom KS, ki je bil ugotovljen tako pri klinično izraženih kot tudi pri klinično prikritih IMK (66). Tveganje za razvoj demence pri bolnikih z enim samim možganskim infarktom pa je bilo manjše kot pri tistih, ki so doživeli več možganskih infarktov. Razvoj od nastanka IMK do demence gre ponavadi skozi oblike blagega upada KS. Pri 8 % bolnikov blag upad KS, ki nastane po IMK, napreduje v demenco (67).

Pendlebury in Rothwell sta naredila sistematični pregled razvoja demence v obdobju vsaj treh mesecev po IMK (45). Skupaj sta zbrala 73 raziskav z izvirnimi podatki, ki ne vključujejo le serije hospitaliziranih bolnikov, ampak tudi nekatere populacijske študije. Za študije, v katerih so bili vključeni le bolniki s prvo IMK, izključeni pa bolniki z demenco, ki se jim je razvila pred kapjo, je zbrana ocena o razširjenosti znašala 7,4–12,0 %. Najpomembnejši napovedni dejavniki demence po IMK, ki so bili opredeljeni v tem sistematičnem pregledu, vključujejo višjo starost, ženski spol, nižjo izobrazbo, nebelo raso, sladkorno bolezen in atrijsko fibrilacijo. Dejavniki, ki so značilni za IMK in jih lahko uporabimo za razvoj demence, vključujejo znotrajmožgansko krvavitev, disfazijo, prizadetost leve možganske poloble in podatek, ali je bila to prva ali ponovna IMK. Podobno kot nekatera poročila o napovednih dejavnikih pojavov akutne in subakutne motnje KS po IMK so epileptični napadi, inkontinenca ali epizoda akutne zmedenosti v času kapi povezani z večjim tveganjem za demenco po IMK. Levkoaraijoza in možganska atrofija, zlasti medialnega senčnega režnja, sta prav tako zelo povezani z na-

stankom demence po kapi (45). Mnogi od teh dejavnikov kažejo na možganskožilno poškodbo, ki v mnogih primerih poteka prikrito. Če pod izrazom demenca največkrat razumemo Alzheimerjevo bolezen (AB), potem ni jasno, ali so vplivi možganskih infarktov na razvoj demence posledica žilne bolezni, ki neposredno povzroči nevropatološke spremembe, podobne tistim pri AB, ali Alzheimerjeva bolezen in žilna nevropatologija delujeta sinergistično in tako skupaj privedeta do poslabšanja KS (45). Do sedaj zbrani dokazi podpirajo obe hipotezi. Zato je najbolje, če govorimo o žilnem prispevku k razvoju AB. Na to napeljuje naraščajoče število dokazov, ki kažejo na povezavo med spremembami v koncentraciji holesterola v krvi in razvojem AB (68, 69). Longitudinalna dolgoročna populacijska študija je dokazala, da je visoka koncentracija holesterola v krvi pri ljudeh v srednjih letih dejavnik tveganja za kasnejši nastanek AB (70). Nedavna longitudinalna populacijska študija, v kateri so preučevali bolnike z večjo koncentracijo skupnega holesterola in holesterola v lipoproteinu majhne gostote (angl. *low density-lipoprotein*, LDL) v krvi, je dokazala, da sta višji koncentraciji LDL in skupnega holesterola povezani s hitrejšim upadom KS pri bolnikih z AB (71). Prav tako je bilo izoliranih kar nekaj genov, ki uravnavajo metabolizem lipoproteinov in so povezani s kasnejšim nastankom AB (72). Rezultati študije z naslovom Serum lipo-protein profile and APOE genotype in Alzheimer's disease so potrdili, da je sprememba v homeostazi holesterola povezana z nastankom AB in da je koncentracija LDL-holesterola pri starejših bolnikih z AB večja kot pri starejših, ki nimajo AB (73). Prisotnost APOE e4+ alela se je pokazala kot dejavnik tveganja za razvoj AB, vendar pa je mehanizem, ki povzroča višje tveganje, neodvisen od mehanizma, ki povzroči povečanje koncentracije holesterola v krvi. Vendar moramo še ugotoviti, ali je hiperholesterolemija dejavnik tveganja za razvoj AB ali samo posledica skupnih patofizioloških mehanizmov, vključenih v nevrodegeneracijske procese in uravnavanje homeostaze holesterola. Zanimivo je, da je profil lipoproteinov pri bolnikih z AB glede na status APOE e4 s povečanim LDL-holesterolom drugačen kot pri tistih z AB, ki APOE e4 nimajo (73).

Hipoteza, ki se pojavlja pri AB in drugih nevrodegenerativnih boleznih, je, da pri teh boleznih pride do spremembe živčnožilne enote – funkcionalne enote, ki zajema žilne celice, astrocite in nevrone. Disfunkcija živčnožilne enote povzroči poslabšanje funkcije možganskožilne bariere, disregulacijo pretoka krvi skozi možgane in poslabšanje očiščanja amiloida A β , kar povzroči povečanje oligomerov in topnih A β oblik amiloida (74). Prav sprememba živčnožilne enote pa naj bi bila začetni dogodek pri patogenezi nevrodegenerativne bolezni (75).

V obdukcijski študiji so pri 32,4% bolnikov z nevropatološkimi spremembami, podobnimi AB, našli infarkte, opredeljene v t. i. mejnem področju, ki ga prehranjujeta sprednja in srednja možganska arterija. Značilnost tega območja je, da tam ni kolateral (76). Nasprotno pa so dokazali v raziska-

vi Nun. V njej so pri bolnikih z AB lakunarne infarkte v področju bazalnih ganglijev, talamusa ali globoke bele substance povezali z razvojem demence, saj je le-ta pri njih nastopila z 20-krat večjo verjetnostjo kot pri bolnikih brez možganskih infarktov (77). Rezultati raziskave Nun kažejo, da žilne bolezni pri nevropatoloških spremembah, podobnim AB, zmanjšujejo KS, niso pa neposreden vzrok za te spremembe. Vendar pa v raziskavi Religious Order niso opazili povezave med razvojem demence ter možganskimi infarkti in nevropatološkimi spremembami, značilnimi za AB (78). Ravno zaradi teh nasprotujočih si rezultatov pričakujemo, da bodo nadaljnje raziskave skušale pojasniti, ali razlike nastajajo zaradi razlik v genetskem profilu določene populacije ali zaradi razlik v dejavnih okolja.

LITERATURA

1. Inatomi Y, Yonehara T, Omiya S, et al. Aphasia during the acute phase in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2008; 25 (4): 316–23.
2. Engelter ST, Gostynski M, Papa S, et al. Epidemiology of aphasia attributable to first ischemic stroke: incidence, severity, fluency, etiology, and thrombolysis. *Stroke.* 2006; 37 (6): 1379–84.
3. Ringman JM, Saver JL, Woolson RF, et al. Frequency, risk factors, anatomy, and course of unilateral neglect in an acute stroke cohort. *Neurology.* 2004; 63 (39): 468–74.
4. Hillis AE, Wityk RJ, Barker PB, et al. Subcortical aphasia and neglect in acute stroke: the role of cortical hypoperfusion. *Brain.* 2002; 125 (Pt 5): 1094–104.
5. Hillis AE, Wityk RJ, Tuffiash E, et al. Hypoperfusion of Wernicke's area predicts severity of semantic deficit in acute stroke. *Ann Neurol.* 2001; 50 (5): 561–66.
6. Hillis AE, Barker PB, Beauchamp NJ, et al. MR perfusion imaging reveals regions of hypoperfusion associated with aphasia and neglect. *Neurology.* 2000; 55 (6): 782–8.
7. Hillis AE, Barker PB, Beauchamp NJ, et al. Restoring blood pressure reperfused Wernicke's area and improved language. *Neurology.* 2001; 56 (5): 670–2.
8. Launer LJ, Petrovitch H, Ross GW, et al. AD brain pathology: vascular origins? Results from the HAAS autopsy study. *Neurobiol Aging.* 2008; 29 (10): 1587–90.
9. Hoffmann M. Higher cortical function deficits after stroke: an analysis of 1,000 patients from a dedicated cognitive stroke registry. *Neurorehabil Neural Repair.* 2001; 15 (2): 113–27.
10. Hillis AE. Aphasia: progress in the last quarter of a century. *Neurology.* 2007; 69 (2): 200–13.
11. Verdon V, Schwartz S, Lovblad KO, et al. Neuroanatomy of hemispatial neglect and its functional components: a study using voxel-based lesion-symptom mapping. *Brain.* 2010; 133 (Pt 3): 880–94.
12. Medina J, Kannan V, Pawlak MA, et al. Neural substrates of visuospatial processing in distinct reference frames: evidence from unilateral spatial neglect. *J Cogn Neurosci.* 2009; 21 (11): 2073–84.
13. Baron JC, Bousser MG, Rey A, et al. Reversal of focal «misery-perfusion syndrome» by extra-intracranial arterial bypass in hemodynamic cerebral ischemia: a case study with 15O positron tomography. *Stroke.* 1981; 12 (4): 454–9.
14. Heiss WD, Grond M, Thiel A, et al. Tissue at risk of infarction rescued by early reperfusion: a positron emission tomography study in systemic recombinant tissue plasminogen activator thrombolysis of acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18 (12): 1298–307.

15. Hillis AE, Kleinman JT, Newhart M, et al. Restoring cerebral blood flow reveals neural regions critical for naming. *J Neurosci*. 2006; 26 (31): 8069–73.
16. Olsen TS, Bruhn P, Oberg RG. Cortical hypoperfusion as a possible cause of 'subcortical aphasia'. *Brain*. 1986; 109 (Pt 3): 393–410.
17. Croquelois A, Wintermark M, Reichhart M, et al. Aphasia in hyperacute stroke: language follows brain penumbra dynamics. *Ann Neurol*. 2003; 54 (3): 321–9.
18. Shirani P, Thorn J, Davis C, et al. Severity of hypoperfusion in distinct brain regions predicts severity of hemispatial neglect in different reference frames. *Stroke*. 2009; 40 (11): 3563–6.
19. Lee BH, Kim EJ, Ku BD, et al. Cognitive impairments in patients with hemispatial neglect from acute right hemispheric stroke. *Cogn Behav Neurol*. 2008; 21 (2): 73–6.
20. Nys GMS, van Zandvoort MJ, de Kort PL, et al. Cognitive disorders in acute stroke: prevalence and clinical determinants. *Cerebrovasc Dis*. 2007; 23 (5–6): 408–16.
21. Leśniak M, Bak T, Czepliel W, et al. Frequency and prognostic value of cognitive disorders in stroke patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008; 26 (4): 356–63.
22. Nys GM, van Zandvoort MJ, De Kort PL, et al. Domain-specific cognitive recovery after first-ever stroke: a follow-up study of 111 cases. *J Int Neuropsychol Soc*. 2005; 11 (7): 795–806.
23. Jaillard A, Naegele B, Trabucco-Miguel S, et al. Hidden dysfunctioning in subacute stroke. *Stroke*. 2009; 40 (7): 2473–9.
24. Marshall RS, Perera GM, Lazar RM, et al. Evolution of cortical activation during recovery from corticospinal tract infarction. *Stroke*. 2000; 31 (3): 656–61.
25. Koga M, Reutens DC, Wright P, et al. The existence and evolution of diffusion-perfusion mismatched tissue in white and gray matter after acute stroke. *Stroke*. 2005; 36 (10): 2132–7.
26. Lazar RM, Minzer B, Antoniello D, et al. Improvement in aphasia scores after stroke is well predicted by initial severity. *Stroke*. 2010; 41 (7): 1485–8.
27. Klimkowicz-Mrowiec A, Dziedzic T, Slowik A, et al. Predictors of poststroke dementia: results of a hospital-based study in Poland. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006; 21 (5–6): 328–34.
28. Jehkonen M, Ahonen JP, Dastidar P, et al. Visual neglect as a predictor of functional outcome one year after stroke. *Acta Neurol Scand*. 2000; 101 (3): 195–201.
29. Wade DT, Langton Hewer R. Stroke: associations with age, sex, and side of weakness. *Arch Phys Med Rehabil*. 1986; 67 (8): 540–5.
30. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, et al. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*. 2003; 348 (13): 1215–22.
31. Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP, et al. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. *Stroke*. 1999; 30 (12): 2513–6.
32. Rockwood K, Wentzel C, Hachinski V, et al. Prevalence and outcomes of vascular cognitive impairment. *Vascular cognitive impairment investigators of the canadian study of health and aging*. *Neurology*. 2000; 54 (2): 447–51.
33. Rasquin SM, Verhey FR, van Oostenbrugge RJ, et al. Demographic and CT scan features related to cognitive impairment in the first year after stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75 (11): 1562–7.
34. Pedersen PM, Jørgensen HS, Nakayama H, et al. Hemineglect in acute stroke incidence and prognostic implications. *The Copenhagen Stroke Study*. *Am J Phys Med Rehabil*. 1997; 76 (2): 122–7.
35. Gottesman RF, Kleinman JT, Davis C, et al. Unilateral neglect is more severe and common in older patients with right hemispheric stroke. *Neurology*. 2008; 71 (18): 1439–44.
36. Reid JM, Dai D, Gubitzi GJ, et al. Gender differences in stroke examined in a 10-year cohort of patients admitted to a Canadian teaching hospital. *Stroke*. 2008; 39 (4): 1090–5.
37. Kruyt ND, Nys GM, van der Worp HB, et al. Hyperglycemia and cognitive outcome after ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2008; 270 (1–2): 141–7.
38. Gottesman RF, Bahrainwala Z, Wityk RJ, et al. Neglect is more common and severe at extreme hemoglobin levels in right hemispheric stroke. *Stroke*. 2010; 41 (8): 1641–5.
39. Cordonnier C, Hénon H, Derambure P, et al. Early epileptic seizures after stroke are associated with increased risk of new-onset dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78 (5): 514–6.
40. Mok VC, Wong A, Lam WW, et al. Cognitive impairment and functional outcome after stroke associated with small vessel disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75 (4): 560–6.
41. Mok V, Wong A, Tang WK, et al. Determinants of prestroke cognitive impairment in stroke associated with small vessel disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005; 20 (4): 225–30.
42. Wagle J, Farner L, Flekkøy K, et al. Association between ApoE epsilon4 and cognitive impairment after stroke. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009; 27 (6): 525–33.

43. Wright RM, Roumani YF, Boudreau R, et al. Effect of central nervous system medication use on decline in cognition in community-dwelling older adults: findings from the Health, Aging And Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc.* 2009; 57 (2): 243–50.
44. Hénon H, Lebert F, Durieu I, et al. Confusional state in stroke: relation to preexisting dementia, patient characteristics, and outcome. *Stroke.* 1999; 30 (4): 773–9.
45. Pendlebury ST, Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2009; 8 (11): 1006–18.
46. Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc.* 2009; 8 (3): 448–60.
47. Jaillard A, Grand S, Le Bas JF, et al. Predicting cognitive dysfunctioning in nondemented patients early after stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2010; 29 (5): 415–23.
48. Lazar RM, Speizer AE, Festa JR, et al. Variability in language recovery after first-time stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79 (5): 530–4.
49. Fisher CM. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology.* 1982; 32 (8): 871–6.
50. Wen HM, Mok VC, Fan YH, et al. Effect of white matter changes on cognitive impairment in patients with lacunar infarcts. *Stroke.* 2004; 35 (8): 1826–30.
51. McMurtray AM, Liao A, Haider J, et al. Cognitive performance after lacunar stroke correlates with leukoaraiosis severity. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 24 (2–3): 271–6.
52. Rasquin SM, van Oostenbrugge RJ, Verhey FR, et al. Vascular mild cognitive impairment is highly prevalent after lacunar stroke but does not increase over time: a 2-year follow-up study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007; 24 (5): 396–401.
53. Anderson JF, Saling MM, Srikanth VK, et al. Individuals with first-ever clinical presentation of a lacunar infarction syndrome: is there an increased likelihood of developing mild cognitive impairment in the first 12 months after stroke? *J Neuropsychol.* 2008; 2 (Pt 2): 373–85.
54. Stebbins GT, Nyenhuis DL, Wang C, et al. Gray matter atrophy in patients with ischemic stroke with cognitive impairment. *Stroke.* 2008; 39 (3): 785–93.
55. Grau-Olivares M, Bartrés-Faz D, Arboix A, et al. Mild cognitive impairment after lacunar infarction: voxel-based morphometry and neuropsychological assessment. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 23 (5–6): 353–61.
56. Pfeifer LA, White LR, Ross GW, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS Autopsy Study. *Neurology.* 2002; 58 (11): 1629–34.
57. Fazekas F, Ropele S, Enzinger C, et al. MTI of white matter hyperintensities. *Brain.* 2005; 128 (Pt 12): 2926–32.
58. Williamson J, Nyenhuis D, Stebbins GT, et al. Regional differences in relationships between apparent white matter integrity, cognition and mood in patients with ischemic stroke. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2010; 32 (7): 673–81.
59. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 1995; 333 (24): 1581–8.
60. Nys GM, van Zandvoort MJ, Algra A, et al. Cognitive and functional outcome after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment in patients with a first symptomatic brain infarct. *J Neurol.* 2006; 253 (2): 237–41.
61. Hillis AE, Ulatowski JA, Barker PB, et al. A pilot randomized trial of induced blood pressure elevation: effects on function and focal perfusion in acute and subacute stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2003; 16 (3): 236–46.
62. Sachdev PS, Brodaty H, Valenzuela MJ, et al. Progression of cognitive impairment in stroke patients. *Neurology.* 2004; 63 (9): 1618–23.
63. Saczynski JS, Sigurdsson S, Jonsdottir MK, et al. Cerebral infarcts and cognitive performance: importance of location and number of infarcts. *Stroke.* 2009; 40 (3): 677–82.
64. Narasimhalu K, Ang S, De Silva DA, et al. Severity of CIND and MCI predict incidence of dementia in an ischemic stroke cohort. *Neurology.* 2009; 73 (22): 1866–72.
65. Troncoso JC, Zonderman AB, Resnick SM, et al. Effects of infarcts on dementia in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Ann Neurol.* 2008; 64 (2): 168–76.
66. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, et al. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med.* 2003; 348 (13): 1215–22.
67. Sachdev PS, Chen X, Brodaty H, et al. The determinants and longitudinal course of post-stroke mild cognitive impairment. *J Int Neuropsychol Soc.* 2009; 15 (6): 915–23.
68. Lesser G, Kandiah K, Libow LS, et al. Elevated serum total and LDL cholesterol in very old patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001; 12 (2): 138–45.
69. Evans RM, Emsley CL, Gao S, et al. Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease: a population-based study of African Americans. *Neurology.* 2000; 54 (1): 240–2.
70. Kivipelto M, Ngandu T, Laatikainen T, et al. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (9): 735–41.

71. Helzner EP, Luchsinger JA, Scarmeas N, et al. Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2009; 66 (3): 343–8.
72. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, et al. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* 2005; 66 (7): 940–7.
73. Cagnin A, Zambon A, Zarantonello G, et al. Serum lipoprotein profile and APOE genotype in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2007; (72): 175–9.
74. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008; 57 (2): 178–201.
75. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5 (5): 347–60.
76. Suter OC, Sunthorn T, Kraftsik R, et al. Cerebral hypoperfusion generates cortical watershed microinfarcts in Alzheimer disease. *Stroke.* 2002; 33 (8): 1986–92.
77. Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, et al. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: the Nun Study. *JAMA.* 1997; 277 (10): 813–7.
78. Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, et al. Cerebral infarctions and the likelihood of dementia from Alzheimer disease pathology. *Neurology.* 2004; 62 (7): 1148–55.

Prispelo 28. 1. 2012

Gregor Rečnik¹

Diferencialna diagnoza bolečine v križu pri otrocih in mladostnikih

Differential Diagnosis of Back Pain in Children and Adolescents

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: hrbtenica, spondiloliza, ukleščenje medvretenčne ploščice, zlom apofiznega obroča

Epidemiološke študije so pokazale, da je bolečino v križu izkusilo že 50% otrok, mlajših od 15 let. V večini primerov gre za nenevarno mišično-vezivno bolečino, povezano bodisi z nošnjo pretežkih šolskih nahrbtnikov ali prekomerno športno aktivnostjo bodisi s prisilnim sedečim položajem in neaktivnostjo. Kadar bolečina v nekaj tednih ne izzveni, je treba začeti razmišljati o resnejši patologiji kostnega sistema – obolenjih hrbtenice. Pridruženi sistemski simptomi in znaki pri najmlajših vzbudijo sum na možno okužbo medvretenčnega prostora ali maligni proces. Nenadno nastala bolečina, ki se iz križa širi v spodnje okončine, je pri najstnikih pogosto povezana z zlomom apofiznega obroča in ukleščenjem medvretenčne ploščice. Ponavljajoča se bolečina v križu, ki se pojavi po športnem udejstvovanju in delno mine v obdobju mirovanja, je zelo sumljiva za spondilolizo. Pri starejšem fantu s topo, težko določljivo bolečino v križu in jutranjo okorelostjo bi lahko šlo za začetek ankilozantnega spondilitisa. V prispevku so predstavljeni najpomembnejši alarmantni znaki, ki nas v razmišljanju usmerijo proč od benignih mišično-vezivnih bolečin v smer resnejše, pogosto težko obvladljive patologije hrbtenice.

ABSTRACT

KEY WORDS: spine, spondylolysis, herniated disc, apophyseal ring fracture

Epidemiological studies have shown that about 50% of children younger than 15 years have already experienced low back pain. In most cases, this can be attributed to either wearing overweight school backpacks or excessive sports activity on the one hand, as well as to forced sedentary position and inactivity on the other. If the pain is still present after a few weeks, we should start thinking about a more serious pathology of the bone – spine diseases. Associated systemic symptoms and signs in the youngest should raise suspicion of a possible intervertebral space infection or malignancy. Sharp pain spreading to the lower extremities in a teenager is often associated with fracture of the apophyseal ring or herniation of the intervertebral disc. Recurring back pain that occurs after sports and partly diminishes during rest is very suspicious of spondylolysis. An older boy with morning stiffness and a dull low back pain that is difficult to determine, could be experiencing the start of ankylosing spondylitis. This paper presents the disturbing signs that alarm us to think about a more serious spinal pathology, which is often difficult to manage.

¹ Asist. dr. Gregor Rečnik, dr. med., Oddelek za ortopedijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor; gregorrecnik@yahoo.com

UVOD

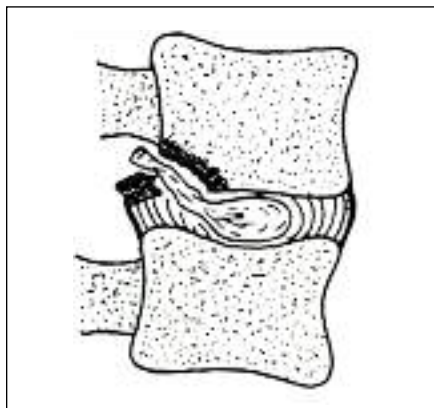
O bolečini v križu pri otrocih in mladostnikih se govori vse pogosteje, saj so epidemiološke študije pokazale, da ima epizodo tovrstne bolečine do 15. leta starosti kar 50 % otrok (1). Pri 90% od teh bolečina izzveni v naslednjih šestih tednih. Čeprav se število najstnikov, ki tožijo za bolečinami v križu, povečuje, je le majhen delež podvržen zdravstveni obravnavi in ustreznim diagnostičnim postopkom. Bolečina v križu pri najmlajših otrocih je še posebej zaskrbljujoča, saj je mogoče skoraj vedno dokazati klinično pomembno stanje, z zdravljenjem katerega ni pametno odlašati. Po drugi strani pa pri vsakem otroku, ki navaja bolečine v križu, ni treba (in tudi ni upravičeno) opraviti številnih slikovnih preiskav, ki so na voljo. Znano je, da že povečana masa v šolskem nahrbtniku poveča možnost za nastanek bolečine v križu pri šolajočem se otroku (2). Naloga zdravnika, ki med svojim rutinskim delom v ambulanti obravnava otroka ali mladostnika z bolečino v križu, je, da izlušči tiste posameznike, za katere obstaja realna možnost nezanimljive patologije in da v tem primeru sproži ustrezni diagnostični postopek oz. bolnika preusmeri v ortopedsko ambulanto.

ANAMNESTIČNE ZNAČILNOSTI BOLEČINE V KRIŽU

Pri razmejitvi, kateri otrok potrebuje nadaljnjo klinično obravnavo in kateri le simptomatsko zdravljenje z mirovanjem, blagimi protibolečinskimi sredstvi in fizioterapijo, nam je v pomoč usmerjena anamneza, predvsem podatki o značilnosti bolečine.

Akutna bolečina v križu po poškodbi

Akutna bolečina po poškodbi se lahko pojavi pri ukleščanju medvretenčne ploščice, zlomu apofiznega obroča ali pri pravem zlomu kosti. Pri otroku pride do zloma kosti ob visokoenergetski poškodbi z nenadno nastalo hudo bolečino v križu. Kadar pride do zloma kostne površine brez ustrezne intenzitete poškodbe, je treba razmisliti o vzporednem malignem obolenju.



Slika 1. Shematski prikaz odlomljenega kostno-hrstančnega koščka apofize z zdrsom le-tega nazaj v hrbtenični kanal (5).

Do ukleščanja medvretenčne ploščice pride pri starejših otrocih le občasno. Največkrat je povezano s poškodbo ali ponavljajočimi se obremenitvami ledvene hrbtenice. V 80 % se bolečina širi v spodnje okončine in se ojača pri kašljanju ali napenjanju (3). Zlom oz. zdrs apofiznega obroča se pojavi pri najstnikih in mladih odraslih. Takrat je vezivni obroč medvretenčne ploščice najbolj elastičen, apofiza krovne plošče pa je najšibkejši del medvretenčnega prostora. Nastane bodisi kot posledica nenadne aksialne obremenitve hrbtenice v predklonu, bodisi kot posledica ponavljajočih se manjših poškodb apofiznega obroča. Apofiza se običajno prelomi na stiku med hrstančnim obročem in kostnim delom v zadnjem spodnjem delu vretenca (slika 1). Odlomljeni hrstančno-kostni kos nato zdrsne v hrbtenični kanal ter povzroči hudo bolečino v križu, ki se nato, podobno kot pri ukleščanju medvretenčne ploščice, širi navzdol po spodnji okončini (4).

Počasi nastajajoča bolečina v križu

Počasi nastajajoča bolečina je značilna za Scheuermannovo bolezen in benigne neoplazme. Scheuermannova bolezen je razvojna motnja, ki se pojavi v najstniškem obdobju, za katero sta značilni povečani prsna kifoza in ledvena lordoza. Topa bolečina je prisotna na apeksu prsne krivine in v predelu ledvene hrbtenice. Ojača se po športni aktivnosti in po daljšem sedenju ter se ne širi v spodnje

okončine. Najstniki pogosto obiščejo ortopedsko ambulanto v spremstvu zaskrbljenih staršev predvsem zaradi slabe drža in pogosto zanikajo pomembne bolečine v hrbtenici.

Med benignih neoplazem, ki se pojavljajo v hrbtenici, velja na prvem mestu omeiniti osteoidni osteom. Gre za najpogostejši hrbtenični tumor pri otrocih z značilno bolečino ponoči, ki se po zaužitju Aspirina® delno pomiri. Anevrizmalna kostna cista je lokalno agresivna sprememba, ki se pogosto kaže s hudo bolečino v hrbtenici zaradi patološkega zloma. Podobno kot osteoblastom lahko vrašča v hrbtenični kanal in povzroča nevrološke simptome (motnje odvajanja in šibkost v spodnjih okončinah). Bolečina v križu, ki jo povzroča eozinofilni granulom, se v mirovanju ali z opornicami pogosto zmanjša (6).

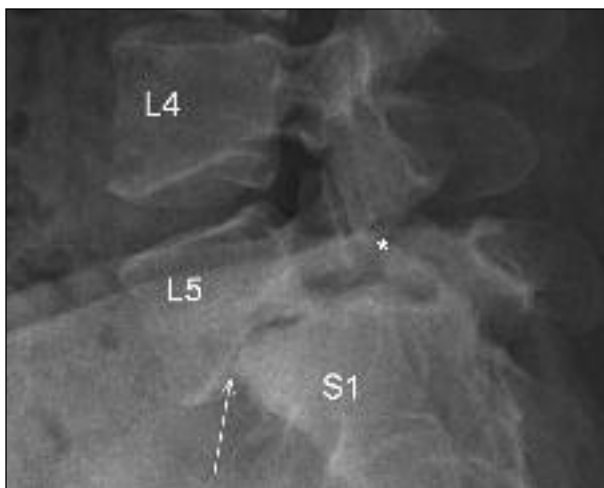
Ponavljajoča se bolečina v križu

Ponavljajoča se bolečina, ki se pojavi po športnem udeleževanju in delno mine v obdobju mirovanja, je sumljiva za utrujenostni prelom *pars interarticularis* oz. spondilolizo. Najpogosteje se pojavi na vretencih L5 (v 85%) in L4; obojestransko se pojavi v 80% in enostransko v 20%, zato moramo ob ugotovljeni spondilolizi na eni strani aktivno

iskati prelom tudi na drugi. Kljub temu da je prevalenca spondilolize v populaciji okoli 5%, študije nakazujejo, da je spondiloliza prisotna pri kar polovici vseh mladih športnikov z bolečino v križu, ki ne mine po nekaj tednih (7). Kadar se obremenitve iztegnjene ledvene hrbtenice ponavljajo, pride do majhnih poškodb interartikularnega dela vretenca, ki sčasoma vodijo v utrujenostni prelom tega predela. Tovrstnim poškodbam so podvrženi predvsem otroci v športnih aktivnostih, ki se izvajajo v položajih pretirane ekstenzije oz. zaklona ledvene hrbtenice (npr. gimnastiki, atletiki, nogometu, tenisu itd.). Bolečina se lahko iz križa širi v predel stegen (8). Ob neustrejni modifikaciji aktivnosti lahko pride pri obojestranski spondilolizi do zdrsa vretenca – spondilolisteze (slika 2).

Neobvladljiva bolečina v križu

Bolečina, ki ne mine po protibolečinskih sredstvih in ponoči zbudi otroka iz spanja, predstavlja najbolj alarmantno stanje, saj je pogosto povezana z okužbo ali malignim obolenjem (9). Bakterijska okužba medvretenčnega prostora se imenuje discitis in je najpogostejši vzrok za bolečino v križu pri otrocih, mlajših od petih let (slika 3). Pri predšolskih otrocih krvne žile prehajajo preko krovnih



Slika 2. Stranski rentgenski posnetek ledveno-križne hrbtenice s spondilolizo interartikularnega dela vretenca L5 (označeno z zvezdico) in posledičnim zdrsom vretenca (spondilolisteza) na nivoju L5–S1 pri 21-letnem dekletu (označeno s puščico).



Slika 3. Sagitalni in prečni magnetorezonančni posnetek ledvene hrbtenice z discitisom (označeno s puščico) na nivoju L4–L5 pri devetletnem fantu, ki je popolnoma ozdravel po dolgotrajnem antibiotičnem zdravljenju.

plošč vretenca in se končujejo v mehkem jedru medvretenčne ploščice, ki je tako zelo dovzetno za okužbo in razrast bakterij (10). Otroci ob tem, da navajajo hudo bolečino v križu, šepajo in ne želijo hoditi. Pogosto so prisotne tudi bolečine v trebuhu. Najpogostejši bakterijski povzročitelj discitisa je *Staphylococcus aureus*. Osteomielitis se razvije, če se okužba razširi na sosednje vretence – govorimo o infektivnem spondilitisu.

Prisotnost sistemskih simptomov in znakov

Pri določanju resnosti obolenja nam je najbolj v pomoč prisotnost oz. odsotnost sistemskih simptomov. Povišana telesna temperatura je prisotna v polovici primerov discitisa. Levkemija je najpogostejši maligni vzrok bolečine v križu pri otrocih (11). Bolečina v križu je lahko prvi simptom levkemije, zato je treba starše skrbno izprašati o utrujenosti, neješčnosti, izpuščajih ali podkožnih krvavitvah. Medtem ko je Ewingov sarkom tisti primarni tumor kosti, ki se občasno pojavi v vretencih, je najpogostejši zasevek v vretencih posledica razsoja nevroblastoma. Šibkost, nezmožnost hoje ali motnje občutkov po telesu lahko kažejo na tumor v hrbtenjači, najpogosteje astrocitom ali ependimom. Vprašanja o odvajanju vode in blata morajo biti usmerjena, saj mladostniki pogosto teh težav sami ne omenijo. Kljub temu da hrbtenjačne tumorje oskrbijo nevrokirurgi, jih pogosto spremlja bolečina v križu, zaradi česar so v 50 % pri-

merov primarno napoteni k specialistu ortopedske kirurgije (12).

Razdelitev vzrokov za bolečino v križu po starosti

Bolečina v križu pri majhnih otrocih je večinoma povezana z okužbo ali malignim obolenjem. Ob vročini, šepanju ali slabem počutju je treba hitro sprožiti diagnostični postopek. Otroci, starejši od desetih let, pogosteje navajajo bolečino v križu v povezavi s poškodbo ali preobremenitvami. Tako se kažejo spondiloliza, ukleščanje medvretenčne ploščice ali zlomi apofiznega obroča. Redko se v najstniškem obdobju na ta način predstavi maligno obolenje. Najstniki s slabo določljivo bolečino v križu, brez sistemskih ali nevroloških simptomov, ki niso pretirano športno aktivni, pogosto nimajo mišično-skeletnega vzroka za težave. Z izključitvijo drugih vzrokov lahko podamo diagnozo psihosomatske bolečine (6).

SESTAVLJEN HRBTENIČNI PREGLED

V kolikor deluje otrok že na prvi pogled bolan, je nujna takojšnja opredelitev morebitne okužbe ali malignega obolenja. Pomembno je ovrednotiti, ali otrok lahko sam hodi, saj nezmožnost hoje kaže na resno obolenje. S tipanjem trnastih odrastkov hrbtenice lahko določimo mesto patologije. Lokalizirana bolečina je lahko posledica benigne ali maligne neoplazme, spondilolize ali spondilolisteze.

Preverjanje gibljivosti ledvene hrbtenice

Z Adamsovim testom predklona ugotavljamo ukrivljenost hrbtenice vstran (skoliozo), ki pa je zelo redko vzrok bolečinam. Ponavadi gre za dodatni simptom osnovnega obolenja, ko se hrbtenica nagne vstran od dražječega procesa (npr. pri ukleščanju medvretenčne ploščice, malignih in benignih tumorjih). S predklonom preverjamo tudi gibljivost hrbtenice; normalno se prsna kifoza poudari, ledvena lordoza pa izravna.

Pri bolečinah se otrok upira gibanju hrbtenice in pri predklonu raje skrči kolena. Za spondilolizo je značilna bolečina pri zaklonu. Bolečina se okrepi, kadar se temu pridruži še rotacija ob hiperekstenziji hrbtenice.

Šoberjev test uporabimo za določitev omejitve obsega giba, tako da v predelu ledveno-križnične hrbtenice določimo v mediani liniji razdaljo 10 cm. Ob predklonu se v normalnih pogojih razdalja med mejnima točkama poveča vsaj še za 5 cm. Revmatološko obolenje, za katerega je značilno zmanjšanje gibljivosti v hrbtenici, ovrednoteno z manjšim razmikom trnastih odrastkov v predklonu, se imenuje ankilozantni spondilitis. Ponavadi gre za mlajšega moškega s topo, težko določljivo bolečino v križu in jutranjo okorelostjo. Kadar se pojavi pred 16. letom starosti, je povezano s hujšo obliko funkcionalne prizadetosti v odrasli dobi. Čeprav se lahko pojavi tudi pri ženskah, se takrat pojavi kasneje in v milejši obliki. Verjetnost ankilozantnega spondilitisa v populaciji je približno 1%. Kadar imamo pred sabo fanta s sumljivimi simptomi in znaki, ki je pozitiven za humani levkocitni antigen B27 in ima očeta s potrjeno boleznijo, se verjetnost dvigne na 30% (13).

Ugotavljanje prizadetosti nevroloških struktur v hrbtenici

Bolečina, ki se širi v ritnice ali noge, se lahko pojavi v sklopu ukleščanja medvretenčne ploščice, zloma apofiznega obroča, spondilolize, zdrsa vretenca ali hrbtenjačnega tumorja. Za opredelitev draženja korenine živca v hrbtenici, t. i. prave radikularne bolečine, opravimo test po Lasegue-Lazareviću (slika 4). Dvig spodnje okončine od podlage sproži ostro bolečino, ki se iz križa razširi po zadnji

strani spodnje okončine do goleni ali prstov na nogi. Manjši kot dviga spodnje okončine nakazuje hujše draženje korenine živca. Kadar v skrajni legi s potiskom stopala v dorzifleksijo izzovemo še ostrejšo bolečino, govorimo o pozitivnem Bragardovem znaku, ki je najbolj specifičen za draženje korenine živca v hrbtenici pri otrocih z ukleščanjem medvretenčne ploščice ali zlomom apofiznega obroča. Test natega stegenskega živca opravimo na trebuhu, tako da pokričimo koleno in ga nekoliko dvignemo od podlage. Je ekvivalenten testu po Lasegue-Lazareviću, kadar leži stisnjena korenina višje v ledveni hrbtenici (L2–L4) in se bolečina razširi po sprednji strani stegna do kolena (8).

Test po Lasegue-Lazareviću je negativen, kadar se bolečina razširi iz križa le do ritnic oz. stegen. Izvajanje testa tako povzroča bolečine v križu in stegnih pri otrocih z zategnjenimi mišicami zadnje stegenske lože ob zdrsu vretenca – spondilolistezi. Tudi test natega femoralnega živca je negativen, kadar je bolečina prisotna le v predelu križa ali ritnic, kar lahko opazimo pri spondilolizi ali spondilolistezi. Praviloma gre pri tem za preneseno in nikoli za pravo radikularno bolečino, razen v kasnejšem obdobju obolenja.

Kljub temu da je lahko bolečina zaradi pritiska medvretenčne ploščice na korenino živca zelo huda, jo le redko spremljajo nevrološki izpadi v spodnjih okončinah. Le-ti so pogostejši v primeru vraščanja tumorja v živčne strukture. Preverjamo moč palca noge, stopala in kolena, opredelimo motnjo občutljivosti na dotik in bolečino ter preskusimo



Slika 4. Shematski prikaz testa po Lasegue-Lazareviću. Ob dvigu iztegnjene spodnje okončine se bolečina v primeru pozitivnega testa, ki nakazuje utesnitev korenine živca v hrbtenici, razširi kot elektrika po zadnjem delu stegna, kolena in goleni vse do prstov na nogi.

patelarni in Ahilov refleksi; vedno primerjamo strani med sabo. Ob sumu na tumor v hrbtenjači, ki je sestavni del osrednjega živčevja, ocenjujemo povišan tonus mišičja, močno izražene reflekse, prisotnost klonusa v predelu gležnja, prisotnost znaka Babinski in prekusimo abdominalne reflekse (12). Pregled na tej stopnji ponavadi že opravi zdravnik specialist, usmerjen na področje nevropediatrije.

Orientacijska izključitev trebušne patologije

Vedno je treba pretipati tudi trebuh. Pogosto se z bolečinami v križu kažejo okužbe zgornjih sečil ali mesečno perilo pri deklicah (14). Tudi otroci z retroperitonealno ležečim vnetim slepičem pogosto navajajo bolečine v križu. Po drugi strani pa discitis pogosto spremljajo bolečine v trebuhu, kar je lahko pogojeno s tvorbo abscesa na sprednji strani hrbtenice.

DIAGNOSTIČNE PREISKAVE

S pomočjo podatkov, ki smo jih pridobili z anamnezo, in natančnim kliničnim pregledom odredimo usmerjene diagnostične preiskave. Kadar je otrok starejši od desetih let, če bolečine trajajo manj kot šest tednov in če med kliničnim pregledom ne najdemo odstopanj, potem lahko najstnika nekaj tednov opazujemo, ne da bi naročili dodatne preiskave. Standardne rentgenske posnetke hrbtenice moramo naročiti takoj, kadar je otrok mlajši od desetih let, če bolečina traja dlje od šestih tednov, če so prisotni sistemski simptomi in znaki (vročina, slabo počutje, mrzlica, šibkost ali izpuščaji) ali če otrok navaja izrazite bolečine ponoči (6). Žal večine otrok ne moremo preprosto razvrstiti v ti dve skupini, zato je odločitev o nadaljnjih diagnostičnih ukrepih individualna in zaupana v presojo lečečemu zdravniku.

Rentgenski posnetki

Standardni rentgenski posnetki so najboljši za orientacijsko oceno strukture hrbtenice. Na anteroposteriornih in stranskih posnetkih hrbtenice ocenjujemo ukrivljenost v obeh ravninah, opazujemo zožitev medvretenčnih prostorov, nepravilnosti v predelu krovnih plošč ter prisotnost osteolitičnih lezij. Na anteroposteriornih posnetkih moramo vide-

ti pedikle vseh vretenc, saj odsotnost pedikla močno poveča verjetnost za infiltrativni proces. Ob sumljivem posnetku naredimo še cilj- ni posnetek nejasnega vretenca. Na stranskih posnetkih opazujemo prisotnost spondilolize ali spondilolisteze. Ob sumu na spondilolizo opravimo še polstranske posnetke ledvene hrbtenice, ki bolje prikažejo interartikularni predel.

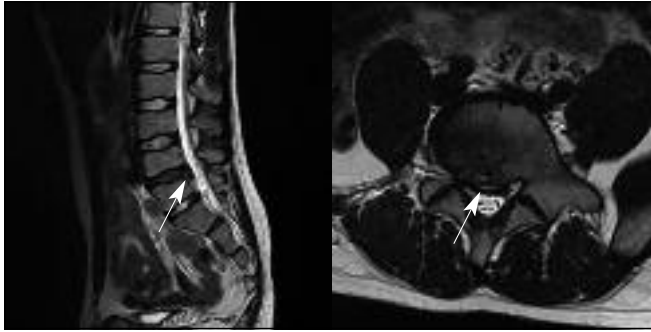
Kadar na stranskih posnetkih opazimo skoliozo, ji ne smemo prehitro pripisati vzročnega pomena, saj je lahko le naključna spremljevalna najdba. Idiopatska skolioza le v tretjini primerov povzroča blage bolečine v predelu prominirajočih reber na hrbtu, skoraj nikoli pa niso le-te v ospredju (15). Pri skoliozi z izrazitimi bolečinami moramo pozornost usmeriti na apeks krivulje, kjer se lahko nahaja benigna ali maligna kostna sprememba.

Scintigrafija skeleta

Kadar otrokovi simptomi opozarjajo na kostno patologijo, ob tem pa so standardni rentgenski posnetki normalni in nevrološki pregled ne odkrije nenormalnosti, je smiselno opraviti trifazno scintigrafijo okostja z radioaktivnim tehnejem. Scintigrafija je izredno občutljiva, vendar manj specifična preiskava za lokalizacijo kostne patologije. Zaradi povečane premene kosti se kot področje povečane aktivnosti prikažejo tako vnetja kot zlomi in večina kostnih tumorjev. Kot nadgradnja se vse pogosteje uporablja kombinacija z računalniško tomografijo, saj ta omogoča še natančnejšo lokalizacijo patologije. Povečano kopičenje radiofarmaka v posteriornih elementih hrbtenice zelo natančno pokaže mesto spondilolize.

Računalniška tomografija

Računalniška tomografija najbolje ovrednoti spremembe v kostnem delu hrbtenice. Uporabimo jo, kadar vidimo kostno patologijo na standardnem rentgenskem posnetku ali kadar scintigrafija skeleta pokaže intenzivno kopičenje v določenem vretencu. Preiskava je tudi uporabna za določanje nedotaknjenosti *pars interarticularis* pri otrocih s sumom na spondilolizo. Čeprav se kostne spremembe dobro vidijo tudi z magnetno resonanco, pa lahko zaradi spremljajočega edema kosti na ta način precenimo velikost kostne lezije (6).



Slika 5. Sagitalni in prečni magnetnoresonančni posnetek ukleščene medvretenčne ploščice (označeno s puščico) na nivoju L4–L5 pri 13-letnem fantu, ki je bil po osmih tednih nezadovoljivega konzervativnega zdravljenja uspešno operiran in rehabilitiran.

Magnetnoresonančno slikanje

Magnetnoresonančno slikanje se uporablja za slikovno diagnostiko hrbtenjače pri vseh otrocih z nevrološkimi nenormalnostmi. Z njo lahko ugotovimo neoplazmo v hrbtenjači, siringomielijo, discitis in ukleščanje medvretenčne ploščice (slika 5). Nekateri avtorji celo priporočajo, da se magnetnoresonančno slikanje opravi pri vseh otrocih, ki imajo bolečine v križu, trajajoče več kot šest tednov (16).

Laboratorijske preiskave

Pri otrocih z bolečino v križu, ki je izrazitejša ponoči, ali kadar spremlja bolečine povišana telesna temperatura, je nujno opraviti osnovne laboratorijske preiskave, kot so hemogram, določitev C-reaktivnega proteina in sedimentacije. Kadar opazimo izrazito šibkost otroka ali številne odrgnine po koži, moramo pomisliti na možnost levkemije in zato naročiti razmaz bele krvne slike. Ob sumu na ledvično patologijo opravimo tudi analizo urina. Sistemske znaki vnetja in prizadetost tudi drugih sklepov po telesu govorijo

o možnosti juvenilnega revmatoidnega artritisa – v tem primeru je smiselno v plazmi določiti revmatoidni faktor (11).

ZAKLJUČEK

Zdravnik, ki obravnava otroka z bolečino v križu, mora biti seznanjen s tistimi grozečimi simptomi in znaki, ki nakazujejo nezamisljivo hrbtenično patologijo, in se v danem trenutku ustrezno odzvati. V večini primerov lahko razložimo bolečine v križu s povsem banalnimi vzroki, kot sta nošnja težkega šolskega nahrbtnika ali nateg mišice pri športni aktivnosti. Po drugi strani pa so nočne bolečine v križu, ki jih spremlja vročina, še posebej pri otroku, mlajšem od desetih let, skoraj vedno odraz resnega hrbteničnega obolenja, bodisi vnetja bodisi tumorskega procesa, ki zato zahteva nujno diagnostično obdelavo. Ob dejstvu, da je bolečina v križu pri otrocih in mladostnikih v porastu, je postavitev utemeljenega suma, da gre za klinično resno obolenje, toliko pomembnejša.

LITERATURA

1. Burton AK, Clarke RD, McClune TD, et al. The natural history of low back pain in adolescents. *Spine*. 1996; 21 (20): 2323–8.
2. Sheir-Neiss GI, Kruse RW, Rahman T, et al. The association of backpack use and back pain in adolescents. *Spine*. 2003; 28 (9): 922–30.
3. Parisini P, DiSilvestre M, Gregg T, et al. Lumbar disc excision in children and adolescents. *Spine*. 2001; 26 (18): 1997–2000.

4. Takata K, Inoue S, Takahashi K, et al. Fracture of the posterior margin of a lumbar vertebral body. *J Bone Joint Surg Am.* 1988; 70 (4): 589–94.
5. Puertas EB, Wajchenberg M, Cohen M, et al. Avulsion fractures of apophysial ring («limbus») posterior superior of the L5 vertebra, associated to pre-marginal hernia in athletes. *Acta Ortop Bras.* 2002; 10: 25–30.
6. Karol LA. Back pain in children and adolescents. In: Herkowitz HN, Garfin SR, Eismont FJ, eds. *The spine.* Philadelphia: Saunders; 2011. p. 358–73.
7. Sassmannhausen G, Smith BG. Back pain in the young athlete. *Clin Sports Med.* 2002; 21 (1): 121–32.
8. Vengust R. Degenerativne bolezni ledvene hrbtenice in operativno zdravljenje. Celje: Mavrica; 2009.
9. Ginsburg GM, Bassett GS. Back pain in children and adolescents. Evaluation and differential diagnosis. *J Am Acad Orthop Surg.* 1997; 5 (2): 67–78.
10. Tay BKB, Deckey J, Hu S. Spinal infections. *J Am Acad Orthop Surg.* 2002; 10 (3): 18–97.
11. Luhmann SJ, Skaggs DL. Pediatric spine conditions. In: Lieberman JR, ed. *Comprehensive orthopaedic review.* Rosemont: AAOS; 2009. p. 245–65.
12. Parker AP, Robinson RO, Bullock P. Difficulties in diagnosing intrinsic spinal cord tumors. *Arch Dis Child.* 1996; 75 (3): 204–7.
13. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973; 288 (14): 704–6.
14. Selbst SM, Lavelle JM, Soyupak SK, et al. Back pain in children who present to the emergency department. *Clin Pediatr.* 1999; 38 (7): 401–6.
15. Ramirez N, Johnston CE, Browne RH. The prevalence of back pain in children who have idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79 (3): 364–8.
16. Auerbach JD, Ahn J, Zgonis MH, et al. Streamlining the evaluation of low back pain in children. *Clin Orthop.* 2008; 466 (8): 1971–7.

Prispelo 13. 2. 2012

Irena Zupanič Pajnič¹

Molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov

Molecular Genetic Identification of Skeletal Remains

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: skeletni ostanki, kratke tandemske ponovitve, mitohondrijska DNA, množična grobišča, druga svetovna vojna

Prispevek na pregleden način predstavlja osnove genetskih preiskav DNA, pridobljene iz skeletiziranih človeških posmrtnih ostankov na primeru molekularnogenetskih identifikacij žrtev druge svetovne vojne, ki jih opravljamo v Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete v Ljubljani. V prispevku podajamo lastnosti DNA, pridobljene iz starih kosti in zob, ter dejavnike, ki vplivajo na njeno ohranitev. Opisana so priporočila za izkop in shranjevanje posmrtnih ostankov za nadaljnjo genetsko identifikacijo, priporočila za zbiranje vzorcev še živečih sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko ter priporočila za molekularnogenetsko identifikacijo skeletnih ostankov. Natančno opredeljujemo, katere kosti in zobje so najprimernejši za genetske preiskave in kakšni so ukrepi za preprečevanje kontaminacije endogene DNA kosti in zob. Opisan je postopek ekstrakcije genske DNA, postopek določitve količine DNA v vzorcu, postopki za pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in haplotipom mitohondrijske DNA ter metode statističnega ovrednotenja verjetnosti sorodstvenih povezav ob ujemanju genetskih profilov kosti ali zob s še živečimi sorodniki.

ABSTRACT

KEY WORDS: skeletal remains, short tandem repeat, mitochondrial DNA, mass graves, World War II

This review article describes genetics investigations of DNA from human skeletal remains. In the molecular genetic laboratory at the Institute of Forensic Medicine, molecular genetic identifications of the World War II mass grave victims are performed. The characteristics of ancient DNA and the environmental factors which affect its preservation are described. The recommendations for excavation, storage and molecular genetic identification of skeletal remains are presented. Reference samples from relatives and samples for the elimination database are collected and analyzed for each mass grave. The most appropriate type of bones and teeth for genetic analyses are described and the measures for preventing contamination are listed. Procedures for DNA extraction, DNA quantification, DNA typing of autosomal microsatellites, Y chromosome microsatellites and mitochondrial DNA are described and statistical calculations of match probability are exposed.

¹ Viš. znan. sod. doc. dr. Irena Zupanič Pajnič, univ. dipl. biol., Laboratorij za molekularno genetiko, Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; irena.zupanic@mf.uni-lj.si

UVOD

V živi celici encimski procesi skrbijo za to, da ostaja DNA neokrnjena (1). Po smrti organizma se ravnovesje v celici poruši in DNA je izpostavljena razgradnji z nukleazami celičnih lizosomov ter razgradnji z bakterijami in glivami, ki se prehranjujejo z makromolekulami (2). Ob vezavi DNA na mineralno osnovo kosti in zob se encimska in mikrobnna razgradnja upočasnjuje, zato se lahko DNA ohrani tudi v zelo starih skeletnih ostankih. Vendar je pogosto razgrajena na fragmente, katerih dolžina je med 100 in 500 baznih parov (bp) (3, 4). Ohranjenost DNA v skeletnih ostankih s starostjo pada, vendar vedno temu ni tako, saj na ohranitev DNA v največji meri vpliva okolje, v katerem se skeletni ostanki nahajajo (4–6). Najpomembnejši dejavniki okolja so temperatura, vlažnost, pH, kemijske lastnosti zemlje in prisotnost mikroorganizmov. Hitra izsušitev posmrtnih ostankov omogoča boljše ohranitev DNA, prav tako na ohranitev DNA pozitivno vpliva nizek nivo izpostavljenosti ultravijoličnemu (UV) sevanju. DNA se bolje ohrani v zemlji z visoko koncentracijo soli, nevtralnimi ali rahlo bazičnim pH, nizko vsebnostjo huminskih kislin in nizko vlažnostjo (1, 7, 8). Ključni dejavnik ohranitve DNA pa je vsekakor temperatura okolice, v kateri so se skeletni ostanki nahajali od smrti organizma do izkopa oziroma do molekularnogenetskih preiskav. Nizke povprečne letne temperature omogočajo najboljšo ohranitev DNA, zato najdemo najboljše ohranjeno DNA v bioloških vzorcih, najdenih v jamah in trajno zamrznjenih tleh (9, 10). Na količino in kakovost DNA v skeletnih ostankih pa vpliva tudi način njihovega shranjevanja po izkopu (11, 12). Uspešnost genetske tipizacije je večja pri sveže izkopanih skeletih kot pri skeletih, ki so bili več let shranjeni pri sobni temperaturi (npr. v muzejskih zbirkah), zlasti zaradi višjih temperatur okolice in umivanja skeletnih ostankov pred njihovim shranjevanjem, kar zmanjša pH in koncentracijo soli v kosteh. Za čim daljšo ohranitev DNA v skeletnih ostankih je najprimernejše njihovo zamrzovanje (13). Za molekularnogenetske preiskave so najprimernejše dolge kosti in zobje, v katerih se DNA najdlje ohrani (14–16).

Zaradi močno razgrajene DNA, pridobljene iz skeletnih ostankov, so molekularnoge-

netske preiskave zasnovane na zelo kratkih polimorfnihih odsekih jedrne in mitohondrijske DNA (mDNA). Tipi polimorfizmov, ki jih preiskujemo, so natančno opisani v tretji številki 50. letnika Medicinskih razgledov (17). Poleg avtosomskih mikrosatelitov in mikrosatelitov, vezanih na kromosom Y, se poslužujemo tudi preiskav sekvenčnih polimorfizmov kontrolne regije mitohondrijske DNA. Ta se v celici nahaja v številnih kopijah, kar ji omogoča daljšo ohranitev v starih skeletnih ostankih v primerjavi z jedrno DNA (4, 18–20). V metabolno aktivnih celicah najdemo od 1.000 do 10.000 molekul mDNA. Krožna oblika in mitohondrijska ovojnica ščitita mDNA pred razgradnjo z eksonukleaznimi encimi, zato je manj podvržena razgradnji kot jedrna DNA (21). Mitohondrijska DNA se pri človeku deduje po materi in se za razliko od kromosoma Y, ki se deduje po očetu (sledimo lahko očetovi liniji), prenese na vse njene potomce ne glede na spol, kar nam omogoča sledenje materini liniji. Zaradi odsotnosti rekombinacije in dedovanja po materi oz. očetu imajo osebe z enakimi zaporedji nukleotidov mDNA skupnega ženskega prednika in osebe z enakimi haplotipi kromosoma Y skupnega moškega prednika (22). To je osnova za identifikacijo skeletnih ostankov s pomočjo analize mDNA in kromosoma Y. Stopnja identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo mDNA in s preiskavo mikrosatelitov kromosoma Y, je zaradi odsotnosti rekombinacije veliko nižja od stopnje identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo mikrosatelitov avtosomske jedrne DNA. S tipizacijo mDNA in kromosoma Y lahko identificiramo le maternalno in paternalno linijo, medtem ko nam mikrosateliti avtosomske jedrne DNA omogočajo individualizacijo posameznika. Zato preiskujemo pri identifikaciji starih skeletnih ostankov, če je to le mogoče, tako polimorfizme jedrne DNA (avtosome in kromosom Y) kot polimorfizme mDNA (23).

Pri tipizaciji DNA starih skeletnih ostankov se poleg močno razgrajene DNA srečujemo tudi z zelo majhnimi količinami endogene DNA, ki jo težko razlikujemo od veliko pogostejše sodobne (eksogene) DNA. Prav ta kontaminacija je resen problem pri preiskavah DNA, pridobljene iz starih skeletnih ostankov (3, 24–27). Do kontaminacije endo-

gene DNA kosti in zob s sodobno DNA lahko pride ob izkopu, ob neprimernem shranjevanju skeletnih ostankov ter ob antropoloških in molekularnogenetskih preiskavah (28). Zato je treba upoštevati priporočila za preprečevanje kontaminacije in kriterije, ki potrjujejo verodostojnost pridobljenih genetskih profilov (4, 29). Zelo pomembno je, da vzporedno z vzorci kosti in zob testiramo tudi ekstrakcijske in pomnoževalne negativne kontrole ter osebe, ki je sodelovalo pri izkopu, shranjevanju in antropoloških ter genetskih preiskavah, kar nam omogoča sledenje kontaminaciji v primeru, da do nje pride. Za posamezen skelet je treba tipizirati vsaj dva vzorca in iz obeh je treba pridobiti identične genetske profile (30).

Molekularnogenetske identifikacije skeletnih ostankov bomo prikazali na primeru žrtev povojnih množičnih pobojev v Sloveniji iz časa druge svetovne vojne. Komisija Vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč je v zadnjih letih evidentirala preko 600 grobišč iz tega obdobja (31). Natančnih podatkov o številu žrtev v grobiščih ni, po mnenju zgodovinarja Jožeta Dežmana naj bi jih bilo okoli 100.000. Za večino grobišč ni nobenih dokumentov, na osnovi katerih bi lahko opravili molekularnogenetsko identifikacijo. Izjemo predstavljajo redka grobišča, največje med njimi je grobišče pri breznu Konfin I, za katerega je bilo mogoče iz ohranjenih arhivskih virov sestaviti seznam 88 žrtev (32). V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino smo genetsko obdelali in pozitivno identificirali žrtve treh grobišč, za katera so bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živčih sorodnikov. To so grobišča Konfin I, Storžič in Bodoveljska grapa. Za Konfin I smo pozitivno identificirali 32 žrtev, za Storžič 3 žrtve in za Bodoveljsko grapo 7 žrtev (23, 33–37).

SKLETIZIRANI POSMRтни OSTANKI

Zobje

V primerjavi s kostmi je DNA v zobeh bolj zaščiten, saj predstavljajo trda zobna tkiva, ki obdajajo pulpno votlino, fizično zaščito zob-

ne pulpe (38). Trda zobna tkiva se ohranijo v številnih ekstremnih okoljih, saj niso podvržena hitri razgradnji po zakopu, raztapljanju v vodi in prenesejo temperaturo do 1.100 °C (39). Garcia s sodelavci je preučeval vpliv okolja na razgradnjo DNA v zobeh in ugotovil, da pride do razgradnje DNA najhitreje v vodi, nato v zemlji, najpočasneje pa na zraku (40). V starih zobeh je DNA izredno stabilna, saj je, podobno kot v starih kosteh, vezana na hidroksiapatit (41).

Najbogatejši vir DNA v zobeh predstavlja zobna pulpa. Ta je v pulpni votlini dobro zaščiten, vse dokler je zob trdno zasidran v alveolni kosti. Če je zob shranjen v suhem okolju, pride do dehidracije zobne pulpe in mumifikacije, kar zaustavi nekrotične in gnilobne procese in omogoča dobro ohranjenost DNA. Če obehalni aparat zoba popusti in je mikrookolje vlažno, pulpa hitro zgine. Tako že tri tedne po pokopu zoba v zemljo Schwartz zaradi uničenja zobne pulpe ni več uspel pridobiti jedrnega profila, Pfeiffer pa ugotavlja 90 % zmanjšanje količine jedrne DNA po šestih tednih v zemlji (38, 42). V primerih, ko je posmrtni interval dolg in je verjetnost razgradnje zobne pulpe velika, lahko opravimo tipizacijo mDNA, katere glavni vir je dentin – ostanki podaljškov odontoblastov v dentinskih kanalih, pa tudi cementociti v cementu (43, 44). Največ DNA dobimo iz zoba, če cel zob zmeljemo, saj zajamemo tudi DNA, ki se nahaja v trdih zobnih tkivih (39). Količina DNA je odvisna od velikosti zobne pulpe oziroma skupine zob, zato so kočniki najbogatejši vir DNA. Za izolacijo DNA si zobje po primernosti sledijo v naslednjem vrstnem redu: endodontsko nezdravljeni kočnik, ličnik, podočnik in sekalec ter endodontsko zdravljeni kočnik, ličnik, podočnik in sekalec (45). Za identifikacijo žrtev množičnih grobišč Boles s sodelavci priporoča uporabo zob, saj je te lažje transportirati kot kosti in omogočajo pridobitev kakovostne genomske DNA (46).

Mörnstad je je v dveh ločenih postopkih izoliral DNA iz zobne pulpe in dentina in pri preiskovancih ugotavljal vpliv kronološke starosti na količino mDNA v dentinu (47). Opazil je upadanje količine mDNA s starostjo, kar je v skladu z degenerativnimi starostnimi spremembami podaljškov odontoblastov in zapiranjem dentinskih kanalov s kristali

kalcijevega fosfata. Vendar tudi po razkroju podaljškov odontoblastov ostane v dentinu med kristali kalcijevega fosfata ujetje dovolj mDNA za uspešno molekularnogenetsko identifikacijo. Količina DNA v endodontsko zdravljenem – polnjenem zobu je 100-krat manjša kot v vitalnem zobu, vendar dovolj velika za uspešno pomnožitev z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Prisotnost DNA v endodontsko oskrbljenem zobu kaže na prisotnost DNA v trdih tkivih zoba (dentin in cement), saj je bila zobna pulpa odstranjena. Prisotnost kariesa in plombirnih materialov na ekstrakcijo DNA in njeno pomnoževanje ne vpliva, zato plombirnih materialov pred mletjem zoba ni treba odstranjevati (39). V primeru eksplozij ali letalskih nesreč je pogosto treba opraviti molekularnogenetsko identifikacijo iz fragmentiranih zob.

Gaytmenn in Sweet sta ugotavljala, kateri del zoba vsebuje največ DNA (48). Zob sta v raziskavi razdelila na štiri dele: grizno in vratno polovico zobne krone ter na vratni dve tretjini korenine in apikalno tretjino korenine. Ugotovila sta, da je najvišja koncentracija DNA v vratnih dveh tretjinah korenine (zobna pulpa, dentin in cement), sledita vratni del krone (zobna pulpa, dentin in sklenina) ter apikalna tretjina korenine (zobna pulpa, dentin in cement), najmanj DNA pa je v grizni polovici krone (dentin, sklenina in morda divertikli zobne pulpe). Sama količina DNA se tako med posamezniki kot med skupinami zob močno razlikuje, količina in kakovost izolirane DNA pa je odvisna tudi od patološkega stanja zoba, zobozdravstvenih posegov, časa, ki je pretekel od ekstrakcije zoba do izolacije DNA, in starosti donorja (42). Tsuchimochi je z metodo Chelex uspešno izoliral genomsko DNA iz zob (zobne pulpe), ki jih je za 2 minuti izpostavil temperaturi 300 °C, zelo dobre rezultate pa je s to metodo dosegel tudi pri identifikaciji zoglenelih trupel (49). Pri izpostavljenosti zoba temperaturam 500 °C ali več je prišlo do karbonizacije zobne pulpe in posledičnega uničenja DNA. Sweet je pri zoglenem truplu iz zobne pulpe neizraslega modrostnega zoba pridobil 1,35 µg DNA (50). Iz sveže izpuljenih in nepoškodovanih kočnikov, ki sta jih zmlela v prah, sta Sweet in Hildebrand ekstrahirala 0,5–97,5 µg DNA (pov-

prečno 30 µg), Schwartz pa 15–20 µg DNA (39, 42). Sweet je pridobil mikrosatelitski jedrni profil iz zob trupla, ki je bilo ekshumirano 3,5 let po pokopu, Alvarez Garcia pa iz zob, starih do 50 let (40, 51). Boles je iz zob trupel, izkopanih 10 let po pokopu, pridobil 10–50 ng DNA na posamezen zob in uspešno tipiziral mDNA (46). Baker je pridobil mDNA iz 3.000 let starih zob (52). V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti 11 ng DNA/g zobnega prahu in kompletne jedrne genetske profile iz preko 300 let starih zob, izkopanih v Auzerspergovi kapeli na tržnici v Ljubljani (Rezultati še niso objavljeni).

Kosti

V kostnem tkivu se DNA nahaja v osteocitih, ki so obdani z mineralizirano kostno maso. V enem mm³ kosti je 20.000–26.000 osteocitov (53). Kostnina je tkivo, zgrajeno iz celic in medceličnine. Medceličnino sestavljajo organske (predvsem kolagen tipa I) in anorganske sestavine (najpogostejši so kalcijevi in fosfatni ioni, prisotni pa so še bikarbonatni, magnezijevi, kalijevi in natrijevi ioni). Kalcijevi in fosfatni ioni tvorijo kristale hidroksiapatita, iz katerih so plošče, ki ležijo vzdolž kolagenskih vlaken. Povezava kolagenskih vlaken s kristali zagotavlja trdnost in odpornost kostnine. Če kost dekalciniramo, sicer ohrani obliko, vendar postane mehka in upogljiva. Če pa odstranimo organsko medceličnino, kost prav tako ohrani obliko, vendar postane krhka in lomljiva (54). Kemp in Smith sta zagovornika hipoteze, ki pravi, da omogoča stabilnost DNA in njeno ohranitev v starih skeletnih ostankih vezava DNA na hidroksiapatit, ki predstavlja glavno kostno maso (55). Mehanizem vezave DNA na hidroksiapatit je negotov, predvidevajo pa, da se negativno nabite fosfatne skupine molekule DNA vežejo na hidroksilna mesta na hidroksiapatitu. To hipotezo potrjuje dejstvo, da se ob povečani degradaciji hidroksiapatita ohrani v kosti manj DNA. Močna vezava kolagenskih in nekolagenskih proteinov na hidroksiapatit prepreči razgradnjo hidroksiapatita, do katere bi sicer zaradi zunanjih vplivov (temperatura in različni kemijski dejavniki) lahko prišlo.

Za preiskavo DNA iz skeletnih ostankov so po mnenju Edsona s sodelavci najprimernejše dolge kosti, zlasti stegnenice in kosti

reber, sledijo golenice in kosti vretenc, medenične kosti, nadlahtnice, lopatice in čeljusti z zobmi, med najmanj primerne za genetske preiskave pa Edson s sodelavci šteje kosti lobanje (16). S primerjalno študijo uspešnosti tipizacije jedrne DNA na skeletnih ostankih (tipizirali smo zobe, stegnenice in golenice) iz masovnih grobišč druge svetovne vojne smo v našem laboratoriju ugotovili, da so za tipizacijo DNA najprimernejši zobje, tem sledijo stegnenice in slednjim golenice (56). Do podobnih zaključkov sta prišla tudi Miloš s sodelavci in Misner s sodelavci (14, 15).

Prve uspešno izvedene preiskave DNA, pridobljene iz nekaj mesecev do deset let starih kosti, so opravili Lee, Hochmeister in Hagelbergova (53, 57–60). Sledili so jim številni raziskovalci in v odvisnosti od starosti in stopnje poroznosti kosti analizirali jedrne mikrosatelite ali polimorfizme mDNA (14, 34, 37, 61–81). Hagelbergova je pri molekularno antropoloških preiskavah kosti, starih od 300 do 5.500 let, ugotovila, da je ohranjenost DNA v kosteh odvisna predvsem od pogojev, v katerih so se skeletni ostanki nahajali, manj pa od same starosti skeletnih ostankov (59). Lee je iz nekaj mesecev stare kosti brez predhodne dekalcinacije pridobil od 0 do 500 ng DNA/mg kosti, Hochmeister je iz nekaj mesecev do 11 let starih kosti s predhodno dekalcinacijo pridobil od 25 ng do 3,3 µg DNA/g kosti, Yamamoto je iz 16 let starega skeleta novorojenca iz 1 g stegnenice pridobil 5 ng DNA, Seo je iz 10 let starih skeletnih ostankov novorojenca pridobil iz 1,5 g kosti 6 µg DNA, Tahir pa iz 27 let starega ekshumiranega skeleta 8 ng DNA/g kosti (57, 53, 61, 62, 80). V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti do 100 ng DNA/g kostnega prahu in kompletne jedrne genetske profile iz 65 let starih kosti, izkopanih iz povojnega množičnega grobišča v kraški jami Konfin I (34, 35).

V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino izberemo za genetsko preiskavo za vsak skelet iz posameznega povojnega grobišča eno dolgo kost (najprimernejša je stegnenica) in dva zoba (po možnosti dobro ohranjena in endodontsko nezdravljena kočnika), kar je mogoče le ob izkopu skeletov v anatomski legi. Če izkop skeletov ni bil opravljen v anatomski legi, izberemo za molekularnogenetske preiskave vse

leve ali vse desne stegnenice, najdene v grobišču. Ves skeletni material fotodokumentiramo in primerno označimo ter zamrznemo do postopka izolacije DNA.

UKREPI ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE DNA

Kemijski in biološki dejavniki okolja, ki so jim človeški posmrtni ostanki izpostavljeni, povzročajo razgradnjo genetskega materiala in kontaminacijo z DNA bakterij in gliv. Tovrstnih sprememb DNA, ki v največji meri vplivajo na uspešnost tipizacije jedrne ali mDNA, ne moremo preprečiti. Preprečimo pa lahko najnevarnejši tip kontaminacije, to je kontaminacija s človeškim biološkim materialom oz. sodobno DNA. Zaradi nizke vsebnosti DNA in njene razgrajenosti v starih bioloških materialih so tovrstni vzorci zelo dovzetni za kontaminacijo s sodobno DNA. V reakciji PCR sodobna DNA tekmuje z endogeno DNA kosti in zob in končni rezultat tipizacije je v najslabšem primeru genetski profil sodobne – kontaminacijske DNA (55). Do kontaminacije s sodobno DNA lahko pride pri izkopu in shranjevanju skeletov ali med samo tipizacijo v laboratoriju. Najpogostejša je površinska kontaminacija zaradi neprimerne rokovanja (prijemanje skeletnih ostankov brez sterilnih zaščitnih laboratorijskih rokavic). Površinsko kontaminacijo odstranjujemo z različnimi metodami. Med njimi so najpogostejše spiranje v vodi, detergentu, kislini, etanolu ali belilu, obsevanje z UV-svetlobo, pri kosteh fizično odstranjevanje površine in kot zadnja, pridobitev DNA iz materiala, odvzetega iz notranjosti kosti ali zoba. Za učinkovito odstranjevanje površinske kontaminacije se običajno uporabljajo različne kombinacije naštetih tehnik.

Uporabo belila (natrijev hipoklorid, NaOCl) kot sredstva za odstranjevanje kontaminacije iz površine starih kosti ali zob je preučeval Kemp (55). Ugotovil je, da belilo uniči kontaminacijsko DNA na površini kosti ali zob, če je pred izolacijskim postopkom vzorec vsaj 15 min obdeloval s 3–6 % belilom. NaOCl z oksidativnim delovanjem razcepi kontaminacijsko DNA na kratke fragmente ali celo posamezne baze, kar sta dokazala Prince in Andrus z neuspelim pomnoževanjem 76 bp

dolgega fragmenta DNA, obdelane z 10 % NaOCl (belilo Clorox) (82). Za endogeno DNA je Kemp ugotovil, da ostane nepoškodovana, tudi če je kost obdeloval s 6 % belilom 21 ur (55). Vzrok za to je izredna stabilnost DNA, ki je v stari kosti verjetno vezana na hidroksiapatit. Ta ščiti DNA pred kemijsko razgradnjo.

Fizično odstranjevanje površine kosti ali izrezovanje materiala iz notranjosti za učinkovito odstranitev površinske kontaminacije po Kempovem prepričanju ni zadostno, saj lahko kontaminacijska DNA prodre globlje v kost (55). Zato je treba ti dve tehniki kombinirati z drugimi tehnikami. Kemp celo priporoča za dekontaminacijo površine le 15-minutno spiranje v 6 % belilu, kar je po njegovem mnenju najučinkovitejše, najhitrejše in cenovno vsem dostopno (55). Belilo je iz kosti ali zob odstranil z večkratnim zaporednim spiranjem (1–2 minuti) z ultračisto, bidestilirano vodo. S to tehniko je učinkovito odstranil površinsko kontaminacijo iz 500–10.000 let starih skeletnih ostankov.

Rennick je preučeval vpliv različnih tehnik za odstranjevanje mehkega tkiva iz površine kosti na razgradnjo endogene DNA (83). Ugotovil je, da štiriurno kuhanje v 3 % raztopini belila povzroča degradacijo endogene DNA, medtem ko kuhanje v vodi ali v vodni raztopini detergenta (Alconox) in natrijevega karbonata (ohranja bazičnost raztopine) na endogeno DNA ne vplivata razgrajevalno. Zato za odstranjevanje mehkega tkiva iz površine kosti namesto belila priporoča uporabo detergenta Alconox.

Pri zobeh je zobna pulpa, ki je glavni vir DNA, zaprta v pulpni votlini in obdana s trdimi tkivi (sklenina, dentin in cement), zato je manj izpostavljena kontaminaciji (49). Večina raziskovalcev uporablja za dekontaminacijo površine zob zaporedno spiranje v detergentu, etanolu in vodi ter obsevanje z UV-svetlobo (39, 48, 52). Če je zob poškodovan (zlomljen ali prizadet z zobno gnilobo), njegovo površino dekontaminiramo le s spiranjem v vodi in obsevanjem z UV-svetlobo (39).

Poleg površinske kontaminacije s sodobno DNA je možna še kontaminacija s predhodnimi produkti reakcije PCR ali kontaminacija reagentov, plastike in druge laboratorijske opreme. Pri molekularnogenetskih preiska-

vah za preprečevanje kontaminacije s sodobno DNA v Laboratoriju za molekularno genetik Inštituta za sodno medicino vedno sledimo mednarodnim priporočilom (4, 22, 29, 30, 55, 64, 65, 84–89). Za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije v genetskem laboratoriju upoštevamo veliko ukrepov, med katerimi so najpomembnejši naslednji:

- Da vzorca ne kontaminiramo z lastnim biološkim materialom, pri delu uporabljamo čiste laboratorijske rokavice, ki jih pogosto menjavamo, kirurško masko za nos in usta (prepreči kontaminacijo s slino ob kašljanju, kihanju ali govorjenju), zaščitno kapo in očala ter svež laboratorijski plašč. Pri obdelavi kosti in zob z nizko vsebnostjo DNA uporabljamo dvojne laboratorijske rokavice. Rokavice pri obdelavi različnih vzorcev menjavamo, da ne kontaminiramo vzorcev med seboj.
- Vse laboratorijske površine pred končanim delom in po njem očistimo s komercialno dostopnim razkužilom, vodo in etanolom, pri čemer uporabimo papirnate brisače za enkratno uporabo. Površine očistimo tudi med vzorčenjem in obdelavo različnih skeletnih elementov.
- Uporabljamo vodo in laboratorijsko plastiko, za katero proizvajalec zagotavlja, da je prosta DNA (ne vsebuje DNA).
- Vse orodje za čiščenje, brušenje in mletje kosti in zob pred uporabo umijemo z 10 % detergentom Alconox (Alconox Inc.), sterilno bidestilirano vodo in 80 % etanolom ter ga steriliziramo.
- Vse reagente, orodje in laboratorijsko plastiko po steriliziranju preko noči postavimo pod UV-svetlobo. Dodatno jih obsevamo z UV-svetlobo še vsaj 30 minut pred uporabo.
- Za vsak vzorec kosti ali zob uporabimo čisto in sveže orodje.
- Za vsak vzorec uporabimo sveže sterilne rokavice, ki jih po potrebi med obdelavo posameznega vzorca tudi menjavamo.
- Z rokavicami na rokah se ne dotikamo obraza.
- Vzorce DNA, pridobljene iz kosti ali zob, analiziramo ločeno od referenčnih vzorcev ali vzorcev za eliminacijsko podatkovno zbirko od postopka izolacije DNA pa vse do končnih rezultatov tipizacije.

- Kontaminacijo s predhodnimi produkti reakcije PCR preprečimo s fizično ločitvijo prostorov, kjer kosti in zobe čistimo in meljemo, od tistih, kjer izoliramo genomsko DNA, pripravljamo reakcijske mešanice za PCR in analiziramo produkte pomnoževanja. Po končani reakciji PCR se produkti iz analitskega prostora nikoli ne vračajo v prostor za pripravo kosti in zob, prostor za izolacijo DNA ter prostor za pripravo reakcijskih mešanic za PCR. Postopke pred reakcijo PCR in po njej je treba izvajati v ločenih prostorih.
- Vse reagentne shranjujemo v skladu z navodili proizvajalca.
- Vzoredno z DNA kosti in zob v reakciji PCR pomnožujemo negativno kontrolo, katere pomnožitev nas bi opozorila na kontaminacijo reagentov ali laboratorijske plastike s predhodnimi produkti pomnoževanja ali kontaminacijsko DNA.
- Negativne kontrole vključimo tudi v sam postopek izolacije genske DNA, s čimer preverjamo čistost uporabljene laboratorijske plastike in izolacijskih reagentov.
- Vzoredno z DNA kosti in zob pri mDNA sekvenciramo tudi negativno kontrolo.
- Uporabljamo nastavke za pipete s filtri, ki preprečujejo aerosolno kontaminacijo in so bili pred uporabo vsaj 30 minut izpostavljeni delovanju UV-svetlobe.
- V prostoru, kjer kosti in zobe čistimo in meljemo ter iz njih izoliramo DNA, ne obdelujemo bioloških materialov, ki vsebujejo velike količine DNA (npr. kri, slina), pač pa je ta prostor namenjen izključno delu s starimi kostmi in zobmi.
- Pri kosteh in zobeh izolacije in pomnoževanje ponovimo dvakrat, s čimer preverimo identičnost dobljenih rezultatov.
- mDNA vedno sekvenciramo v obe smeri, s čimer zagotovimo pravilnost določitve nukleotidnega zaporedja.

IZKOP SKELETNIH OSTANKOV IN NJIHOVO SHRANJEVANJE

Stari skeletni ostanki vsebujejo zelo malo DNA ali je ta močno razgrajena. Zato je pravičen pristop k izkopu skeletnih ostankov, antropološki obdelavi in shranjevanju tovrstnega biološkega materiala za uspešnost genetske identifi-

kacije ključnega pomena. Nepravilni postopki pri rokovanju s skeletnimi ostanki in njihovo neprimerno shranjevanje lahko privedejo do kontaminacije in razgradnje endogene DNA kosti in zob, posledica česar so napačni rezultati molekularnogenetskih analiz ali neuspešna analiza (23, 90).

Pri izkopu skeletnih ostankov je z vidika nadaljnjih genetskih preiskav treba upoštevati troje. Obvezna je uporaba čistih rokavic, previdno ravnanje v smislu biološke kontaminacije (ob prehladu, kašljanju ali kihanju je treba nositi masko za usta in nos) in shranjevanje skeletnih ostankov v zračne zaboje. Ni primerna uporaba vreč iz neprodušne umetne mase, saj se v njih kosti ne morejo sušiti in lahko pride do gnitja in razpadanja. Znotraj zaboja naj bodo posamezni anatomske deli skeleta (npr. lobanja z zobmi) dodatno zaščiteni tako, da so shranjeni v čiste papirnate vreče, ki morajo biti ustrezno označene (opremljene z evidenčnimi številkami skeleta, ki mu lobanja pripada). Najprimernejši je navaden papir, ki ni odišavljen in kemično obdelan. Skeletne ostanke je treba ustrezno dokumentirati (označiti in fotografirati) in shranjevati v čistih, zračnih in suhih prostorih, kjer so za razvoj mikroorganizmov slabši pogoji (91).

Za antropološko obdelavo skeletnih ostankov je najprimerneje antropologa oskrbeti z razkužilnimi sredstvi, laboratorijskimi rokavicami, kapami, maskami in plašči za enkratno uporabo ter ga seznaniti s pravilnim načinom rokovanja s skeletnimi ostanki (uporaba zaščitnih oblačil, razkuževanje delovne površine in inštrumentov ter menjavanje rokavic).

ELIMINACIJSKA PODATKOVNA ZBIRKA

Do kontaminacije posmrtnih ostankov s človeškim biološkim materialom oziroma sodobno DNA lahko pride, kot smo že omenili, ob izkopu, ob neprimernem shranjevanju skeletnih ostankov ter ob antropoloških in molekularnogenetskih preiskavah (28). V genetskem laboratoriju se lahko kontaminacijska DNA nahaja v laboratorijski plastiki, reagentih ali so fragmenti DNA vezani na aerosolne delce v zraku (92). Da lahko omogočimo sledljivost v primeru pojava kontaminacije, moramo

za posamezno grobišče pripraviti eliminacijsko podatkovno zbirko, ki vsebuje vse osebe, ki v katerikoli fazi zbiranja, shranjevanja, antropološke in molekularnogenetske preiskave pridejo v stik s skeletnimi ostanki. Treba je pridobiti brise ustnih sluznic vseh, ki so sodelovali pri izkopu, vseh, ki so sodelovali pri antropološki študiji, in vseh, ki sodelujejo pri molekularnogenetski identifikaciji. Osebam, ki sestavljajo eliminacijsko podatkovno zbirko, je treba dostaviti komplete za odvzem brisa ustne sluznice na sterilno vatirano palčko z navodili za pravilen odvzem. Poleg brisov ustne sluznice je treba pridobiti tudi podpisano izjavo o strinjanju s preiskavo. Za vse osebe, ki so vključene v eliminacijsko podatkovno zbirko, je treba pridobiti genetske profile jedrne avtosomske DNA, mDNA in za osebe moškega spola še haplotipe kromosoma Y (33–37).

REFERENČNE OSEBE – SORODNIKI ŽRTEV

Za zbiranje referenčnih oseb – še živečih sorodnikov je treba v medijih objaviti seznam domnevnih žrtev grobišča in telefonsko številko tajništva Inštituta za sodno medicino, kjer lahko svoji pridobijo vse potrebne informacije o nadaljnjem postopku zbiranja brisov ustne sluznice. Po pogovoru s svojci in izbiri primernih referenčnih oseb sorodnikom po pošti pošljemo komplet za odvzem brisa ustne sluznice, ki vsebuje sterilno, zaščiteno vatirano paličico in navodila za pravilen odvzem brisa ustne sluznice ter sterilne rokavice. Prav tako sorodniki prejmejo v podpis izjavo, da se strinjajo s preiskavo in z objavo rezultatov genetske identifikacije. Svojci nam po pošti vrnejo brise ustnih sluznic in podpisane izjave. Za primerjavo avtosomskih mikrosatelitov jedrne DNA kot referenčne osebe uporabimo najbližje sorodnike žrtev, za primerjavo polimorfizmov mDNA uporabimo sorodnike po materini liniji, ki so lahko v bližnjem ali daljnem sorodu z žrtvijo, za primerjavo haplotipov kromosoma Y pa uporabimo bližnje ali daljne sorodnike po očetovi liniji. Za vse sorodnike pridobimo genetske profile za avtosomsko jedrno DNA, profile kromosoma Y pridobimo za sorodnike po očetovi liniji, profile mDNA pa za sorodnike po materini liniji.

Molekularnogenetsko identifikacijo žrtev povojnih množičnih grobišč sestavlja več korakov. Prvi je pridobitev DNA iz skeletnih ostankov ter iz sline sorodnikov žrtev in oseb, ki sestavljajo eliminacijsko podatkovno zbirko. Temu sledi določitev količine DNA v vzorcih ter pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in mDNA za kosti in zobe, referenčne osebe in osebe iz eliminacijske podatkovne zbirke. Preveriti je treba čistost ekstrakcijskih in pomnoževalnih negativnih kontrol. Pridobljene genetske profile kosti in zob primerjamo z genetskimi profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke nato pa še z genetskimi profili referenčnih oseb – še živečih sorodnikov žrtev. V končni fazi ob ujemanju profilov kosti in zob žrtev grobišč z referenčnimi osebami statistično ovrednotimo verjetnost sorodstvenih povezav.

PRIDOBITEV (IZOLACIJA ALI EKSTRAKCIJA) GENOMSKE DNA

Metoda izolacije DNA iz kosti je ena najzahtevnejših in najdaljših izolacijskih metod v forenzičnih genetskih preiskavah. Ker je v starih kosteh prisotnih veliko inhibitorjev reakcije PCR (predvsem huminske kisline iz zemlje) in je vsebnost DNA nizka, je treba izbrati takšno izolacijsko metodo, ki omogoča pridobitev čim večje količine DNA in odstranitev inhibitornih snovi v čim večji meri (93). Dekalcinacija z 0,5 M etilendiaminetetraocetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) nam omogoča ločitev kostnih celic od medceličnine (79). Pri svežih kosteh in zobeh za pridobitev genomske DNA ni potrebna predhodna dekalcinacija, pri starih skeletnih ostankih pa nam predhodna dekalcinacija omogoča pridobitev večje količine DNA (53). Tako je Loreillu s sodelavci uspelo s popolno demineralizacijo kosti pridobiti zadostne količine DNA iz starih skeletnih ostankov, ki brez demineralizacije niso dali nobenih rezultatov (94). Več raziskav je pokazalo, da umivanje skeletnih ostankov in rokovanje z njimi brez zaščite kontaminira površino in do določene mere tudi notranjost kosti in zob s sodobno DNA, pri čemer je kontaminacija notranjosti odvisna od ohranjenosti in stopnje poroznosti skeletnih ostankov (95–97).

Zato je treba skeletizirane posmrtnne ostanke očistiti mehansko in kemično, obsevati z UV-svetlobo in upoštevati vse ukrepe za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije, ki smo jih našli v poglavju Ukrepi za preprečevanje kontaminacije DNA. Postopek izolacije genomske DNA vključuje tri korake: čiščenje, mletje in ekstrakcijo DNA iz kostnega in zobnega prahu (98).

Čiščenje kosti in zob

Površinsko kontaminacijo pri kosteh in zobeh odstranimo s kombinacijo naslednjih tehnik: fizično odstranjevanje površine (pri zobeh ta postopek zamenjamo z obsevanjem z UV-svetlobo) ter spiranje v detergentu, vodi in etanolu. Od stegenice (enako velja za druge dolge kosti) z žago, ki ji vstavimo nov sterilni list, odrežemo približno 10 cm dolg kos kompaktne kosti in ga vzdolžno prerežemo. S površine vzdolžno prerezanega dela kosti in iz zoba s skalpelom odstranimo zemljo. Nato kost in zob spiramo v sterilni bidestilirani vodi ter ju preko noči posušimo. Sledi tehtanje in odstranjevanje površinske kontaminacije pri kosteh z brušenjem in pri zobeh z obsevanjem z UV-svetlobo na obeh straneh po 30–60 minut. Kost vpnemo v primež (Proxxon) in z linearnim brušenjem s pomočjo brusilnika (Minicraft MB 8571) in različnih brusilnih nastavkov (Proxxon) odstranimo površinsko plast, debelo 2–3 mm. Da pri brušenju ne pride do pregrevanja kosti, jo večkrat ohladimo s tekočim dušikom. Segrevanje kosti lahko namreč povzroči razgradnjo endogene DNA (64). Očiščen del kosti, katerega teža običajno ne presega 4–6 g (teža zob je manjša), s krožno diamantno žagico (Proxxon) odrežemo od preostalega dela kosti. Sledi kemično čiščenje kosti in zob s 5 % detergentom Alconox (Alconox Inc.), sterilno vodo in 80 % etanolom.

Mletje kosti in zob

Za ekstrakcijo zadostne količine DNA iz starih skeletnih ostankov je treba iz kosti in zob pridobiti fin prah, za kar ni primeren vsak homogenizator. Pri zelo malih delcih prahu je demineralizacija učinkovitejša in hitrejša (99). Kostni in zobni prah pridobimo ob uporabi tekočega dušika z mletjem v homo-

genizatorju TissueLyser (Retsch), pri čemer uporabimo kovinske komore s kovinskimi krogli. S tekočim dušikom ohladimo tako kovinske komore kot očiščene fragmente kosti in zobe ter jih meljemo 1–2 minuti pri frekvenci 30 Hz. Dobljeni prah prenesemo v epruveto, stehamo in zamrznemo do postopka ekstrakcije genomske DNA.

Ekstrakcija DNA

Genomsko DNA ekstrahiramo iz 0,5 g kostnega ali zobnega prahu po 72-urni dekalcinaciji v raztopini 0,5 M EDTA. Vzorcju dodamo proteinazo K in inkubiramo preko noči pri 56 °C. Po centrifugiranju iz supernatanta ob uporabi kompleta EZ1 DNA Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen) izoliramo genomsko DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen). Celoten postopek ekstrakcije je avtomatiziran, traja le 20 minut in ne zahteva uporabe nevarnih organskih topil, kot sta fenol in kloroform. Temelji na tehnologiji magnetnih delcev, pri kateri se nukleinske kisline vežejo na s silicijem prevlečene površine magnetnih delcev v prisotnosti kaotropičnih soli (gvanidin tiocianat – GuSCN ali gvanidin hidroklorid – GuHCl ali natrijev jodid – NaI), ki so izredno učinkovite pri čiščenju nukleinskih kislin (100). Kaotropične soli namreč lizirajo celice, denaturirajo proteine, inaktivirajo nukleaze ter pospešujejo vezavo DNA na paramagnetne, s silicijem prevlečene delce. Celoten ekstrakcijski postopek poteka v plastičnem nastavku za pipete, ki je zavarovan s filtrom in ga po uporabi zavržemo. Tudi izolacijski reagenti so v zaprtem sistemu, jih ni treba ročno pipetirati in so za enkratno uporabo, kar močno zmanjša možnost kontaminacije. Pri skeletnih ostankih z nizko vsebnostjo DNA je slednje izrednega pomena. Veliko učinkovitost ekstrakcije DNA s tehnologijo magnetnih delcev so potrdile številne študije (101–104). V ekstrakcijskem postopku pridobljeno DNA kosti in zob zamrznemo do postopka kvantifikacije in tipizacije jedrne in mDNA. V postopek ekstrakcije genomske DNA vključimo negativne kontrole, s čimer preverjamo čistost izolacijskih reagentov in plastike. Iz sline sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko pridobimo genomsko DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen) ob uporabi kompleta EZ1 DNA

Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen).

KVANTIFIKACIJA ALI DOLOČITEV KONCENTRACIJE DNA V VZORCU

Kadar preiskujemo močno poškodovano (razgrajeno) DNA ali ko je število kopij molekul DNA v vzorcu zelo nizko, je treba pred pomnoževanjem v reakciji PCR vzorce kvantificirati, saj lahko le s tem zagotovimo kakovost preiskav, ki temeljijo na metodi PCR. Ob uporabi zelo nizke koncentracije začetne DNA (pod 20 kopij (60 pg) pri jedrni DNA) se namreč zaradi stohastičnega učinka možnost napak pri pomnoževanju v reakciji PCR poveča zaradi nepomnoženih alelov (105). Za kvantifikacijo DNA je na razpolago veliko različnih metod; najnovejša temelji na kvantitativni reakciji PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*) in ima od vseh znanih kvantifikacijskih metod največjo občutljivost (105–107). Kvantifikacija jedrne in mDNA nam služi kot začetni presejalni test, saj lahko na osnovi rezultatov kvantifikacije ocenimo, ali je vzorec kosti ali zob primeren za tipizacijo mikrosatelitov jedrne DNA ali le za tipizacijo mDNA. Določimo lahko optimalno količino DNA za uspešno analizo, s čimer zmanjšamo porabo DNA in ohranimo vzorec za nadaljnje neodvisne preiskave (108). Kvantifikacijski testi nam omogočajo tudi zaznavo inhibitornih snovi v vzorcu (107).

Vsak vzorec DNA (pridobljen iz kosti, zob, slin sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko) pred pomnoževanjem v reakciji PCR kvantificiramo z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času. Metoda temelji na zaznavi 5'-nukleazne aktivnosti Taq DNA-polimeraze ob uporabi s fluorescentnimi barvili označenih sond in detekcijskega sistema, pri katerem spremljamo napredovanje pomnoževanja s PCR v realnem času. Računalniški program v povezavi s standardno krivuljo avtomatsko izračuna koncentracijo DNA v preiskovanem vzorcu. Za kvantifikacijo jedrne DNA uporabimo komplet Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems), s katerim pomnožujemo 62 bp dolg intronski odsek gena *TERT* (gen za telomerazno reverzno transkriptazo),

ki se nahaja na kromosomu 5. Z notranjo pozitivno kontrolo, ki je dodana vsakemu vzorcu, ugotavljamo prisotnost inhibitornih snovi v vzorcu DNA. Z uporabo tega kompleta lahko natančno določimo količino DNA v preiskovanem vzorcu v območju od 23 pg/μl do 50 ng/μl.

V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti do 100 ng DNA/g kostnega prahu iz 84 stegnic, izkopanih iz povojnega množičnega grobišča v kraškem breznu Konfin I, do 8,6 ng DNA/g kostnega prahu iz treh stegnic grobišča pod Storžičem, do 55 ng DNA/g zobnega prahu iz dveh kočnikov skeleta iz grobišča pod Storžičem in do 16 ng DNA/g kostnega prahu iz 25 stegnic, izkopanih iz grobišča Bodovelske grapa (23, 34, 35, 37). Jdrne DNA nismo zaznali pri izolacijskih negativnih kontrolah, kar kaže na čistost postopka izolacije in odsotnost kontaminacije vzorcev med postopkom izolacije.

GENETSKI PROFILI AVTOSOMSKE JEDRNE DNA, HAPLOTIPI KROMOSOMA Y IN HAPLOTIPI MITOHONDRIJSKE DNA

Za hkratno pomnoževanje avtosomskih mikrosatelitov je običajno potrebno 250 pg DNA (50 dvoverižnih kopij) in 28–30 ciklov reakcije PCR, vendar z novimi pomnoževalnimi kompleti pridobimo popolne genetske profile tudi iz manj kot 100 pg DNA (56).

Neuspešno pomnoževanje jedrnih avtosomskih mikrosatelitov je lahko posledica:

- preveč razgrajene DNA (treba bi bilo uporabiti začetne oligonukleotide, ki dajejo krajše produkte pomnoževanja),
- zelo nizkih koncentracij DNA (uporabiti bi bilo treba večje število ciklov reakcije PCR),
- inhibicije reakcije PCR zaradi prisotnosti inhibitornih snovi (DNA bi bilo treba redčiti z vodo v volumskem razmerju vsaj 1:20, v reakcijo PCR bi bilo treba vključiti goveji serumski albumin (angl. *bovine serum albumin*, BSA) in povečati količino polimeraze) ali
- prisotnosti polimorfizma (mutacije) v nukleotidnem zaporedju, kamor bi se morali vezati začetni oligonukleotidi.

Pri prvih treh točkah je vzrok neuspešnega pomnoževanja pojav prioriteta enega alela, pri zadnji točki pa pojav tihih alelov zaradi mutacije.

Pri molekularnogenetski preiskavi kosti in zob žrtev iz grobišč je treba opraviti tipizacijo jedrne avtosomske DNA, mikrosatelitov na kromosomu Y, treba pa je določiti tudi nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA. Jedrno avtosomsko DNA tipiziramo s tremi komercialno dostopnimi kompleti. Profile, dobljene s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), preverimo še s kompletom Investigator ESSplex Kit (Qiagen) in s kompletom MiniFiler (Applied Biosystems), ki nam omogoča pomnoževanje kratkih mikrosatelitov pri močno razgrajeni DNA. Tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y izvedemo z zaporednima pomnožitvama s kompletom YFiler (Applied Biosystems), s sekvenciranjem pa določimo nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA (109).

Pri referenčnih osebah – še živečih sorodnikih opravimo tipizacijo jedrne avtosomske DNA s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Za sorodnike po materini liniji je treba določiti nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA, za sorodnike po očetovi liniji pa opraviti tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y, za kar uporabimo komplet YFiler (Applied Biosystems).

Pri osebah za eliminacijsko podatkovno zbirko opravimo tipizacijo jedrne avtosomske DNA s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), določimo nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA, pri moških osebah pa opravimo še tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y, za kar uporabimo komplet YFiler (Applied Biosystems).

Pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA

S pomnoževalnim kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 15 avtosomskih mikrosatelitov (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D16S539, D22S1045, vWA, D8S1179, FGA, D2S441, D12S391, D19S433) in odsek ame-

logenijskega homolognega gena X in Y, ki nam omogoča določitev spola. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

S kompletom Investigator ESSplex Kit (Qiagen) sočasno pomnožimo 15 avtosomskih mikrosatelitov (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D16S539, D22S1045, vWA, D8S1179, FGA, D2S441, D12S391, D19S433) in odsek amelogeninskega gena. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,35 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

S kompletom MiniFiler (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 8 avtosomskih mikrosatelitov (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO in FGA) in odsek amelogeninskega gena. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5–0,75 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

Fluorescentno označene produkte naštetih kompletov, ki se med seboj razlikujejo po dolžini in po barvi, ločimo z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in notranjega velikostnega standarda GeneScan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) ter notranjega velikostnega standarda 550 BTO (Qiagen). Genetske profile določimo z računalniškim programom Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems).

Genetske profile grafično prikažemo z elektroferogrami, na katerih vsak vrh ustrezno enemu alelu mikrosatelita. Os x nam podaja dolžino fragmentov DNA (aleli so označeni s številom ponovitev osnovnih motivov), os y pa intenziteto fluorescentnega signala v relativnih enotah fluorescence (angl. *relative fluorescence units*, RFU). Pri kompletu AmpF/STR NGM (Applied Biosystems) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: D10S1248, vWA, D16S539 in D2S1338), z zeleno trije mikrosateliti (D8S1179, D21S11 in D18S51) ter odsek amelogeninskega gena, homolognega kromosomoma X in Y, ki nam omogoča določitev spola. S črno barvo so označeni štirje

mikrosateliti (D22S1045, D19S433, THO1 in FGA) in z rdečo barvo štirje mikrosateliti (D2S441, D3S1358, D1S1656 in D12S391). Pri kompletu Investigator ESSplex (Qiagen) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: THO1, D3S1358, vWA in D21S11) ter odsek amelogininskega gena, z zeleno pet mikrosatelitov (D16S539, D1S1656, D19S433, D8S1179 in D2S1338). S črno barvo so označeni štirje mikrosateliti (D10S1248, D22S1045, D12S391 in FGA) in z rdečo barvo dva mikrosatelita (D2S441 in D18S51). Pri kompletu MiniFiler (Applied Biosystems) sta z modro barvo označena dva mikrosatelita (D13S317 in D7S820), z zeleno prav tako dva mikrosatelita (D2S1338 in D21S11) ter odsek amelogininskega gena, s črno barvo dva mikrosatelita (D16S539 in D18S51) in z rdečo barvo zadnja dva mikrosatelita (CSF1PO in FGA).

Na sliki 1 sta prikazana elektroferograma genetskih profilov skeleta (zoba) iz poveljnega grobišča Storžič, ki smo ju pridobili s kompletoma AmpFISTR NGM® (Applied Biosystems) in Investigator ESSplex Kit (Qiagen).

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev poveljnih pobojev smo uspeli pridobiti avtosomske jedrne genetske profile iz kar 98% stegenic, izkopenih iz grobišča v kraškem breznu Konfin I, iz vseh treh skeletov grobišča

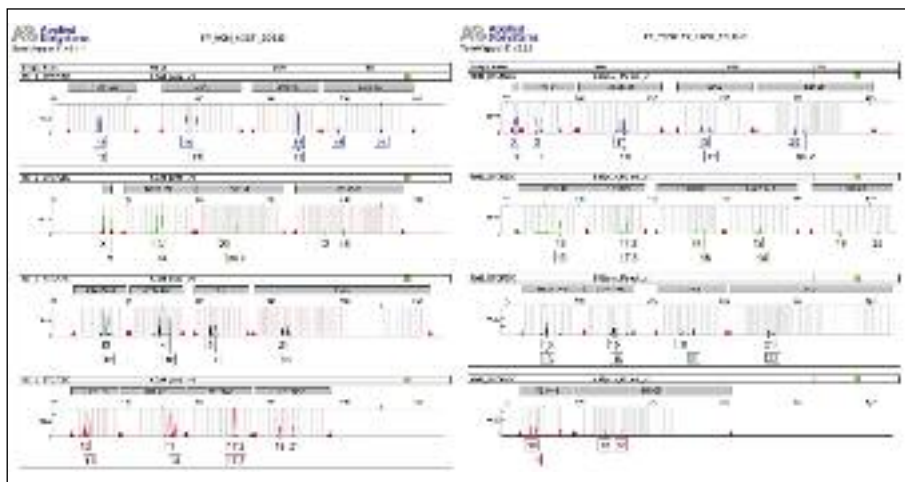
pod Storžičem ter iz 18 od skupno 25 kosti, ki smo jih tipizirali za grobišče Bodoveljska grapa (23, 34, 35, 37).

Pridobitev haplotipov kromosoma Y

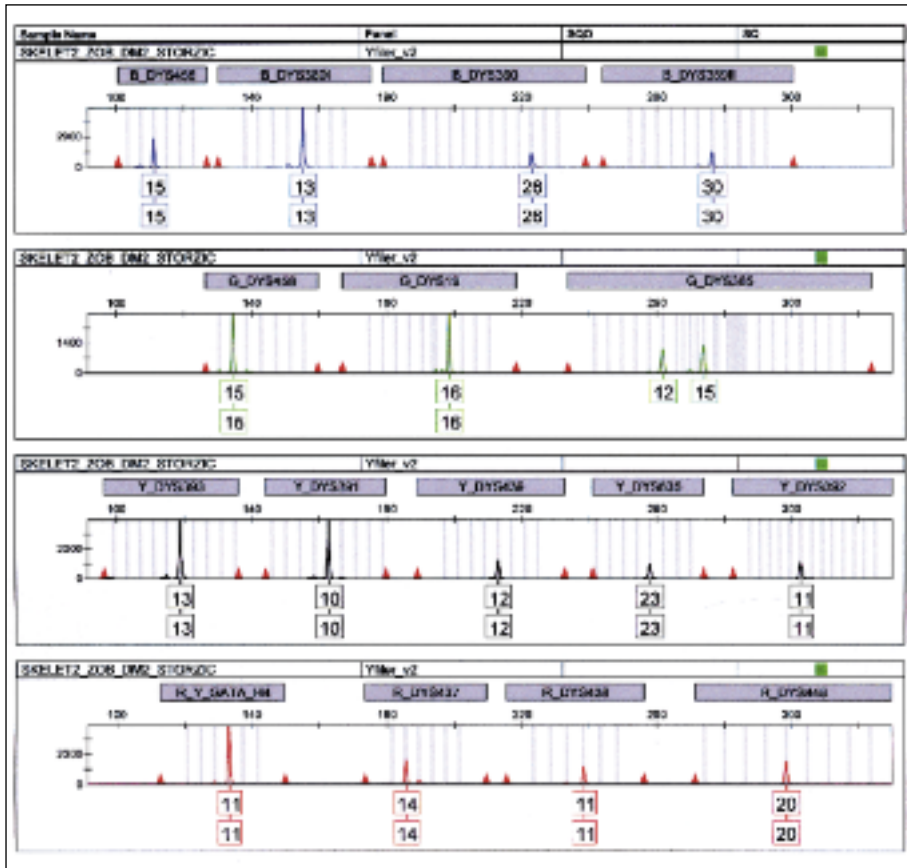
S kompletom Yfiler (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 17 mikrosatelitov kromosoma Y: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 in DYS448. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5–1 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

Fluorescentno označene produkte reakcije Yfiler ločimo z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in notranjega velikostnega standarda GeneScan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Genetske profile določimo s pomočjo računalniških programov Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems).

Genetske profile grafično prikažemo z elektroferogrami, na katerih vsak vrh ustreza alelu mikrosatelita. Os x nam podaja dolžino fragmentov DNA (aleli so označeni s številom ponovitev osnovnih motivov), os y pa intenziteto fluorescentnega signala v (RFU).



Slika 1. Elektroferograma popolnih genetskih profilov avtosomskih mikrosatelitov skeleta (zoba) iz poveljnega grobišča Storžič, ki smo ju pridobili s kompletoma AmpFISTR NGM® (Applied Biosystems) in Investigator ESSplex Kit (Qiagen).



Slika 2. Elektroferogram popolnega genetskega profila mikrosatelitov kromosoma Y skeleta (zoba) iz povojnega grobišča Storžič, ki smo ga pridobili s kompletom YFiler (Applied Biosystems).

Pri kompletu YFiler (Applied Biosystems) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: (DYS456, DYS389I, DYS390 in DYS389II), z zeleno štirje mikrosateliti, (DYS458, DYS19, DYS385a in DYS385b), s črno pet mikrosatelitov (DYS393, DYS391, DYS439, DYS635 in DYS392) in z rdečo barvo štirje mikrosateliti (Y GATA H4, DYS437, DYS438 in DYS448).

Rezultati tipizacije mikrosatelitov kompleta YFiler so prikazani na sliki 2 (pomnožili smo DNA, pridobljeno iz skeleta (zoba) iz grobišča Storžič).

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev povojnih pobojev smo uspeli pridobiti haplotipe kromosoma Y iz kar 98 % stegenic, izkopanih iz grobišča v kraškem breznu

Konfin I in iz vseh treh skeletov grobišča pod Storžičem (34, 35, 37).

Pridobitev haplotipov mitohondrijske DNA

Za določitev haplotipa mDNA v reakciji PCR pomnožimo celotno regijo HVI in HVII; HVI z začetnima oligonukleotidoma L15997/H16401, HVII pa z L00029/H00408 (109, 110). Vzoredno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo. Pomnožitvene produkte prečistimo z ultrafiltracijskimi enotami Centricon-100 (Millipore Corporation) in sekvenciramo z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, verzi-

ja 1.1 (Applied Biosystems). Regiji HVI in HVII v skladu z mednarodnimi priporočili vedno sekvenciramo v obeh smereh in tako s sekvenciranjem težke verige preverimo nukleotidno zaporedje, dobljeno s sekvenciranjem lahke verige mDNA (22). Produkte sekvenčne reakcije prečistimo s kolonami MicroSpin® G-50 (Amersham Biosciences) in jih ločimo z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in računalniških programov Data Collection v 3.0 in AB DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems). Pridobljena nukleotidna zaporedja primerjamo v regiji HVI v območju 16030–16381, v regiji HVII pa v območju 55–388 z Andersonovo referenčno sekvenco, ki jo uporabljamo kot referenčno nukleotidno zaporedje pri raziskovanju polimorfizmov človeške mDNA (111).

Rezultate tipizacije mDNA prikazujemo v obliki elektroferogramov, pri katerih vsak vrh ustreza eni bazi, baze pa se razlikujejo med seboj po barvi. Z modro barvo je označen citozin (C), z zeleno adenin (A), s črno gvanin (G) in z rdečo timin (T).

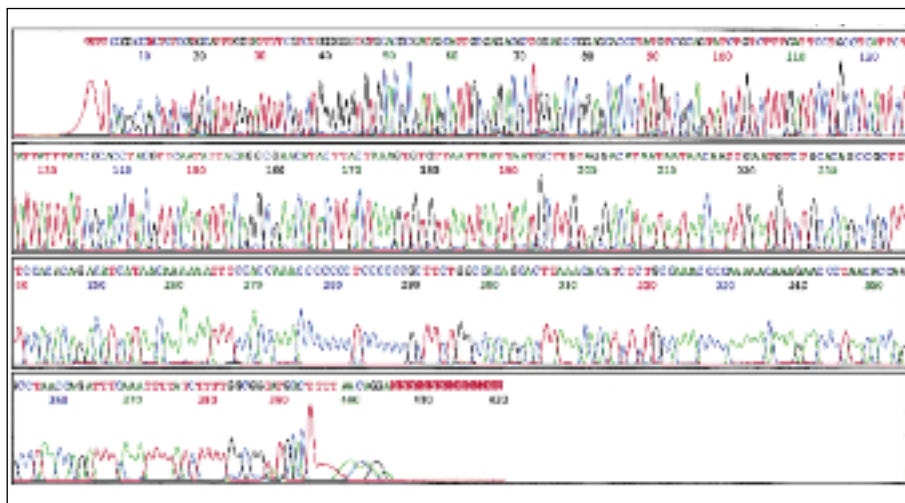
Na sliki 3 je prikazan elektroferogram nukleotidnega zaporedja celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mDNA skele-

ta (zoba) iz grobišča Storžič, ki smo ga pridobili z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja.

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev povojnih pobojev smo uspeli pridobiti haplotipe mDNA iz kar 98 % stegnic, izkopanih iz grobišča v kraškem breznu Konfin I, iz vseh treh skeletov grobišča pod Storžičem ter iz vseh 25 skeletov, ki smo jih tipizirali pri grobišču Bodoveljska grapa (23, 34, 35, 37).

STATISTIČNI IZRAČUN VERJETNOSTI SORODSTVENIH POVEZAV

Dobljene genetske profile (avtosomske, haplotipe kromosoma Y in mDNA) kosti oziroma zob in referenčnih oseb med seboj primerjamo in ugotavljamo, ali imajo skupen izvor ali ne. Kadar se dva profila med seboj ne ujema, biološka vzorca nimata skupnega izvora. Ob ujemanju genetskih profilov potrdimo skupen izvor in statistično ovrednotimo moč genetskega dokaza. Verjetnosti sorodstvenih povezav za avtosomske mikrosatelite izračunamo s statističnim programom DNA VIEW v. 28.71 (2011) avtorja C. H. Brennerja (Berkeley, ZDA), pri čemer upoštevamo alelne



Slika 3. Sekvenca celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mDNA skeleta (zoba) iz grobišča Storžič, dobljena z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

frekvence v slovenski populaciji in predhodno verjetnost $1/n+1$, pri čemer predstavlja n število žrtev v grobišču (112–115). Verjetnosti sorodstvenih povezav za haplotipe kromosoma Y in za haplotipe mDNA pa izračunamo na osnovi frekvenc haplotipov (P) v različnih podatkovnih zbirkah (116). Frekvenco haplotipa kromosoma Y določimo s pomočjo podatkovne zbirke YHRD (angl. *Y chromosome haplotype reference database*), frekvenco haplotipa mDNA pa s podatkovno zbirko EMPOP (angl. *European mDNA Database*), pri čemer za oceno frekvence haplotipa uporabimo metodo štetja ter upoštevamo korekcijski faktor za napake pri vzorčenju (85, 117–120). Korekcija je potrebna zaradi razmeroma majhnih podatkovnih zbirk in velikega števila haplotipov, zaradi česar pogosto opazimo nov haplotip, ki ga v obstoječi podatkovni zbirki ni:

$$P = \chi + 2 / n + 2, \quad (1)$$

pri čemer je P frekvence haplotipov, χ število opaženih haplotipov v podatkovni zbirki, n pa število oseb s tem haplotipom (22, 120).

Verjetnosti sorodstvenih povezav podamo v obliki verjetnostnega razmerja, ki ga označimo s kratico LR (angl. *likelihood ratio*). Poleg LR podamo tudi vrednost za naknadno verjetnost sorodstva, ki jo označimo s kratico PP (angl. *posterior probability*) in upošteva predhodno verjetnost dogodka. Za predhodno verjetnost upoštevamo število žrtev v grobišču, kot pozitivno identificirane žrtve pa upoštevamo tiste žrtve, pri katerih dosegamo naknadno verjetnost 99,9% (115, 121, 122). Pri avtosomskih mikrosatelitih nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da izkopane kosti ali zobje pripadajo osebi, ki je v sorodu z referenčno osebo, kot da pripadajo neki naključno izbrani z referenčnim vzorcem nesorodni osebi iz slovenske populacije. Ob identičnem haplotipu mDNA kosti ali zob in referenčne osebe nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripadajo izkopane kosti in zobje ter referenčna oseba isti maternalni liniji, kot da pripadajo različnima maternalnima linijama. Ob identičnem haplotipu kromosoma Y pa nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripadajo izkopane kosti in zobje ter referenčna oseba isti paternalni liniji, kot da pripadajo različnima paternalnima linijama.

Kromosom Y in mDNA nam ob preiskavi avtosomske jedrne DNA služita kot zelo koristna dodatna sistema pri identifikaciji žrtev množičnih pobojev ob koncu druge svetovne vojne v Sloveniji, saj lahko v preiskavo vključimo tudi daljne sorodnike po očetu in materini liniji, hkrati pa lahko s pomočjo kromosoma Y in mDNA pri bližnjih sorodnikih, npr. bratih in sestrah, povečamo izračunano statistično verjetnost sorodstva med žrtvijo in še živim sorodnikom (120, 123). Kadar opazimo med kostmi (ali zobmi) in sorodniki ujemanje avtosomskih jedrnih genetskih profilov in haplotipov mDNA, uporabimo pri oceni skupnega verjetnostnega razmerja (LRc) pravilo produkta (123). Enako naredimo, kadar opazimo ujemanje avtosomskih jedrnih genetskih profilov in haplotipov kromosoma Y (120).

Za avtosomske mikrosatelite jedrne DNA in genetske označevalce mDNA velja, da se dedujejo neodvisno. Z vidika matematične verjetnostne teorije torej predstavljata jedrni profil in haplotip mDNA osebe dva neodvisna dogodka, zato lahko pri oceni skupnega verjetnostnega razmerja (LRc) uporabimo pravilo produkta in ga izračunamo po enačbi:

$$LRc = LR_{(avtosomski\ STR)} \times LR_{(mDNA)} \quad (123). \quad (2)$$

Prav tako se dedujejo neodvisno avtosomski mikrosateliti in mikrosateliti kromosoma Y, zato lahko tudi pri teh genetskih označevalcih uporabimo pravilo produkta in skupno verjetnostno razmerje izračunamo po enačbi:

$$LRc = LR_{(avtosomski\ STR)} \times LR_{(Y-STR)} \quad (120). \quad (3)$$

Dobljene genetske profile (avtosomske, kromosoma Y in mDNA) kosti in zob primerjamo tudi s profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, s čimer ugotavljamo, ali je prišlo do kontaminacije vzorcev kosti in zob s sodobno DNA.

PRIMER POZITIVNE IDENTIFIKACIJE ŽRTVE POVOJNEGA MNOŽIČNEGA GROBIŠČA

Pozitivno molekularnogenetsko identifikacijo žrtev povojnih množičnih grobišč prikazujemo na primeru ene od žrtev poboja v kraškem breznu Konfin I. Žrtev JG smo identificirali

s primerjavo s še živečo sestro AK, ki nam je služila za primerjavo jedrnih avtosomskih mikrosatelitskih polimorfizmov in haplotipov mDNA. Desna stegnenica 43 pat (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom) in desna stegnenica 48 pat imata identične genetske profile avtosomske jedrne DNA, kromosoma Y in mDNA, kar kaže na to, da obe kosti pripadata isti osebi iz grobišča. Desni stegnenici 43 in 48 pat sta prelomljeni, fragmentirani kosti. Na sliki 4 je prikazana desna stegnenica 43 pat in fragment, ki smo ga odvzeli za genetsko preiskavo. Na sliki 5 pa je prikazana desna stegnenica 48 pat in fragment, ki smo ga odvzeli za genetsko preiskavo.

Desni stegnenici 43 in 48 pat imata identičen haplotip mDNA kot sorodnica AK (glej tabelo 1). Haplotip mDNA desnih stegnenic 43 in 48 pat ter sestre AK smo v evropski kavkazijski podatkovni zbirki, ki vsebuje 4.476 haplotipov, opazili enkrat. Vrednost za LR za ta haplotip je 1.493, kar pomeni, da je 1.493-krat

bolj verjetna hipoteza, da pripadata desni stegnenici 43 in 48 pat in AK isti maternalni liniji, kot hipoteza, da pripadata različnim maternalnim linijam. V tabeli 2 so prikazani genetski profili jedrne avtosomske DNA desnih stegnenic 43 in 48 pat ter sestre AK.

Za analizirane mikrosatelite smo izračunali LR, katerega vrednost je 681 (to pomeni, da je 681-krat bolj verjetno, da fragmenta desnih stegnenic 43 in 48 pat pripadata bratu AK, kot da pripadata neki naključno izbrani, AK nesorodni osebi iz slovenske populacije). Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 87,3 %, pri čemer smo upoštevali kot predhodno verjetnost sorodstva vrednost 0,01. JG smo identificirali s polimorfizmi jedrne avtosomske DNA in mDNA, zato smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRC, katerega vrednost je 1×10^6 . Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,99 %, pri čemer smo upoštevali kot predhodno verjetnost sorodstva vrednost 0,01. V tabeli 3 sta prikazana haplo-



Slika 4. Desna stegnenica 43 pat iz grobišča Konfin I in fragment, odvzet za genetsko preiskavo (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom).



Slika 5. Desna stegnenica 48 pat iz grobišča Konfin I in fragment, odvzet za genetsko preiskavo (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom).

tipa kromosoma Y desnih stegnic 43 in 48 pat. Obe kosti imata identičen haplotip kromosoma Y, kar poleg identične avtosomske jedrne DNA in mDNA govori v prid temu, da obe kosti pripadata žrtvi JG.

Žrtev JG iz grobišča Konfin I, za katero smo kot primerjalni genetski material uporabili DNA še živeče sestre, smo pozitivno identifikirali, saj je izračunana naknadna verjetnost presejala vrednost 99,9% (115, 121, 122).

Tabela 1. Haplotipi regij HVI in HVII mDNA desnih stegnic 43 in 48 pat in sestre žrtve AK. CRS – cambsiška referenčna sekvenca, pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	Razlike glede na CRS	Območje
Desna stegnenica 43 pat	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388
Desna stegnenica 48 pat	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388
Sestra žrtve AK	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388

Tabela 2. Genetski profili jedrne avtosomske DNA desnih stegnic 43 in 48 pat in sestre AK. Amelog. – odsek amelogeninskega gena, pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539
Desna stegnenica 43 pat	13 14	29 30	10 12	11 12	17 17	7 9.3	8 13	13 13
Desna stegnenica 48 pat	13 14	29 30	10 12	11 12	17 17	7 9.3	8 13	13 13
Sestra žrtve AK	14 14	30 33.2	10 11	10 12	17 17	7 9.3	8 13	12 13
Vzorec	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Amelog.	D5S818	FGA
Desna stegnenica 43 pat	20 25	12 15	16 16	8 8	12 18	X Y	11 11	22 23
Desna stegnenica 48 pat	20 25	12 15	16 16	8 8	12 18	X Y	11 11	22 23
Sestra žrtve AK	23 25	12 13	14 16	8 8	12 14	X X	11 12	19 21

Tabela 3. Haplotipa kromosoma Y desnih stegnic 43 in 48 pat. pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385a/b	DYS393
Desna stegnenica 43 pat	18	13	26	29	14	15	11/15	13
Desna stegnenica 48 pat	18	13	26	29	14	15	11/15	13
Vzorec	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	DYSH4	DYS437	DYS438	DYS448
Desna stegnenica 43 pat	10	11	23	11	12	14	11	20
Desna stegnenica 48 pat	10	11	23	11	12	14	11	20

Z žrtvijo JG smo povezali dve fragmentirani stegenici, ki sta imeli identične genetske profile avtosomskih mikrosatelitov, mikrosatelitov kromosoma Y in mDNA, kar kaže na možnost, da prelomljeni kosti predstavljata proksimalni in distalni del iste kosti (v grobišču Konfin I je bilo 40 ranjencev, ki so bili prepeljani iz Bolnišnice Ljubljana na morišče in so imeli zlomljene ali amputirane ude). Pri identifikaciji žrtev iz grobišča Konfin I izključujemo možnost kontaminacije endogene DNA kosti med izkopom (pri zbiranju in shranjevanju kosti), med antropološko ter med genetsko preiskavo. Verodostojnost genetskih profilov kosti iz grobišča Konfin I potrjujejo čiste izolacijske in pomnoževalne negativne kontrole, ponovljivost rezultatov zaporednih pomnoževanj z različnimi pomnoževalnimi kompleti in neujemanje genetskih profilov kosti z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke.

ZAKLJUČEK

Ob upoštevanju mednarodnih priporočil in v našem laboratoriju razvitih postopkov smo uspešno identificirali žrtve povojnih pobojev iz grobišča Konfin I, Storžič in Bodoveljska grapa (23, 33–37). Opisane ekstrakcijske in tipizacijske metode za avtosomsko DNA, kromosom Y in mDNA so izredno učinkovite, saj smo iz več kot 65 let starih kosti in zob pridobili zelo kakovostno DNA, ki smo jo lahko pomnožili z uporabo komercialno dostopnih pomnoževalnih kompletov ter uspešno tipizirali ne le mDNA, temveč tudi jedrno DNA. Pokazalo se je, da je za identifikacijo starih skeletnih ostankov smiselno analizirati tako

jedrno avtosomsko DNA kot mDNA, v primeru sledenja paternalni liniji (preverjanju sorodstvenih povezav očetje, sinovi, bratje, bratranci, strici, nečaki) pa je treba v preiskavo vključiti tudi mikrosatelite kromosoma Y, saj z večjim številom genetskih označevalcev povečamo moč genetskega dokaza. Z uporabo večjega števila pomnoževalnih kompletov smo preverili istovetnost genetskih profilov kosti. Pri degradiranih vzorcih smo uporabili tudi komplet za pomnoževanje zelo kratkih avtosomskih mikrosatelitov. Ob ujemanju genetskih profilov kosti in zob s še živečimi sorodniki smo dosegali zelo visoke verjetnosti sorodstvenih povezav (te so presegle vrednost 99,9%), kar kaže na to, da smo preiskali zadostno število genetskih označevalcev za doseganje pozitivnih identifikacij in da smo v preiskavo vključili zadostno število sorodnikov, ki so bili tako v bližnjem kot daljnem sorodstvu z žrtvami. Žrtve smo identificirali s pomočjo še živečih bratov, sester, hčerk, sinov, bratrancev in nečakov po očetovi in po materini liniji. Zelo uspešni smo bili tudi pri preprečevanju kontaminacije endogene DNA kosti in zob s sodobno DNA. Verodostojnost genetskih profilov kosti in zob namreč potrjujejo čiste izolacijske in pomnoževalne negativne kontrole, ponovljivost rezultatov dveh zaporednih preiskav in neujemanje genetskih profilov z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke. Izkušnje, ki smo jih pridobili pri genetskih raziskavah skeletnih ostankov iz povojnih množičnih grobišč, so nam v veliko pomoč pri razvijanju metod za molekularno antropološke preiskave veliko starejših skeletnih ostankov iz arheoloških najdišč.

LITERATURA

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362 (6422): 709–15.
2. Eglinton G, Logan GA. Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1991; 333 (1268): 315–28.
3. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, et al. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. 2001; 2 (5): 353–9.
4. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86 (6): 1939–43.
5. Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, et al. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24 (7): 1304–7.

6. Poinar HN, Hoss M, Bada JL, et al. Amino acid racemisation and the preservation of ancient DNA. *Science*. 1996; 272 (5263): 864–6.
7. Hagelberg E, Bell LS, Allen T, et al. Analyses of ancient bone DNA: techniques and applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1991; 333 (1268): 399–407.
8. Tuross N. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*. 1994; 50 (6): 530–5.
9. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, et al. Neanderthal DNA. Not just old but old and cold? *Nature*. 2001; 410 (6830): 771–2.
10. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, et al. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol*. 2003; 45 (3): 203–17.
11. Burger J, Hummel S, Hermann B, et al. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 1999; 20 (8): 1722–8.
12. Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (3): 739–44.
13. Malmstrom H. Ancient DNA as a means to investigate the European Neolithic [doktorsko delo]. Uppsala (Švedska): Uppsala University; 2007.
14. Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J*. 2007; 48 (4): 486–93.
15. Misner LM, Halvorson AC, Dreier JL, et al. The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci*. 2009; 54 (4): 822–8.
16. Edson SM, Ross JP, Coble MD, et al. Naming the dead – confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Reviews*. 2004; 16 (1): 64–89.
17. Zupanič Pajnič I. Forenzična genetika. *Med Razgl*. 2011; 50 (3): 325–40.
18. Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*. 2006; 314 (5802): 1113–8.
19. Valdiosera C, Garcia N, Dalen L, et al. Typing single polymorphic nucleotides in mitochondrial DNA as a way to access Middle Pleistocene DNA. *Biol Lett*. 2006; 2 (4): 601–3.
20. Alaedddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – a review. *Forensic Sci Int Genet*. 2010; 4 (3): 148–57.
21. Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med*. 1996; 108 (5): 237–43.
22. Tully G, Bär W, Brinkmann B, et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int*. 2001; 124 (1): 83–91.
23. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
24. Handt O, Richards M, Trommsdorf M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*. 1994; 264 (5166): 1775–8.
25. Kolmann CJ, Tuross N. Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol*. 2000; 111 (1): 5–23.
26. Wandeler P, Smith S, Morin PA, et al. Patterns of nuclear DNA degradation over time—a case study in historic teeth samples. *Mol Ecol*. 2003; 12 (4): 1087–93.
27. Handt O, Krings M, Ward RH, et al. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*. 1991; 59 (2): 368–76.
28. Brown TA, Brown KA. Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity*. 1992; 66 (250): 10–23.
29. Pääbo S. Amplifying ancient DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al., eds. *PCR-Protocols and Amplifications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 159–66.
30. Pääbo S, Poinar H, Serre D, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*. 2004; 38: 645–79.
31. Ferenc M. Topografija evidentiranih grobišč. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 7–27.
32. Jamnik P. Ugotavljanje identitete žrtev iz brezna pri Konfinu I v arhivskih virih. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 83–93.
33. Zupanič-Pajnič I. Preliminarno poročilo molekularno genetske identifikacije okostij iz grobišča pri Konfinu 1. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 147–74.
34. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc B, Balažič J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second world war Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med*. 2010; 124 (4): 307–17.
35. Zupanič-Pajnič I. Identificirane žrtve grobišča pri Konfinu 1. In: Dežman J, ed. *Resnica in sočutje. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2009–2011*. Ljubljana: Družina; 2012. p. 113–88.
36. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija žrtev medvojnih pobojev pod Storžičem. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 219–50.
37. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobrskih žrtev. *Zdrav Vestn*. 2008; 77 (11): 745–50.

38. Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, et al. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med.* 1999; 112 (2): 142-4.
39. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (6): 1199-202.
40. Alvarez Garcia A, Munoz I, Pestoni C, et al. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med.* 1996; 109 (3): 125-9.
41. Ohira H, Yamada Y. Advantages of dental mitochondrial DNA from detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Forensic Med Pathol.* 1999; 20 (3): 261-8.
42. Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, et al. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (4): 979-90.
43. Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, et al. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in Korean population. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (6): 309-13.
44. Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, et al. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *J Forensic Sci.* 1993; 38 (5): 1194-209.
45. Budowle B, Smith J, Moretti T, et al. DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis. Washington: Eaton Publishing; 2000. p. 304.
46. Boles CT, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (3): 349-55.
47. Mörnstad H, Pfeiffer H, Yoon C, et al. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med.* 1999; 112 (2): 98-100.
48. Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci.* 2003; 48 (3): 622-5.
49. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal aliphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23 (3): 268-71.
50. Sweet DJ, Sweet CH. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (2): 310-4.
51. Sweet D, Hildebrand D, Phillips D. Identification of skeleton using DNA from teeth and a PAP smear. *J Forensic Sci.* 1999; 44 (3): 630-3.
52. Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J Forensic Sci.* 2001; 46 (1): 126-30.
53. Hochmeister MN, Budowle MD, Borer UV, et al. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (6): 1649-61.
54. Petrovič D, Zorc M, eds. *Histologija*. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; 2005. p. 35-42, p. 115-23, p. 166-8.
55. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int.* 2005; 154 (1): 53-61.
56. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelec B, Balažič J, et al. Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croat Med J.* 2012; 53 (1): 17-23.
57. Lee H, Pagliaro E, Berka K, et al. Genetic markers in human bone: I. deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (2): 320-30.
58. Hochmeister MN, Budowle B, Borer V, et al. Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (4): 701-5.
59. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature.* 1989; 342 (6249): 485.
60. Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature.* 1991; 352 (6334): 427-9.
61. Yamamoto T, Uchihira R, Kojima T, et al. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (3): 701-5.
62. Tahir MA, Balraj E, Luke L, et al. DNA typing of samples for polymarker DQA1 and nine STR loci from human body exhumed after 27 years. *J Forensic Sci.* 2000; 45 (4): 902-7.
63. Leonart R, Riggo E, Sainz de la Pena MV, et al. Forensic identification of skeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's guerrillas in Bolivia based on DNA typing. *Int J Legal Med.* 2000; 113 (2): 98-101.
64. Alonso A, Andelinović Š, Martin P, et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J.* 2001; 42 (3): 260-6.
65. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, et al. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 478-85.
66. Irwin JA, Edson SM, Loreille O, et al. DNA identification of »Earthquake McGoon« 50 years postmortem. *J Forensic Sci.* 2007; 52: 1115-8.

67. Irwin JA, Leney MD, Loreille O, et al. Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains. *J Forensic Sci.* 2007; 52 (5): 1322-7.
68. Marjanović D, Durmić-Pasić A, Bakal N, et al. DNA identification of skeletal remains from World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 513-9.
69. Lee HY, Kim NY, Park MJ, et al. DNA typing for the identification of old skeletal remains from Korean war victims. *J Forensic Sci.* 2010; 55 (6): 1422-9.
70. Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J.* 2009; 50 (3): 286-95.
71. Bogdanowicz W, Allen M, Branicki W, et al. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (30): 12279-82.
72. Anslinger K, Weichhold G, Keil W, et al. Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med.* 2001; 114 (3): 194-6.
73. Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci.* 2001; 46 (1): 173-6.
74. Palo JU, Hedman M, Soderholm N, et al. Repatriation and identification of Finnish World War II soldiers. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 528-35.
75. Jehaes E. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Europ J Hum Gen.* 1998; 6 (4): 383-95.
76. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Legal Med.* 1992; 105 (2): 83-6.
77. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, et al. Extraction evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone. *J Forensic Sci.* 1993; 38 (1): 60-8.
78. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, et al. mtDNA as a tool for identification of human remains – identification using mtDNA. *Int J Legal Med.* 1996; 109 (4): 205-9.
79. Bender K, Schneider PM, Rittner C. Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int.* 2000; 113 (1-3): 103-7.
80. Seo Y, Uchiyama T, Shimizu K, et al. Identification of remains by sequencing of mitochondrial DNA control region. *Am J Forensic Med Pathol.* 2000; 21 (2): 138-43.
81. Koyama H, Iwasa M, Ohtani S, et al. Personal identification from human remains by mitochondrial DNA sequencing. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23 (3): 272-6.
82. Prince AM, Andrus L. PCR how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* 1992; 12 (3): 358-60.
83. Rennick SL, Fenton TW, Foran DR. The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *J Forensic Sci.* 2005; 50 (5): 1016-9.
84. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, et al. DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med.* 2000; 113 (4): 193-6.
85. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, et al. DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int.* 2000; 110 (2): 79-85.
86. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, et al. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med.* 1995; 108 (2): 68-74.
87. Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, et al. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28 (12): e67.
88. Tamariz J, Voynarovska K, Prinz M, et al. The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci.* 2006; 51 (4): 790-4.
89. Shaw K, Sesardić I, Bristol N, et al. Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *Int J Legal Med.* 2008; 122 (1): 29-33.
90. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija neznanih trupel iz skeletnih ostankov in zob. In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, et al., eds. *Molekularna diagnostika v medicini. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo; 2005 Nov 30-Dec 2; Ljubljana. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 73-84.*
91. Zupanič-Pajnič I. Priporočila za molekularno genetsko identifikacijo žrtev povojnih pobojev v Sloveniji. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005-2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 133-46.*
92. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol.* 2007; 3: 221-5.
93. Cattaneo C, Craig OE, James NT, et al. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci.* 1997; 42 (6): 1126-35.
94. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, et al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 191-5.
95. Salamon M, Tuross N, Arensburg B, et al. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (39): 13783-8.

96. Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological bone and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeol Sci.* 2005; 32 (5): 785–93.
97. Sampiarto ML, Gilbert MT, Lao O, et al. Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol.* 2006; 23 (9): 1801–7.
98. Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov. *Zdrav Vestn.* 2011; 80: 171–81.
99. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc.* 2007; 2 (7): 1756–62.
100. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clinical Microb.* 1990; 28 (3): 495–503.
101. Nagy M, Otremba P, Krüger C, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads technology in forensics. *Forensic Sci Int.* 2005; 152 (1): 13–22.
102. Kishore R, Hardy WR, Anderson VJ, et al. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the biorobot EZ1 and biorobot M48. *J Forensic Sci.* 2006; 51 (5): 1055–61.
103. Valgren C, Wester S, Hansson O. A comparison of three automated DNA purification methods in forensic casework. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series.* 2008; 1 (1): 76–7.
104. Montpetit SA, Fitch IT, O'Donnell PT. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci.* 2005; 50 (3): 555–63.
105. Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int.* 2004; 139 (2–3): 141–9.
106. Andresson H, Nilsson M, Budowle B, et al. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci Int.* 2006; 164 (1): 56–64.
107. Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J.* 2003; 44 (3): 273–80.
108. Andresson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Bio Techniques.* 2002; 33 (2): 402–11.
109. Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med.* 2004; 118 (1): 1–4.
110. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, et al. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (3): 124–32.
111. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290 (5806): 457–65.
112. Zupanič I, Balažič J, Komel R. Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (5): 248–50.
113. Zupanič Pajnič I, Šterlinko H, Balažič J, et al. Parentage testing with 14 STR loci and population data for 5 STRs in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2001; 114 (3): 178–80.
114. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji [magistrska naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
115. Brenner CH, Weir BS. Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoret Popul Biol.* 2003; 63 (3): 173–8.
116. Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, et al. DNA commission of the international society of forensic genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y STRs in the forensic analysis. *Int J Legal Med.* 2006; 120 (4): 191–200.
117. Willuweit S, Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 83–7.
118. Parson W, Dür A. EMPOP – a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 88–92.
119. Balding DJ, Nichols RA. DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int.* 1994; 64 (2–3): 125–40.
120. Walsh B, Redd AJ, Hammer MF. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int.* 2008; 174 (2–3): 234–8.
121. Biesecker LG, Bailey-Wilson JE, Ballantyne J, et al. Epidemiology. DNA identification after the 9/11 World Trade Center attack. *Science.* 2005; 310 (5751): 1122–3.
122. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victims identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (1): 3–12.
123. Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, et al. Forensic identification of urine sample: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Int J Legal Med.* 2006; 120 (2): 67–72.

Nataša Bratina¹, Tadej Battelino²

Sladkorna bolezen tipa 1 in zdravljenje z inzulinsko črpalko v otroštvu in mladostniških letih

Diabetes Mellitus Type 1 and Subcutaneous Continuous Insulin Infusion (Insulin Pump) Therapy in Children and Adolescents

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: sladkorna bolezen tipa 1, otroci, mladostniki, inzulinska črpalka, senzor, presnovna urejenost

Sladkorna bolezen je pogosta motnja v delovanju endokrinega sistema. Po oceni Svetovne zdravstvene organizacije in Mednarodnega združenja diabetikov bo število obolelih kmalu doseglo 250 milijonov. Med njimi je 5 % bolnikov, ki potrebujejo inzulini takoj, ko zbolijo. V tem primeru govorimo o sladkorni bolezni tipa 1. Sladkorna bolezen tipa 1 imajo največkrat mladi ljudje, med njimi prevladujejo otroci in mladostniki, prav število otrok z novo odkrito sladkorno boleznijo pa v zadnjih 50 letih strmo narašča. Dobro vodenje sladkorne bolezni je izjemnega pomena, saj s primerno dolgoročno presnovno urejenostjo sladkorne bolezni lahko odložimo ali preprečimo pozne zaplete bolezni, kot so nefropatija, periferna in avtonomna nevropatija ter retinopatija, za več desetletij. Danes pri dobrem vodenju sladkorne bolezni postajajo nepogrešljiv pripomoček inzulinske črpalke s sodobnimi, hitro delujočimi inzulinskimi analogi, vedno bolj pa tudi sistemi za nepretrgano merjenje sladkorja v medceličnici.

ABSTRACT

KEY WORDS: type 1 diabetes mellitus, children, adolescents, insulin pump, sensor, metabolic control

Diabetes is a common endocrine disorder. According to the data from the World Health Organization and the International Diabetes Federation, almost 250 million people are suffering from diabetes around the world, approximately 5 % of which need insulin immediately. They have diabetes mellitus type 1. Most patients with type 1 diabetes are young. The number of children with newly diagnosed diabetes has been increasing rapidly during the past 50 years. Strict metabolic control is extremely important for delaying diabetes complications for several decades; such complications are retinopathy, nephropathy, peripheral and autonomic neuropathy. Insulin pumps, modern insulin analogues and continuous glucose monitoring systems can help us achieve these goals in a large group of patients.

¹ Doc. dr. Nataša Bratina, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; nata-sa.bratina@kks-kamnik.si

² Prof. dr. Tadej Battelino, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

UVOD

Sladkorna bolezen (SB) sodi med pogostejše motnje žlez z notranjim izločanjem. Na svetu je obolelih že skoraj 250 milijonov ljudi, predvidevanja kažejo, da naj bi število obolelih do leta 2035 preseglo celo 350 milijonov ljudi (1, 2). Danes prevladuje v državah razvitega sveta SB tipa 2 (SBT2), le nekaj odstotkov bolnikov pa potrebuje inzulin takoj kot edino možno obliko zdravljenja. V tem primeru govorimo o SB tipa 1 (SBT1), ki je avtoimunsko obolenje, ki postopno uničuje celice beta trebušne slinavke in večkrat nastopi pri ljudeh s tveganim genetskim ozadjem (3).

Kateri zunanji dejavniki prispevajo poleg tveganega genetskega ozadja k razvoju SBT1, še vedno ni povsem znano, preučevali pa so vplive dojenja, cepiv, virusnih okužb, v zadnjem času pa tudi vpliv onesnaženosti okolja, vitamina D₃ in stresa (4-10). Teorija pospešitve v prvi vrsti poudarja, da je pri dovzetnih posameznikih hitrost apoptoze celic beta visoka, vendarle pa ni zadostna za dokončen razvoj SBT1. Šele debelost naj bi skupaj s telesno neaktivnostjo privedla do inzulinske rezistence, to pa je drugi korak v razvoju SBT1 (11-13). Izrednega pomena je v tem krogu tudi genetska dovzetnost za razvoj SBT1, označuje jo zasnova za antigene poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa pri človeku (angl. *human leukocyte antigen*, HLA) (3). Takšna celica beta, ki je metabolno zelo aktivna, je tako izredno ogrožena, nastopi njena disfunkcija in postopen propad, kar privede do klinične slike SBT1. Torej naj bi bila SBT1 le končni del SBT2, ki pa je izjemno naglo potekala in bila prezrta. Higienska teorija temelji na teoriji, da smo s spremenjenim načinom življenja spremenili imunski odziv našega telesa, ki se namesto proti naravnim imunogenim molekulam obrača proti lastnim tkivom (11-15).

SBT2 je mnogo pogostejša, za njo je obolelo že preko 236 milijonov ljudi na vsem svetu. Najverjetneje na vsakega bolnika s SBT2 živi še eden, ki ne ve, da ima SBT2, ki bo tako največkrat prepozno odkrita. Za to obliko SB še vedno največkrat obolevajo odrasli, prekomerno prehranjeni ljudje, osnovna značilnost pri tej obliki SB je inzulinska rezistenca (16).

Pri otrocih in mladostnikih gre največkrat za SBT1, čeprav s porastom debelosti vedno več držav poroča tudi o povečani pogostnosti SBT2. Pri SBT1 govorimo o popolnem pomanjkanju inzulina, znaki boleznii se pojavijo, ko je v telesu manj kot 10% običajne količine inzulina. Takrat se srečamo s klasičnimi znaki, kot so poliurija, polidipsija, izrazita žeja in hujšanje (3).

ZDRAVLJENJE SLADKORNE BOLEZNI PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI

Raziskave, kot sta DCCT (angl. *The Diabetes Control and Complications Trial*) in UKPDS (angl. *The United Kingdom Prospective Diabetes Study*), so dokazale, da natančno uravnavana glikemija dolgoročno zmanjša nevarnost poznih zapletov SB (17-20). Sodobna diabetologija zato priporoča natančno odmerjanje inzulina glede na raven krvnega sladkorja ter splošno zdravstveno stanje bolnika in njegove načrtovane aktivnosti. Poleg varovalne prehrane je izjemnega pomena tudi redna telesna aktivnost. Sodobni inzulini, mehanski injektorji, ki omogočajo tudi na 0,5 enote (E) natančno odmerjanje inzulina, skupaj s pogostim merjenjem krvnega sladkorja pripomorejo k cilju stabilne glikemije – vrednost glikozilirane hemoglobina A1c (HbA1c) vsaj pod 8% pri otrocih in mladostnikih, pri odraslih pod 7% ali celo pod 6,5% (18, 19).

Kadar s klasičnimi načini urejanja SB z mehanskimi injektorji ne dosežemo primerne urejenosti SB, lahko bolniku in njegovi družini tudi v Sloveniji že več kot deset let predlagamo najsodobnejšo obliko urejanja SB z inzulinsko črpalko. V času prvega sprejema v bolnišnico zdravljenje SBT1 v otroštvu pričnemo s pomočjo mehanskih injektorjev in uporabo srednjedolgodelujočih analogov ter kratkodelujočih inzulinov. Otrok ali mladostnik prejmeta štiri odmerke inzulina dnevno, srednjedolgodelujoči inzulinski analog v predšolskem obdobju injiciramo zjutraj, pri solarjih in mladostnikih v večernih urah. Starše in otroke poučimo o principih samokontrole ter varovalni prehrani in pomenu redne športne aktivnosti. V obdobju pred tretjim letom starosti pa zdravljenje takoj pričnemo z inzulinsko črpalko, saj tako bolj natančno odmerjamo

inzulin ter zmanjšamo stres za malčka in starše. Starejši otroci inzulinsko črpalko pričnejo uporabljati po koncu stabilnega obdobja remisije.

Inzulinska črpalka je sodoben pripomoček, ki omogoča natančno (tudi na 0,025 E na odmerek) odmerjanje inzulina. Izpopolnjene sodobne generacije črpalk bolniku pomagajo pri odločitvi glede pravega odmerka inzulina s posebnim računalom, ki je vgrajeno v programsko opremo, tehnična uporaba je enostavna in zanesljiva, tako da se postopkov ravnanja s črpalko kmalu priučijo tudi otroci, pa tudi laične osebe še in vrtce, kar je nujno potrebno, da se lahko otrok vrne v domače okolje (21).

Sestavni deli črpalke so poleg črpalke same, ki je elektronsko krmiljena in omogoča pristop v posamezne programe s štirimi ali petimi gumbi ter vsebuje prostor za brizgalko, napolnjeno z inzulinom, še set za dovajanje inzulina, brizgalka in sprožilna naprava za vstavitve seta v telo. Nekatere od sodobnih črpalk imajo programe na zaslonu prevedene v slovenski jezik, kar olajša rokovanje z njo otrokom in družinskimi članom, ter samo priučitev (22).

RAZISKAVE O UPORABI ČRPALK

Preden je črpalka prodrla na vodilno mesto v zdravljenju SB, je minilo več desetletij. Potrebne so bile številne raziskave tako pri odraslih bolnikih kot pri otrocih in mladostnikih s SBT1, da so prevladali dokazi, da gre za sodobno in varno metodo dovajanja inzulina v podkožje, katere uporaba ni povezana s pogostimi zapleti, kot so težke hipoglikemije (23–26). Velika večina raziskav je dokazala, da se s črpalko urejenost SB izboljša, kot pokazatelj urejenosti je največkrat vzeti HbA1c. Velika metaanaliza, objavljena v letu 2008, je dokazala, da je v povprečju vrednost HbA1c ob uporabi inzulinskih črpalk manjša za 0,61 %, hkrati pa pada verjetnost težkih hipoglikemij kar za štirikrat (24). To pomeni, da se izboljšano urejenost SB doseže na račun stabilnejše glikemije in ne zaradi pogostejših hipoglikemij. Rezultati so bili podobni, kadar so zajeli bolnike z dobro vodeno SB ali tiste s slabo vodeno SB, nosečnice, malčke, skupine s SBT1 ali SBT2 (23, 25). Raziskave v skupinah otrok in malčkov so bile enako ključnega

pomena, saj se je pogosto postavljalo vprašanje, ali je uporaba črpalk v otroškem obdobju varna in smiselna (27, 28).

Danes ob črpalki vedno pogosteje uporabljamo tudi sistem za nepretrgano merjenje sladkorja v medcelični. Od leta 2000, ko smo prvič uporabili tak sistem v Sloveniji, je veliko raziskav dokazalo pomen redne uporabe senzorjev za dolgoročno izboljšanje urejenosti SB in zmanjšano variabilnost sladkorjev (29–32). V več raziskavah smo sodelovali tudi na Pediatrični kliniki. Raziskava Guard Control je tako prikazala, da je uporaba senzorjev v skupini otrok in mladostnikov s slabo urejeno SBT1 pomembno vplivala na stabilizacijo sladkorja in izboljšanje presnovne urejenosti. Raziskava SWITCH je vključila otroke in mladostnike s SBT1 in zadovoljivo urejeno SB. Tudi tokrat so rezultati prikazali izboljšanje urejenosti SBT1 brez tveganja težkih hipoglikemij. Raziskava Navigator, ki je zajela dobro urejene odrasle bolnike ter mladostnike, pa je potrdila, da tudi v skupini bolnikov z dobro presnovno urejenostjo nepretrgana uporaba senzorjev lahko dodatno izboljša presnovno urejenost. Pomemben je podatek, da se je kljub padcu HbA1c zmanjšalo število in trajanje hipoglikemij (29, 32). Tako pri uporabi senzorjev v otroštvu raziskave kažejo, da je uspeh odvisen od redne uporabe senzorjev. V kolikor jih malček, otrok ali mladostnik uporabljajo več kot 80 % časa, je dosežen stabilen padec HbA1c. Tudi kadar govorimo o bolnikih z dobro urejeno SB, bomo dosegli enak učinek na urejenost SBT1, kot če pogledamo bolnika s slabše vodeno SB. Danes so izdane tako smernice za uporabo črpalk kot tudi senzorjev, ki jih vedno večja skupina otrok uporablja tudi v Sloveniji (33–35). Ob prehodu na zdravljenje z inzulinsko črpalko in/ali senzorjem je izjemnega pomena dobro poznavanje tehnologije, ki jo prinaša črpalka, ter pravilni napotki za varno uporabo črpalke v različnih situacijah, kot so stres, šport, hipoglikemija in ketoacidoza (36–39).

OSNOVNI POJMI PRI DELU S ČRPALKO

Bazalni nivo inzulina

Ko načrtujemo odmerke inzulina za prehod na inzulinsko črpalko, bo novi celodnevni

skupni odmerek inzulina najpogosteje za 15–20% nižji kot na prejšnji inzulinski shemi. Bazalnemu inzulinu je namenjenih 40–50% celotnega odmerka inzulina. S tem pojmom označimo tisto količino inzulina, ki doteka v telo nepretrgoma in jo načrtujemo vnaprej za različna časovna obdobja. Tako lahko načrtujemo različne bazalne odmerke za čas pouka, fenomen zore, popoldansko redno telesno aktivnost. Bazalni odmerek lahko spremenimo vsakih 30 minut na 0,025 E natančno. Večinoma zadošča štiri do pet različnih bazalnih odmerkov.

Pri odrasli osebi tako inzulini ponavadi teče s povprečno hitrostjo približno 1 E/h, pri otrocih pa ponavadi veliko manj, pri malčkih včasih le 0,050 E/h. Pri posameznikih s tanko plastjo podkožnega maščevja (manj kot 10 mm) se inzulini vsrkava dvakrat hitreje kot pri tistih, ki imajo debelejšo plast maščevja (več kot 20 mm).

Začasni bazalni odmerek

Pri večini črpalk je možno ob določenih situacijah (hipoglikemija, stres, športna aktivnost) bazalni odmerek inzulina začasno spremeniti. Ob hipoglikemiji tako lahko črpalko boljši popolnoma ustavimo ali pa začasno znižamo bazalni odmerek na 0 E za čas od 30 do 60 minut. To pomeni, da bolnik v tem času ne bo dobival inzulina, programiranega v bazalnih odmerkih, po končanem časovnem obdobju, ki smo ga programirali v funkciji začasnih bazalnih odmerkov, pa bo črpalka brez dodatnega pritiska na gumb pričela ponovno dovajati običajne količine inzulina. Podobno lahko v stresnih situacijah (izpit, spraševanje v šoli) začasno zvišamo odmerek za 0,2 ali 0,1 E/h oziroma, kar je še lažje, načrtujemo povečanje bazalnega odmerka za določeno obdobje v odstotkih. Tudi ob dalj časa trajajoči telesni aktivnosti (npr. peturno kolesarjenje) bolnik nastavi začasni bazalni odmerek, ki je 50% nižji od običajnega. Kadar ima naporen trening zvečer, znižamo bazalni odmerek preko cele noči za 0,1–0,2 E/h ali 10–20%.

Bolusi - odmerki inzulina

V inzulinski črpalki uporabljamo le hitro delujoče inzulinske analoge (Humalog®, Apidra®,

Novorapid®). Zato lahko ob primerni glikemiji odmerke ali boluse inzulina vbrizgamo tik pred obrokom. Časovni razmik je torej odvisen od višine krvnega sladkorja pred obrokom.

A vendar velja upoštevati pravila, kaj narediti, če je sladkor izjemno visok ali prenizek. Kadar je krvni sladkor zelo visok (preko 14 mmol/l), bomo s predhodnim korekcijskim odmerkom inzulina najprej skušali sladkor znižati v zaželeno območje. Obrok bomo nato pojedli čez 15–30 minut z rednim inzulinskim kritjem obroka. Kadar pa je sladkor prenizek, velja, da je treba krvni sladkor najprej stabilizirati v območje preko 4,0 mmol/l in šele nato injicirati predvideni odmerek inzulina za obrok.

Odmerke inzulina pred posameznimi obroki prilagajamo količini in sestavi hrane (štetje ogljikovih hidratov v hrani), točno razmerje določi diabetolog in sledi pravilu 500 ali 300 (odrasli ali otroci), kar pomeni, da število 500 delimo s predvidenim celodnevним odmerkom inzulina. Tako na primer bolnik, ki porabi 50 E inzulina, dnevno potrebuje 1 E za 10 g ogljikovih hidratov ($500 : 50 = 10$). Podobno izračunamo tudi korekcijski odmerek inzulina (razmerje, ki pove, za koliko mmol/l nam 1 E zniža krvni sladkor). Tu pravilo imenujemo 100, in torej število 100 delimo s celodnevno količino inzulina. Tako bo naš bolnik, ki porabi 50 E inzulina v enem dnevu, z 1 E inzulina znižal krvni sladkor za 2 mmol/l ($100 : 50 = 2$). Vendar velja posebno opozorilo – korekcija naj nikoli ne preseže 0,1 E/kg telesne teže, saj bi predvsem težji bolnik, ki porabi veliko inzulina, pri izjemno visokem sladkorju lahko z velikim korekcijskim odmerkom utrpel težko hipoglikemijo.

Sodobne črpalke danes že olajšajo delo uporabniku s pomočjo posebnega računalna, kjer v poseben program vnesemo podatke o ogljikohidratnem razmerju za posamezne obroke, dejavnik občutljivosti, čas delovanja inzulina in ciljne sladkorje. Tako po vnosu potrebnih podatkov (krvni sladkor in količina ogljikovih hidratov v obroku) črpalka samodejno izračuna, koliko inzulina potrebujemo, pri čemer upošteva tudi »aktivni inzulini« – preostali inzulini v našem telesu od predhodnih odmerkov inzulina. V programu lahko vnesemo različna ogljikohidratna razmerja za

obroke, tudi dejavnik občutljivosti je lahko drugačen v času pouka ali večernih urah in enako tudi tarčni sladkorji. Pripomoček je dobrodošel predvsem v skupini mlajših otrok ter kot pomoč vzgojiteljicam in učiteljem.

Set za dovajanje inzulina

Set za dovajanje inzulina je sestavljen iz brizgalk in cevke, povezane s kanilo, ki jo vstavimo v podkožje. Kanila ima kovinsko vodilo, ki olajša vstavitve seta – prebod kože – in jo takoj odstranimo. Seti so različno oblikovani, lahko se vstavijo v podkožje ročno ali s pomočjo posebne sprožilne naprave. Tudi glede materiala so razlike, kanila je lahko poliuretanska ali kovinska, dolžina cevke 60 ali 90 cm, brizgalka pa je lahko velika 1,5 ali 3 ml.

Set za dovajanje inzulina najpogosteje vstavimo v trebuh, saj je tam vsrkavanje inzulina najhitrejše. Pri majhnih otrocih lahko vstavimo kanilo tudi v glutealni predel (zunanji predel zadnjice). Številni posamezniki vstavijo kanilo tudi v nadlaket, v stegno ali v ledveni predel. Sete menjavamo na dva do tri dni in tako zmanjšamo možnost nastanka lipohipertrofije in lokalnega draženja ali celo vnetja kože pod obližem. Redko na mestu vstavitve seta opazimo rdečino, ki ne izgine v nekaj urah po menjavi seta. Takrat obstaja nevarnost okužbe tega predela. Umiritev procesa skušamo doseči sprva s toplimi obkladki z dodanim razkužilom ali milom večkrat dnevno po 20 minut. Včasih je potrebno lokalno antibiotično, redko pa kirurško zdravljenje.

Sistem za nepretrgano merjenje sladkorja v medceličnini

Sistem za nepretrgano merjenje krvnega sladkorja omogoča natančen vpogled v njihovo krvnega sladkorja. Sistem opravi 288 meritev sladkorja v 24 urah in jih na ekranu črpalke ali drugega sprejemnika izpiše v obliki krivulje ali trenutne vrednosti sladkorja. Alarm uporabnika opozori, da je sladkor v medceličnini previsok ali prenizek in da mora dodatno izmeriti še sladkor v kapilarni krvi in glede na to vrednost pravilno ukrepati. Sestavljen je iz oddajnika, ki ga povežemo s senzorjem, ki zbira podatke o glukozi v medceličnini in jih brezžično prenese v sprejem-

nik. Senzor deluje encimsko, vsebuje encim glukoza-oksidozo. Sestavljen je iz sterilne upogljive elektrode, ki vsebuje prej omenjeni encim, in je zaščiten s poliuretanskim polimerom. Sladkor se analizira na deset sekund in se nato kot električni signal posreduje v sprejemnik. Sprejemnik vrednosti sladkorja analizira in računa povprečje sladkorja v medceličnini v zadnjih petih minutah. Ker senzor beleži sladkor v medceličnini, nastajajo razlike med izmerjeno ravnijo sladkorja v krvi ter senzorskim rezultatom, zabeleženim na ekranu. Razlika je najmanjša v obdobju stabilnih sladkorjev in se povečuje v času hitrega porasta ali padca sladkorja (po obroku, stres, hipoglikemija), takrat razlika med ravnijo sladkorja v krvi in medceličnini znaša tudi več mmol/l, na kar moramo uporabnika opozoriti in posebej educirati o vrednotenju rezultatov meritev sistema za kontinuirano merjenje glukoze (angl. *continuous glucose monitoring*).

Odčitavanje črpalke

Vse sodobne črpalke lahko s pomočjo računalniških programov odčitamo. Tako realno razberemo, kako bolnik rokuje s črpalke in kako vodi svojo SB. Razberemo lahko celodnevno porabo inzulina, nastavitve bazalnih odmerkov, število in količino danih bolusov ter njihov raspored preko dneva, količino zaužitih ogljikovih hidratov in tudi število meritev sladkorja ter njihove povprečne vrednosti.

KAJ MORAMO VEDETI PRI UPORABI INZULINSKE ČRPALKE?

Zaloge (depo) inzulina v telesu

Ob uporabi inzulinske črpalke so zaloge inzulina v telesu zelo majhne. Tako že kratkotrajna prekinitev dotoka inzulina privede do znakov pomanjkanja inzulina (ketoacidoza). Že v nekaj urah pride do bruhanja, slabosti in prisotnosti ketonov v urinu. Večjo zalogo inzulina v telesu imajo debeli ljudje. Izračunali so, da se pri posamezniku s 40 mm plastjo podkožnega maščevja, z bazalnim odmerkom 1 E/h ustvari zaloga inzulina v količini 6 E, kar večinoma zadošča za dve do tri ure.

Ketoacidoza

Ker so zaloge inzulina v telesu tako majhne, ketoacidoza nastopi že po nekaj urah težav s črpalko ali setom. Če se set iztakne preko noči, se bo otrok že zjutraj zbudil z začetnimi znaki ketoacidoze – z bruhanjem in slabostjo. Zato je pomembno, da ob visokih sladkorjih in slabem počutju vedno preverimo tudi vsebnost ketonov in sladkorja v urinu.

Kaj privede do ketoacidoze?

Vzroki so lahko številni, na primer izpad katetra ali pretisnjen set, povečana potreba po inzulinu med boleznijo, vneta koža na predelu vstavitve seta, set, vstavljen v predel lipohipertrofije, ali pa to, da je bil inzulin izpostavljen zmrzali ali ekstremno visoki temperaturi. Izredno pomembno je hitro in pravilno ukrepanje! Vedno, kadar se otrok ali mladostnik slabo počuti in je krvni sladkor preko 14 mmol/l, je treba v urinu preveriti nivo sladkorja in ketonskih teles. Takoj je treba vbrizgati največji dovoljeni korekcijski odmerek inzulina (0,1 E/kg telesne teže). Če sumimo, da je nekaj narobe s setom ali črpalko, inzulin vbrizgamo z mehanskim injektorjem ali penom. Krvni sladkor preverjamo vsako uro. Če se nakazuje trend padanja, enak ali nižji odmerek inzulina dodamo vsako uro, dokler ne pade sladkor v krvi vsaj pod 14 mmol/l. Bolnik počiva, pije po požirkih neoslajen napitek, sedaj je čas, da preverimo delovanje črpalke in po odstranitvi seta pregledamo vbodna mesta. Če družina ukrepa pravočasno in se posvetuje še z diabetološkim timom, je sprejem v bolnišnico redko potreben. Le kadar bolnik ob bruhanju in slabosti ne pomisli na ketoacidozo in se posvetuje s Centrom za diabetes šele po več urah od pričetka simptomov, bo potreben sprejem v bolnišnico.

Hipoglikemija

Hipoglikemija je akuten zaplet SB, ko krvni sladkor pade pod 3,5 mmol/l, ali pa stanje naglega padca krvnega sladkorja, ko krvni sladkor še ni padel pod 3,5 mmol/l, obenem pa so že izraženi znaki hipoglikemije. Ob hipoglikemiji lahko črpalko popolnoma zaustavimo ali pa začasno znižamo bazalne odmerke na 0 E/h za 30–60 minut. Zaužijemo živila, ki vsebujejo enostavne sladkorje, ki hitro

dvignejo nivo krvnega sladkorja (glukočni gel, glukočni napitki, jedilni sladkor, med ipd.). Za dvig krvnega sladkorja za 3–4 mmol/l v času 15–20 minut potrebujemo 2–3 g čiste glukoze oz. 5 g jedilnega sladkorja na 10 kg telesne teže.

Pogostnost meritev krvnega sladkorja

Osnovno navodilo za uporabnika črpalke je, da preko dneva opravi vsaj štiri do šest meritev krvnega sladkorja pred glavnimi obroki in malicami, med katerimi sta zelo pomembni meritvi sladkorja na tešče in pred spanjem. Prav tako je pomembna kontrola sladkorja in ketonov v urinu (vsaj vsako jutro in vedno, ko je krvni sladkor preko 14 mmol/l, ali ob slabem počutju).

Bolezen, povišana telesna temperatura

Ob boleznih in še posebno pri povišani telesni temperaturi je potreba organizma po inzulinu povečana. Takrat se v večji meri izločajo stresni hormoni (kortizol, adrenalin, glukagon), katerih učinek je nasproten inzulinu in s svojim delovanjem višajo krvni sladkor. Zato v tem primeru odmerkov inzulina ne znižujemo, tudi če otrok nima apetita in manj je. Ko bolnik opazi, da narašča krvni sladkor, najprej poveča bazalne odmerke za 10–20%. Tudi boluse pred obroki je treba povečevati za 20 ali več odstotkov. Le pri driski z bruhanjem (gastroenteritisu) so potrebe po inzulinu lahko manjše.

Kadar bolnik potrebuje urgenten operativni poseg ob poškodbi, vnetju slepiča ali pa je načrtovan reden operativni poseg, je možna uporaba črpalke tako med samim operativnim posegom kot v fazi intenzivne nege in terapije. V takem primeru je ključno takojšnje sodelovanje operaterja, anesteziista ter diabetologa v pripravljenosti v Centru za diabetes, ki izda natančna navodila, kako rokovati s črpalko v takem primeru.

Telesna aktivnost

Pri telesni aktivnosti, ki je kratkotrajna, lahko črpalko odložimo, še posebej seveda takrat, ko gre za kontaktne športe, kjer bi lahko črpalko poškodovali (borilne veščine, košarka,

odbojka), enako velja za izrazito aerobne aktivnosti, kjer je poraba energije velika in trening traja eno uro ali dlje. Pri daljših, manj intenzivnih aktivnostih priporočimo uporabo začasnega bazalnega odmerka, ki ga znižamo vsaj za polovico ali še bolj. To lahko ugotovimo le s pogostimi meritvami krvnega sladkorja v času telesne aktivnosti. Po napor- nem treningu je treba zaloge glukoze v telesu obnoviti, zato preko noči lahko zmanjšamo bazalni odmerek inzulina za 0,1–0,2 E/h. S tem se bolnik uspešneje zavaruje pred hipoglikemijo.

Inzulinsko črpalko uporabljajo tudi vrhunski športniki, saj jim omogoča natančno načrtovanje treningov, obenem pa je možna takojšnja prilagoditev odmerkov inzulina. Med slovenskimi mladostniki ter odraslimi bolniki s SBT1 trenutno inzulinsko črpalko uporablja veslač v kajaku na divjih vodah, ki dosega mednarodne uspehe, veslač v četvercu, ki se je udeležil svetovnega prvenstva v letu 2011, košarkar v državni reprezentanci, vrhunska rokometasica, maratonci, karateisti itd. Seveda potrebujejo veliko izkušenj, sodelovanje med trenerji in diabetologom, dietetikom, pogoste meritve sladkorja, natančno odmerjanje ogljikovih hidratov ter načrtovanje treningov, da dosegajo vrhunske rezultate.

VIZIJA RAZVOJA SODOBNE DIABETOLOGIJE V PRIHODNOSTI – MOŽNOSTI SODOBNE TEHNOLOGIJE

Uporaba sistema za nepretrgano merjenje sladkorja v medceličnini in hkratna uporaba sodobnih inzulinskih črpalk za zdravljenje SBT1 je vodila v raziskave algoritmov, ki bi samodejno nadzirali glikemijo v številnih centrih tako v Evropi kot v Združenih državah Amerike. V letu 2011 se je v raziskave iz tega področja vključila tudi Slovenija v multicentrični raziskavi skupaj z Izraelom in Nemčijo. V raziskavah izhajamo iz spoznanja, kako pomemben je dober nadzor nad krvnim sladkorjem za preprečevanje poznih zapletov SB. Tudi danes ob uporabi najsodobnejše tehnologije strah pred težko hipoglikemijo bolniku ali njegovim staršem prepreči, da bi vzdrževali stabilne vrednosti sladkorja, saj se anksioznost lahko poglablja do te mere, da je

vodenje SB porušeno. Razvoj sistema zaprte zanke – avtomatskega nadzornega sistema, ki povezuje črpalko in senzor za nepretrgano merjenje sladkorja v medceličnini, ponuja inovativen način stabilizacije ravni krvnega sladkorja. Zaprta zanka bi zmanjšala tveganje tako hipoglikemije kot tudi hiperglikemije. Projekt DREAM (angl. *Diabetes Wireless Artificial Pancreas Consortium*) je usmerjen v razvoj algoritma povratne zveze, ki se imenuje MD – Logic Artificial Pancreas (MDLAP). Algoritem temelji na teoriji predvidevanj, s katerimi skušamo zagotoviti stabilno glikemijo. Gre za sistem zaprte zanke, ki je prilagojen vsakemu bolniku, z možnostjo sprotnega učenja in vgrajenimi varnostnimi opozorili za hipo- in hiperglikemijo. Zahteven računalniški program na podlagi spremljanja gibanja sladkorja v medceličnini izračunava predvideno gibanje sladkorja v naslednji časovni enoti ter ga s pomočjo natančnega odmerjanja inzulina stabilizira v zaželenem okvirju. Trenutno v raziskavi preizkušamo uspešnost algoritma v obdobju noči.

SLOVENSKE IZKUŠNJE PRI UPORABI INZULINSKE ČRPALKE PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1

Inzulinska črpalka je našla pomembno mesto v sodobni diabetologiji. Na Pediatrični kliniki v Ljubljani jo sedaj uporabljamo dvanajsto leto. V celotnem obdobju smo uvedli že več kot 750 črpalk, več kot 50 otrok in mladostnikov uporablja senzorje za nepretrgano merjenje sladkorja. Stare generacije črpalk zamenjujejo najbolj sodobne, čakamo na razvoj novih inzulinov, novih črpalk, tudi zaprte zanke, kjer bi črpalka v povezavi s senzorjem samodejno uravnavala sladkor.

Že sedaj lahko potrdimo, da je prehod na zdravljenje z inzulinsko črpalko v naši skupini bolnikov uspešen, saj je desetletna analiza podatkov o dolgoročni urejenosti SB ter morebitnih zapletih zdravljenja s črpalko tudi na Pediatrični kliniki pokazala, da gre za varno zdravljenje. Črpalko uporablja več kot 70 % naših bolnikov. V obdobju desetih let smo ure-

jenost vsem otrokom, mladostnikom in študentom s SBT1 izboljšali, saj je HbA1c v tem času padel z 9,1 % na 7,53 %, kar hkrati napoveduje, da smo večini bolnikov zmanjšali tveganje za zaplete SB za polovico ali ga odmaknili za nekaj desetletij.

ZAKLJUČEK

Inzulinska črpalka je sodoben pripomoček, ki otroku, mladostniku ali odraslemu bolniku s SBT1 izboljša kakovost življenja ter vodenje SBT1. Natančnejše odmerjanje inzulina, uporaba računalna v črpalki, vključitev sistema za

napretrgano merjenje sladkorja v medceličnini večini bolnikov omogočijo stabilizacijo sladkorja, nižje vrednosti HbA1c ter s tem manjšo nevarnost poznih zapletov SBT1. Uporaba inzulinske črpalke je možna v vseh starostnih obdobjih od neonatalnega obdobja naprej. Dolgotrajna uporaba črpalk prinaša pomembne izkušnje zdravniku posamezniku ter Centru za diabetes v celoti. Hiter napredek tehnologije bo v prihodnjem desetletju nedvomno prinesel dodatne izboljšave pri vodenju SBT1, ki bodo bolnikom omogočile še boljše nadzor nad SBT1.

LITERATURA

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998; 21 (9): 1414–31.
2. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27 (5): 1047–53.
3. Craig ME, Hattersley A, Donaghue K; International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006–2007. Definition, epidemiology and classification. *Pediatr Diabetes*. 2006; 7 (6): 343–51.
4. Pugliese A. Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics. *Int Diabetes Monitor*. 2010; 22: 101–11.
5. Zipris D. Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin Immunol*. 2009; 131 (1): 11–23.
6. Viner RM, Hindmarsh PC, Taylor B, et al. Childhood body mass index (BMI), breastfeeding and risk of type 1 diabetes: findings from a longitudinal national birth cohort. *Diabet Med*. 2008; 25 (9): 1056–61.
7. Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, et al. Psychological stress may induce diabetes related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care*. 2005; 28 (2): 290–5.
8. Akerblom HK, Virtanen SM, Ilonen J, et al. Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia*. 2005; 48 (5): 829–37.
9. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta analysis of observational studies. *Diabetologia*. 2008; 51 (5): 726–35.
10. Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: environmental factors. *Int Diabetes Monitor*. 2010; 22: 112–20.
11. D'Angeli MA, Merzon E, Valbuena LF, et al. Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010; 164 (8): 732–8.
12. Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: weight gain as a missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia*. 2001; 44 (7): 914–22.
13. Wilkin TJ. The great weight gain experiment, accelerators and their implications for autoantibodies in diabetes. *Arch Dis Child*. 2006; 91 (6): 456–8.
14. Gale EAM. To boldly go-or to go too boldly? The accelerator hypothesis revisited. *Diabetologia*. 2007; 50 (12): 1571–5.
15. Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis. *Diabetologia*. 2002; 45 (4): 588–94.
16. Diabetes in Children and Adolescents Work Group of the National Diabetes Education Program. An update on type 2 diabetes in youth from the National Diabetes Education Program. *Pediatrics*. 2004; 114 (1): 259–63.
17. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. *J Pediatr*. 1994; 125 (2): 177–88.
18. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005; 28 (1): 186–212.

19. Rewers M, Pihoker C, Donaghue K, et al. Assessment of glycemic control and adolescents with diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2009; 10 Suppl 12: 71–81.
20. Genuth S. The UKPDS and its global impact. *Diabet Med*. 2008; 25 Suppl 2: 57–62.
21. Battelino T, Janež A. Zdravljenje z inzulinsko črpalko. In: Battelino T, Janež A, eds. *Inzulinska črpalka*. 1st ed. Ljubljana: Didakta; 2007. p. 7–12.
22. Logar T, Zupančič I, Battelino T, et al. Dobra šola vodenja sladkorne bolezni – inzulinska črpalka. In: Žargaj B, Tomažin Šporar M, eds. *Zbornik predavanj: strokovni seminar; 2002 Oct 25–26; Terme Čatež*. Ljubljana: Endokrinološka sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov Slovenije; 2002. p. 32–9.
23. Pańkowska E, Błazik M, Dziechciarz P, et al. Continuous subcutaneous insulin infusion vs. multiple daily injections in children with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Pediatr Diabetes*. 2009; 10 (1): 52–8.
24. Pickup JC, Sutton AJ. Severe hypoglycaemia and glycaemic control in type 1 diabetes: meta-analysis of multiple daily insulin injections compared with continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabet Med*. 2008; 25 (7): 765–74.
25. Jeitler K, Horvath K, Berghold A, et al. Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily insulin injections in patients with diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2008; 51 (6): 941–51.
26. Misso ML, Egberts KJ, Page M, et al. Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) versus multiple insulin injections for type 1 diabetes mellitus. 2010 Jan 20 [citirano 2012 Apr 5]. In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Ltd. c1999–2013. 1579K. Dosegljivo na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005103.pub2/full>. Številka vpisa: CD005103.
27. Shalitin S, Phillip M. The use of insulin pump therapy in the pediatric age group. *Horm Res*. 2008; 70 (1): 14–21.
28. Scrimgeour L, Cobry E, McFann K, et al. Improved glycemic control after long-term insulin pump use in pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2007; 9 (5): 421–8.
29. Battelino T, Phillip M. Real-time continuous glucose monitoring in randomized control trials. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2010; 7 Suppl 3: 401–4.
30. Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group. Quality-of-life measures in children and adults with type 1 diabetes: Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring randomized trial. *Diabetes Care*. 2010; 33 (10): 2175–7.
31. Davis SN, Horton ES, Battelino T, et al. STAR 3 randomized controlled trial to compare sensor-augmented insulin pump therapy with multiple daily injections in the treatment of type 1 diabetes: research design, methods, and baseline characteristics of enrolled subjects. *Diabetes Technol Ther*. 2010; 12 (4): 249–55.
32. Battelino T, Phillip M, Bratina N, et al. Effect of continuous glucose monitoring on hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34 (4): 795–800.
33. Bode BW, Battelino T. Continuous glucose monitoring. *Int J Clin Pract Suppl*. 2010; (166): 11–5.
34. Ives B, Sikes K, Urban A, et al. Practical aspects of real-time continuous glucose monitors: the experience of the Yale Children's Diabetes Program. *Diabetes Educ*. 2010; 36 (1): 53–62.
35. Blevins TC, Bode BW, Garg SK, et al. Statement by the american association of clinical endocrinologists consensus panel on continuous glucose monitoring. *Endocr Pract*. 2010; 16 (5): 730–45.
36. Tamborlane WV, Swan K, Sikes KA, et al. The renaissance of insulin pump treatment in childhood type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006; 7 (3): 205–13.
37. Tamborlane WV, Fredrickson LP, Ahern JH. Insulin pump therapy in childhood diabetes mellitus: guidelines for use. *Treat Endocrinol*. 2003; 2 (1): 11–21.
38. Weintrob N, Shalitin S, Phillip M. Why pumps? Continuous subcutaneous insulin infusion for children and adolescents with type 1 diabetes. *Isr Med Assoc J*. 2004; 6 (5): 271–5.
39. Phillip M, Battelino T, Rodriguez H, et al. Use of insulin pump therapy in the pediatric age-group: consensus statement from the European Society for Paediatric Endocrinology, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, endorsed by the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30 (6): 1653–62.

Simona Perčič¹, Alojz Ihan²

Chédiak-Higashijev sindrom

Chédiak-Higashi Syndrome

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Chédiak-Higashijev sindrom, klinični opis, diagnoza, genetsko svetovanje, zdravljenje

Za Chédiak-Higashijev sindrom je značilna različna stopnja očesno-kožnega albinizma, ponavljajoče se okužbe, pogoste krvavitve in različni nevrološki izpadi. Je redka avtosomno recisivno dedovana bolezen. Zdravljenje temelji na presaditvi krvotvornih matičnih celic, ki popravi imunološke in hematološke okvare, vendar očesno-kožna in nevrološka simptomatika vztrajata. Nezdravljeni bolniki umrejo zaradi hudih bakterijskih okužb ali razvijejo tako imenovano pospešeno fazo limfoproliferativnosti.

ABSTRACT

KEY WORDS: Chédiak-Higashi syndrome, clinical description, diagnosis, genetic counseling, treatment

Chédiak-Higashi syndrome is characterized by varying degrees of oculocutaneous albinism, recurrent infections, bleeding disorders and variable neurological involvement. It is a rare autosomal recessive disorder. The treatment consists of bone marrow transplantation, which corrects the immunologic and hematologic defects. Nevertheless, oculocutaneous and neurological changes persist. Untreated patients die as the result of bacterial infections or develop »accelerated phase« lymphoproliferation.

¹ Simona Perčič, dr. med., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; simona.percic@gmail.com

² Prof. dr. Alojz Ihan, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Chédiak-Higashijev sindrom (CHS) (v podatkovni zbirki bolezni Online Mendelian Inheritance in Man kot OMIM#214500) je prvič opisal Beguez-Cesar leta 1943 pri treh sorodnih otrocih, ki so imeli enako klinično sliko nevtropenije in nenormalna zrnca v levkocitih (1). Steinbrick je poročal o še enem primeru leta 1948 (2). Kubanski hematolog Chédiak je poročal o podobnem primeru leta 1952. Leta 1954 je japonski pediater Higashi poročal o vrsti primerov bolnikov, pri katerih je našel pomanjkanje mieloperoksidaze v zrnih nevtrofilcev (3, 4).

CHS je redka avtosomno-recesivna bolezen, za katero so značilni očesno-kožni albinizem, ponavljajoče se bakterijske okužbe zaradi okvare aktivnosti naravnih celic ubijalk (angl. *natural killer cells*, NK), T-celične citotoksičnosti, kemotakse in ubijanja bakterij z granulociti in monociti, napredujoče nevrološke okvare in prisotnost velikih, lizosomom podobnih organelov v večini celic, ki vsebujejo zrnca in pogoste krvavitve (5–8). Nenormalna zrnca so navadno vidna v krvnih levkocitih in v levkocitih kostnega mozga, še posebno pa v granulocitih in v melanocitih (9, 10). Druge klinične značilnosti za CHS so srebrni lasje, preobčutljivost na svetlobo, horizontalni in rotatorni nistagmus ter hepatosplenomegalija.

Približno 85 % bolnikov razvije tako imenovano »pospešeno fazo«, v kateri pride do limfoproliferativne infiltracije predvsem kostnega mozga in retikuloendotelijskega sistema, lahko pa tudi do skoraj vseh organov in organskih sistemov (11). Za to fazo so značilne visoka vročina, zlatenica, hepatosplenomegalija, limfadenopatija, pancitopenija in krvavitve (12). Temelj za diagnozo je pojav nenormalnih orjaških zrn v nevtrofilcih, ki so peroksidaza pozitivni (9, 10). Bolezen je povzročena z mutacijo v genu *CHS1/LYST*, ki se nahaja na kromosomu 1, posledica česar je motena morfologija in delovanje lizosoma (8, 11, 13–15). Natančen pomen proteina CHS1 je nepoznan, vendar ga zadnje raziskave bolje opredeljujejo. Imel naj bi vlogo pri uravnavanju prometa vezikul in lizosomalni velikosti (8, 16, 17). Milejši fenotip bolezni se pojavi pri bolnikih, ki nosijo samo eno točkovno

mutacijo, kar povzroči delno aktivnost CHS1. Bolniki s hujšo fenotipsko obliko CHS imajo navadno bolj okvarjen ali odsoten gen *CHS1*. Večja kot je okvara lizosoma, hujše so okužbe pri bolnikih (8, 11, 14). Tako imenovana »pospešena faza« je najhujša klinična oblika bolezni in ogroža življenje zaradi visoke stopnje okužb in krvavitve (11, 12, 18). Zdravljenje s kortikosteroidi in etopozidom je pokazalo rezultate prehodne remisije, vendar so ponovitve pogoste in zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (KMC) je edino končno zdravljenje (12, 18). Uspeh zdravljenja s presaditvijo KMC je odvisen od statusa bolezni pred presaditvijo. Zdravljenje je uspešno, če bolnik pred presaditvijo še ni bil v »pospešeni fazi« bolezni (18). Očesno-kožna in nevrološka simptomatika vztrajata kljub presaditvi (14).

KLINIČNA SLIKA

Naravni potek bolezni

Delni očesno-kožni albinizem

Pomanjkanje pigmenta je spremenljivo in lahko vključuje lase, kožo in oči. Pri klasičnih oblikah CHS so lasje srebrnkasti. Pomanjkanje pigmenta v koži ni jasno vidno, razen v primerjavi s temnejšo pigmentacijo članov družine. Pomanjkanje pigmenta v šarenici je združeno s pomanjkanjem pigmenta v mrežnici in nistagmusom. Vid niha od normalnega do delno okvarjenega. Pigmentni skupki v lasih so navadno vidni pod svetlobnim mikroskopom (5, 8, 19, 20).

Imunska pomanjkljivost

Pogoste okužbe navadno nastopijo že v otroštvu in so hude. Najpogostejše so bakterijske okužbe, pogosti povzročitelji so stafilokoki in streptokoki. Prav tako se pojavijo virusne in glivične okužbe. Najpogostejše so okužbe kože in dihalnih poti. Novejši podatki govorijo o periodontitisu kot posledici imunske pomanjkljivosti. Bolniki z neznačilnim CHS so lahko brez anamneze hudih okužb (5–7, 20–27).

Nagnjenost h krvavitvam

Klinične oblike so navadno mile in se kažejo kot krvavitve iz nosu, sluznične krvavitve

in nagnjenost k podplutbam. Krvavitve pri CHS so lahko nepomembne in ne potrebujejo zdravniških posegov. Težave s krvavitvami naj ne bi povzročale bolnikove zaskrbljenosti (5, 8, 20, 28).

Pospešena faza Chédiak-Higashijevega sindroma

Pojavi se pri 85 % bolnikov s CHS in to v katerem koli starostnem obdobju. Klinično se pojavijo vročina, limfadenopatija, hepatosplenomegalija, slabokrvnost, nevtropenija in včasih trombocitopenija. Prizadeti so lahko vsi organi ali organski sistemi. Sprva so raziskovalci mislili, da gre za maligno obolenje, podobno limfomu, danes pa je znano, da gre za hemofagocitno limfohistiocitozo, ki se kaže z večorgansko prizadetostjo. Pospešena faza in njeni zapleti so najpogostejši vzrok smrti pri CHS. Kako ta faza nastane, ostaja neznan. Okužba z virusom Epstein-Barr je ena izmed možnosti, ki naj bi povzročila pospešeno fazo, vendar pravih dokazov še ni. Prav tako naj bi pospešeno fazo povzročila odsotnost celic NK (11, 12, 18).

Nevrološka obolenja

Kljub uspešnemu izidu imunološke in hematološke simptomatike pri presaditvi KMC pa se pri CHS pojavijo nevrološka obolenja, ki so napredujoče narave in se ne popravijo kljub presaditvi KMC. Nevrološka obolenja so podobna pri vseh oblikah CHS, tudi pri neznanih. Značilni so tremor, nizka spoznavna sposobnost, motnje ravnotežja, ataksija, odsotnost tetivnih refleksov ter motorične in senzorične nevropatije (5, 7, 8, 14, 29, 30). Tardieu s sodelavci je leta 2005 objavil raziskavo, v kateri so pri 11 bolnikih s CHS, ki so jim uspešno presadili KMC pred 20 leti, primerjali nevrološka obolenja s tistimi bolniki s CHS, ki jim KMC niso presadili. Ugotovili so, da so nevrološka obolenja napredujoče narave pri obeh skupinah in se med seboj ne razlikujejo. Avtorji se strinjajo, da nevrološke okvare izhajajo iz dolgo trajajoče, napredujoče bolezni in ne iz nevrotoksičnega učinka presaditve KMC ali pospešene faze. Ta dva dejavnika nista verjetna, ker kljub nevrološkim okvaram ni znakov sistemskega izražanja hemofagocitnega sindroma ali toksičnosti

zaradi presaditve KMC ali pridruženih nenormalnosti v možgansko-hrbtenjačni tekočini, ki bi kazala na tak vzrok. Nevrološke okvare tako najverjetneje nastanejo zaradi nenehne dolgo trajajočega napredovanja lizosomske okvare v nevronih in celicah gljive. Natančni mehanizmi pa ostajajo nepoznani (31, 32).

Neznačilni fenotipi

Določen, še neznan delež bolnikov s CHS ima neznačilno ali blago fenotipsko obliko, ki pogosto ostaja neopažena. Lastnosti neznačilne oblike so naslednje (8, 11, 14):

- odsotnost očesno-kožnega albinizma,
- neznačilne okužbe ali hude okužbe v otroštvu, ki izvenijo do odraslosti,
- zmanjšano število trombocitov z blagimi krvavitvami in
- napredujoče nevrološke motnje, ki so opisane zgoraj.

Povezava genotip-fenotip

Klinični fenotipi CHS so povezani z molekularnim genotipom. Različni klinični fenotipi CHS korelirajo z molekularnimi genotipi; mutacije z izgubo delovanja (angl. *loss of function*) proteina, ki ga kodira *LYST*, so združene s hudo obliko CHS, ki se pojavi zelo zgodaj v življenju, z značilnimi smrtnimi okužbami in hemofagocitno limfohistiocitozo, medtem ko so mutacije gena *LYST* z izgubo smisla proteina (angl. *missense*) blažje, CHS se pojavi kasneje v življenju s počasi napredujočimi nevrološkimi okvarami ali z začetkom v puberteti z okužbami, vendar brez hemofagocitne limfohistiocitoze (11, 14, 33). Natančne raziskave fibroblastov in melanocitov pri bolnikih s CHS z različnimi kliničnimi fenotipi so pokazale paleto povečanja znotrajceličnih zrnec pri različnih celičnih tipih CHS (14).

Razširjenost

Od leta 1989 do leta 1999 je bilo v literaturi objavljenih nekaj več kot 200 primerov bolnikov. Natančno razširjenost je težko oceniti, saj so lahko posamezni primeri opisani večkrat, po drugi strani pa tisti bolniki z milo obliko bolezni niso vsi prepoznani in predstavljeni v literaturi (5).

DIAGNOZA

Klinična diagnoza

Na diagnozo CHS pomislimo pri bolnikih z enim izmed naslednjih znakov (5–10, 14, 19–27, 29, 30, 34, 35):

- Delni očesno-kožni albinizem: pomanjkanje pigmenta v koži in laseh, ki se lahko ugotovi ob rojstvu pri rutinskem pregledu. Za prepoznavo in diagnozo zmanjšanja pigmenta v šarenici, ki se kaže kot šarenična transluminacija, je potreben celostni oftalmološki pregled. Pridružena sta lahko tudi sočasen nistagmus in zmanjšana pigmentacija mrežnice.
- Orjaški vključki v levkocitih: prisotnost orjaških vključkov v polimorfonuklearnih nevtrofilcih in manjkrat v limfocitih je najzanesljivejši diagnostični klinični kriterij za CHS, vendar se ga lahko spregleda pri rutinskem pregledu krvne slike. Pomembno je, da je odvzet in pregledan vzorec krvi iz periferije.
- Imunska pomanjkljivost: pozorni smo na anamnezo okužb, še posebno bakterijskih okužb kože in dihal.
- Milejša oblika pogostih krvavitev.
- Nevrološki izpadi: nevrološki izpadi so spremenljivi, vključujejo pa upad spoznavnih sposobnosti, periferno nevropatijo, ataksijo in parkinsonizem. Simptomi se lahko pojavijo kadar koli od otroštva do zgodnje odraslosti.

Ker je za diagnozo CHS najzanesljivejši dokaz orjaških vključkov v levkocitih, naj bi kombinacija katerega koli zgornjega pojava vodila k dokazovanju orjaških vključkov v periferni krvi.

Testiranje

Na peroksidazo pozitivne orjaške vključke vidimo pri bolnikih s CHS v levkocitih, megakariocitih in drugih prekursorjskih celicah v kostnem mozgu. Prisotnost orjaških vključkov v levkocitih v periferni krvi je trenutno edini verodostojen histološki test za potrditev diagnoze CHS (9, 10).

Diagnozo CHS podpirajo tudi (5–10, 19):

- Celice NK so večinoma v normalnem številu, vendar z manjšo aktivnostjo.

- Nevtropenija in okvarjeno nevtrofilno delovanje (posebno kemotaksa in znotraj-celično bakterično delovanje). Imunoglobulini, komplement, tvorba protiteles in pozna preobčutljivost niso spremenjeni.
- Mikroskopiranje las pod svetlobnim mikroskopom kaže skupke pigmenta (analiza las je neinvazivna in hitra; če vzorec krvi kaže orjaška zrnca, naj bi bila narejena analiza las).
- Motnje trombocitov: nizko število ali odsotnost, nepravilna morfologija, trombociti, ki vsebujejo kalcij, adenosin-5'-difosfat (angl. *adenosine-5'-diphosphate*, ADP), adenosin-5'-trifosfat (angl. *adenosine-5'-triphosphate*, ATP) in serotonin, so pomembni pri sekundarnem valu trombocitne agregacije.

Potek preiskav

Če so prisotni klinični kriteriji, ki kažejo v prid CHS, so potrebne naslednje preiskave:

- odvzem krvi za dokaz nenormalnih zrn v levkocitih,
- oftalmološki dokaz očesno-kožnega albinizma,
- preiskava trombocitne agregacije,
- izključitev Hermansky-Pudlakovega sindroma in
- molekularno-gensko testiranje gena *LYST*.

Potrebno je testiranje nosilcev in njihovih sorodnikov na *LYST* in mutacije, ki so značilne za družino. Pri nosečnosti s povečanim tveganjem je potrebna prenatalna diagnoza ali predimplantacijska genetska diagnoza za prepoznavanje mutacije, ki povzroča bolezen v družini.

DIFERENCIALNA DIAGNOZA

Klinična diagnoza pri bolnikih s CHS temelji na pigmentnih okvarah las, kože in oči, kongenitalni ali prehodni nevtropeniji, imunski pomanjkljivosti in nepojasneni nevrološki okvari. Vsaka od teh ugotovitev je lahko spremenljivo prisotna pri posameznem bolniku, zato je treba pazljivo postaviti diagnozo.

Očesno-kožni albinizem je pogost znak (obolevnost je 1 na 18.000 ljudi) in se lahko

v različnih oblikah pojavi pri drugih boleznih, vključno pri nekaterih primarnih imunskih pomanjkljivostih (36).

Hermansky-Pudlakov sindrom (OMIM #20330) je podobno kot CHS združen z očesno-kožnim albinizmom in motnjami v strjevanju krvi, pri nekaterih oblikah pa tudi s kongenitalno nevtropenijo, ponavljajočimi se bakterijskimi okužbami in nevrološkimi motnjami, vendar brez orjaških zrn v nevtrofilcih (37).

Za sindrom Griscelli so značilni blaga oblika kožne hipopigmentacije in srebrnkasti lasje, trombocitno število pa je normalno. Trenutno poznamo tri tipe Griscellijevega sindroma. Ločimo jih glede na to, kateri gen je okvarjen (38–40):

- Griscellijev sindrom I (OMIM#214450): gre za hude nevrološke okvare,
- Griscellijev sindrom II (OMIM#607624): imunopomanjkljivost in limfohistiocitoza in
- Griscellijev sindrom III (OMIM#609227): samo hipopigmentacija.

Crossov sindrom (OMIM#608271) se kaže kot hipopigmentacija, očesne okvare in huda duševna zaostalost z večjo okvaro osrednjega živčevja. Okužbe niso glavni problem (36).

Pomanjkljivost endosomalnega prilagoditvenega proteina p14 je novejši odkrit sindrom primarne imunske pomanjkljivosti. Klinični znaki vključujejo delni albinizem, nizko rast, kongenitalno nevtropenijo in limfoidno pomanjkljivost. Nevtrofilci kažejo spremenjena azurofilna zrnca in zmanjšano mikrobicidno delovanje fagosomov, v nasprotju z orjaškimi zrnici v nevtrofilcih pri CHS. Nevrološke motnje pri tem sindromu niso opisane (41).

Za družinsko hemofagocitno limfohistiocitozo (OMIM#610382) sta značilni proliferacija in infiltracija hiperaktiviranih makrofagov in limfocitov T. Kaže se kot akutna bolezen z dolgo trajajočo vročino in hepatosplenomegalijo. Začetek je značilen. Nastopi v prvih mesecih življenja ali celo znotrajmaternično. Pojavijo se tudi nevrološke okvare, izpuščaji in limfadenopatija sta redkejša. Prisotne so citopenija (anemija, trombocitopenija in nevtropenija), okvara jeter in hemofagocitoza kostnega mozga. Povprečno preživetje

otrok s to boleznijo je dva meseca, če niso zdravljeni (42, 43).

Sindrom Vici (OMIM#256950), za katerim je zbolelo le nekaj ljudi, se kaže s hipopigmentacijo kože, kombinirano imunsko pomanjkljivostjo, agenezo kaloznega korpusa, obojestransko katarakto in shizo ust ter mehkega neba. Pojavijo se okvare spoznavnih sposobnosti, krči in hude okužbe dihal (44–46).

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje kliničnih znakov

Hematološke okvare in imunske pomanjkljivosti

Edini način zdravljenja teh okvar je presaditev KMC. Protokol, po katerem poteka presaditev kostnega mozga, navadno vsebuje kombinacijo etopozida, busulfana in ciklofosfamida (32). Trenutni standard je presaditev KMC čim prej po postavljeni diagnozi, pri čemer mora biti pospešena faza izključena in bolnik v remisiji. Najboljše rezultate dosežemo, če je presaditev KMC pred pospešeno fazo bolezni. Ob prisotnih znakih pospešene faze mora biti hemofagocitoza vodena v klinično remisijo pred presaditvijo KMC (18).

Smernice za zdravljenje pospešene faze, ki so bile objavljene leta 2004, so sestavljene iz kombinacijskega zdravljenja z etopozidom, deksametazonom in ciklosporinom A. Nekateri bolniki dobijo tudi intratekalno metotreksat in prednizolon (43). Remisija je dosežena pri 75 % bolnikov v osmih tednih, vendar so ponovitve pogoste in odgovor na zdravljenje vse slabši. Ko nastopi remisija, je indicirana presaditev KMC (42).

Celotno petletno preživetje pri 35 otrocih, ki so jim presadili KMC, je bilo 62 % (18). Presaditev med pospešeno fazo je imela večjo smrtnost. Bolniki v remisiji po pospešeni fazi so imeli visoko stopnjo uspešne presaditve KMC (18).

Očesne anomalije

Izboljšanje refraktivnih napak lahko popravi vid. Za zaščito občutljivih oči pred ultravijoličnim sevanjem je priporočljiva uporaba sončnih očal.

Nevrološki izpadi

Zaradi napredujoče narave nevroloških simptomov naj bi že zgodaj ob odkritju boleznih starejše bolnike vodili specialisti rehabilitacijske medicine (5, 7, 8, 14, 29, 30).

Preprečevanje sekundarnih zapletov

Pomembna naj bi bila zaščita pred bakterijskimi okužbami. Antibiotike in protivirusna zdravila bi morali smiselno uporabljati. Razi-skava, ki jo je objavil Wolf s sodelavci, je dokazala, da preventivno zdravljenje ni učinkovito, vendar pride v poštev pri ponavljajočih se okužbah (27). Antibiotična terapija je indicirana pred invazivnimi posegi in pri izdrtju zoba. Imunizacijo bolniki največkrat dobro prenašajo in je potrebna pri vseh oblikah CHS.

Za nadzor krvavitev naj bi 30 minut pred invazivnim posegom vnesli dezmpresin intravensko. Pri resnejših poškodbah in krvavitvah je potrebna trombocitna transfuzija. Treba se je izogibati vsem nesteroidnim protivnetnim zdravilom, ker lahko poslabšajo krvavitve.

Zaščita kože je odvisna od resnosti hipopigmentacije. Ne glede na obliko bolezni je treba zaščititi kožo pred soncem zaradi možnosti kožnega raka.

Sledenje

Pri neznačilnih mladostniških in odraslih oblikah CHS moramo letno opraviti (5):

- ultrazvok trebuha za spremljanje hepatosplenomegalije,
- pregled krvi za določanje citopenije,
- laboratorijske preiskave za spremljanje morebitne jetrne okvare vključno s hipertrigliceridemijo in hipofibrinogenemijo,
- določanje serumskega feritina,
- določanje topnega interlevkin-2 receptorja in
- če anamneza in klinični pregled kažeta na obolenje osrednjega živčevja ali druge oblike pospešene faze, premislimo o možnosti biopsije kostnega mozga in/ali lumbalne punkcije.

Za obe obliki, klasično in neznačilno, je priporočljiv letni pregled pri oftalmologu.

Nosečnost in Chédiak-Higashijev sindrom

V literaturi obstaja samo en prikaz primera, v katerem je bolnica s CHS (homozigot) rodila normalnega otroka. V tem primeru bolezen ni vplivala na nosečnost in porod. Nosečnost tudi ni vplivala na potek bolezni pri noseči materi. V literaturi ni nobenega drugega primera, da bi bolnica s CHS (homozigot na mutacijo za gen *LYST*) zanosila. Tako ni podatkov o spontanah splavih pri tej bolezni (47).

GENSKO SVETOVANJE

Gensko svetovanje je proces, pri katerem posameznika ali družine poučimo o naravi bolezni, dedovanju in zdravljenju in mu/jim omogočimo samostojno odločitev. Gen *LYST*, nedavno imenovan *CHS1*, je edini poznan gen, ki povzroča CHS (8, 11). Mutacije drugih genov, ki bi povzročale CHS, trenutno niso poznane. Ker delovanje uravnalnih proteinov za lizosomski promet, ki so kodirani z *LYST*, v glavnem ostaja neznano, je možno, da mutacije drugih genov, katerih produkti sodelujejo z *LYST*, prav tako vodijo v CHS (11, 33).

Tveganje za člane družine

Starši bolnih otrok so navadno heterozigoti in potemtakem nosilci enega mutiranega alela. Heterozigotni starši so brez izraženih simptomov. Status nosilcev mora biti potrjen z molekularnim genskim testiranjem. Če sta oba starša heterozigotna, ima vsak otrok teh dveh staršev 25 % verjetnost, da bo zbolel, 50 %, da bo nosilec brez izraženih simptomov, in 25 % verjetnost, da bo zdrav in hkrati ne nosilec bolezni. Ko je znano, da je otrok takih staršev zdrav, je dve tretjini možnosti, da ostane nosilec. Potomci bolnika, ki ima CHS in zdravega partnerja, so obvezni heterozigoti (nosilci) za bolezen, ki jo povzroča mutacija na genu *LYST*.

Odkrivanje nosilcev in načrtovanje družine

Za družine s povečanim tveganjem je primer-no testiranje nosilcev, ko je bila v družini odkrita mutacija. Optimalen čas za določitev genetskega tveganja, razvrstitev statusa nosilca in pogovor o prenatalnem genetskem testira-

nju ali predimplantacijski genetski diagnostiki (PGD) je pred nosečnostjo. PGD je način ugotavljanja dednih in genetskih boleznih pri zarodku, ki izkorišča tehnike zunajtelesne oploditve. Omogoča dokaj zanesljivo odkrivanje genskih in kromosomskih nepravilnosti med nosečnostjo. V postopku PGD mora par skozi rutinske postopke zunajtelesne oploditve, ki omogočajo spočetje in gojenje zarodka izven materinega telesa. Sam postopek je kombinacija embrioloških tehnik, ki se uporabljajo pri postopkih zunajtelesne oploditve, ter genetskih metod, ki nam omogočijo zaznavanje že omenjenih nepravilnosti na zelo omejenem številu razpoložljivih celic. Po postavitvi diagnoze lahko v maternico vrnemo zgolj zarodke, ki so zanesljivo zdravi.

Prenatalna diagnoza za nosečnosti s povečanim tveganjem je mogoča z analizo DNA iz zarodnih celic, ki jih dobimo z amniocentezo med 15. in 18. tednom nosečnosti, ali iz zarodnih celic, ki jih dobimo iz vzorca horionskih resic med 10. in 12. tednom nosečnosti. Mogoče je tudi analizirati zarodne celice, do-

bljene iz materine krvi. Že pri šestih tednih nosečnosti je mogoče pri tovrstni metodi določiti nekatere lastnosti otroka. Mutacija, ki povzroča bolezen v družini, mora biti znana pred nosečnostjo.

ZAKLJUČEK

Chédiak-Higashijev sindrom je redka bolezen, ki se deduje avtosomno recesivno. Uspešno prepoznavanje bolezni z genskim zaznavanjem nosilcev vodi v dobro prenatalno genotipsko/fenotipsko napoved bolezni za dotično družino. Zgodnje prepoznavanje te bolezni in morebitna presaditev KMC čim prej v otroštvu pa pomeni boljšo napoved poteka bolezni za bolnika in ob primernem simptomatskem zdravljenju večjo kakovost življenja. Raziskave trenutno potekajo v smeri odkrivanja patologije bolezni na molekularni ravni in odkrivanja morebitnih novih genov, katerih okvara prav tako vodi v bolezen. Prihodnost je v genski tehnologiji, s katero bi lahko zdravili med drugim tudi Chédiak-Higashijev sindrom.

LITERATURA

1. Begues Cesar A. Neutropenia crónica maligna familiar con granulaciones atípicas de los leucocitos. Bol Soc Cubana Pediatr. 1943; 15 (12): 900–22.
2. Steinbrinck W. Über eine neue Granulationsanomalie der Leukozyten. Dtsch Arch Klin Med. 1948; 193: 577–81.
3. Chédiak MM. New leukocyte anomaly of constitutional and familial character. Rev Hematol. 1952; 7 (3): 362–7.
4. Higashi O. Congenital gigantism of peroxidase granules. Tohoku J Exp Med. 1954; 59 (3): 315–32.
5. Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. Chédiak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. Curr Mol Med. 2002; 2 (5): 469–77.
6. White JG. The Chédiak-Higashi syndrome: a possible lysosomal disease. Blood. 1966; 28 (2): 143–56.
7. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. Mol Genet Metab. 1999; 68 (2): 283–303.
8. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. Curr Opin Hematol. 2008; 15 (1): 22–9.
9. Yasha TS, Vani S, Vasanth A, et al. Chediak-Higashi syndrome: a case report with ultrastructural and cytogenetic study. Indian J Pathol Microbiol. 1997; 40 (1): 75–9.
10. Fukai K, Ishii M, Kadoya A, et al. Chédiak-Higashi syndrome: report of case and review of the Japanese literature. J Dermatol. 1993; 20 (4): 231–7.
11. Karim MA, Suzuki K, Fukai K, et al. Apparent genotype-phenotype correlation in childhood, adolescent, and adult Chediak-Higashi syndrome. Am J Med Genet. 2002; 108 (1): 16–22.
12. Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. Eur J Pediatr. 2007; 166 (2): 95–109.
13. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for the Chediak-Higashi syndrome. Nat Genet. 1996; 14 (3): 307–11.
14. Westbroek W, Adams D, Huizing M, et al. Cellular defects in Chediak-Higashi syndrome correlate with the molecular genotype and clinical phenotype. J Invest Dermatol. 2007; 127 (11): 2674–7.

15. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, et al. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9: 359–86.
16. Tchernev VT, Mansfield TA, Giot L, et al. The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med.* 2002; 8 (1): 56–64.
17. Ward DM, Shiflett SL, Huynh D, et al. Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/beige protein: identification of multiple phenotypes. *Traffic.* 2003; 4 (6): 403–15.
18. Eapen M, DeLaat CA, Baker KS, et al. Hematopoietic cell transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39 (7): 411–5.
19. Smith VV, Anderson G, Malone M, et al. Light microscopic examination of scalp hair samples as an aid in the diagnosis of paediatric disorders: retrospective review of more than 300 cases from a single center. *J Clin Pathol.* 2005; 58 (12): 1294–8.
20. Blume RS, Wolff SM. The Chediak-Higashi syndrome: studies of four patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1972; 51 (4): 247–80.
21. Clark R, Griffiths GM. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15 (5): 516–21.
22. Bailleul-Forestier I, Monod-Broca J, Benkerrou M, et al. Generalized periodontitis associated with Chediak-Higashi syndrome. *J Periodontol.* 2008; 79 (7): 1263–70.
23. Hart TC, Atkinson JC. Mendelian forms of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007; 45: 95–112.
24. Khocht A, Viera-Negron YE, Ameri A, et al. Periodontitis associated with Chediak-Higashi syndrome in a young African American male. *J Int Acad Periodontol.* 2010; 12 (2): 49–55.
25. Morimoto M, Tanabe F, Kasai H, et al. Effect of a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, on susceptibility to infection with *Staphylococcus aureus* in Chediak-Higashi syndrome (beige) mice. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7 (7): 973–80.
26. Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM. Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak-Higashi syndrome patients. *Traffic.* 2000; 1 (5): 435–44.
27. Wolff SM. The Chediak-Higashi syndrome: studies of host defenses. *Ann Intern Med.* 1972; 76 (2): 293–306.
28. White JG. Electron-dense chains and clusters in platelets from patients with storage pool-deficiency disorders. *J Thromb Haemost.* 2003; 1 (1): 74–9.
29. Manoli I, Golas G, Westbroek W, et al. Chediak-Higashi syndrome with early developmental delay resulting from paternal heterodisomy of chromosome 1. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A (6): 1474–83.
30. Rudelius M, Osanger A, Kohlmann S, et al. A missense mutation in the WD40 domain of murine *Lyst* is linked to severe progressive Purkinje cell degeneration. *Acta Neuropathol.* 2006; 112 (3): 267–76.
31. Tardieu M, Lacroix C, Neven B, et al. Progressive neurologic dysfunctions 20 years after allogeneic bone marrow transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Blood.* 2005; 106 (1): 40–2.
32. Haddad E, Le Deist F, Blanche S, et al. Treatment of Chediak-Higashi syndrome by allogeneic bone marrow transplantation: report of 10 cases. *Blood.* 1995; 85 (11): 3328–33.
33. Zorzour W, Kleta R, Frangoul H, et al. Two novel CHS1 (*LYST*) mutations: clinical correlations in an infant with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab.* 2005; 85 (2): 125–32.
34. Huynh C, Roth D, Ward DM, et al. Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (48): 16795–800.
35. Möhlig H, Mathieu S, Thon L, et al. The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C. *Exp Cell Res.* 2007; 313 (12): 2703–18.
36. Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis.* 2007; 2: 43.
37. Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome [internet]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington; 1993–2012. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>
38. Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, et al. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet.* 1997; 16 (3): 289–92.
39. Menasche G, Pastural E, Felmann J, et al. Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 2000; 25 (2): 173–6.
40. Menasche G, Ho CH, Sanal O, et al. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanolin defect (GS3) or a *MYO5A* F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest.* 2003; 112 (3): 450–6.
41. Bohn G, Allroth A, Brandes G, et al. A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nat Med.* 2007; 13 (1): 38–45.
42. Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006; 6 (6): 410–5.
43. Henter JL, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2007; 48 (2): 124–31.
44. Dionisi Vici C, Sabetta G, Gambarara M, et al. Agenesis of the corpus callosum, combined immunodeficiency, bilateral cataract, and hypopigmentation in two brothers. *Am J Med Genet.* 1988; 29 (1): 1–8.

45. Del Campo M, Hall BD, Aeby A, et al. Albinism and agenesis of the corpus callosum with profound developmental delay: Vici syndrome, evidence for autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet.* 1999; 85 (5): 479–85.
46. Miyata R, Hayashi M, Sato H, et al. Sibling cases of Vici syndrome: sleep abnormalities and complications of renal tubular acidosis. *Am J Med Genet A.* 2007; 143 (2): 189–94.
47. Price FV, Legro RS, Watt-Morse M, et al. Chediak-Higashi syndrome in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992; 79 (5): 804–6.

Prispelo 22. 5. 2012

periferna in centralna nevropatska bolečina

LYRICA[®]
PREGABALIN

Pogasi žarenje, ki boli.

LYRICA 25 mg, 75 mg, 150 mg, 300 mg trde kapsule; 20 mg/ml peroralna raztopina

Sestava in oblika zdravila: Ena trda kapsula vsebuje 25 mg, 75 mg, 150 mg ali 300 mg pregabalina. 1 ml raztopine vsebuje 20 mg pregabalina. Ena trda kapsula vsebuje 35 mg, 8,25 mg, 16,50 mg ali 33 mg laktoze monohidrata. 1 ml vsebuje 1,3 mg E218 in 0,163 mg E216. **Indikacije:** Zdravljenje periferne in centralne nevropatske bolečine pri odraslih. Dodatno zdravljenje epilepsije pri odraslih s parcialnimi napadi, s sekundarno generalizacijo ali brez nje. Zdravljenje generalizirane anksiozne motnje pri odraslih. **Odmerjanje in način uporabe:** 150 do 600 mg na dan v dveh ali treh deljenih odmerkih, peroralno, s hrano ali brez nje. Zdravljenje se lahko začne s 150 mg na dan v dveh ali treh ločenih odmerkih. Glede na bolnikov odziv in prenašanje je mogoče odmerek zvečati: *nevropatska bolečina* - čez 3 do 7 dni na 300 mg na dan in čez nadaljnjih 7 dni na 600 mg na dan; *epilepsija* - čez 1 teden na 300 mg na dan, po dodatnem tednu na 600 mg na dan; *generalizirana anksiozna motnja* - po enem tednu na 300 mg na dan, še en teden zatem na 450 mg na dan. En teden pozneje 600 mg na dan. **Ukinitev pregabalina:** odmerek je priporočljivo zmanjševati postopoma vsaj 1 teden. **Bolniki z okvaro ledvic:** odmerek je treba prilagoditi. **Bolniki z okvaro jeter:** odmerka ni treba prilagoditi. **Pediatrična populacija:** varnost in učinkovitost pri otrocih, starih do 12 let, in pri mladostnikih (12-17 let) nista bili dokazani; podatkov ni na voljo. Starejši: odmerek je treba prilagoditi, če ima bolnik okrnjeno delovanje ledvic. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na zdravilno učinkovino ali katerokoli pomožno snov. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Bolniki z diabetesom, ki pri zdravljenju s pregabalinom pridobijo na telesni masi. Preobčutljivostne reakcije, vključno z angioedemom. Nezgodne poškodbe, povezane z omotico in somnolenco. Izguba zavesti, zmedenost in poslabšanje mentalnih sposobnosti. Izguba, zamegljenost ali druge spremembe ostrine vida, mnoge so bile prehodnega značaja. Primeri odpovedi ledvic. Ukinitev sočasnih antiepileptičnih zdravil in prehod na monoterapijo s pregabalinom. Odtegnitveni simptomi po prekinitvi zdravljenja. Krči, vključno z epileptičnim statusom in generaliziranimi krči. Kongestivno srčno popuščanje (večinoma se pojavi pri starejših bolnikih s srčnožilnimi boleznimi, ki dobivajo pregabalina za nevropatsko indikacijo). Zvečana incidenca neželenih učinkov pri zdravljenju centralne nevropatske bolečine kot posledice poškodbe hrbtnega. Možno majhno povečanje tveganja za pojav samomorilnega razmišljanja in vedenja. Zmanjšano delovanje spodnjega GI trakta ob sočasni uporabi zdravil, ki povzročajo zaprtost. Zloraba zdravila. Možna encefalopatija. Trde kapsule: Bolniki z redkimi prirojenimi motnjami, kot so intoleranca za galaktozo, laponska oblika zmanjšane aktivnosti laktaze ali malabsorpcija glukoze/galaktoze, ne smejo jemati tega zdravila. Peroralna raztopina: Vsebuje metilparahidroksibenzoat in propilparahidroksibenzoat, ki lahko povzročita alergijske reakcije (lahko zapoznele). **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili:** Etanol, lorazepam, oksikodon ter zdravila, ki zavirajo osrednji živčni sistem. **Plodnost, nosečnost in dojenje:** Med nosečnostjo se ne sme uporabljati, razen če je nujno potrebno. Pri ženskah v rodnem obdobju je potrebna uporaba učinkovite kontracepcije. Dojenje med uporabo pregabalina ni priporočljivo. Ni kliničnih podatkov o vplivu na plodnost pri ženskah. Vpliva na motiliteto sperme niso ugotovili. **Vpliv na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji:** Lahko povzroči omotico in somnolenco. **Neželeni učinki:** Ponavadi blagi do zmerni. Zelo pogosti (≥ 1/10): omotica in somnolenca. Pogosti (≥ 1/100 do < 1/10): zvečanje apetita, evforično razpoloženje, zmedenost, razdražljivost, zmanjšanje libida, dezorientiranost, nespečnost, ataksija, poslabšana koordinacija, tremor, dizartija, okvara spornina, motena pozornost, parestezije, sedacija, motnje ravnotežja, letargija, glavobol, zamegljen vid, diplopija, vrtoglavica, bruhanje, suha usta, zaprtje, flatulenca, motnje erekcije, nenormalna hoja, občutek pijanosti, utrujenost, periferni edemi, edemi in zvečanje telesne mase. **Način izdajanja:** Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept. **Imetnik dovoljenja za promet:** Pfizer Limited, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, Velika Britanija. **Datum zadnje revizije besedila:** 15.2.2013

Pred predpisovanjem se seznanite s celotnim povzetkom glavnih značilnosti zdravila.



Pfizer Luxembourg SARL, GRAND DUCHY OF LUXEMBOURG,
51, Avenue J. F. Kennedy, L-1855
Pfizer, podružnica Ljubljana, Letališka cesta 3c, Ljubljana, Tel: 01 52 11 400

Lovro Žiberna¹, Damijana Mojca Jurič²

Histaminski receptor tipa 3 – od gena do terapevtske tarče

Histamine Receptor Type 3 – from Gene to Drug Target

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: histamin, histaminski receptor tipa 3, znotrajcelične signalne poti, ligandi, osrednje živčevje, nevrofarmakologija

Histaminski receptor tipa 3 je odkril Schwartz s sodelavci leta 1983, vendar so njegov genski zapis klonirali šele leta 1999. Izražanje histaminskega receptorja tipa 3 je v veliki meri omejeno na osrednje živčevje. Za receptorje je značilna velika stopnja molekularne in funkcijske heterogenosti, kar je posledica razlik v transkripcijskih in posttranskripcijskih obdelavah molekule. Svojevrstna značilnost je tudi konstitutivna aktivnost v razmerah *in vivo* in pestrost znotrajceličnih signalnih poti, ki preko regulatornih proteinov $G\alpha_{i/o}$ vključujejo adenilat ciklazo, fosfolipazo A_2 , z mitogenom aktivirano protein kinazo in signalno pot Akt/glikogen-sintaza-kinaza 3. Omenjene signalne poti so pomembne pri signaliziranju na ravni nevroplastičnosti v osrednjem živčevju, zato je razvoj zdravilnih učinkovin, ki delujejo na histaminske receptorje tipa 3, trenutno osrednjega pomena na področju histamina v farmacevtski industriji. Histaminski receptor tipa 3 deluje kot inhibitorni avtoreceptor ali heteroreceptor. Aktivacija avtoreceptorjev na histaminergičnih nevronih pomeni zavrtje proženja celičnih signalov, zaviranje izgradnje histamina in njegovega sproščanja. Kot predsinaptični heteroreceptor na ostalih nevronskih populacijah nadzira sproščanje številnih živčnih prenašalcev, kot so biogeni amini, acetilholin, glutamat in γ -aminomaslena kislina. Delovanje histaminskega receptorja tipa 3 je vpleteno v kognitivne procese, obnašanje, uravnavanje budnosti in spanja, lokomocijo, uravnavanje apetita ter prenos bolečinskih dražljajev.

ABSTRACT

KEY WORDS: histamine, histamine receptor type 3, intracellular signalling, ligands, central nervous system, neuropharmacology

Histamine receptor type 3 was discovered in 1983 by Schwartz and coworkers and cloned in 1999. The expression of histamine receptor type 3 is largely confined to the central nervous system, where differential transcriptional and posttranscriptional processing lead to a high degree of molecular and functional heterogeneity. Histamine receptor type 3 has unique properties including constitutive activity *in vivo* and the recruitment of plasticity-related signal transduction pathways, including $G\alpha_{i/o}$ -proteins, adenylyl cyclase, phospholipase A_2 , mitogen-activated protein kinase and Akt/glycogen synthase kinase 3 signalling. These make the histamine receptor type 3 the most prominent target for histaminergic drug development. Histamine receptor type 3 can function both as an autoreceptor and as a heteroreceptor. As an autoreceptor on histaminergic neurons, histamine receptor type 3 activation inhibits cell

¹ Asist. dr. Lovro Žiberna, mag. farm., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

² Asist. dr. znan. sod. Damijana Mojca Jurič, univ. dipl. kem., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; damijana-mojca.juric@mf.uni-lj.si

firing, histamine synthesis and release. As a presynaptic heteroreceptors on other neurons, histamine receptors type 3 abundantly control the outflow of various neurotransmitters, including biogenic amines, acetylcholine, glutamate and γ -amino butyric acid. The histamine receptor type 3 functioning is associated with cognition, behaviour, wakefulness and sleep regulation, locomotion, appetite regulation and pain perception.

UVOD

Histamin (2-(1H-imidazol-4-il)etanamin) je pomemben biogeni amin, ki kot lokalni hormon, živčni prenašalec in/ali nevro-modulator uravnava številne fiziološke in patofiziološke procese v organizmu. Nastaja z dekarboksilacijo aminokislina L-histidin, ki jo katalitsko uravnava histidin dekarboksilaza, razgrajuje pa se preko oksidativne deaminacije, ki jo katalizira diaminooksidaza in preko metilacije s histamin-N-metiltransferazo. Histamin posreduje svoje učinke preko aktivacije histaminskih receptorjev. Na osnovi preučevanja genskega zapisa, znotrajceličnih signalnih poti in edinstvenih farmakoloških lastnosti so bili do sedaj prepoznani štiri podtipi histaminskih receptorjev, ki so poimenovani tip 1 (H_1R), tip 2 (H_2R), tip 3 (H_3R) in tip 4 (H_4R), ki jih uvrščamo v razred receptorjev, sklopljenih z regulatornimi proteini G (1, 2).

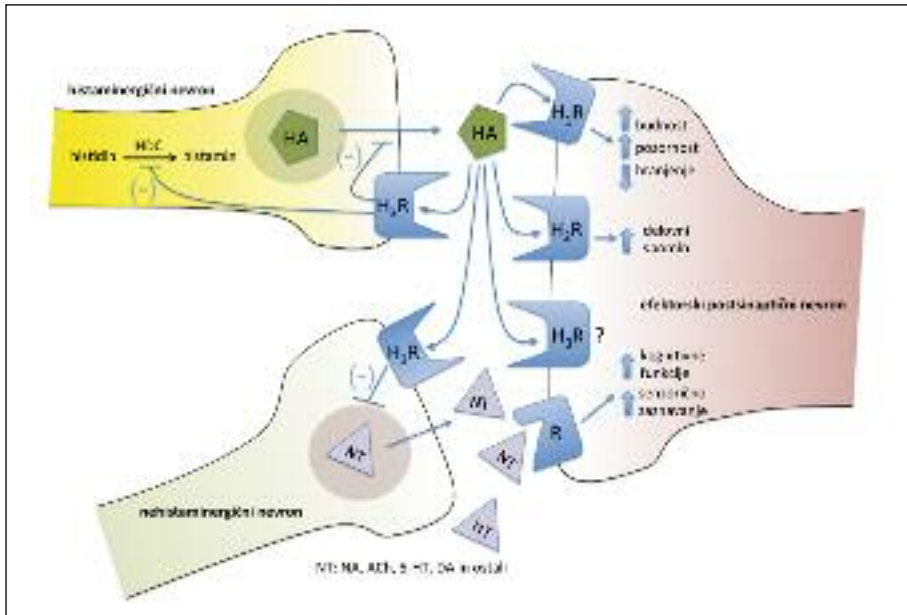
Histaminski sistem je že od prvih študij v začetku prejšnjega stoletja, ki jih je opravil pionir sodobne farmakologije in Nobelov nagradenec Sir Henry Hallett Dale, pomembna tarča za razvoj zdravilnih učinkovin (3, 4). Odkritje prvih antihistaminikov (antagonistov H_1R) leta 1936 je povzročilo pravi razcvet raziskav na področju histamina (5). Te so omogočile natančen vpogled v vlogo in način delovanja histamina v organizmu in privedle do odkritja visoko selektivnih antagonistov H_1R in H_2R (antihistaminikov), pomembnih zdravilnih učinkovin, ki danes lajšajo alergijske reakcije in simptome želodčne razjede milijonom ljudi po svetu. Izjemnost odkritij histaminskih raziskav potrjujeta tudi Nobelovi nagradi, ki sta ju prejela dr. Daniel Bovet leta 1957 in Sir James Black leta 1988.

V zadnjih dveh desetletjih se je zanimanje številnih raziskovalcev in histaminergične farmacevtske industrije usmerilo v potencialno terapevtsko vlogo mediatorjev novejših dveh histaminskih receptorjev, H_3R in H_4R . H_3R je poglaviti dejavnik pri uravnavanju fizioloških učinkov histaminergičnega signaliziranja v osrednjem živčevju, pomembno pa vpliva tudi na aktivnost drugih živčnih prenašalcev. Zadnje raziskave potrjujejo potencialno terapevtsko uporabo ligandov H_3R za zdravljenje različnih nevrodegenerativnih stanj in motenj spanja. Vloga nedavno odkritega H_4R še ni dokončno pojasnjena, predklinične študije pa nakazujejo udeležnost pri vnetnih in imunomodulatornih procesih.

HISTAMINSKI RECEPTOR TIPA 3

Schwartz s sodelavci je odkril H_3R leta 1983, ko je ugotavljal, da histaminergične živčne celice uravnava svojo aktivnost preko presinaptičnega avtoreceptorja tako, da preko negativne povratne zanke zavirajo proženje celičnih signalov ter s tem izgradnjo in sproščanje histamina v možganih (slika 1) (6). Študije porazdelitve receptorja so potrdile, da je izražanje H_3R v veliki meri omejeno na osrednje živčevje, kjer je prisoten v večini možganskih področij, z največjo gostoto v možganski skorji, hipokampusu, bazalnih ganglijah in hipotalamusu (7).

V možganih vretenčarjev se nahajajo telesa histaminergičnih živčnih celic samo v tuberomamilarnem jedru posteriornega dela hipotalamusa, od koder preko ascendentnih in descendentnih eferentnih poti projicirajo široko skozi možgane, tudi v prej omenjena področja. Ta področja uravnava številne



Slika 1. Shematski prikaz porazdelitve in delovanja H_3R na nevronih v sinapsi (16). HA – histamin, H_1R – histaminski receptor tipa 1, H_2R – histaminski receptor tipa 2, H_3R – histaminski receptor tipa 3, R – drugi (nehistaminski) receptori v osrednjem živčevju, NT – živčni prenašalec (neurotransmitor), NA – noradrenalin, ACh – acetilholin, 5-HT – 5-hidroksitriptamin (serotonin), DA – dopamin, HDC – histidin dekarboksilaza.

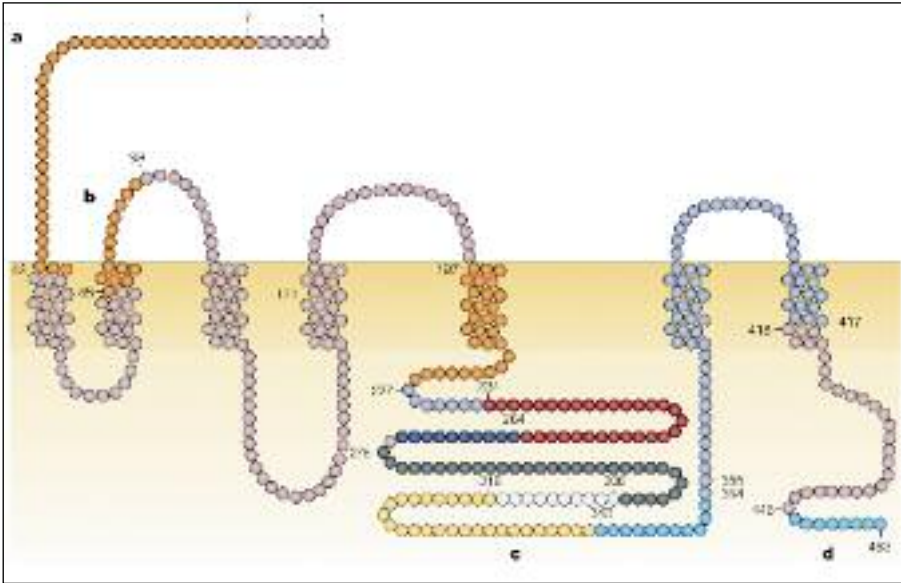
homeostatske fiziološke procese (hipotalamus) kot tudi višje možganske funkcije (možganska skorja in hipokampus) (2). V osrednjem živčevju se H_3R izraža tudi v področjih, ki so povezana z nocicepcijo (specifična področja v talamusu, dorzalnih koreninskih ganglijih in v hrbtenjači), zato predstavlja potencialno terapevtsko mesto za uravnavanje bolečinskih dražljajev (8).

Izražanje H_3R ni omejeno le na histaminergične nevrone, pač pa tudi na norepinefrenične populacije živčnih celic, kjer kot presinaptični heteroreceptor uravnava izgradnjo in sproščanje drugih pomembnih živčnih prenašalcev v možganih. Pri glodalcih in človeku tako aktivacija H_3R zavira sproščanje acetilholina, noradrenalina, dopamina, serotonina, γ -aminomaslene kisline (angl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA), glutamata in neuropeptidov (slika 1) (9–15). Pojavlja se tudi kot posinaptični receptor na perikarionu različnih populacij živčnih celic, vendar njegova fiziološka vloga na tem mestu še ni pojasnjena (7).

Poleg osrednjega živčevja se H_3R izraža tudi v perifernih tkivih, predvsem na nevro-nih perifernega živčnega tkiva v prebavilih, dihalnih poteh in srčno-žilnem sistemu (8). Stopnja izražanja v perifernih tkivih je v primerjavi z osrednjim živčevjem nizka, kar pa je v primeru bodoče uporabe zdravil z delovanjem na ta receptor velika prednost, saj posledično lahko pričakujemo manj perifernih neželenih učinkov.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA GENA HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

Genski zapis za H_3R je leta 1999 uspešno kloniral in natančno določil Lovenberg s sodelavci (17). Izolirana komplementarna DNA človeškega H_3R (angl. *human histamine receptor type 3*, h H_3R) kodira 445 aminokislinskih dolgih kisli proteinov z vsemi lastnostmi proteinov iz družine A rodopsinu podobnih, z regulatornimi proteini G sklopljenih receptorjev (18). Glede na stopnjo homologije v aminokislinskih



Slika 2. Različne izooblike histaminskega receptora tipa 3 so posledica alternativnega izrezovanja predinformacijske RNA v zapisu za štiri različne regije proteina (označene a–d) (21). Alternativno izrezovanje v prvi regiji (regija a) lahko privede do krajšega N-terminalnega dela proteina (delecija aminokislin 7–43), izrezovanje v drugi regiji (regija b) pa povzroči delno delekcijo druge transmembranske domene in prve znotrajcelične zanke (delecija aminokislin 85–98). V regiji c je alternativno izrezovanje najobsežnejše in vodi do različno dolge tretje znotrajcelične zanke ali do izgradnje histaminskega receptora tipa 3 z odsotnimi transmembranskimi domenami 5, 6 in 7. V regiji d alternativno izrezovanje vodi do nastanka izooblik z osmimi dodatnimi aminokisljinami (446–453) na C-terminalnem delu proteina.

skem zaporedju je hH₃R najbolj podoben hH₄R (≈ 60 % homologija na področju transmembranskih domen), mnogo manj pa hH₁R in hH₂R (≈ 20 % homologija na področju transmembranskih domen) (17, 19, 20). To je tudi razlog za tako pozno določitev genskega zapisa receptorja hH₃R, saj kloniranje na osnovi homologij s hH₁R in hH₂R ni bilo uspešno.

Gen za hH₃R se nahaja na kromosomu 20 na lokusu 20q13.133 (HRH3 GeneID: 11255). Za razliko od genov za hH₁R in hH₂R, ki ju kodirata eksona brez vmesnih intronov, se v kodirajoče regije hH₃R vrinjajo trije introni. Posledica take genske strukture je alternativno izrezovanje predinformacijske RNA (angl. *pre-messenger RNA*, pre-mRNA) in s tem izgradnja več izooblik receptorja. Znanih je preko 20 izooblik hH₃R z različno dolgimi aminskimi (N-) konci, inkluzijami na karboksilnem (C-) koncu, z delecijami na transmembranskih domenah in z različno dolgo tretjo znotrajcelično zanko (slika 2) (21). Izooblike z inkluzijami ali delecijami na tretji

znotrajcelični zanki so deležne največje pozornosti raziskovalcev, saj je ta domena ključna za sklapljanje receptorske molekule z regulatornimi proteini G in tudi razlog za različne farmakološke lastnosti, kot so signalni mehanizmi, vezavne afinitete ligandov ali spontana aktivnost. Vse izooblike nimajo izražene proteinske G-aktivnosti, vendar se predvideva, da sodelujejo pri uravnavanju drugih funkcionalnih izooblik.

Gen za H₃R so do sedaj klonirali tudi pri različnih živalskih vrstah (pri miši, podgani, morskem prašičku in opici) in pri vseh potrdili prisotnost izooblik (22–29). Med receptorji obstajajo vrstno specifične razlike, ki pomembno vplivajo na molekularne lastnosti, in sicer porazdelitev, funkcionalne lastnosti in farmakološki odziv receptorjev, kar otežuje raziskovalno delo pri vrednotenju učinkovitosti selektivnih ligandov v razmerah *in vivo* (30).

Poleg različnih izooblik receptorja so študije potrdile tudi genske polimorfizme hH₃R.

Do danes so bili opisani trije polimorfni aleli gena (17, 31, 32). Pretvorbo citozina v timidin na mestu 839 (C839T) gena za hH_3R in zamenjavo alanina z valinom na aminokislinskem mestu 280 (A280V) so odkrili pri bolniku s Shy-Dragerjevimi sindromom (idiopatsko ortostatsko hipotenzijo) – neurodegenerativno boleznijo osrednjega živčevja, za katero je značilna tudi napredujoča disfunkcija avtonomnega živčevja (31, 32). Omenjeni polimorfizem naj bi zaradi mutiranega receptorja povzročil pretirano zaviranje izločanja noradrenalina in tako prispeval k etiologiji omenjenega sindroma (31).

ZNOTRAJCELIČNE SIGNALNE POTI HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

Svojevrstna značilnost H_3R je velika pestrost znotrajceličnih signalnih poti (slika 3) (33). Pri preučevanju vezave [^{35}S] gvanozin trifosfat gama S (angl. [^{35}S] *guanosine triphosphate gamma S*, [^{35}S]GTP γ S) na možganskih tkivih podgane so v prisotnosti toksina oslovskega kašlja ugotovili, da se H_3R sklaplja z regulatornimi proteini $G\alpha_{i/o}$ (34). Študije na rekombinantnih in nativnih receptorjih so potrdile, da H_3R preko proteina $G\alpha_{i/o}$ inhibira adenilat ciklazo – encim, ki je odgovoren za pretvorbo adenosin-5'-trifosfata (angl. *adenosine 5'-triphosphate*, ATP) v ciklični adenosin-3', 5'-monofosfat (angl. *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Znižanje znotrajcelične koncentracije cAMP privede do manjše aktivnosti protein kinaze A (PKA), ki uravnava tako transkripcijo genov preko vezavnega proteina za odzivni element za cAMP (angl. *cAMP responsive element binding protein*, CREB), kot tudi aktivnost številnih encimov in receptorjev (35). Preko aktivacije proteina $G_{i/o}$ sproži H_3R tudi fosforilacijo z mitogenom aktivirane protein kinaze (MAP-kinaze) in fosfatidilinozitol 3-kinaze (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), aktivira fosfolipazo A_2 (angl. *phospholipase A_2*, PLA $_2$), kar vodi do sproščanja arahidonske kisline, inhibira izmenjevalec Na^+/H^+ in inhibira s K^+ -induciran prehod kalcijevih ionov v celice (slika 3) (33).

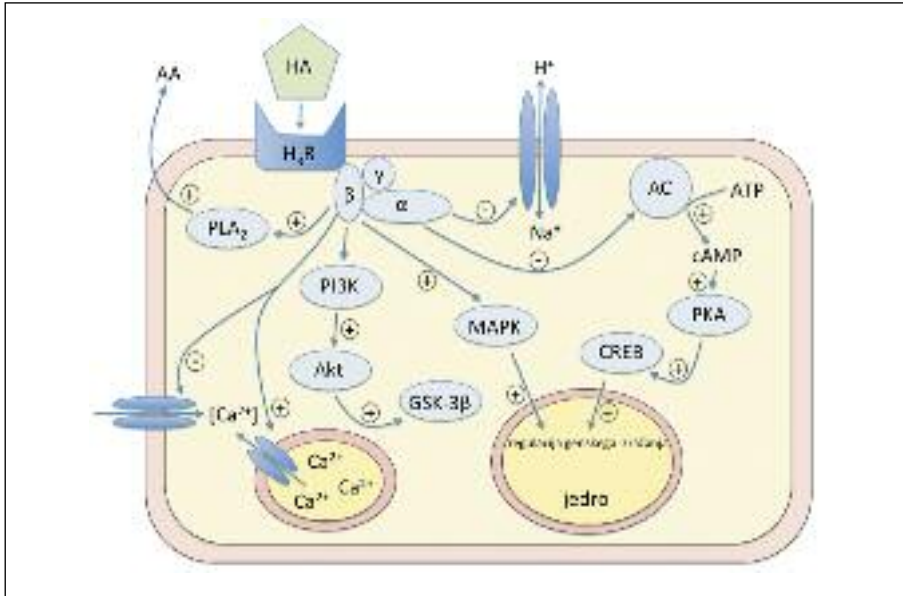
Inhibicija nivojev cAMP in cAMP/PKA kaskade ter signalne poti kalcija in od kalmo-

dulina odvisne protein kinaze II predstavlja glavno signalno pot, preko katere H_3R na histaminergičnih živčnih končičih zavira izgradnjo in sproščanje histamina (36–38). Podobni signalni mehanizmi naj bi bili udeleženi tudi pri zaviranju sproščanja drugih živčnih prenašalcev, ki poteka po aktivaciji heterogenega H_3R na nehistaminergičnih živčnih celicah (39, 40). MAP-kinazna pot uravnava celično rast, diferenciacijo in preživetje nevronov, zato je pomembna pri vzdrževanju sinaptične plastičnosti in s tem kognitivnih funkcij (npr. spomin) (41). PI3K aktivira protein kinazo B (znana tudi kot Akt), ki nadalje fosforilira in s tem inhibira delovanje glikogen-sintaze-kinaze 3 β (GSK3 β) – poglavitne tau kinaze v možganih (42).

Med embrionalnim razvojem je H_3R specifično izražen le v določenih predelih možganov, zato se predvideva, da je aktivacija Akt preko teh receptorjev pomembna pri nadzoru nevronske migracije (43). V odraslem živčevju normalna Akt/GSK-3 β -kinazna aktivnost zavira apoptozo nevronov, medtem ko spremembe njene aktivnosti spremljajo Alzheimerjevo bolezen, nevrološke motnje in shizofrenijo (44–46). V patoloških stanjih, kot so ishemične poškodbe, Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen, je bila ugotovljena tudi pretirana aktivnost PLA $_2$, ki poleg arahidonske kisline povzroča sproščanje lipidnih mediatorjev, ki prožijo nevronske apoptozo (47).

SPONTANA AKTIVNOST HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

H kompleksnemu delovanju H_3R prispeva poleg pestrosti znotrajceličnih signalnih poti tudi visoka stopnja spontane (konstitutivne) aktivnosti, tj. aktivnosti v odsotnosti agonista (48). H_3R je alosterični protein, ki v ravnotežnem stanju zavzema različne konformacijske oblike. Spontano aktivna oblika receptorja se sklaplja s proteinom G in sproža znotrajcelične signalne poti. Spontana aktivnost H_3R je bila sprva določena na celičnih linijah, kjer je velika gostota nekaterih rekombinantno izraženih izooblik sovpadala s spontano inhibicijo adenilat ciklaze, vezavo [^{35}S]GTP γ S in s povečanim sproščanjem arahidonske kisli-



Slika 3. Znotrajcelične signalne poti, ki potekajo preko aktivacije histaminskih receptorjev tipa 3. Receptor preko aktivacije proteinov $G_{\beta/\gamma}$ sproži inhibicijo adenilat ciklaze, fosforilacijo z mitogenom aktivirane proteinske kinaze in fosfoinozitolid 3-kinaze, spodbuja fosfolipazo A_2 , kar vodi do sproščanja arahidonske kisline, inhibira izmenjevalec Na^+/H^+ in s K^+ -induciranim prehodom kalcijevih ionov v celice (21). AA – arahidonska kislina (angl. arachidonic acid), HA – histamin, H_3R – histaminski receptor tipa 3, α , β , γ – podenote proteinov G, PLA_2 – fosfolipaza A_2 (angl. phospholipase A_2), $PI3K$ – fosfatidilinozitol 3-kinaza (angl. phosphatidylinositol 3-kinase), Akt – protein kinaza B, $GSK3\beta$ – glikogen-sintaze-kinaza β , MAPK – z mitogenom aktivirana protein kinaza, AC – adenilat ciklaza, ATP – adenzin-5'-trifosfat (angl. adenosine 5'-triphosphate), cAMP – ciklični adenzin-3',5'-monofosfat (angl. 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate), PKA – protein kinaza A, CREB – vezavni protein za odzivni element za ciklični adenzin-3',5'-monofosfat (angl. cAMP responsive element binding protein).

ne (49–51). Študije na možganih glodavcev so visok delež spontano aktivnih H_3R določile tudi v razmerah *in vivo* in potrdile njihovo pomembno fiziološko vlogo, saj naj bi presinaptični receptor preko tega mehanizma zaviral nevronske aktivnosti (37, 49–51).

Stopnja spontane aktivnosti receptorja je odvisna od živalske vrste, izooblike, celične gostote ter znotrajceličnih signalnih poti, zanj pa je odgovorno kratko aminokislinsko zaporedje na C-koncu tretje znotrajcelične zanke (32, 52). Spontano aktivnost receptorja lahko učinkovito inhibirajo samo inverzni agonisti; to so snovi, ki se vežejo na isti receptor kot agonisti, ga ne aktivirajo, ampak povzročijo nasprotni učinek kot agonisti, ker stabilizirajo receptor v njegovi neaktivni konformaciji. Tako preprečujejo sklapljanje H_3R s proteinom G in posledično aktivirajo endogeno sproščanje histamina in drugih živčnih

prenašalcev. Številni klasični antagonisti H_3R (npr. tioperamid, klobenoprit in ciproksifan) v resnici delujejo kot inverzni agonisti (49, 50).

HISTAMINSKI RECEPTOR TIPA 3 IN ASTROCITI

Astrociti so najštevilnejše celice glije, ki so zaradi svoje edinstvene sposobnosti spreminjanja funkcije in prilagajanja na spremembe v mikrookolju aktivni dejavniki delovanja osrednjega živčevja. Interakcije med astrociti in živčnimi celicami so ključne za uravnavanje strukturne in funkcionalne sinaptične plastičnosti v času razvoja živčevja in pri odraslih, posegajo pa tudi v procese regeneracije poškodovanih možganov (53–55). Astrociti so pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov. Študije so potrdile, da astrociti iz različnih predelov osrednjega živčevja sesal-

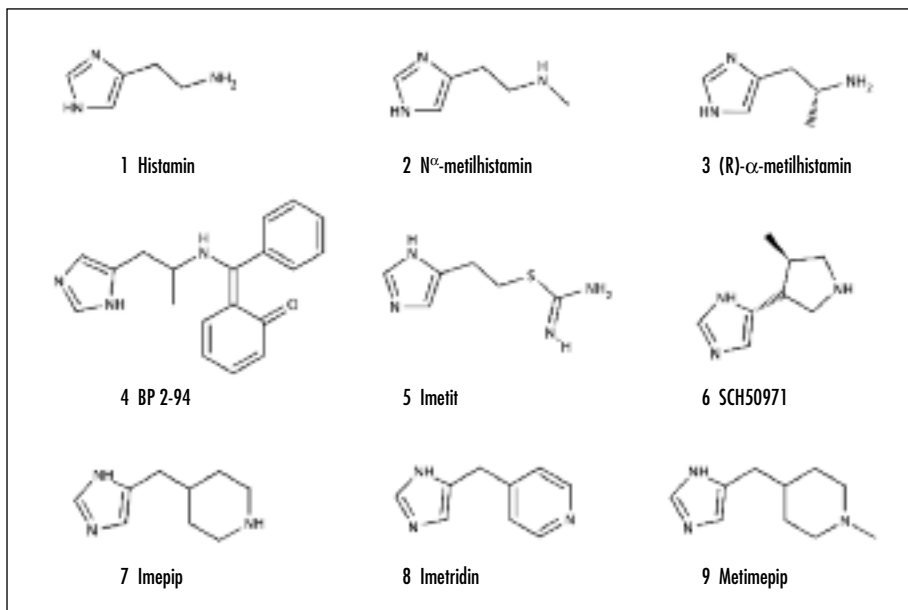
cev izražajo H_1R in H_2R (56–58). Astrociti privzemajo in razgrajujejo histamin iz okolja, histamin pa uravnava astrocitno rast in proliferacijo, razgradnjo glikogena ter preko H_1R zvišuje znotrajcelično aktivnost kalcija, kar pomembno prispeva k sproščanju t. i. glijalnih prenašalcev (glijatransmitorjev) (59–65). Histamin uravnava tudi izgradnjo astrocitnih citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov (58, 66–68).

Naša študija na astrocitih možganske skorje podgane je pokazala, da poleg že znanih dveh podtipov histaminskih receptorjev te celice izražajo tudi H_3R (69). Tako kot nevronski se tudi astrocitni H_3R sklaplja s proteini $G\alpha_{i/o}$, preko inhibicije adenilat ciklaze znižuje znotrajcelične koncentracije cAMP, aktivira MAP-kinazno signalno pot, preko fosfolipaze C pa aktivira protein kinazo C. Zanimivo je, da spontane aktivnosti tega receptorja, ki bi uravnava nivoje znotrajceličnega cAMP, nismo zaznali. Potrdili smo tudi funkcionalno vlogo astrocitnega H_3R , saj histamin preko aktivacije vseh treh histaminskih receptorskih podtipov in njihovih znotrajceličnih signalnih poti, ki se združijo na nivoju aktivacije MAP-kinazne poti, spodbuja gensko izražanje in proteinsko izgradnjo nevrotrofičnega dejavnika

nevrotrofina-3 (NT-3) (69). V možganih podgane so izolirali več izooblik H_3R , zato želimo ugotoviti prisotnost teh izooblik tudi na astrocitih ter proučiti njihove vezavne lastnosti in specifične signalne poti (23). Odkritje astrocitnega H_3R pomembno prispeva k poznavanju interakcij med histaminskim sistemom in glijalnimi celicami, njegove funkcionalne lastnosti pa potrjujejo kompleksno naravo in nakazujejo udeležnost pri uravnavanju delovanja osrednjega živčevja.

LIGANDI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV TIP 3

Histamin se veže na H_3R z visoko afiniteto, zato je v začetni fazi razvoja specifičnih ligandov veljalo prepričanje, da je imidazolni obroč, ki je strukturna lastnost histamina, nujen za doseg potrebne afinitete za vezavo na receptor. Izgradnja dodatnih funkcionalnih skupin (substituentov) na imidazolni obroč je preprečila vezavo na H_3R , modifikacija endogenega liganda v stranski verigi pa je vodila v izgradnjo 4-substituiranih imidazolov – učinkovitih in selektivnih agonistov H_3R (slika 4) (70). (R)- α -metilhistamin je danes v farmakologiji najbolj pogosto uporab-

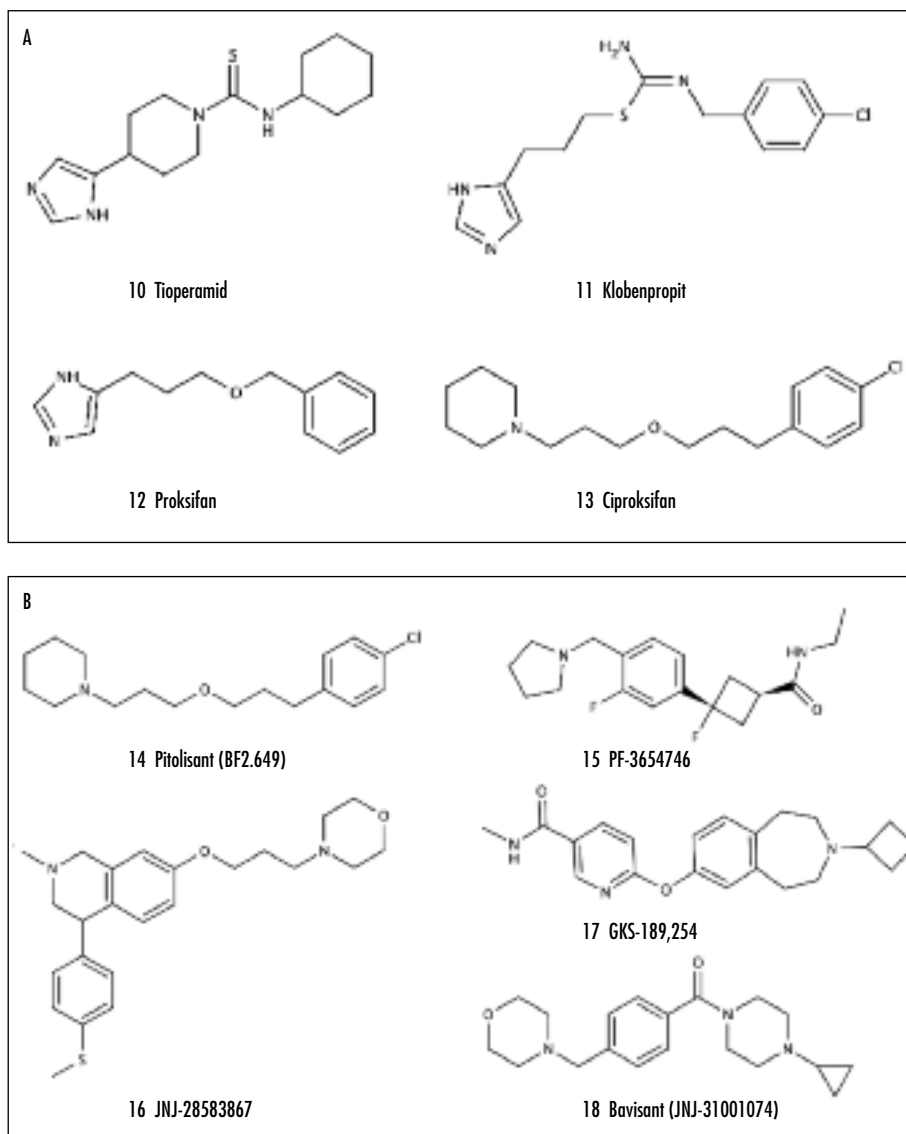


Slika 4. Histamin in predstavniki sinteznih agonistov histaminskih receptorjev tipa 3.

ljen agonist, vendar je njegova uporaba v razmerah *in vivo* precej omejena zaradi visoke bazičnosti in hidrofilnosti ter obsežnega metabolizma prvega prehoda (71).

Z vezavo azometinske skupine na (R)- α -metilhistamin je nastala spojina BP 2-94 – predzdravilo z večjo biološko uporabnostjo in izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi ter prva učinkovina s potencialno terapevtsko uporabnostjo za različna periferna bolezenska sta-

nja (72, 73). Zamenjava aminske skupine z izotiosečnino (imetit) in pretvorba fleksibilne stranske verige v rigidno strukturo z uvedbo pirolidinskega (SCH50971) ali piperidinskega obroča (imepip) je povečala selektivnost in afiniteto vezave agonistov na H_3R ter sposobnost njihovega prehajanja v osrednje živčevje (74–76). S strukturnimi modifikacijami se je povečala tudi selektivnost agonistov za H_3R v primerjavi z receptorjem H_4R ; imetri-



Slika 5. A – imidazolni antagonisti histaminskega receptorja tipa 3, B – neimidazolni antagonisti histaminskega receptorja tipa 3.

din je 300-krat in metimepip 2.000-krat selektivnejši za H₃R (77, 78).

Tako kot prva generacija agonistov je bila tudi prva generacija antagonistov H₃R osnovana na strukturi histaminskega imidazolnega heterocikla (slika 5A). Tioperamid, ciproksifan, proksifan in klobenpripit so veljali za referenčne spojine, vendar se je izkazalo, da je bazični imidazolni obroč odgovoren za številne stranske in nepredvidljive učinke, kot so interakcije s citokromi P450 in slabo prehajanje v osrednje živčevje (79). Imidazolni antagonistni imajo manjšo potencialno terapevtsko uporabnost v primerjavi z neimidazolnimi, vendar so zelo uporabni v številnih nekliničnih farmakoloških raziskavah, kot so vezavne študije, klasifikacija histaminskih podtipov, poskusi v razmerah *in vitro* ipd.

Vrstno specifične razlike v učinkovitosti imidazolnih antagonistov ter razlike v vrednotenju njihove učinkovitosti v razmerah *in vivo* so pospešile iskanje drugačnih bazičnih skupin in s tem razvoj neimidazolnih antagonistov H₃R (slika 5B). Imidazolni obroč so zamenjali z različnimi sekundarnimi in s terciarnimi aminami, predvsem v obliki alifatskih heterociklov, kot so npr. piperidin, piperazin, pirolidin, 2-aminopirolidin in morfolin (80). Zaradi močnejših farmakoloških učinkov in manjših far-

makokinetičnih interakcij danes med neimidazolnimi antagonistami H₃R prevladujejo spojine, ki vsebujejo piperidin (slika 5B) (81).

Razvoj zdravilnih učinkovin, ki delujejo na H₃R, je usmerjen v izgradnjo spojin, ki so sposobne učinkovito inhibirati agonistično delovanja histamina in zavirati spontano aktivnost receptorja. Kompleksno delovanje receptorja in spremenljivost njegovih lastnosti med živalskimi vrstami in pri človeku zahteva skrbno načrtovanje novih selektivnih antagonistov/inverznih agonistov, ki jih bomo v prihodnosti lahko uporabljali v klinične namene. Raziskave na tem področju so intenzivne, saj je več takih spojin že v fazi II in III kliničnega preizkušanja zdravil za zdravljenje nekaterih bolezni, ki prizadenejo kognitivne funkcije, stanje budnosti in energijsko homeostazo (tabela 1) (82–84).

POTENCIALNA TERAPEVTSKA UPORABA LIGANDOV HISTAMINSKIH RECEPTORJEV TIPA 3

Upad kognitivnih funkcij

Kognitivne oz. spoznavne funkcije so tiste zmožnosti, ki so najbolj značilne za človeka

Tabela 1. Antagonisti/inverzni agonisti histaminskega receptorja tipa 3, ki so v kliničnih fazah preizkušanja zdravil za zdravljenje bolezni osrednjega živčevja (84). ADHD – motnja pomanjkanja pozornosti s hiperaktivnostjo (angl. attention deficit hyperactivity disorder).

Obolenje	Učinkovina	Indikacija	Klinična faza
narkolepsija	Pitolisant (BF2.649)	zaspanost	III
	Pitolisant (BF2.649)	katapleksija	III
	JNJ-17216498 ^a	zaspanost	II
	PF-03654746	zaspanost	II
	GSK-189,254	zaspanost	II
Alzheimerjeva bolezen	GSK-189,254	blaga/srednja	II
	MK-0249 ^a	blaga/srednja	II
	PF-03654746	blaga/srednja	I
ADHD	JNJ-31001074 (Bovisant)	odrasli in otroci	II
shizofrenija	Pitolisant (BF2.649)	kognitivna oškodovanost	II
	GSK-239512 ^a	kognitivna oškodovanost	II
	MK-0249 ^a	kognitivna oškodovanost	II
Parkinsonova bolezen	Pitolisant (BF2.649)	zaspanost	III

^a Kemijske strukture še niso poznane, ker so pod patentno zaščito.

in vključujejo sposobnost učenja, pomnjenja, koncentracije, motivacije, pozornosti ipd. Nastajajo v kompleksni mreži asociacijskih področij možganske skorje in ostalih delov živčevja (85). Različna nevrodegenerativna obolenja in duševne motnje, vključno z motnjo pomanjkanja pozornosti s hiperaktivnostjo (angl. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), Alzheimerjevo boleznijo (angl. *Alzheimer's disease*, AD) in shizofrenijo, spremlja upad kognitivnih sposobnosti. Na voljo je veliko terapevtskih pristopov za zdravljenje omenjenih stanj (psihostimulansi pri ADHD, holinesterazni inhibitorji pri AD, antipsihotiki pri shizofreniji), vendar je njihova učinkovitost nepopolna, neželeni učinki pa pogosti.

Histaminski sistem je pomemben modulator kognitivnih funkcij (83, 85–87). Histamin kot ekscitatorni živčni prenašalec, ki posinaptično vzburja H_1R in H_2R ter povzroči obsežno aktivacijo možganske skorje, spodbuja budnost in pozornost. Z delovanjem na H_3R uravnava svojo izgradnjo in sproščanje, pa tudi eksocitozo drugih živčnih prenašalcev. Farmakološka blokada inhibitornega H_3R s selektivnimi antagonistami/inverzni agonisti lahko spodbudi sproščanje živčnih prenašalcev in aktivira nevronske poti, ki so udeležene pri uravnavanju kognitivnih procesov v osrednjem živčevju, zato predstavlja modulacija H_3R obetaven način zdravljenja okrnjenih kognitivnih funkcij in izjemno zanimivo področje predkliničnih in kliničnih raziskav (1, 85).

Predklinične raziskave so potrdile, da antagonistami/inverzni agonisti H_3R aktivirajo histaminergične živčne celice in spodbujajo različne nevrokemijske in vedenjske odzive (16, 83, 86). Študije so potekale na modelnih sistemih glodavcev, ki so jim z uporabo antiholinergikov (npr. skopolamin) ali antagonistov N-metil-D-aspartata (NMDA) (npr. dizocilpin) oslabili normalno kognitivno delovanje. Živali so izgubile prostorsko orientiranost in sposobnosti pomnjenja, kar je značilno za bolnike z AD. Omenjeni posegi so jim oslabili tudi socialni spomin, kar spremlja AD, shizofrenijo in ADHD. Na teh živalskih modelih je bilo možno oceniti tudi impulzivnost (pomemben sestavni del ADHD) in izvršilno dejavnost (motena pri shizofreniji) (87).

Strukturno različni antagonistami/inverzni agonisti H_3R so v vedenjskih testih na glodavcih, kot so socialni spomin, delovni spomin, prepoznavanje objektov, orientiranje v labirintih ipd., preprečili spremembe, inducirane s skopolaminom. Njihovi prokognitivni učinki so bili posledica inhibicije H_3R v holineričnem bazalnem jedru, kar je močno povečalo nivoje acetilholina – ključnega živčnega prenašalca pri uravnavanju pozornosti in pomnjenja – v možganski skorji, ugotovljena pa je bila tudi aktivacija dopaminergičnih in noradrenergičnih živčnih celic v prefrontalni možganski skorji (83). Z vlogo inhibitorjev H_3R se ujema tudi poskusi na $H_3R^{-/-}$ -miših, ki ne vsebujejo genskega zapisa za H_3R . Te živali so imele normalno sposobnost pomnjenja in učenja, vendar so bile odporne na amnestično delovanje skopolamina (88).

Modulacija sproščanja dopamina predstavlja terapevtski izziv za zdravljenje shizofrenije, kjer nezadostna aktivnost dopaminskega sistema povzroča negativne simptome in kognitivni upad (89). Ker histaminergične živčne celice oživčujejo področja, ki so tesno povezana z razvojem shizofrenije, bi antagonistami/inverzni agonisti H_3R lahko vplivali na patofiziologijo bolezni. Raziskave na živalskih modelih za študij mehanizmov shizofrenije, pozornosti in kognitivnih sposobnosti so potrdile njihovo antipsihotično delovanje, saj so spodbujali nivoje dopamina in acetilholina v prefrontalni možganski skorji, zmanjšali primanjkljaj senzorične aktivnosti ali zavrli z metamfetaminom povzročeno psihomotorično aktivnost (90).

Antagonisti/inverzni agonisti H_3R vplivajo na prenos več živčnih prenašalcev v osrednjem živčevju, zato predstavljajo velik izziv za razvoj učinkovitih zdravilnih snovi, ki bodo ponovno vzpostavile okrnjeno delovanje živčnih prenašalcev, brez sočasnega vpliva na normalno delovanje možganov. Hkrati s predkliničnimi študijami potekajo tudi klinične raziskave, ki preučujejo prokognitivne lastnosti antagonistov/inverzni agonistov, kot so Pitolisant ali BF2.649, GSK-239512, MK-0249, PF-03654746 in JNJ-31001074 pri bolnikih z AD ali shizofrenijo (91, 92). Prav tako je v začetnih fazah preizkušanja substanca JNJ-31001074, ki je v predkliničnih študijah na živalskem modelu ADHD učinkovito

zavirala pretirano aktivnost in impulzivnost ter predstavlja obetaven izboljševalec kognicije pri motnjah pozornosti (93). Rezultati kliničnih študij omenjenih ligandov H_3R vlivajo upanje, da bo v prihodnosti možno tudi z njihovo pomočjo omiliti upad kognitivnih funkcij pri bolnikih z različnimi nevrodegenerativnimi obolenji in duševnimi motnjami (tabela 1).

Motnje spanja

Kompleksno izmenjavo budnosti in spanja v cirkadianem ritmu uravnava več sistemov živčnih prenašalcev (histamin, noradrenalin, glutamat, acetilholin, GABA ter oreksin, ki je peptidni nevrotransmitor, ki vpliva na hranjenje in budnost in katerega pomanjkanje ima ključno vlogo pri narkolepsiji) (85, 94). Fiziološka vloga histamina pri tem procesu je bila prvič omenjena v 70. letih prejšnjega stoletja, danes pa je podprta s številnimi študijami, ki potrjujejo, da projekcije histaminergičnih živčnih celic v možgansko skorjo in nekatere druge predele osrednjega živčevja predstavljajo eno glavnih nevronske poti, ki spodbujajo zavest in budnost (95). Histaminergični nevroni imajo večjo prožilno aktivnost v budnem stanju kot v spanju (94). Zavariranje inhibitornega delovanja H_3R poveča vzdražnost in odzivnost histaminskih živčnih celic in spodbuja sproščanje histamina, ki s stimulacijo posinaptičnih H_1R povzroči obsežno aktivacijo osrednjega živčevja (96, 97). Za vrsto antagonistov/inverznih agonistov H_3R so na različnih živalskih modelih potrdili, da spodbujajo izgradnjo in sproščanje histamina, ohranjanje budnost, zmanjšajo fazo spanja s hitrim gibanjem očesnih zrkel (angl. *rapid-eye movement*) in skrajšajo čas spanja v stanju nizke možganske aktivnosti, njihova sposobnost ohranjanja budnosti pa je povezana s povečano aktivnostjo histaminskega sistema in drugih ascendentnih sistemov retikularne formacije (noradrenergičnega, holinergičnega ali dopaminergičnega) (96, 98, 99).

Obetavni rezultati predkliničnih raziskav na različnih živalskih modelnih sistemih so nakazali možnost klinične uporabe inverznih agonistov H_3R za zdravljenje simptomov prekomerne zaspanosti (narkolepsija s katapleksijo, Parkinsonova bolezen) (16, 84, 96). Pitolisant ali BF2.649 je bil prvi inverzni

agonist H_3R , ki so ga uporabili v pilotskih kliničnih raziskavah pri bolnikih z različnimi motnjami budnosti. Rezultati kliničnih raziskav faze II in III so pokazali značilno zmanjšanje števila in trajanje dnevnega spanja ter zmanjšanje frekvence katapleksičnih epizod pri bolnikih z narkolepsijo, opazno pa je bilo tudi zmanjšanje dnevne zaspanosti pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo (93). Drugi inverzni agonisti, kot so JNJ-17216498, PF-03654746 ali GSK-189254, šele vstopajo v fazo II kliničnih raziskav za zdravljenje narkolepsije, zato rezultati še niso znani (tabela 1).

Debelost

Debelost je kronična bolezen energijske homeostaze, ki postaja zdravstveni problem epidemičnih razsežnosti. S prekomerno telesno težo se pomembno povečuje pojavnost srčnožilnih obolenj, sladkorne bolezni tipa 2, nekaterih rakavih obolenj, obstruktivne apneje v spanju in ostalih bolezni, zato predstavlja učinkovito zdravljenje debelosti pomemben izziv za farmacevtsko industrijo. Farmakološko zdravljenje debelosti temelji na modulaciji presnove maščob (orlistat – periferni inhibitor lipaz), uporaba centralnih zaviralcev apetita pa zaradi resnih psihiatričnih in srčnožilnih neželenih učinkov za zdaj ni varna. Nezadostna učinkovitost zdravljenja te bolezni zato vodi v iskanje novih terapevtskih pristopov.

Histaminski sistem je udeležen pri uravnavanju apetita in energijske homeostaze (100). Študije na živalskih modelih debelosti so pokazale, da histamin preko posinaptičnega H_1R v ventromedialnem delu hipotalamusa zavira vnos hrane, akumulacijo maščob in nivo leptina ter omili inzulinsko rezistenco (101–104). Udeležnost H_1R in z njim povezane aktivacije hipotalamične adenosin-5'-monofosfat (angl. *adenosine-5'-monophosphate*, AMP) kinaze pri uravnavanju apetita so potrdile tudi študije na modelu miši z izbitim genom za H_1R ter neželeni učinki zdravljenja s klasičnimi antihistaminiki (H_1R -antagonisti prve generacije), antidepresivi in antipsihotiki z afiniteto do H_1R , za katere je znano, da povečujejo apetit in telesno težo pri živalih in ljudeh (105). Zaradi omenjene vloge histamina pri nadzoru apetita so predvidevali,

da bi lahko z inhibicijo H_3R dosegli povišanje nivojev histamina v osrednjem živčevju in tako zmanjšali vnos hrane, kar je študija s klobenpropitom na živalskem modelu debelosti tudi potrdila (106).

Nekatere raziskave tej hipotezi nasprotujejo. Tako je npr. tioperamid povečal, imetit (agonist H_3R) pa zmanjšal apetit in vnos hrane; ta učinek je bil pri miših z izbitim genom za H_3R odsoten (107). Študije torej kažejo, da je delovanje modulatorjev H_3R pri uravnavanju apetita kompleksno in poleg histamina odvisno tudi od drugih živčnih prenašalcev in njihovih vplivov na oreksinski sistem. Antagonisti/inverzni agonisti H_3R , ki so v kliničnih fazah preizkušanja zdravil za zdravljenje narkolepsije ali ADHD, niso imeli pomembnega vpliva na telesno težo (tabela 1). Zanimivo bo videti, ali bo faza II klinične raziskave s substancno SCH 497079 potrdila vpliv na zmanjšan vnos hrane in izgubo telesne teže.

Bolečina

Histamin je eden izmed glavnih posrednikov lokalnega vnetja in je vključen tako v periferno kot tudi v centralno nocicepcijo (108). Kadar se histamin sprošča na perifernih mestih, povzroča bolečino in aktivacijo z bolečino povezanih signalnih poti v primarnih aferentnih živčnih vlaknih. V osrednjem živčevju histamin vpliva na prenos bolečinskih signalov, predvsem preko vpliva na bolečinsko zaznavanje v talamusu in možganski skorji. Pokazali so, da je tioperamid (antagonist H_3R) preprečil z imetitom povzročeno hiperalgezijo le v pozni fazi, ki je odgovorna za vnetno bolečino (109). V primeru aplikacije tioperamida v možganske prekate (intracerebroventrikularno) pride do povišanja bolečinskega vzdražnega praga na modelu nevropatške bolečine z delno ligacijo perifernega živca, medtem ko ga sistemska (intravenska) aplikacija zniža (110).

Ti podatki kažejo, da bi lahko bili agonisti H_3R uporabni za zdravljenje vnetnega tipa bolečine, antagonisti H_3R pa za zdravljenje nevropatške bolečine. Razlaga teh rezultatov

je še posebej težka, saj imajo svojo vlogo pri prenosu bolečine tudi H_4R . Pri tem je treba omeniti, da sta agonist imetit in antagonist tioperamid tudi liganda H_4R . Uporaba bolj specifičnega antagonista/inverznega agonista GSK207040 je značilno inhibirala s kapsaicinom povzročeno sekundarno alodinijo (tj. stanje, pri katerem normalno neboleči dražljaji povzročijo bolečino) v primerjavi s kontrolno skupino (111). To dokazuje, da so pri bolečini, povezani z vnetjem, antagonisti H_3R učinkovitejši kot agonisti. Vsekakor bodo potrebne nadaljnje raziskave, ki bodo natančneje pojasnile vlogo perifernih, spinalnih in možganskih H_3R pri različnih tipih bolečine.

ZAKLJUČEK

Veliko zanimanje raziskovalcev je pripomoglo k pomembnemu napredku pri poznavanju vloge H_3R v osrednjem živčevju. Preko preučevanja molekularnih (izoblike, tkivna porazdelitev), farmakoloških (vezavne afinitete ligandov) in funkcionalnih lastnosti (spontana aktivnost, znotrajcelični signalni mehanizmi) danes bolje razumemo njegovo izjemno kompleksno naravo. Izgradnja visoko učinkovitih in selektivnih antagonistov/inverzni agonistov H_3R je omogočila številne predklinične študije na živalskih modelih ter začetne klinične raziskave nekaterih od teh ligandov za zdravljenje različnih bolezni, ki prizadenejo kognitivne funkcije, budnost in energijsko homeostazo.

Cilj razvoja ligandov H_3R je terapevtska uporabnost. Iz trenutno javno dostopnih podatkov je govoriti o uspehu ali neuspehu posameznih zdravilnih učinkovin prehitro, saj je večina kliničnih raziskav še v teku. Hkrati je nemogoče predvideti, ali bodo antagonisti/inverzni agonisti H_3R enako uspešni pri ljudeh, kot so bili pri glodavcih. Razvoj učinkovin, ki delujejo na ta receptor, je intenziven in finančno podprt – odprto ostaja le vprašanje, ali bomo kmalu videli oglaševanje v smislu »postanite pametnejši in vitkejši« ali pa bo interes farmacevtske industrije zaradi dolgotrajnosti raziskav zamrl.

LITERATURA

1. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 2008; 88 (3): 1183–241.
2. Hough LB, Leurs R. Histamine. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, et al., eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* 7th ed. Burlington (MA): Elsevier Academic Press; 2006. p. 249–65.
3. Barger G, Dale HH. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J Physiol.* 1910; 41 (12): 19–59.
4. Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-imidazolylethylamine. *J Physiol.* 1910; 41 (5): 318–44.
5. Bovet D, Staub A. Action protectrice des éthers phénoliques au course de l'intoxication histaminique. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1936; 124: 547–9.
6. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature.* 1983; 302 (5911): 832–7.
7. Pillot C, Heron A, Cochois V, et al. A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 2002; 114 (1): 173–93.
8. Cannon KE, Chazot PL, Hann V, et al. Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: potential antinociceptive targets. *Pain.* 2007; 129 (1–2): 76–92.
9. Clapham J, Kilpatrick GJ. Histamine H3 receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 1992; 107 (4): 919–23.
10. Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, et al. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 340 (6): 633–8.
11. Schlicker E, Fink K, Detzner M, et al. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. *J Neural Transm Gen Sect.* 1993; 93 (1): 1–10.
12. Schlicker E, Betz R, Göthert M. Histamine H3 receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988; 337 (5): 588–90.
13. Arias-Montaña JA, Floran B, Garcia M, et al. Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol.* 2001; 133 (1): 165–71.
14. Molina-Hernández A, Nuñez A, Sierra JJ, et al. Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology.* 2001; 41 (8): 928–34.
15. Pillot C, Héron A, Schwartz JC, et al. Ciproxifan, a histamine H3-receptor antagonist/inverse agonist, modulates the effects of methamphetamine on neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Eur J Neurosci.* 2003; 17 (2): 307–14.
16. Esbenshade TA, Fox GB, Cowart MD. Histamine H3 receptor antagonists: preclinical promise for treating obesity and cognitive disorders. *Mol Interv.* 2006; 6 (2): 77–88.
17. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, et al. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol.* 1999; 55 (6): 1101–7.
18. Leurs R, Hoffmann M, Wieland K, et al. H3 receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21 (1): 11–2.
19. Zhu Y, Michalovich D, Wu H, et al. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (3): 434–41.
20. Liu C, Ma X, Jiang X, et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (3): 420–6.
21. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, et al. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4 (2): 107–20.
22. Chen J, Liu C, Lovenberg TW. Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2003; 467 (1–3): 57–65.
23. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, et al. Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (1): 1–8.
24. Cassar S. Cloning of the guinea pig H3 receptor. *Neuroreport.* 2000; 11 (12): L3–4.
25. Yao BB, Sharma R, Cassar S, et al. Cloning and pharmacological characterization of the monkey histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2003; 482 (1–3): 49–60.
26. Rouleau A, Heron A, Cochois V, et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. *J Neurochem.* 2004; 90 (6): 1331–8.
27. Morisset S, Sasse A, Gbahou F, et al. The rat H3 receptor: gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280 (1): 75–80.
28. Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Héron A, et al. Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport.* 2000; 11 (4): 755–9.
29. Strakhova MI, Fox GB, Carr TL, et al. Cloning and characterization of the monkey histamine H3 receptor isoforms. *Eur J Pharmacol.* 2008; 601 (1–3): 8–15.

30. Lovenberg TW, Pyati J, Chang H, et al. Cloning of rat histamine H(3) receptor reveals distinct species pharmacological profiles. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293 (3): 771–8.
31. Wiedemann P, Bönisch H, Oerters F, et al. Structure of the human histamine H3 receptor gene (HRH3) and identification of naturally occurring variations. *J Neural Transm.* 2002; 109 (4): 443–53.
32. Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, et al. Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. *Life Sci.* 2003; 73 (24): 3043–72.
33. Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1195–204.
34. Clark EA, Hill SJ. Sensitivity of histamine H3 receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma[S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol.* 1996; 296 (2): 223–5.
35. Brandon EP, Idzerda RL, McKnight GS. PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7 (3): 397–403.
36. Torrent A, Moreno-Delgado D, Gómez-Ramírez J, et al. H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *Mol Pharmacol.* 2005; 67 (1): 195–203.
37. Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, et al. Constitutive activity of H3 autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology.* 2006; 51 (3): 517–23.
38. Moreno-Delgado D, Gómez-Ramírez J, Torrent-Moreno A, et al. Different role of cAMP dependent protein kinase and CaMKII in H3 receptor regulation of histamine synthesis and release. *Neuroscience.* 2009; 164 (3): 1244–51.
39. Rittenhouse AR, Zigmond RE. Role of N- and L-type calcium channels in depolarization-induced activation of tyrosine hydroxylase and release of norepinephrine by sympathetic cell bodies and nerve terminals. *J Neurobiol.* 1999; 40 (2): 137–48.
40. Seyedi N, Mackins CJ, Machida T, et al. Histamine H3-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase A activity mediates a reduction in intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312 (1): 272–80.
41. Thomas GM, Hagan RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5 (3): 173–83.
42. Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem.* 2002; 277 (14): 11933–40.
43. Karlstedt K, Ahman MJ, Anichtchik OV, et al. Expression of the H3 receptor in the developing CNS and brown fat suggests novel roles for histamine. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24 (3): 614–22.
44. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29 (5): 233–42.
45. Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, et al. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport.* 2004; 15 (6): 955–9.
46. Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, et al. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet.* 2004; 36 (2): 131–7.
47. Faroouqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist.* 2006; 12 (3): 245–60.
48. Arrang JM, Morisset S, Gbahou F. Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28 (7): 350–7.
49. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, et al. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature.* 2000; 408 (6814): 860–4.
50. Wieland K, Bongers G, Yamamoto Y, et al. Constitutive activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3) antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299 (3): 908–14.
51. Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, et al. Histamine H3-receptor-mediated [35S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2002; 135 (2): 383–92.
52. Takahashi K, Tokita S, Kotani H. Generation and characterization of highly constitutive active histamine H3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307 (1): 213–8.
53. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 795–813.
54. Fellin T, Carmignoto G. Neuron to astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 2004; 559 (Pt 1): 3–15.
55. Elmariah SB, Highes EG, Joo Oh, et al. Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol.* 2005; 10: 1–11.
56. Höslü L, Höslü E, Schneider U, et al. Evidence for the existence of histamine H1- and H2-receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett.* 1984; 48 (3): 287–91.
57. Čarman-Kržan M, Lipnik-Štangelj M. Molecular properties of central and peripheral histamine H1 and H2 receptors. *Pflugers Arch.* 2000; 439 (3 Suppl): R131–2.

58. Lipnik-Štangelj M, Čarman-Kržan M. Activation of histamine H1-receptor enhances neurotrophic factor secretion from cultured astrocytes. *Inflamm Res*. 2004; 53 (6): 245–52.
59. Rafałowska U, Waśkiewicz J, Albrecht J. Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett*. 1987; 80 (1): 106–10.
60. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, et al. Kinetic and pharmacological properties of [(3)H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. *Inflamm Res*. 2009; 58 (2): 94–102.
61. Rodríguez J, Moran J, Blanco I, et al. Effect of histamine on the development of astroglial cells in culture. *Neurochem Res*. 1989; 14 (7): 693–700.
62. Arbonés L, Pícastoste F, García A. Histamine stimulates glycogen breakdown and increases 45Ca^{2+} permeability in rat astrocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*. 1990; 37 (6): 921–7.
63. Jung S, Pfeiffer F, Deitmer JW. Histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms. *J Physiol*. 2000; 527 (Pt 3): 549–61.
64. Barajas M, Andrade A, Hernandez-Hernandez O, et al. Histamine-induced Ca^{2+} entry in human astrocytoma U373 MG cells: evidence for involvement of store-operated channels. *J Neurosci Res*. 2008; 86 (15): 3456–68.
65. Shelton MK, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes exhibit Ca^{2+} -elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J Neurochem*. 2000; 74 (2): 555–63.
66. Cadman ED, Witte DG, Lee CM. Regulation of the release of interleukin-6 from human astrocytoma cells. *J Neurochem*. 1994; 63 (3): 980–7.
67. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M. Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22 (3): 119–30.
68. Lipnik-Štangelj M. Multiple role of histamine H1-receptor-PKC-MAPK signalling pathway in histamine-stimulated nerve growth factor synthesis and secretion. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72 (11): 1375–81.
69. Jurič DM, Mele T, Čarman-Kržan M. Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology*. 2011; 60 (7–8): 1309–17.
70. Leurs R, Vollinga RC, Timmerman H. The medicinal chemistry and therapeutic potentials of ligands of the histamine H3 receptor. *Prog Drug Res*. 1995; 45: 107–65.
71. Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, et al. Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature*. 1987; 327 (6118): 117–23.
72. Krause M, Rouleau A, Stark H, et al. Synthesis, X-ray crystallography, and pharmacokinetics of novel azomethine prodrugs of (R)-alpha-methylhistamine: highly potent and selective histamine H3 receptor agonists. *J Med Chem*. 1995; 38 (20): 4070–9.
73. Rouleau A, Garbarg M, Ligneau X, et al. Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP 2–94, a histamine H3 receptor agonist prodrug. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281 (3): 1085–94.
74. Garbarg M, Arrang JM, Rouleau A, et al. S-[2-(4-imidazolyl)ethyl]isothiourea, a highly specific and potent histamine H3 receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 263 (1): 304–10.
75. Hey JA, Aslanian R, Bolser DC, et al. Studies on the pharmacology of the novel histamine H3 receptor agonist Sch 50971. *Arzneimittelforschung*. 1998; 48 (9): 881–8.
76. Jansen FP, Mochizuki T, Yamamoto Y, et al. In vivo modulation of rat hypothalamic histamine release by the histamine H3 receptor ligands, imnepip and clobenpropit. Effects of intrahypothalamic and peripheral application. *Eur J Pharmacol*. 1998; 362 (2–3): 149–55.
77. Kitbunnadaj R, Zuiderveld OP, Christophe B, et al. Identification of 4-(1H-imidazol-4(5)-ylmethyl)pyridine (immetridine) as a novel, potent, and highly selective histamine H(3) receptor agonist. *J Med Chem*. 2004; 47 (10): 2414–7.
78. Kitbunnadaj R, Hashimoto T, Poli E, et al. N-substituted piperidinyl alkyl imidazoles: discovery of methimepip as a potent and selective histamine H3 receptor agonist. *J Med Chem*. 2005; 48 (6): 2100–7.
79. Stephanos JJ. Drug-protein interactions: two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin. *J Inorg Biochem*. 1996; 62 (3): 155–69.
80. Ganellin CR, Leurquin F, Piripitsi A, et al. Synthesis of potent non-imidazole histamine H3-receptor antagonists. *Arch Pharm (Weinheim)*. 1998; 331 (12): 395–404.
81. Meier G, Apelt J, Reichert U, et al. Influence of imidazole replacement in different structural classes of histamine H(3)-receptor antagonists. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 13 (3): 249–59.
82. Sander K, Kottke T, Stark H. Histamine H3 receptor antagonists go to clinics. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31 (12): 2163–81.
83. Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, et al. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol*. 2008; 154 (6): 1166–81.
84. Passani MB, Blandina P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32 (4): 242–9.
85. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC, eds. *Molecular Neuropharmacology. A foundation for Clinical Neuroscience*. 2nd ed. McGraw-Hill: New York; 2008.

86. Brioni JD, Esbenshade TA, Garrison TR, et al. Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 38–46.
87. Wrenn CC, Kinney JW, Marriott LK, et al. Learning and memory performance in mice lacking the GAL-R1 subtype of galanin receptor. *Eur J Neurosci.* 2004; 19 (5): 1384–96.
88. Toyota H, Dugovic C, Koehl M, et al. Behavioral characterization of mice lacking histamine H(3) receptors. *Mol Pharmacol.* 2002; 62 (2): 389–97.
89. Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, et al. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl).* 2004; 174 (1): 3–16.
90. Southam E, Cilia J, Gartlon JE, et al. Preclinical investigations into the antipsychotic potential of the novel histamine H3 receptor antagonist GSK207040. *Psychopharmacology (Berl).* 2009; 201 (4): 483–94.
91. Ligneau X, Perrin D, Landais L, et al. BF2.649 [1-{3-[3-(4Chlorophenyl)propoxy]propyl} piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H3 receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320 (1): 365–75.
92. Schwartz JC. The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol.* 2011; 163 (4): 713–21.
93. Bonaventure P, Letavic M, Dugovic C, et al. Histamine H3 receptor antagonists: from target identification to drug leads. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1084–96.
94. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 17–23.
95. Schwartz JC. Histaminergic mechanisms in brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1977; 17: 325–39.
96. Monti JM, Jantos H, Boussard M, et al. Effects of selective activation or blockade of the histamine H3 receptor on sleep and wakefulness. *Eur J Pharmacol.* 1991; 205 (3): 283–7.
97. Ligneau X, Lin J, Vanni-Mercier G, et al. Neurochemical and behavioral effects of ciproxifan, a potent histamine H3-receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 287 (2): 658–66.
98. Le S, Gruner JA, Mathiasen JR, et al. Correlation between ex vivo receptor occupancy and wake-promoting activity of selective H3 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325 (3): 902–9.
99. Parmentier R, Anacle C, Guhenec C, et al. The brain H3-receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1157–71.
100. Passani MB, Blandina P, Torrealba F. The histamine H3 receptor and eating behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 24–9.
101. Itoh Y, Oishi R, Saeki K. Feeding-induced increase in the extracellular concentration of histamine in rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett.* 1991; 125 (2): 235–7.
102. Mercer LP, Kelley DS, Humphries LL, et al. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J Nutr.* 1994; 124 (7): 1029–36.
103. Ookuma K, Sakata T, Fukagawa K, et al. Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats. *Brain Res.* 1993; 628 (1-2): 235–42.
104. Masaki T, Yoshimatsu H, Chiba S, et al. Central infusion of histamine reduces fat accumulation and upregulates UCP family in leptin-resistant obese mice. *Diabetes.* 2001; 50 (2): 376–84.
105. Kim SF, Huang AS, Snowman AM, et al. From the cover: antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (9): 3456–9.
106. Ishizuka T, Hatano K, Murotani T, et al. Comparison of the effect of an H(3)-inverse agonist on energy intake and hypothalamic histamine release in normal mice and leptin resistant mice with high fat diet-induced obesity. *Behav Brain Res.* 2008; 188 (2): 250–4.
107. Yoshimoto R, Miyamoto Y, Shimamura K, et al. Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonist for the treatment of obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103 (37): 13866–71.
108. Hough LB, Rice FL. H3 receptors and pain modulation: peripheral, spinal, and brain interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 30–7.
109. Farzin D, Nosrati F. Modification of formalin-induced nociception by different histamine receptor agonists and antagonists. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007; 17 (2): 122–8.
110. Huang L, Adachi N, Nagaro T, et al. Histaminergic involvement in neuropathic pain produced by partial ligation of the sciatic nerve in rats. *Reg Anesth Pain Med.* 2007; 32 (2): 124–9.
111. Medhurst AD, Briggs MA, Bruton G, et al. Structurally novel histamine H3 receptor antagonists GSK207040 and GSK334429 improve scopolamine-induced memory impairment and capsaicin-induced secondary allodynia in rats. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1182–94.

Zvonka Zupanič Slavec¹, Ksenija Slavec²

Zdravstvo proti nalezljivim boleznim skozi čas

The Fight against Infectious Diseases over Time

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: epidemiologija, nalezljive bolezni, organizacija zdravstvene strategije, karantena, cepljenje, javnozdravstveni nadzor

Epidemije in pandemije so v zgodovini človeštva terjale največ smrtnih žrtev, zato so družbo in zdravstvo od nekdaj vsestransko zaposlovale. Njihove katastrofalne demografske, gospodarske, socialne, psihološke in druge posledice so privedle do iskanja vzrokov ter možnih družbenih in zdravstvenih rešitev zanje. Med najuspešnejšimi zgodnjimi ukrepi je bila uvedba karanten, s prvo med njimi v Dubrovniku leta 1377. Šele mikrobiološka era je z odkrivanjem bakterijskih, virusnih in drugih povzročiteljev postavila strokovne temelje racionalni protiepidemijski strategiji z ustreznimi navodili in ukrepi, predvsem pa s cepljenji. Za javnozdravstveno strategijo preprečevanja in zatiranja epidemičnih bolezni je na mednarodni ravni sprva skrbela zdravstvena sekcija Društva narodov, po drugi svetovni vojni pa Svetovna zdravstvena organizacija. V pomoč so bila tudi trgovinska združenja, ki so za preprečevanje gospodarske škode v primeru epidemij že od sredine 19. stoletja organizirala mednarodne sanitarne konference.

ABSTRACT

KEY WORDS: epidemiology, infectious diseases, health organization and strategy, quarantine, vaccination, public health control

Throughout the history of mankind, epidemics and pandemics were the cause of most deaths; this is why they have always occupied an important place in the society and its health system. Their disastrous demographic, economic, social, psychological and other consequences have led to a search of the causes and possible social and medical solutions for them. One of the most successful early measures was the quarantine, introduced for the first time in Dubrovnik in 1377. Since the microbiological era, when bacterial, viral and other agents were discovered, professional foundations have been set for a rational antiepidemic strategy with its guidelines and measures, and above all vaccination. At first, the health section of the League of Nations was responsible for the public health strategy of prevention and fight against epidemic diseases at an international level, whereas after World War II, World Health Organization took over. Trade associations were also very supportive, organizing international sanitary conferences since the mid-19th century in order to prevent economic damage, caused by epidemics.

¹ Prof. dr. Zvonka Zupanič Slavec, dr. med., Inštitut za zgodovino medicine, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 7a, 1000 Ljubljana; zvonka.slavec@gmail.com

² Ksenija Slavec, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

IZHODIŠČA

Epidemiologija se ukvarja s pojavom in razširjenostjo določene bolezni ter z vrednotenjem njenega za človeka in družbo ogrožajočega potenciala. Med njene metode med drugim sodijo preučevanje vzrokov in širjenja nalezljivih bolezni ter oblikovanje ukrepov za njihovo obvladovanje in preprečevanje. Glede na številčnost in obseg obolelih ločimo: endemije – stalni pojav neke bolezni na določenem območju (npr. trahom), epidemije – povečano število obolelih na določenem območju v določenem času – in pandemije – povečano število obolelih v več deželah, celo po vsem svetu v določenem času (npr. pandemija kolere, pandemija influence). Za epidemijo je potrebno zadostno število dovzetnih za okužbo z mikroorganizmi (bakterijami, virusi). Karantenske bolezni mora epidemiološka služba obvezno prijavljati Svetovni zdravstveni organizaciji. Včasih so mednje spadale tuberkuloza, gobavost, sifilis in koze, danes pa kolera, rumena mrzlica, otroška paraliza, pegavi tifus in malarija. Nalezljive bolezni različni avtorji različno delijo: po povzročiteljih (bakterijske, virusne, glivične, zajedavske), po mestih okužbe (prehladne, črevesne okužbe, okužbe osrednjega živčevja, kože), na otroške bolezni itd. Delimo jih tudi na bolezni, ki jih prenašajo živali (kuga, pegavi tifus, malarija), črevesne bolezni (tifus, paratifus, kolera, griža, nalezljive driske, zlatenica, otroška paraliza) in otroške nalezljive bolezni (daviča, škrlatinka, ošpice, mumps, oslovski kašelj, rdečke). V Sloveniji moramo večino nalezljivih bolezni prijavljati epidemiološki službi.

V ljudskem jeziku je kuga vsaka (najpogosteje smrtonosna) bolezen, za katero se zdi, da je neobvladljiva, ki se pojavi nenadoma ter povzroči hitro in množično zbolevanje ter umiranje. Zgodovina kuge v najširšem pomenu besede je torej zgodovina velikih epidemij, ki so v kratkem času pobile na tisoče ljudi. Združuje številne nalezljive bolezni, od bubonske kuge do črnih koz, pegavega tifusa, ošpic, noric, škrlatinke in številnih današnjih kug, med katerimi je v ospredju aids.

UVOD

Epidemije so se začele pojavljati, ko so ljudje organizirano zaživel v večjih skupnostih,

krajih in mestih. Sprva so jih sprejemali kot naravni pojav, kasneje pa so jih pripisovali nadnaravnim silam, predvsem zato ker niso vedeli, kako je do bolezni prišlo ter kako bi jo preprečili in zdravili. Prav zaradi tega so se proti boleznim borili večinoma na iracionalne načine (glede na različna filozofska, verska in druga prepričanja). Med pomembnimi ukrepi preprečevanja epidemij bolezni je bilo npr. navodilo, zapisano v Bibliji, da je bilo treba osamiti gobavce in obvezno kopati bolnike z gonorejo. Tako drastične ukrepe, kot je recimo osamitev obolelih, bi z običajnim svetovanjem in prigrvarjanjem le težko dosegli. Stari Kitajci so bili dobri opazovalci, saj so videli, da s prenosom kužnine koz na neobolele povzročijo njihovo blago obolenje, ob epidemijah pa tako zaščiteni ne zbolevalo več. Tako so prvi uvedli primitiven, vendar učinkovit način »cepljenja« – variolizacijo proti kozam. Tudi stari Grki so verjeli v iracionalne vzroke epidemij, npr. Apolon, bog glasbe in medicine, je po zapisih s kužno puščico zanesel epidemijo v sovražnikov tabor pred Trojo.

Ob epidemijah je med ljudmi zavladala neobvladljiva panika, zato so bežali po znamenem reku »*Mox, cito, longe!*« – »Beži takoj, hitro, daleč!« S tem so epidemije še bolj širili. Stari Rimljani so bili učinkoviti s poostreno higieno, skrbjo za odvoz in sežiganje mrličev ter urejanjem pokopališč izven naselij. Tudi sicer so vpeljali številne higienske in javnozdravstvene ukrepe, pisali sanitarno zakonodajo in jo tudi nadzirali.

Številnih epidemij starih in antičnih narodov ni lahko identificirati. S paleopatološkimi raziskovalnimi metodami pa dandanes prihajamo do novih ugotovitev. Med najbolj popisanimi kugami antičnega sveta je t. i. atenska ali Tukididesova kuga (430–425 pr. n. š.), ki je razsajala med peloponeško vojno. Kmalu so ugotovili, da lahko bolnike negujejo le tisti, ki so to bolezen tudi sami preboleli in so v javnost zahajali oblečeni v kužne maske s ptičjimi nosovi, v katerih so imeli aromatična zelišča, pogosto pelin, kar jih je ščitilo pred kužnim smradom. Že stari Egipčani so poznali zvezo med vojnami in epidemijami. Za nekatere kulture pa celo velja, da so jih ugonobile prav kužne bolezni, pri Rimljanih naj bi bila udeležena malarija.

PREDMIKROBIOLOŠKA DOBA

Medicinske vede dolgo niso poznale vzrokov množičnega obolenja. Antične razlage o miazmah ali nezdravih zemeljskih izparinah so bile teoretična razlaga za kužne bolezni vse do odkritja povzročiteljev bolezni v 19. stoletju. Razmišljali so tudi o vročem, lepljivem puščavskem zraku, vetrovih in podobnem, ki naj bi prinesli nekaj neznanega, kar so vsi vdihavali. Nemalokrat so pomislili tudi na kužnost vode, sežigali pa so tudi stvari, za katere so sumili, da bi jih lahko okužile. Mislili so na vse tisto, kar so vsi uživali in čemur se niso mogli izogniti. Hipokrat je o nalezljivih boleznih napisal knjigo z naslovom »O epidemijah« (1). Kužne bolezni niso izbirale žrtev ne po spolu ne po starosti in ne po stanu. Pojavile so se kot strela z jasnega in treščile v kogar koli. Zdravniki so zgodaj spoznali, da gre za prenos bolezni s predmeta na človeka in s človeka na človeka. O tej kontaktni teoriji si niso upali govoriti na glas, saj bi bili s tem tudi sami prenašalci bolezni in bi lahko bili hitro izobčeni (2). Ljudje so iskali tudi krivce za množične bolezni. Najlaže je bilo s prstom pokazati na tuje in nepriljubljene etnične skupnosti, kot so Romi, priseljenci in drugi, ki so jih ponekod tudi izgnali, kamnali ipd. V srednjem veku so bili za krivce večkrat obtoženi Židje, ker so bili kot posojevalci denarja običajno nepriljubljeni. Prav tako so kužne bolezni vedno poimenovali po »tujih povzročiteljih«. Italijani so sifilis imenovali francoska bolezen, Francozi italijanska, Španci pa so ji rekli neapeljska bolezen. V iskanju zunanjih krivcev se je od nekdaj kazala nemoč oblasti in posameznikov pri reševanju kužnih bolezni. V srednjem veku so razmišljali, da se pred njimi lahko zaščitijo z »antidoti«, t. i. teriaki, ki so lahko vsebovali tudi 150 različnih substanc najbolj bizarnega izvora: od mišjih iztrebkov do zmletih netopirjev, delov krokodilov ter ves imaginarij t. i. »Dreck Apotheke«, kar je vodilo do mističnih obredov pri javnem kuhanju teh pripravkov (3). Te so po malem uživali kot antidote, da bi se zaščitili pred okužbo.

V mestih so ob epidemijah množična umiranja porušila normalno življenje. Zaprtje mestnih vrat ter prepoved vstopa in izstopa naj bi preprečila nadaljnje širjenje bolezni. Tudi množični shodi so bili že v antičnih časih

označeni za neprimerne in so jih kasneje odsvetovali ali celo prepovedovali. Ker je bilo izredno stanje nemalokrat dolgotrajno, je prišlo do zloma ekonomije, trgovine, primanjkovalo je hrane, vode itd. Vse manj je bilo tudi zdravih, ki bi lahko negovali bolnike in pokopavali mrličje. Z nepokopanih žrtev se je okužba običajno širila naprej. V najhujših primerih so kužne bolezni pripeljale do konca vojne, pokopale mesta, države itd. V želji po preživetju so se ob epidemijah ljudje različno obnašali: eni so se zapirali pred svetom, drugi so v smrtnem strahu prestopili vse meje civiliziranega obnašanja, kradli, se maščevali, ubijali, požigali, posiljevali in velikokrat tudi sami končali s samomori. Panike ni bilo lahko preprečiti. V srednjem veku, ko je vladalo prepričanje, da so bolezni kazen za grešno življenje, so se ob epidemijah ljudje zatekali v cerkev, k molitvam, procesijam in drugim verskim obredom. Tam se je zaradi druženja bolezen še bolj širila. Pojavljali so se tudi bičarji, ki so verjeli, da se z bičanjem lahko spokorijo za grehe in premagajo bolezni.

Kulminacijo med kužnimi boleznimi predstavlja t. i. črna smrt, kuga iz sredine 14. stoletja, katere izvora še danes ne moremo pojasniti in se ne ve, ali je to res bila bubonska kuga, ki jo prenašajo okužene podganje bolhe, morebiti vranični prisad (antraks) ali celo hemoragična mrzlica, ki jo povzroča smrtonosni virus Ebola (4). Zmanjšanje tedanje evropske populacije za tretjino ali več je pripeljalo do zloma ekonomije in družbenega reda. Predvsem pa je nastopilo veliko pomanjkanje delovne sile, kar so takratne oblasti reševale z novo populacijsko politiko. Pregarjanje vsakršnih metod preprečevanja zanositve in poroda oz. vseh zvez, ki niso vodile do potomstva, je postalo osrednja vsebina t. i. čarovniških procesov. V začetku novega veka so z njimi izkoreninili praktično vse zdravstveno osebje, babice, zeliščarice, »modre žene«, ki so nosile empirično znanje človeštva o naravnih kontracepciji in naravnih splavih (5). Od urejene srednjeveške družine, ki je v povprečju štele okoli 3–4 otroke, so v novem veku nastale družine z ducatom otrok, v katerih je po pojavu industrijske revolucije vladala lakota in velik padec življenjske ravni. Posledično so se razplamtele socialne bolezni, predvsem tuberkuloza.



Slika 1. Stavba nekdanje karantene v Dubrovniku, kjer so od leta 1377 naprej 40 dni zadrževali vse, ki so prihajali v luko, da ne bi prinesli kužne bolezni (vir: Inštitut za zgodovino medicine Medicinske fakultete v Ljubljani).

Če se vrnemo k protikužnim spoznanjem poznega srednjega veka, zapišimo, da se je takrat izkristalizirala misel, da »čudne« kužne bolezni prihajajo od daleč z mornarji, trgovci, vojaki, popotniki in drugimi, kar je leta 1377 pripeljalo do ustanovitve prve karantene na svetu, in to v Dubrovniku (slika 1). Karantene so se kmalu za tem razširile po italijanskih, francoskih in drugih evropskih obmorskih mestih, kjer so v posebej zgrajenih objektih 40 dni zadrževali vse, ki so pripotovali. Menili so, da je to čas, v katerem se lahko razvijejo vse potencialno nevarne nalezljive bolezni (6).

Razvoj epidemiologije se je začel z renesančnim reformatorjem te stroke, Italijanom Girolamom Fracastorom (1478–1553). Ta je v svojem vodilnem delu »*De contagione et contagiosis morbi*« leta 1546 zapisal, da nalezljive bolezni povzročajo očem nevidne kužne klice (lat. *seminaria contagiosa*), ki se razmnožujejo. Uvedel je pojem inkubacije in imunosti ter s tem postavil temelje epidemiologije. V primeru kuge je svetoval telesno čistočo, čistočo stanovanja in hrane, pokop mrličev, razkuževanje predmetov in kužnih stanovanj, ni pa še vedel, da kugo prenašajo podganje bolhe. Potegnil je mejo med bubonsko kugo in pegavim tifusom (7).

Dve stoletji kasneje je predhodnik sodobne mikrobiologije, zdravnik slovenskega rodu iz

Solkana dr. Marko Anton Plenčič (1705–1786) v svojem izvirnem delu *O bolezenskem kontagiju*, katerega prvi del je bil preveden v slovenski jezik, zagovarjal specifičnost povzročiteljev bolezni: vsaka bolezen ima svojega specifičnega povzročitelja (8, 9). Ker je s svojimi spoznanji prehitel čas, je bil sprva prezrt (slika 2) (10).

Kužne bolezni so bile tudi najhujša orožja osvajalnih vojn. Cortezova osvojitve Mehike in Peruja v 16. stoletju ni potrebovala orožja: veliko prebivalstva je pomrlo, ker so jih okužili s črnimi kozami in ošpicami, ki jih na zahodni celine niso poznali in pred njimi niso razvili imunosti (11). Podobna katastrofa je doletela severnoameriške staroselce. Najverjetneje je z zahodne celine v stari svet prišel sifilis, ki se je v 16. stoletju razvil v kugo tedanje dobe. Povzročil je množično zapiranje javnih kopališč, mest razvrata in zakonski zvestobi vrnil družbeno ustaljeno mesto (12). Rušenje družbenih norm se je v medicini večkrat pokazalo za vzrok novim boleznim. Po pojavu sifilisa so začeli uvajati jedilni pribor in krožnike za posameznike, spreminjati navede v zvezi z osebno higieno, opuščati poljubljanje ob srečanju, uporabljati parfume za prikrivanje smradu obolelih, lasulje za skrivanje sifilitične plešavosti in si briti brade, ki jih je bolezen močno razredčila (13, 14).



Slika 2. Naslovnica slovenskega prevoda dela Marka Antona Plečiča *O bolezenskem kontagiju* (lat. *De contagii morborum*) (vir: *Inštitut za zgodovino medicine Medicinske fakultete v Ljubljani*).

Posebna endemična oblika sifilisa se je pod imenom škrljevska bolezen pojavila med prebivalci reškega zaledja, Notranjske in bližnje okolice. V začetku 19. stoletja je postala nova kužna grožnja, ki so jo avstrijske zdravstvene oblasti zatrle s prisilnimi pregledi (vizitacijami) in hospitalizacijami vseh obolenih do ozdravitve (15). S tako odločnim pristopom je bil endemski sifilis, ki se je širil na nespolni način, med Slovenci in Hrvati iztrebljen že do leta 1850, na Balkanu pa se je obdržal še polnih 100 let, ko ga je v petdesetih letih 20. stoletja s penicilinom iztrebila Svetovna zdravstvena organizacija (16).

Med epidemične kužne bolezni sodi še kolera, ki se je v obliki velikih pandemij širila po Evropi v 19. stoletju. Z razvojem trgovine in intenzivnimi stiki med odmaknjenim vzhodnim in zahodnim svetom so jo trgovci z bengalskega območja raznesli po vsem svetu. Prislovično umazani Evropejec tedanje dobe je imel malo možnosti, da bi se izognil tej bolezni umazanih rok. Prenašala se je kontaktno in z okuženo vodo ter povzročala hitro smrt zaradi dehidracije. Stara celina je razvila sistem zaščite z ureditvijo vodnjakov, loči-

tvijo odpadnih vod od pitne in drugimi ukrepi. Po pandemijah v letih 1816–1826, 1829–1851, 1852–1860, 1863–1875 in 1881–1896 se kolera v Evropi ni več epidemično pojavljala (17).

MIKROBIOLOŠKA DOBA: OD VARIOLIZACIJE DO VAKCINACIJE

Prvo uspešno zaščito pred kužnimi boleznimi je prinesla Jennerjeva variolizacija (1798) z vakcino kravjih koz. Angleški zdravnik Edward Jenner (1749–1823) je z eksperimentalnim delom potrdil trditev, ki jo je na angleški dvor preko pisem prenesla žena angleškega veleposlanika v Turčiji, Mary Wortly Montagu (1689–1762). Turki so kravje kože prenašali na ljudi in jih tako zaščitili pred virusom *Variola vera*. To pravadno kitajsko izkušnjo, ki so jo uporabljali Turki, ni pa prodrla do stare celine, je Jenner leta 1798 objavil v delu »O delovanju in učinkih cepiva proti kozam« (angl. »An Inquiry into the Causes and Effects of the Variole Vaccinæ«) (18). Ker so bile kože ena najhujših nadlog takratnega evropskega človeka, se je Jennerjev zapis razširil kot blisk. K nam ga je prenesel dr. Vincenc Kern (1760–1829), ki je še istega leta o tem spisal knjižico v nemškem jeziku in jo je naslednje leto Valentin Vodnik prevedel v slovenski jezik ter naslovil »Nauk od kose stavljenja« (slika 3) (19, 20). V delu so po zgodovinskem uvodu v sedmih točkah razloženi razlogi za variolizacijo. Metoda je bila na Kranjskem uradno uvedena leta 1803 in se je kmalu razširila po Dolenjski, Notranjski, Gorenjski in drugje. Na tem mestu ne bi bilo odveč omeniti, da so kože leta 1801 na Postojnskem pokopale 3.000 ljudi, da je v istem letu v ljubljanski škofiji podleglo 1.200 otrok in da so na račun teh dramatičnih števil v času Ilirskih provinc izdali predpise za zatiranje koz. Že leta 1812 je bilo na Kranjskem cepljenih 7.200 otrok, leta 1814 pa so že pri sprejemih v državno službo zahtevali potrdilo o cepljenju (slika 4). Leta 1822 je bilo predpisano splošno in obvezno cepljenje, dve leti zatem pa so že predpisali kazen za prikrivanje bolnika s črnimi kozami. Tukaj se začne revolucionarno poslanstvo zamisli o vnosu blage kužnine v zdrav organizem, čemur sodobno rečemo cepljenje, in vodi do pridobljene imunosti (21). Ker so kuž-



Slika 3. Oljni portret Vincenca Kerna (1760–1829), začetnika cepljenja proti kozam pri Slovencih (last Ginekološke klinike v Ljubljani) (vir: Inštitut za zgodovino medicine Medicinske fakultete v Ljubljani).



Slika 4. Cepilno potrdilo iz sredine 19. stoletja (vir: Inštitut za zgodovino medicine Medicinske fakultete v Ljubljani).

ne bolezni večinoma prihajale z vzhoda ali juga, je avstrijska država predvsem proti kozam na jugu postavila posebno protikužno bariero t. i. kužni kordon (slika 5) (22).

Razvoj mikrobiologije 19. stoletja je sprva bakterijskim, kasneje pa tudi virusnim boleznim stopil na prste. Proti boleznim mikroorganizmom so vse uspešneje razvijali cepiva, ki pa nikakor niso za vse bolezni enako uspešna (23). Za kolero in škrlatinko npr. ni učinkovitega cepiva, proti trebušnemu tifusu se uporablja le v izjemnih primerih, pa tudi cepivo proti kugi ni namenjeno množični uporabi (cepi se le laboratorijske in terenske delavce ter turiste, ki potujejo v endemična območja). Da so nekatere nalezljive bolezni postale manj nevarne, so v določenih obdobjih prispevali nekateri ukrepi in dejavniki, ne le cepljenja. Človeštvo pa je v splošnem s cepljenjem proti nalezljivim boleznim razvilo odpornost – imunost. Pri Slovencih so bila uvedena cepljenja proti kozam leta 1803 (ukinjeno leta 1978), davici leta 1937, tuberkulozi leta 1945 (ukinjeno leta 2005), tetanusu leta 1951,

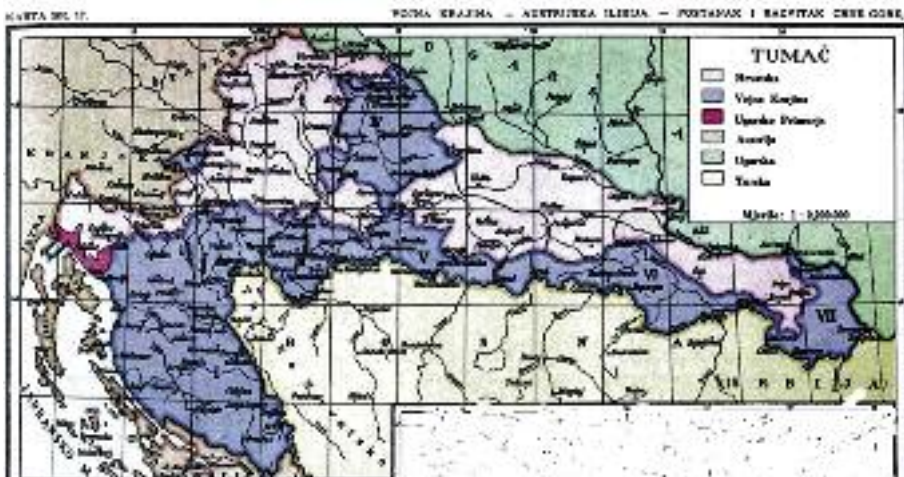
otroški paralizi leta 1957, oslovskemu kašlju leta 1959, ošpicam leta 1968, mumpsu leta 1979, rdečkam za deklice leta 1972 (prej pri deklicah zaradi škodljivega učinka rdečk na plod), za dečke leta 1990 (24). Pogostnost nekaterih obolenj je narekovala še nova cepljenja: cepljenje otrok proti bakteriji *Haemophilus influenzae* tipa B leta 2000 in odraslim proti virusu hepatitisa B leta 1998, pa tudi proti gripi in klopnemu meningoencefalitisu. V zadnjih letih se uvaja prostovoljno cepljenje proti pnevmokoknim in rotavirusnim okužbam, noricam in od leta 2009 proti okužbam s človeškim papilomavirusom za deklice v starosti 11 oz. 12 let.

Še pol stoletja je trajalo, da so znanstveniki odkrili antibiotike (penicilin leta 1928) kot uspešna zdravila proti večini bakterijskih okužb (25). Razvoj medicine in javnega zdravstva 20. stoletja s socialno medicino in higieno, s sanitacijo bivalnega okolja, prosvetljevanjem prebivalstva, preventivnim zdravstvenim delom, rednim nadzorom nad širjenjem nalezljivih bolezni idr. pa so preprečili nadaljevanje epidemičnega širjenja nalezljivih bolezni,

ki so postale obvladljive. To velja za ves razviti svet, vključno s Slovenijo in nekdanjo Jugoslavijo (26).

S cepljenjem posameznih s kozami okuženih skupin prebivalstva v nerazvitem svetu so v letu 1977 uspeli celo iztrebiti črne kozе, ker te nimajo rezervoarja povzročiteljev med živalskimi vrstami. To je eden največjih dosežkov sodobne medicine. Pri virusnih povzročiteljih drugih bolezni stvar ni bila vedno tako preprosta, predvsem ne pri virusu influence A. Viruse so z razvojem biologije in tehnike odkrili v tridesetih letih 20. stoletja in proti njim pripravili veliko uspešnih cepiv (27). Virusi s svojo izjemno spremenljivo naravo in hitrimi mutacijami predstavljajo nepredvidljiv bolezenski agens (28). Gripa je podobno kot kolera potrebovala ustrezne pogoje za širjenje po svetu. Številne trgovske poti, predvsem pa turizem in hitri transport, so to le na videz banalno bolezen naredili človeku nevarno. Sodobna pandemija leta 2009 z novim virusom influence A tipa H1N1, podtipa virusa prašičje gripe, je le ena od tovrstnih pandemij. Pandemije influence so bolj znane in preučevane predvsem v zadnjih 110 letih ter so vedno prihajale z Vzhoda. Proti koncu 19. stoletja se je razvila večja epidemija t. i. ruske gripe. Ob koncu prve svetovne vojne med letoma 1918 in 1919 se je pojavila zelo smrtonosna oblika gripe, povzročena s ptičjim virusom influence A tipa H1N1, ki se je razširil po vseh

frontah sveta in povzročil najbolj katastrofalno pandemijo vseh časov t. i. špansko gripo (29). Po oceni Svetovne zdravstvene organizacije je ta gripa pokopala okoli 50 milijonov ljudi, med njimi predvsem vojake in mlajše civiliste. Mlajši so zaradi zdravega imunskega sistema reagirali prekomerno in najpogosteje umirali zaradi krvave pljučnice. Za špansko gripo je zbolelo okoli 40% svetovnega prebivalstva, smrtnih žrtev pa je bilo več kot padlih med prvo svetovno vojno (30). Pandemija gripe se lahko pojavi 3–4-krat v stoletju, ker se v tem času nabere dovolj prebivalcev, ki so za bolezen občutljivi. V 20. stoletju so španski gripi sledile še pandemije influence A leta 1957 kot azijska gripa, ki je terjala okoli 2 milijona žrtev, desetletje za tem, leta 1968, hongkonška gripa, ki so jo uspeli hitro ustaviti in je terjala okoli 750.000 žrtev. Tri desetletja za njo, ob koncu 20. stoletja, se je na Kitajskem pojavila ptičja gripa, ki pa je zaradi izjemno hitrih preventivnih akcij terjala le nekaj življenj. Pandemija nove gripe iz leta 2009, ki se (tudi) zaradi izjemno razširjenih letalskih zvez po svetu širi hitreje kot katera koli gripa doslej, ima pred seboj množico za bolezen dovzetnih ljudi. Dosedanje izkušnje kažejo, da virus ni bil tako patogen, kot so bili nekateri pred njim, upoštevanje navodil za preprečevanje bolezni, zaščitno cepljenje in njeno zdravljenje pa so v dobro posameznikov in vsega človeštva (31).



Slika 5: Zemljevid nekdanje »vojne krajine«, zaščite habsburške monarhije pred črnimi kozami.

V zapisu smo se dotaknili skoraj vseh hujših epidemičnih in pandemičnih boleznih v zgodovini človeštva in prav je, da omenimo še aids. Nova bolezen, ki so jo z retrospektivnimi analizami bioloških vzorcev umrlih za neznanimi vzroki dokazali že leta 1958 pri nekem angleškem homoseksualnem mornarju, je šele leta 1981 dobila svoje ime, povzročitelja in pojasnjeni način širjenja. Povzročata jo dva podobna človeška virusa imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV), eden med njimi se je v Afriki prenesel na človeka iz živalskega sveta, najverjetneje z opic zelenih mačk (32). Povzročitelj aida, ki se je iz Afrike razširil na Haiti, nato pa okoli leta 1969 v ZDA in preostanek sveta, ima danes v Afriki tudi do 25% okuženost. Po mednarodnih zdravstvenih projekcijah bi aids do leta 2025 lahko pokončal 31 milijonov ljudi v Indiji, 18 milijonov na Kitajskem in kar 75–80 milijonov v Afriki (33).

Živalski rezervoar okužb za človeka je bil in ostaja nevaren, pa naj gre za okužene podganje bolhe, ki prenašajo povzročitelje kuge, z rikecijami, povzročiteljicami pegavega tifusa, okužene uši, različne glodavce, prenašalce mrzlic, za antraks, ki ga prenašajo domače rastlinojede živali, ali bruceloza, ki jo prenašajo številne domače in divje živali. Tudi ptice, prašiči in opice lahko prenašajo različne patogene mikroorganizme, bakterije in predvsem viruse. Proti zoonozam, boleznim, ki se prenašajo z živali na človeka, se zdravstvo od nekdanj zavestno bori. Nevarnostim, da se živalski agens prenese na človeka in postane zanj ne le nevaren, ampak celo smrtonosen, se očitno pri množici znanih načinov genskega spreminjanja, ni lahko izogniti. Pozornost zdravstvene službe mora biti zato usmerjena v budno spremljanje pojavov in njihovo nadziranje, da duh ne uide iz steklenice. Zdi se, da je dandanes preventiva dovolj dobra, da kužni agens ne more uničiti človeštva. Lahko pa je uničujoč za nerazviti svet in socialno šibkejše. Razvito zdravstvo lahko obvladuje bolezni, težava pa ostaja tam, kjer teh služb ni in so zato posledice toliko hujše. Čeprav neki agens napada brez »pedsodkov« vse ljudi, se privilegirana družba temu navadno učinkovito izogne, razvije zaščitna sredstva, cepiva, ki pa spet ne pridejo do vseh – najbolj prizadeti ostajajo najrevnejši sloji prebivalstva.

Epidemije nalezljivih boleznih so v sodobnem času nadomestile epidemije kroničnih nenalezljivih boleznih, kot so bolezni srca in ožilja, rak, poškodbe, duševne bolezni in samomori, bolezni odvisnosti, debelost pa tudi zmanjšana rodnost. Sodobni vzroki nalezljivih boleznih, ki povzročajo klasične epidemije in pandemije, tičijo v mobilnosti svetovnih množic, razmahu turizma in trgovine, rušenju družbenih norm, krizi družinskega življenja, spolni svobodi in še v čem. Zdravstvo pri vsem tem ostaja nemočno brez osveščenih in sodelujočih množic obolelih in potencialnih bolnikov. Gmotni problemi v družbi in zdravstvu predvsem nerazvitega sveta pa lahko ponovno vodijo do širitve epidemij nalezljivih boleznih, ki se danes zdijo obvladljive.

ZAKLJUČEK

Preventivni ukrepi, ki sta jih družba in zdravstvo sprejemala skozi čas proti epidemičnemu širjenju nalezljivih boleznih, odražajo dobo svojega nastanka. Pogojevalo jih je takratno znanje in razumevanje kug. Ukrepi kažejo tudi na racionalne in iracionalne pristope, kot sta jih narekovala prostor in čas. Prepoved družbenja, zapiranje mestnih vrat, poostrena higiena, pokopavanje trupel zunaj naselij in sežiganje kužnih predmetov so le nekateri klasični ukrepi. Šele uvedba karantene v 14. stoletju, predvsem pa odkritje povzročiteljev nalezljivih boleznih in priprava uspešnih cepiv proti njim v 19. in 20. stoletju, so epidemijam pristigla krila. Higieniski, socialnomedicinski in javnozdravstveni ukrepi so skupaj z izobraževanjem in osveščanjem prebivalstva klasične epidemične bolezni potisnili v arzenal zgodovinskega spomina. Pri tem ne pozabimo, da brez ekonomske podpore zapisani ukrepi ne bi bili izvedljivi, saj jih nerazviti svet ne pozna. Ker pa ima vsaka doba svojo kugo, epidemične bolezni niso stvar preteklosti. Novi časi prinašajo nove bolezni, nove izzive za mednarodne zdravstvene organizacije in družbo kot celoto. Primer pandemije nove gripe iz leta 2009, ki pa na srečo ni šla v katastrofalne razsežnosti kot pred 90 leti španska gripa, kaže, kako epidemične bolezni tudi danes ogrožajo mednarodno skupnost. Zaradi izjemne mobilnosti človeštva terjajo epidemične bolezni toliko večjo pozornost.

ZAHVALA

Za pomoč se zahvaljujeva prof. dr. Milanu Čižmanu in prof. dr. Alenki Radšel Medvešček.

LITERATURA

1. Cartwright FF, Biddiss M. Disease & History. Phoenix Mill: Sutton Publishing Limited; 2004. p. 5–24.
2. Winslow CE. The conquest of epidemic diseases. Princeton, NJ: Princeton University Press; 1943.
3. Avery H. Plague churches, monuments and memorials. Proc R Soc Med. 1966; 59 (2): 115.
4. Moe JB, et al. Plaque assay for Ebola virus. J Clin Microbiol. 1981; 13 (4): 791–3.
5. Heinsohn G, Steiger O. Uničenje modrih žensk. Ljubljana: Študentska organizacija; 1993. p. 157.
6. Grmek MD. Karantena. In: Medicinska enciklopedija. Vol. 3. Zagreb: JLZ; 1968. p. 593.
7. Glesinger L. Povijest medicine. Zagreb: Školska knjiga; 1978. p. 145.
8. Plenčič MA. Marci Antonii Plenciz, medici Vindobonensis Opera medico physica, in quatuor tractatus digesta, quorum primus contagii morborum ideam novam una cum additamento de lue bovina, anno 1761. epidemice grassante sistit. Secundus de variolis, tertius de scarlatina, quartus de terræ motu, sed præcipue illo horribili agit, qui prima novbris anno 1755. Europam, Africam, et Americam conquassabat. Vindobonæ: typis, Joannis Thomæ Trattner; 1762.
9. Plenčič MA. O bolezenskem kontagiju: nova ideja. Zupanič Slavec Z, ed. Ljubljana: Inštitut za zgodovino medicine Medicinske fakultete, Slovensko mikrobiološko društvo; 1998.
10. Zupanič Slavec Z. Marko Anton Plenciz (1705–1786) und die neue Theorie vom Contagium = Marko Anton Plenciz (1705–1786) and the new theory of contagium. Wien Klin Wochenschr. 2001; 113 (13–14): 543–8.
11. Prescott W. Osvojitev Mehike. Ljubljana: Cankarjeva založba; 1954.
12. Powell MC, Cook DC. The myth of syphilis: the natural history of treponematosi in North America. Gainesville: University Press of Florida; 2005.
13. Vozelj M. Zgodovina sifilisa. Proteus. 1974; 37 (2): 72–6.
14. Cartwright FF, Biddiss M. Disease & History. Phoenix Mill: Sutton Publishing Limited; 2004. p. 47–71.
15. Zupanič Slavec Z. Endemski sifilis – škrļjevska bolezen na Slovenskem: razvoj in širjenje boleznij po naših krajih v prvi polovici 19. stoletja. Ljubljana: Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2001. p. 141.
16. Zupanič Slavec Z. Morbus Škerļjevo – an unknown disease among Slovenians in the first half of the 19th century. Wien Klin Wochenschr. 1996; 108 (23): 764–70.
17. Snow J. Cholera – Seven Pandemics. UCLA Department of Epidemiology [internet]. 2006 [citirano 2009 Sep 25]. Dosegljivo na: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/114078/cholera/253250/Seven-pandemics>
18. Jenner E. Jenner i vakcinacija velikih boginj. Thaller L, ed. Beograd, Zagreb: Medicinska knjiga; 1949. p. 196.
19. Zupanič Slavec Z, Toplak C. »Choose a lesser of two evils« Vinzenz Kern (1760–1829) and the introduction of vaccination in the Slovenian territories of the Habsburg monarchy – on the 200th anniversary of Jenner's discovery of the small-pox vaccination. Wien Klin Wochenschr. 1998; 110 (13–14): 502.
20. Kern V. Nauk od kose stavljenja Vinzenza Kern, doktorja ranoželenja, uda sdravilske shole na Duneji, zasarskiga uzenika ronoželnstva v' Lublani. Lublana: natisnen per Joa. Fridr. Egerju na Polanah; 1799. p. 16.
21. Zupanič Slavec Z. Dr. Janez Bleiweis – zdravstveni prosvetitelj. Isis. 2009; 18 (5): 72–6.
22. Borisov P. Zdravstvenovrstvene listine in epidemije osepnic na nekdanjem Kranjskem. Zdrav Vestn. 1968; 37 (11): 424.
23. Likar M. Cepiva danes in jutri. Ljubljana: Arkadija; 2004.
24. Piškur Kosmač D. Cepljenje. In: Enciklopedija Slovenije. Vol. 2. Ljubljana: Mladinska knjiga; 1988. p. 34.
25. Maurois A. Fleming – življenje – življenje in delo. Maribor: Založba Obzorja Maribor; 1969. p. 11.
26. Zupanič Slavec Z. Razvoj javnega zdravstva na Slovenskem med prvo in drugo svetovno vojno. Dr. Ivo Pirc (1891–1967) utemeljitelj javnega zdravstva na Slovenskem. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2005. p. 56–8.
27. Likar M. Usoda nalezljivih boleznij. Ljubljana: Državna založba Slovenije; 1981. p. 89.
28. Likar M. Klinična virologija za medicince. Ljubljana: Medicinska univerza Edvarda Kardelja; 1987. p. 21.
29. Taubenberger JK. The Origin and Virulence of the 1918 »Spanish« Influenza Virus. Proc Am Phil Soc. 2006; 150 (1): 86–112.
30. Barry JM. The great Influenza, the epic story of the deadliest plaque in history. New York: Viking; 2004.

31. Gradiva in obvestila za strokovno javnost glede pandemske gripe [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2009 [citirano 2010 Feb 12]. Dosegljivo na: <http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=1782>
32. Grmek MD. Povijest side: počeci, širenje i uzroci jedne epidemijske bolesti naših dana. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1996. p. 56.
33. AIDS in Africa: three scenarios to 2025. Ženeva: UNAIDS; 2005. p. 193.

Prispelo 8. 6. 2012

Saša Štupar¹

Starejši gospod z motnjami mikcije

V ambulantno pride 67-letni gospod. Zadnjih pet mesecev opaža, da mora urinirati čedalje pogosteje, podnevi na približno vsako uro. Enkrat do dvakrat na noč se zbudi zaradi siljenja na vodo. Pacient opisuje, da občuti napenjanje in potrebo po nujnem odvajanju, nato pa težko začne urinirati. Tok urina je počasen, šibek in intermitenten. Pogosto ima občutek, da se mehur ni popolnoma izpraznil. Zanika bolečino in pekoč občutek, ne poroča o prisotnosti krvi v urinu, tudi sprememb v barvi in vonju urina ne zaznava. Ni sladkorni bolnik in ne opaža povečane žeje. V času od pojava simptomov ni imel povišane temperature, diareje, slabosti in ni bruhal. Med digitalnim rektalnim pregledom tipljemo povečano prostato, ki pa je gladka, čvrsta, elastična in brez tipnih vozličev ali zatrdlin. Drugih posebnosti v statusu ne najdemo.

Vprašanja

1. Na katero bolezen bi pomislili ob opisanih težavah?
2. Na katere diferencialne diagnoze bi pomislili?
3. Kakšne nadaljnje preiskave bi naredili?
4. Pri pacientu potrdite vašo delovno diagnozo. Kakšne so možnosti zdravljenja?

Pravilni odgovori so na naslednji strani.

¹ Saša Štupar, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; sasha.stupar@gmail.com

Odgovori

1. Na benigno hiperplazijo prostate.
2. Na rak prostate, rak mehurja, poškodbo mehurja, kronično medenično bolečino, vnetje mehurja, vnetje prostate in zožitve sečnice zaradi drugih vzrokov.
3. Analizo urina (da izključimo okužbe sečil in hematurijo), merjenje serumskega kreatinina (ocena ledvične funkcije), merjenje serumskega prostatičnega antigena (zaradi suma na karcinom prostate), rektalni ultrazvok (ocena velikosti), biopsijo prostate (za histopatološke preiskave pri sumu na karcinom), meritve pretoka urina, uretroskopijo (ocena prehodnosti sečnice, pomembno za izbiro zdravljenja).
4. V primeru blagih simptomov ne uvedemo posebne terapije, pacienta spremljamo. Pacientu lahko predpišemo zaviralce receptorjev alfa ali zaviralce 5-alfa reduktaze. Pri hujših primerih je zdravljenje lahko kirurško, z uporabo klasičnih metod (transuretralna resekcija prostate, transuretralna incizija prostate, prostatektomija) ali z minimalno invazivnimi posegi (laserska terapija, transuretralna igelna ablacija prostate, intrauretralni stenti, transuretralna razširitev prostate z balonom).

Sara Mugerli¹

Dismenoreja in dispareunija pri mladi ženski

V ginekološko ambulantno pride 28-letna bolnica, ki pravi, do so menstruacije v zadnjem času postale bistveno bolj boleče. Bolečina jo včasih popolnoma onemogoči, nesteroidni antirevmatiki je ne ublažijo. Med spolnim odnosom jo večkrat boli v mali medenici. Omeni, da jo pogosto boli križ, ob usmerjenem izpraševanju pove tudi, da je odvajanje blata običajno boleče. V statusu razen difuzne občutljivosti pri bimanualnem pregledu ni nobenih posebnosti.

Vprašanja

1. Kaj bi bila vaša delovna diagnoza?
2. Kaj še pride diferencialno diagnostično v poštev?
3. Ali pričakujete kakšne posebne spremembe v laboratorijskih izvidih?
4. S katero preiskovalno metodo bi delovno diagnozo zanesljivo potrdili?
5. Kakšne so možnosti zdravljenja pri tej bolnici?

Pravilni odgovori so na naslednji strani.

¹ Sara Mugerli, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; sara.mugerli@gmail.com

Odgovori

1. Endometrioza.
2. Adenomioza, medenična vnetna bolezen (angl. pelvic inflammatory disease), leiomiomi, funkcionalne ciste ali novotvorbe jajčnikov, tudi kronično vnetje slepiča in divertikulitis.
3. Lahko bi bil povišan serumski označevalec CA-125.
Opomba: Omenjeni označevalec ni zelo občutljiv in specifičen. Pri bolnicah z blago ali zmerno obliko endometrioze je velikokrat v mejah normale, prav tako pa je lahko povišan pri številnih drugih bolezenskih stanjih. Primernejši je za spremljanje uspeha zdravljenja kot v diagnostične namene.
4. Zlati standard za dokaz endometrioze je diagnostična laparoskopija.
5. Zdravljenje je lahko konzervativno, bodisi s kombiniranimi oralnimi kontraceptivi, analogi progesterona, antagonisti gonadotropin sproščujočega hormona (angl. gonadotropin releasing hormone, GnRH) ali danazolom, sintetičnim androgenom. Endometriotične lezije pa se lahko odstrani tudi kirurško, običajno laparoskopsko med posegom, ki je bil opravljen v diagnostične namene (glej vpr. št. 4).

Miha Oražem¹

33. mednarodni simpozij intenzivne in urgentne medicine

Med 19. in 22. marcem je Bruselj gostil že 33. mednarodni simpozij intenzivne in urgentne medicine, bolje poznan pod kratico ISICEM (angl. *International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine*). Gre za enega največjih tovrstnih srečanj, saj se ga vsako leto udeleži skoraj 6.000 zdravnikov, medicinskih sester in predstavnikov drugih strok, povezanih z intenzivno medicino. V štirih dneh se zvrsti več kot 200 predavateljev, predsednik simpozija pa je profesor Jean Luis Vincent, dobro poznano ime na področju intenzivne medicine, tudi glavni urednik strokovne revije *Critical Care*. Program poteka istočasno na devetih lokacijah kongresnega centra Square v središču Bruslja in raznolikost ponudbe udeležencu simpozija že skoraj otežuje izbiro najprivlačnejšega naslova predavanja.

Izbrane teme prinašajo pregled novosti in zadnjih raziskav v intenzivni medicini v obliki 15-minutnih predavanj, okroglih miz, *pro et contra* debat ali daljših predstavitev. Obravnavane so bile tako »klasične teme«, med drugim mehanska ventilacija, kardiopulmonalno oživljanje, vprašanje nadomeščanja tekočin, biomarkerji v intenzivni medicini, okužbe z večkratno odpornimi mikroorganizmi, sedacija in analgezija, kot tudi nekateri osnovni fiziološki koncepti – npr. mehanizmi odpovedi ledvic in molekularni mehanizmi večorganske odpovedi. Poleg omenjenega pa so bili posebej izpostavljeni različni vidiki organizacije enot za intenzivno terapijo, intenzivna medicina v posebnih okoliščinah, vpliv

na bolnikove svojce in vprašanja, povezana z omejitvijo zdravljenja.

Vsako leto poteka tudi predstavitev posterjev, letos pa so bili prvič predstavljeni na zaslonih na dotik, ki so dostopni vse štiri dni srečanja. Že prvi večer so avtorji ob dvajsetih zaslonih ostalim udeležencem zelo na kratko predstavili svojo temo, strokovna žirija pa je nato nagradila tri izmed preko 500 izbranih posterjev.

V razstavnem prostoru kongresnega centra so se predstavljali proizvajalci medicinske opreme in nekateri med njimi so z organizacijo enournih satelitnih simpozijev na izbrano temo popestrili dogajanje v času kosila ali ob koncu dneva. Veliko zanimanja je npr. požela predstavitev razvoja monitorjev, ki grafično prikazujejo bolnikove življenjske funkcije in kliniku omogočijo še hitrejšo postavitev diagnoze ter bodo v naslednjih letih verjetno postali stalnica v večini enot za intenzivno medicino.

Neposredno pred začetkom uradnega dela srečanja so bili udeležencem ob dodatni registraciji na voljo tečaji mehanske ventilacije, ehokardiografije in hemodinamskega monitoringa, med samim simpozijem pa še nekaj družabno obarvanih srečanj. Vseh zanimivosti in pomembnih novosti preprosto ni mogoče vključiti v kratko poročilo, zato vsem, ki vas področje še posebej privlači svetujem obisk spletne strani <http://m.intensive.org>, kjer lahko najdete mnogo informacij o tem odličnem simpoziju.

¹ Miha Oražem, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

Larisa Kragelj¹

Otorinolarinološki dan 2013

V soboto, 9. 3. 2013, je v veliki predavalnici Medicinske fakultete potekal peti Otorinolarinološki dan. To srečanje je bilo namenjeno zdravnikom družinske medicine, pediatrom in vsem ostalim, ki se srečujejo z razreševanjem »otorinolarinoloških dilem v ambulantni na osnovni ravni« (del v narekovajih je tudi naslov letošnjega srečanja).

Predavanja so sledila vsem subspecialnostim, ki jih zajema otorinolarinologija. Tako smo lahko poslušali zanimiva predavanja s področja otologije, avdiologije, rinologije, foniatrije in laringo-faringologije. Posebno mesto so zajemale tudi motnje dihanja med spanjem, ki so bile predstavljene tako s stališča otrok kot odraslih bolnikov.

Prisluhnili smo lahko še dvema satelitskima simpozijema z naslovoma Akutni rinitis

in rinosinuzitis pri otrocih in Poznavanje raka glave in vratu.

Predavatelji so po vsakem predavanju oz. sklopu odgovarjali tudi na vprašanja iz publike, pri čemer smo lahko dobili odgovore na čisto konkretne težave, s katerimi se zdravniki soočajo pri vsakodnevni obravnavi bolnikov.

Menim, da si srečanje zasluži posebno pohvalo tudi zaradi tega, ker organizatorji znajo prisluhniti svojim poslušalcem: teme predavanj so namreč izbrane na podlagi mnenj in želja občinstva kongresa prejšnjega leta.

Pohvale veljajo tudi prof. Žargiju kot moderatorju srečanja, saj so se predavanja tudi po njegovi zaslugi odvijala po predvidenem časovnem razporedu, brez daljših prekoračitev – slednje pa je na slovenskih srečanjih in kongresih bolj izjema kot pravilo.

¹ Larisa Kragelj, dr. med., Urgentni kirurški blok, Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana; larisa.kragelj@gmail.com

Matic Gornik¹

Predstavitev delavnic *Advanced Life Support*, 30. 3.–5. 4. 2013

Projekt urgentna medicina poteka že trinajsto leto pod okriljem Društva študentov medicine Slovenije. Nastal je zaradi nezadostne pokritosti področja urgentne medicine v študijskem programu, saj so bili študentje mnenja, da niso dovolj pripravljene za nudenje nujne medicinske pomoči. Projekt je zato začel izvajati aktivnosti na tem področju: sprva samo delavnice dodatnih postopkov oživljanja (angl. *advanced life support*, ALS), v zadnjem času pa izvajamo tudi delavnice urgentnega ultrazvoka in študentske kongrese, kjer obravnavamo zanimive teme s področja urgentne medicine.

Delavnice ALS so stalna aktivnost projekta. Urnik smo z leti spreminjali, pred dvema letoma pa smo v sodelovanju s Katedro za ane-

steziologijo in reanimatologijo sestavili urnik po smernicah Evropskega sveta za reanimacijo (angl. *European Resuscitation Council*, ERC), po katerem delavnice potekajo še danes.

Za delavnice ALS med študenti že od samega začetka vlada veliko zanimanje. V preteklosti je o udeležbi na delavnicah odločal samo čas prijave, število mest pa je bilo zaradi lažjega učenja večšin v manjših skupinah omejeno na 20 udeležencev. Zadnja tri leta pa smo za vstop na delavnice uvedli vstopni kolokvij. Prvim 40 prijavljenim pošljemo gradivo, študentje doma to gradivo preštudirajo in nato pišejo kolokvij. Najboljših 20 ima pravico do udeležbe na delavnicah. Kolokvij je bil med udeleženci dobro sprejet, velika večina ga je v zaključni anketi pohvalila.



Slika 1. Gasilska reševalna služba na delu.

¹ Matic Gornik, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; maticgornik@gmail.com



Slika 2. Udeleženci tečaja.

Navedli so, da jim je znanje, ki so ga pridobili, pomagalo, ker so tako lažje in bolj učinkovito sodelovali pri delavnicah.

Delavnice so potekale štiri dni. Prvi dan smo udeležence peljali na ekskurzijo v Kranj, kjer nam je dr. Mitja Mohor predstavil organizacijo sistema nujne medicinske pomoči (NMP) v Sloveniji ter organizacijo helikopterske nujne medicinske pomoči (HNMP). Sledila so predavanja gasilcev in reševalcev ter praktičen prikaz pristopa gasilca do vozila, ki je bilo udeleženo v prometni nesreči (slika 1). Za konec smo se odpeljali na letališče Brnik; dr. Eva Pogačar nam je predstavila svoje delo v HNMP, pilot pa policijski helikopter, ki je namenjen prevozu bolnikov.

Drugi dan delavnic je potekal na Medicinski fakulteti. Uvodno predavanje dr. Marka Žličarja o temeljnih postopkih oživljanja z uporabo avtomatskega defibrilatorja (angl. *automated external defibrillator*, AED) so udeleženci nadgradili s praktičnimi delavnicami, pri katerih so nam pomagali člani projekta Za življenje. Po kratkem odmoru je sledilo predavanje dr. Primoža Gradiška o ABCDE pristopu in nato uporaba znanja v simulacijah, ki smo jih izvedli v simulacijskem centru. Udeležence smo razdelili v dve skupini, ki sta nato vsa-

ka na svoji lutki vadili pristop ABCDE do bolnika.

Tretji dan delavnic smo začeli z zelo zanimivim predavanjem dr. Riharda Knaflja, ki nam je predstavil motnje srčnega ritma in *advanced cardiovascular life support* (ACLS). Sledile so praktične delavnice. Razdeljeni v štiri skupine smo se menjavali na štirih različnih postajah: intravensko in intraosnalno pot sta študentom predstavila Damjana Hojak in Jože Šimenko, delavnico o defibrilaciji je vodil dr. Žličar, delavnico o intubaciji dr. Peter Poredoš, delavnico o alternativnih dihalnih pripomočkih pa dr. Lea Andjelkovič.

Zadnji dan delavnic je bil za mnoge študente še posebej zanimiv. Začeli smo s predavanjem dr. Gregorja Poglajna o diferencialni diagnozi prsne bolečine. Po predavanju in kratkem odmoru smo udeležence razdelili v dve skupini. Prva je odšla v simulacijski center, kjer so na lutki vadili različne scenarije, druga skupina pa je odšla v prostor za simulacijsko medicino, kjer so s pomočjo programa MicroSIM preizkusili znanje, ki so ga pridobili v delavnicah.

Po končanem uradnem delu smo študente povabili v srednjo predavalnico, kjer smo jim razdelili ankete. Njihove predloge in želje

nameravamo upoštevati pri organizaciji naslednjih delavnic. Izkazalo se je, da so bili študentje s potekom in organizacijo delavnic izredno zadovoljni. Prav tako so bili zadovoljni z izbiro mentorjev in delom celotne organizacijske ekipe.

Na teh delavnicah sem bil prvič vodja projekta. Skupaj z mentorji smo bili mnenja, da je bila to ena boljših skupin študentov in je organizacijski ekipi projekta dala dodatno motivacijo za nadaljnje delo (slika 2).

Grega Kragelj¹

Kako do dobre ideje z naglavno lučko – delovni vikend Medicinskih razgledov

Upgrade, always upgrade. S to pozitivno naravnano miselnostjo smo se pred leti v Medicinskih razgledih ponovno odločili za organizacijo delovnega vikenda, kjer smo imeli priložnost za poglobljeno tehnično ali vsebinsko urejanje člankov, kresanje mnenj in izmenjavo izkušenj. Za letošnjo temo smo izbrali oblikovanje in dokončno dodelavo navodil za tehnično urejanje člankov, ki so nastajala z združenimi močmi (in znanji) zdajšnjih in nekdanjih urednikov. Nova navodila so bila več kot potrebna, kajti od zadnje posodobitve do danes se je nabralo toliko ugotovitev in zakonitosti, da si vsega enostavno ni bilo več moč zapomniti. Ali ste vedeli, da obstaja za celo stran pravil, kako pravilno napisati enačbo v besedilu?

Pogovorili smo se o celotnem poteku urejanja članka, od avtorjeve oddaje prispevka pa do končnega izdelka. Kako naj izgleda razlaga kratice? Ali je neobhodno potrebno zamenjati tujke z domačimi ustreznici? Ta in podobna vprašanja so urednikov kruh vsakdanji. Koliko izmenjanih elektronskih sporočil, pregledanih besedil in nenazadnje, trdega dela, je bilo po-

trebnega, da smo tam, kjer smo. Ampak, kot je pred približno letom dni rekel nekdanji glavni urednik Bogdan Vidmar, v Medicinskih razgledih to najbrž počnemo iz čiste dobrote.

Gostoljubna vasica Gorenje, ki je nekje na pol poti med Zrečami in Roglo, je za dva dni postala naš dom. Delovni vikend, ampak s pridihom dopusta, nekje pod pohorskiimi gozdovi. Če nam je ne bi zagodel dež, bi imeli še fotografijo s člani uredništva na travnikih, prekritih z rumenimi regratovimi cvetovi. Pa nič, smo še toliko resneje poprijeli za delo.

Upam, da z revijo napredujemo. Uredništvo sestavljamo izključno študenti medicine in dentalne medicine, ki svoje delo opravljamo prostovoljno. Glede na nam znane podatke smo edina strokovna revija v Evropi, katere uredništvo sestavljajo izključno študenti. Včasih reviji kaj dodamo, izpilimo, poskusimo izboljšati. Drugič se bolj posvetimo prilogi, kot so bile lanskoletne laboratorijske vrednosti. Prav nikoli se pa še ni zgodilo, da bi nam bilo dolgčas. Čeprav je za novo idejo včasih potrebna naglavna lučka, ker se tista žarnica za idejo kar noče in noče prižgati ...

¹ Grega Kragelj, štud. med., uredništvo Medicinskih razgledov, Medicinska fakulteta, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; grega.kragelj@medrazgl.si

**TUKAJ PRIDE ŠE
MEMORIAL!!!
2 STRANI**

Zvišana koncentracija glukoze povezana z večjo pogostnostjo zapletov v obdobju ob operaciji

Annals of Surgery, januar 2013

Zvišana koncentracija glukoze v krvi je povezana z večjo pogostnostjo zapletov v obdobju ob operaciji pri bolnikih z ali brez sladkorne bolezni, je zapisano v poročilu, ki ga je skupina raziskovalcev z University of Washington v Seattlu (ZDA) objavila v januarški številki revije *Annals of Surgery* (*Ann Surg.* 2013; 257: 8–14). Skupina je proučila podatke, zbrane v okviru programa za izboljšanje kakovosti kirurške oskrbe, zbrane v letih 2005–2010 v 47 bolnišnicah iz ameriške zvezne države Washington. V statistični analizi je ovrednotila vpliv zvišanja koncentracije glukoze v krvi na vsaj 10,0 mmol/l in zdravljenja z inzulinom na umrljivost, pogostnost ponovnega posega in pogostnost okužbe pri 11.633 bolnikih (povprečna starost $55,4 \pm 15,3$ let, 65,7 % žensk), ki so jim opravili načrtovano operacijo debelega črevesa ali danke ali bariatrično operacijo.

Zvišano koncentracijo glukoze so vsaj ob eni meritvi, opravljeni en dan pred operaci-

jo, na dan operacije ter en in dva dni po njej, ugotovili pri 29,1 % bolnikov. Statistični izračuni, opravljeni z upoštevanjem medsebojnega prepleta številnih dejavnikov, so pokazali, da je bila zvišana koncentracija glukoze statistično pomenljivo povezana z večjo pogostnostjo okužbe (razmerje obetov 2,0; 95 % razpon zaupanja 1,63–2,44), večjo pogostnostjo ponovnega posega (1,8; 1,41–2,3) in večjo umrljivostjo (2,71; 1,72–4,28). Tveganje za zaplete je bilo povečano tako pri bolnikih z, kot pri bolnikih brez sladkorne bolezni. Dodatne analize so pokazale, da je bila pri bolnikih, ki so zaradi zvišane koncentracije glukoze na dan operacije prejeli inzulin, pojavnost zapletov številsko večja kot pri bolnikih s koncentracijo glukoze v mejah normalnih vrednosti, vendar razlika ni imela statističnega pomena, in razkrile obratno sorazmerje med učinkovitostjo uravnavanja presnove glukoze z inzulinom in opazovanimi izidi.

Zdravljenje s statinom poveča pogostnost bolečine v mišicah

Circulation, januar 2013

Splošno prepričanje je, da zdravljenje s statini poveča pogostnost bolečine v mišicah, čeprav kontrolirane klinične raziskave tega doslej niso potrdile. Cilj randomizirane raziskave STOMP (angl. *Effect of Statins on Skeletal Muscle Function and Performance*), ki so jo opravili v treh središčih v ZDA, je bil zato ovrednotiti pogostnost z zdravljenjem s statini povezanih mišičnih simptomov ter uči-

nek zdravljenja na mišično moč in telesno zmogljivost pri preiskovancih, ki so prejeli 80 mg atorvastatina. Poročilo o rezultatih raziskave je bilo objavljeno v januarški številki revije *Circulation* (*Circulation.* 2013; 127: 96–103).

Raziskava je v štirih letih zajela 420 zdravih preiskovancev iz treh starostnih skupin (20–39 let, 40–54 let, 55 let in več), ki poprej

nikoli niso prejeli statinov. Po naključnostnem izboru so jih razporedili v skupini, ki sta šest mesecev (oziroma do pojava bolečine v mišicah) dvojno zaslepljeno prejeli bodisi 80 mg atorvastatina, bodisi placebo, ter s pregledi dvakrat mesečno sledili pojav mišičnih simptomov. Meritve mišične moči in telesne zmogljivosti ter laboratorijske preiskave so opravili pred začetkom in po zaključku zdravljenja.

V šestih mesecih zdravljenja ni prišlo do zvišanja ravni mišične kreatinske kinaze za desetkratnik zgornje meje normalnih vrednosti pri nobenem preiskovancu, ki je prejel atorvastatin, povprečna raven kreatinske kinaze pa je bila pri preiskovancih, ki so prejeli to zdravilo, za povprečno $20,8 \pm 141,1$ večja kot pri preiskovancih, ki so prejeli placebo. Zdravljenje z atorvastatinom v šestih mesecih v povprečju ni bilo povezano s statistično pomenljivo spremembo telesne zmogljivosti ali mišične moči po nobenem merilu (moč oprijema dominantne roke, izometrična in izokinetična moč upogiba in iztega komolca in kolena itd.), o novem pojavu nepojasnjene bolečine v mišicah pa je poročalo pomenljivo več preiskovancev, ki so prejeli atorvastatin (19 proti 10; $p = 0,05$). Preisko-

vanci, ki so prejeli atorvastatin, so tožili pretežno o bolečinah in krčih v mišicah spodnjih udov (upogibalke kolka, štiriglava stegenska mišica, mišice meč), pritožbe preiskovancev, ki so prejeli placebo, pa so bile manj usmerjene (utrujenost celega telesa, poslabšanje bolečine na mestu prejšnjih poškodb, krči v stopalu).

Raziskovalci so v zaključku poudarili, da gre najverjetneje za prvo randomizirano raziskavo z dvojno zaslepitvijo, ki je vrednotila učinek zdravljenja z velikim odmerkom statina na mišice. Rezultati so po eni strani potrdili varnost zdravljenja s tem odmerkom, saj v šestih mesecih ni vplivalo na mišično moč ali telesno zmogljivost, po drugi strani pa so potrdili prepričanje, da je zdravljenje s statini povezano z večjo pogostostjo bolečine v mišicah. Zvišanje ravni kreatinske kinaze ob zdravljenju z atorvastatinom po mnenju raziskovalcev skupaj z nekaterimi drugimi ugotovitvami kliče po nadaljnjih raziskavah, v katerih bi vpliv zdravljenja s statinom na mišice vrednotili v še daljšem časovnem obdobju tako pri zdravih posameznikih kot pri posameznikih s potrjeno bolečino v mišicah, povezano z zdravljenjem s statinom.

Razdeljevanje naloksona odvisnikom stroškovno učinkovit pristop k preprečevanju smrti zaradi prekomernega odmerka opioidnega mamila

Annals of Internal Medicine, januar 2013

Smrt zaradi prekomernega odmerka prepovedanega opioidnega mamila je eden najpogostejših vzrokov nezgodne smrti v ZDA in v razvitem svetu. Mnenje, da bi lahko ta dogodek preprečili z razdeljevanjem nalok-

sona odvisnikom, ki bi ga ti uporabili v primeru, da so priča grozeči smrti zaradi prekomernega odmerka, je utrdila matematična analiza, katere rezultate so v januarški številki revije *Annals of Internal Medicine* (Ann

Intern Med. 2013; 158: 1–9) objavili raziskovalci iz dveh ameriških akademskih središč.

Raziskovalci so z Markovovim modelom ovrednotili stroškovno učinkovitost razdeljevanja naloksona po več različnih scenarijih, ki so vključevali 21-letnega novega odvisnika od heroína in izkušenejši odvisniki od tega mamila. Izračunali so, da bi s tako razdeljenim naloksonom lahko preprečili 6 % smrti zaradi prekomernega odmerka oziroma da bi eno smrt preprečili z vsakimi 227 razdeljenimi kompleti za odmerjanje naloksona (95 % razpon zaupanja 71–716). Razdeljevanje naloksona je po teh izračunih povečalo

stroške za 53 ameriških dolarjev in pridobilo dodatnih 0,119 QALY (angl. *quality-adjusted life-year*) ob količniku povečane stroškovne učinkovitosti (angl. *incremental cost-effectiveness ratio*, ICER) 438 ameriških dolarjev. Raziskovalci, ki so se pri izračunih opirali na rezultate (razmeroma maloštevilnih) randomiziranih kontroliranih raziskav, so poudarili, da je bilo razdeljevanje naloksona stroškovno učinkovito v analizah vseh scenarijev, tudi v scenariju najslabšega primera, po katerem je prekomeren odmerek vpričo drugih odvisnikov redek dogodek, nalokson pa ob njem redko uporabljen.

Razstavljanje tobačnih izdelkov ob blagajni mladostnike pomembno spodbuja k nakupu

Pediatrics, januar 2013

Številne raziskave so pokazale, da izpostavljenost oglasom za tobačne izdelke v maloprodajnih trgovinah spodbuja mladostnike k pričetku kajenja. Raziskovalci iz več središč v Durhamu (ZDA) so zasnovali raziskavo, v kateri so z uporabo tehnologije navidezne resničnosti preučili, kako na mladostnike vpliva izpostavljenost tobačnim izdelkom in oglasom zanje ob blagajniškem pultu. Vanjo je bilo vključenih 1.216 naključno izbranih mladostnikov, starih 13–17 let (približno 60 % 16–17 let), od katerih jih je 39,5 % kadilo, preostalih 60,5 % nekadilcev pa je bilo glede na odgovore na vprašanja o možnosti, da bodo v prihodnosti pokadili vsaj eno cigareto, nagajenih h kajenju.

Preiskovance so po metodi naključnega izbora razporedili v skupine, ki so v 3-D virtualni trgovini opravile navidezni nakup, ob tem pa so bile izpostavljene enemu od šestih možnih scenarijev v razponu od tobačnih

izdelkov in oglasov na vidnem mestu ob blagajni do tobačnih izdelkov v zaprti omari brez oglasov. Preiskovancem so naročili, naj kupijo en prigrizek s prodajne police v trgovini, eno pijačo iz hladilnika ter po izbiri dva izdelka s polic ob blagajni, za katera jih niso posebej opozorili, da smeta biti tudi tobačna. Poskus nakupa tobačnega izdelka je bil zabeležen, virtualni prodajalec pa ga je zavrnil.

Rezultati so pokazali, da je bil delež preiskovancev, ki so opazili, da so naprodaj tudi tobačni izdelki, največji v skupini, ki je nakupovala v trgovini, v kateri so bili tobačni izdelki razstavljeni na policah ob blagajni (85,2 %), najmanjši pa v skupini, ki je nakupovala v trgovini, v kateri so bili tobačni izdelki ob blagajni v zaprti omari brez vidnih oglasov in logotipov (32,0 %). Tobalni izdelek je poskusilo kupiti 24,3 % oziroma 16,4 % preiskovancev, ki so kupovali v trgovini z razstavljenimi tobačnimi izdelki z oziroma brez oglasov, in

9,0% oziroma 10,8% preiskovancev, ki so kupovali v trgovini s tobačnimi izdelki v zaprti omari z oziroma brez oglasov.

Raziskovalci so mnenja, da so rezultati v prid pobudam o prepovedi razstavljanja tobačnih izdelkov ob blagajni, saj je bil to v tej raziskavi najučinkovitejši ukrep, ki je zmanjšal verjetnost, da bodo mladostniki poskusili kupiti tobačni izdelek. Prisotnost oglasov za tobačne izdelke na motivacijo za nakup ni

imela bistvenega vpliva. V nadaljnjih raziskavah, so poudarili raziskovalci, pa bodo z uporabo iste tehnologije skušali ugotoviti, ali bi lahko z namestitvijo protikadilskih sporočil ob blagajni učinek tam razstavljenih tobačnih izdelkov zmanjšali.

Poročilo o raziskavi je bilo objavljeno v januarški številki revije *Pediatrics* (*Pediatrics*. 2013; 131: e88–95).

Uporaba selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina v nosečnosti ni povezana z večjo umrljivostjo novorojenčkov

The Journal of the American Medical Association, januar 2013

Depresija je v nosečnosti razmeroma pogosta. Uporabo selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina (angl. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI) pri teh nosečnicah so v dosedanjih raziskavah povezali z večjo pogostnostjo prirojenih nepravilnosti, odtegnitvenega sindroma in pljučne hipertenzije pri novorojenčku, manj pa je znanega o povezavi med temi zdravili in obporodno umrljivostjo novorojenčkov. Izsledki raziskave, ki je zajela skoraj 30.000 s SSRI zdravljenih nosečnic iz Skandinavije, niso pokazali, da bi zdravljenje nosečnic s temi zdravili povečalo umrljivost novorojenčkov. Odločitev o uporabi teh zdravil pri nosečnici z depresijo tako po mnenju raziskovalcev iz bolnišnice Karolinska Institutet v Stockholmu (Švedska) in drugih skandinavskih središč temelji na uravnoteženju tveganja drugih škodljivih učinkov in ogroženosti nosečnice zaradi duševne bolezni. Poročilo o raziskavi je bilo objavljeno v prvi januarški številki revije *The Journal of the American Medical Association* (*JAMA*. 2013; 309: 48–54).

Raziskovalci so preučili podatke, prospektivno zbrane v različnih obdobjih v letih 1996–2007 iz zdravstvenih registrov na Danskem, Finskem, Švedskem, Norveškem in na Islandiji. V analizo so zajeli podatke za 1.633.877 porodov po enoplodni nosečnosti, med katero je bil vsaj enkrat izdan recept za SSRI 29.228 nosečnicam (1,79%). Statistična analiza, v kateri so izločili medsebojne vplive številnih dejavnikov (npr. teža duševne bolezni, starost nosečnice ali kajenje), je pokazala, da izpostavljenost SSRI ni bila povezana s statistično pomenljivim povečanjem mrtvorodenosti (razmerje obovetov 1,17; 95% razpon zaupanja 0,96–1,41), neonatalne umrljivosti (1,23; 0,96–1,57) in poneonatalne umrljivosti (1,34; 0,97–1,86). Analiza, v kateri so nosečnice razslojili glede na poprejšnje zdravljenje v bolnišnici zaradi duševne bolezni, je povezavo med izpostavljenostjo SSRI v nosečnosti in temi izidi še dodatno oslabila.

Konzervativen pristop k odločanju za transfuzijo povezan z boljšim preživetjem po akutni krvavitvi iz zgornjih prebavil

The New England Journal of Medicine, januar 2013

Akutna krvavitev iz zgornjih prebavil je pogosta indikacija za transfuzijo krvi oziroma rdečih krvničk. Ta ukrep rešuje življenje pri bolnikih, ki jim zaradi obilne krvavitve grozi izkrvavitev, pri bolnikih z manjšo krvavitvijo pa je njegova uporaba protislovnna, saj so nekatere raziskave pokazale, da utegne biti transfuzija pri bolnikih s hipovolemično anemijo škodljiva. Španski raziskovalci iz bolnišnice Hospital de la Santa Creu i Sant Pau v Barceloni so odgovore o koristih transfuzije pri bolnikih s krvavitvijo iz zgornjih prebavil iskali v randomizirani kontrolirani raziskavi, v kateri so primerjali konzervativen in liberalen pristop k uporabi tega ukrepa.

V omenjeni bolnišnici so v letih 2003–2009 v raziskavo vključili 921 odraslih bolnikov, ki so zaradi krvavitve iz zgornjih prebavil (hematemeza oziroma kri v aspiratu želodca, melena ali oboje) potrebovali bolnišnično zdravljenje. Vir krvavitve je bila pri 49 % bolnikov peptična razjeda želodca, pri 21 % bolnikov pa varice v požiralniku; 31 % bolnikov je imelo cirozo jeter. Bolnike so po metodi naključnega izbora razporedili v skupino, v kateri so se za transfuzijo rdečih krvničk odločali konzervativno (transfuzija ob padcu koncentracije hemoglobina v krvi na manj kot

70 g/l), in v skupino, v kateri so se za transfuzijo odločali liberalno (transfuzija ob padcu koncentracije hemoglobina v krvi na manj kot 90 g/l). Glavni opazovani dogodek je bila smrt zaradi katerega koli vzroka v prvih 45 dneh sledenja.

Transfuzijo je dejansko prejelo 49 % bolnikov, obravnavanih konzervativno, in 85 % bolnikov, obravnavanih liberalno, so raziskovalci poročali v prispevku, objavljenem v januarški številki revije *The New England Journal of Medicine* (N Engl J Med. 2013; 368: 11–21). V 45 dneh je zaradi katerega koli vzroka umrlo 5 % bolnikov iz skupine s konzervativno in 9 % bolnikov iz skupine z liberalno obravnavo (razmerje tveganj za smrt 0,55; 95 % razpon zaupanja 0,33–0,92), čeprav je bila povprečna poraba $1,5 \pm 2,3$ enot oziroma $3,7 \pm 3,8$ enot krvi. V skupini z liberalno obravnavo so zabeležili večjo pojavnost ponovne krvavitve (16 % proti 10 %) in večjo skupno pogostnost zapletov (48 % proti 40 %). Konzervativen pristop k odločitvi za transfuzijo je najbolj koristil bolnikom s cirozo jeter v razredih Child-Pugh A in B, pri bolnikih s krvavitvijo iz peptične razjede in bolnikih s cirozo jeter v razredu Child-Pugh C pa je bil statistično enakovreden liberalnemu.

Nizka koncentracija magnezija povezana z večjim nagnjenjem k fibrilaciji preddvorov

Circulation, januar 2013

Nizko koncentracijo magnezija v serumu so v eksperimentalnih raziskavah povezali s patogenezo motenj srčnega ritma, klinične razi-

skave pa so pokazale, da je povezana z večjo pojavnostjo fibrilacije preddvorov po operaciji srca. Raziskovalci iz več središč v ZDA so

v januarški številki revije *Circulation* (Circulation. 2013; 127: 33–8) predstavili poročilo o izsledkih analize, v kateri so ovrednotili povezavo med koncentracijo magnezija v serumu in pojavom fibrilacije preddvorov med prebivalstvom z uporabo podatkov, zbranih v več kot dveh desetletjih sledenja v raziskavi Framingham Offspring Study.

Analiza je zajela podatke za 3.530 preiskovancev, ki so jim v okviru omenjene raziskave v letih 1979–1983 opravili redni zdravniški pregled z merjenjem serumske koncentracije magnezija in takrat niso imeli klinično očitne srčno-žilne bolezni, vključno s fibrilacijo preddvorov. Preiskovanci so bili ob vstopu v raziskavo stari povprečno približno 44 let, deleža moških in žensk sta bila približno enaka. Povprečna serumska koncentracija magnezija je bila pri moških 0,77 mmol/l (razpon 0,58–0,98 mmol/l), pri ženskah pa 0,76 mmol/l (razpon 0,47–1,01 mmol/l).

V povprečno 18,6 ± 3,7 letih sledenja so fibrilacijo preddvorov na novo odkrili pri 228 preiskovancih, njena za starost in spol specifična pojavnost je bila 9,4 primera na 1.000 oseba let (95 % razpon zaupanja 6,7–11,9 primera na 1.000 oseba let) v četrtini preiskovancev z najmanjšimi (manj kot 0,73 mmol/l) in 6,3 primera na 1.000 oseba let (95 % razpon zaupanja 4,1–8,4 primera na 1.000 oseba let) v četrtini preiskovancev z največjimi (več kot 0,82 mmol/l) izhodiščnimi vrednostmi serumske koncentracije magnezija. Statistična analiza je potrdila, da je bila pojavnost fibrilacije preddvorov pri preiskovancih iz četrtine z najmanjšimi vrednostmi za približno 50 % in statistično pomenljivo večja kot pri ostalih preiskovancih (razmerje tveganj 1,52; 95 % razpon zaupanja 1,00–2,31). Rezultati niso bili bistveno drugačni, če so iz analize izvzeli preiskovance, ki so prejeli diuretik.

Kombinacija midazolama in protipsihotičnega zdravila zagotavlja učinkovitejšo sedacijo ob akutnem nemiru

Annals of Emergency Medicine, januar 2013

Bolnike, ki so med obravnavo zaradi nujnega stanja zelo nemirni, ob neuspehu nefarmakoloških ukrepov pogosto skušajo pomiriti z odmerkom benzodiazepina, protipsihotičnega zdravila ali obojega. Dokazi o primerjalni učinkovitosti posameznih zdravil so pičili, zato je skupina avstralskih raziskovalcev v randomizirani raziskavi z dvojno zaslepitvijo primerjala učinkovitosti in varnosti sedacije z midazolamom in kombinacijo midazolama in droperidola ali olanzapina.

V obdobju od avgusta 2009 do marca 2011 so v raziskavo v vključili 336 odraslih bolni-

kov, obravnavanih na treh oddelkih za nujno zdravniško pomoč, pri katerih je bila zaradi hudega nemira potrebna pomiritev z intravenskim odmerkom zdravila. Bolniki so po naključnostnem izboru prejeli odmerek 5 mg droperidola, 5 mg olanzapina ali placebo (fiziološka raztopina soli), takoj zatem pa še odmerke 2,5–5 mg midazolama, dokler ni prišlo do ustrezne sedacije. Med skupinami ni bilo pomenljivih razlik v izhodiščnih značilnostih.

Rezultati so pokazali, da je bil srednji čas do sedacije pri bolnikih, ki so prejeli droperidol in midazolam, za štiri minute krajši (95 %

razpon zaupanja 1–6 minut), pri bolnikih, ki so prejeli olanzapin in midazolam, pa za pet minut krajši (95 % razpon zaupanja 1–6 minut) kot pri bolnikih, ki so prejeli placebo in midazolam. Razlika je bila v obeh primerih statistično pomenljivo v prid kombinacije dveh aktivnih zdravil, saj je bila verjetnost, da bodo bolniki v 60 minutah po prvem odmerku mirni, ob zdravljenju z droperidolom in midazolamom oziroma zdravljenju z olanzapinom in midazolamom 1,61-krat večja (95 % razpon zaupanja 1,23–2,11) oziroma 1,66-krat večja (95 % razpon zaupanja 1,27–2,17) kot ob

zdravljenju s placebom in midazolamom. Srednji odmerek midazolama, ki je bil potreben za sedacijo, je bil v skupini, ki je prejela placebo, za 5 mg večji kot v skupinah, ki sta prejeli droperidol oziroma olanzapin. Bolniki, ki so prejeli kombinacijo dveh aktivnih zdravil, so manj pogosto potrebovali dodatne ukrepe za pomiritev. Pogostnost neželenih učinkov je bila v vseh treh skupinah podobna.

Poročilo o raziskavi je bilo objavljeno v januarjski številki revije *Annals of Emergency Medicine* (*Ann Emerg Med.* 2013; 61: 72–81).

Jemanje vitamina D ne zavre napredovanja artroze kolena

The Journal of the American Medical Association, januar 2013

Artroza kolena je vse večji javnozdravstveni problem, vendar zanjo ni na voljo zdravila, ki bi vplivalo na naravni potek bolezni. Raziskovalci iz bolnišnice Tufts Medical Center v Bostonu in drugih središč v ZDA so zato v klinični raziskavi z naključnostno razporeditvijo bolnikov preučili pomen nekaterih poročil, da naj bi vitamin D zavrl napredovanje strukturnih okvar sklepov. Poročilo o ugotovitvah je v januarjski številki objavila revija *The Journal of the American Medical Association* (*JAMA.* 2013; 309: 155–62).

V omenjeni bolnišnici so v obdobju od marca 2006 do junija 2009 v raziskavo vključili 146 bolnikov s simptomatsko artrozo kolena. Bolniki so bili večinoma belopolti, njihova povprečna starost je bila $62,4 \pm 8,5$ let, približno 60 % je bilo žensk. Po metodi naključnega izbora so jih razporedili v skupino, ki je dve leti prejela oralni odmerek hloekalci-ferola vsaj 2.000 IE dnevno, in v skupino, ki

je prejela placebo. Zdravljenje je bilo dvojno zaslepljeno, njegov učinek pa so vrednotili z vprašalnikom WOMAC in slikanjem kolena z magnetno resonanco (za oceno izgube sklepne hrustanca).

Raziskavo je po protokolu zaključilo 85 % bolnikov. Serumsko koncentracija 25-OH vitamina D se je v skupini, ki je prejela aktivni pripravek, zvišala za povprečno 40,18 nmol/l, v skupini, ki je prejela placebo, pa za povprečno 5,24 nmol/l. Izhodiščni oceni stopnje bolečine v kolenu in funkcionalnosti sklepa po vprašalniku WOMAC sta bili v skupini, ki je prejela aktivni pripravek, slabši kot v skupini, ki je prejela placebo; do zaključka zdravljenja sta se v obeh skupinah izboljšali, vendar razlika med aktivnim pripravkom in placebom ni imela ne statističnega ne kliničnega pomena. Prostornina sklepne hrustanca se je med zdravljenjem v obeh skupinah zmanjšala za povprečno nekaj več kot 4 %.

Abirateron podaljša preživetje bolnikov z zasevnim rakom prostate

The New England Journal of Medicine, januar 2013

Abirateron je prvo zdravilo iz novega razreda zaviralcev citokroma P-450c17, ključnega encima v sintezi androgenov v modih in zunaj gonad. Dosedanje raziskave so pokazale, da zdravljenje s tem zdravilom v kombinaciji z majhnim odmerkom prednizona izboljša preživetje pri bolnikih z zasevnim rakom prostate, pri katerih ni bilo odziva na kastracijo. V januarski številki revije *The New England Journal of Medicine* (N Engl J Med. 2013; 138–48) pa so bili objavljeni novi obetavni izsledki kliničnega raziskovanja zdravljenja s tem zdravilom. Mednarodna skupina raziskovalcev je predstavila rezultate randomizirane raziskave zdravljenja z abirateronom in prednizonom pri bolnikih z napredujočim zasevnim rakom prostate, neodzivnim na kastracijo, ki poprej niso bili zdravljeni z drugimi zdravili.

Od aprila 2009 do junija 2010 so v raziskavo vključili skupaj 1.088 bolnikov, ki niso imeli klinično pomembnih simptomov raka, in jih naključnostno razporedili v skupini, ki sta poleg prednizona (5 mg dvakrat dnevno) prejemale še abirateron acetat (1.000 mg) ali placebo v enem dnevnem odmerku. Učinek zdravljenja so spremljali s slikovno diagnostiko (računalniška tomografija ali magnetnoresonančno slikanje in scintigrafija kosti) ter merjenjem ravni za prostato specifičnega antigena sprva vsakih 8 tednov, nato pa vsakih 12 tednov.

Raziskavo so prekinili po drugi načrtovani vmesni analizi po srednjem času sledenja 22,2 meseca, ko so zabeležili skupaj 43 % vseh pričakovanih primerov smrti. Srednje preživetje brez radiografskega napredovanja bolezni je bilo 16,5 mesecev v skupini, ki je prejemale abirateron, in 8,3 mesece v skupini, ki je prejemale placebo, in je bilo prepričljivo statistično pomenljivo v prid zdravljenju z abirateronom (razmerje tveganj 0,53; 95 % razpon zaupanja 0,45–0,62). Do prekinitve raziskave je umrlo 27 % bolnikov, ki so prejemale abirateron, in 34 % bolnikov, ki so prejemale placebo. Zdravljenje z abirateronom je tako izboljšalo preživetje za približno 25 % (razmerje tveganj za smrt 0,75; 95 % razpon zaupanja 0,61–0,93; $p=0,01$). Raziskovalci so poudarili, da je bila razlika statistično pomenljivo v prid zdravljenju z abirateronom tudi glede preživetja, vendar zaradi manjšega števila primerov smrti ni dosegla ravni statističnega pomena, ki so jo opredelili v protokolu raziskave ($p=0,001$). Zdravljenje z abirateronom je izboljšalo tudi rezultate po drugih merilih koristi, ob tem pa so v skupini, ki je prejemale abirateron in prednizon, zabeležili večjo pogostnost mineralokortikoidnih škodljivih učinkov stopnje 3 ali 4 in zvišanja ravni jetrnih aminotransferaz.

Zdravljenje s serelaksinom ublaži dispnejo pri bolnikih z akutnim srčnim popuščanjem

Lancet, januar 2013

Relaksin-2 je vazoaktivni peptidni hormon s številnimi biološkimi učinki, kot je hemodinamska prilagoditev ženske na nosečnost s povečanjem vazodilatacije in delovanja ledvic, ki bi bili lahko koristni v zdravljenju bolnikov z akutnim srčnim popuščanjem. Spodbudni rezultati prvih raziskav z rekombinantno različico tega hormona serelaksinom so botrovali večji raziskavi RELAX-AHF (angl. *Relaxin in Acute Heart Failure*), katere cilj je bil ovrednotiti hipotezo, da zdravljenje s serelaksinom ublaži dispnejo pri bolnikih z akutnim srčnim popuščanjem bolj kot zdravljenje s placebom. Poročilo o rezultatih je bilo objavljeno v januarski številki revije Lancet (Lancet. 2013; 381: 29–39), potem ko so bili izsledki strokovni javnosti predstavljeni na Znanstvenem zasedanju American Heart Association novembra 2012 v Los Angelesu.

Raziskava z naključnostno razporeditvijo, dvojno zaslepitvijo in placebo kontrolno skupino je potekala v 96 središčih v 11 državah, vanjo pa je bilo vključenih 1.161 bolnikov, ki so bili največ 16 ur poprej sprejeti v bolnišnico zaradi akutnega srčnega popuščenja z dispnejo v mirovanju ali ob najmanjšem naporu, koncentracijo BNP 350 ng/l ali NT-proBNP 1.400 ng/l in znaki zastoja v pljučih na rentgenskem posnetku prsnega koša. Bolniki, ki so imeli sistolični krvni tlak vsaj 125 mmHg, so pred vključitvijo v raziskavo intravensko prejeli že najmanj 40 mg furose-mida (ali ustrezen odmerek drugega diuretika zanke). Njihova povprečna starost je bila približno 72 let, nekaj več kot 60 % jih je bilo moškega spola, več kot tri četrtine jih je bilo

glede na težo srčnega popuščenja v funkcijskih razredih NYHA II ali III. Po naključnostnem izboru so jih razporedili v skupini, ki sta ob standardnih terapevtskih ukrepah 48 ur prejemale še intravensko infuzijo serelaksina v odmerku 30 µg/kg/dan ali placeba.

Zdravljenje s serelaksinom je statistično pomenljivo izboljšalo oceno stopnje dispneje po vidni analogni lestvici v prvih petih dneh sledenja (oz. natančneje površino pod krivuljo grafa ocene stopnje dispneje v času), ni pa imelo statistično pomenljivega učinka na drugo glavno merilo učinkovitosti, delež bolnikov z zmerno ali znatno dispnejo, ocenjeno z Likertovo lestvico po 24 urah zdravljenja. Med skupinama ni bilo statistično pomenljive razlike v umrljivosti zaradi srčno-žilnih vzrokov, pogostnosti ponovnega sprejema v bolnišnico zaradi srčnega popuščenja ali okvare delovanja ledvic in številu preživetih dni zunaj bolnišnice v prvih 60 dneh sledenja, raziskovalci pa so v prid zdravljenju s serelaksinom izpostavili statistično pomenljivo razliko v umrljivosti zaradi vseh vzrokov v 180 dneh sledenja.

Raziskovalci so zaključili, da je predvsem opaženo zmanjšanje umrljivosti ob zdravljenju s serelaksinom skladno z novjšimi pogledi, po katerih je akutno srčno popuščenje povezano z okvaro več organskih sistemov, ublažitev teh okvar pa ima lahko koristen učinek na preživetje. Rezultati raziskave RELAX-AHF po njihovem prinašajo dokaze o koristi serelaksina pri izbranih bolnikih z akutnim srčnim popuščanjem.

Seznam diplomantov, ki so diplomirali na Medicinski fakulteti od 1. januarja do 31. marca 2013

Diplomanti medicine

Tina Virtič	7. 1. 2013	Katja Prunk	26. 2. 2013
Jernej Strojinc	8. 1. 2013	Dean Koeveš	28. 2. 2013
Katarina Borštnar	8. 1. 2013	Klemen Aleš Pilih	4. 3. 2013
Kristina Hrastar	14. 1. 2013	Dominika Žugelj	4. 3. 2013
Karin Ivančič	15. 1. 2013	Lidija Jovič	5. 3. 2013
Miha Tibaut	21. 1. 2013	Polona Zaletel	5. 3. 2013
Miha Simoniti	22. 1. 2013	Miha Ciringer	6. 3. 2013
Tina Pernuš	28. 1. 2013	Polona Lampič	6. 3. 2013
Romina Sluga	29. 1. 2013	Tanisa Brandner	11. 3. 2013
Petra Strašek	29. 1. 2013	Darja Menard	12. 3. 2013
Iztok Ditz	4. 2. 2013	Ksenija Slavec	12. 3. 2013
Marjeta Puškarič	4. 2. 2013	Pika Mirt	15. 3. 2013
Nika Beton	12. 2. 2013	Bogdan Vidmar	15. 3. 2013
Tea Nizič	12. 2. 2013	Nina Cvek	19. 3. 2013
Denis Paočič	12. 2. 2013	Lara Lozar	19. 3. 2013
Nejc Halas	14. 2. 2013	Andrej Pangerc	19. 3. 2013
Tinka Kuščar	14. 2. 2013	Duša Bošković - Markež	21. 3. 2013
Katja Stopar	18. 2. 2013	Maruša Starc	21. 3. 2013
Nina Freljih	19. 2. 2013	Urška Trček	21. 3. 2013
Anja Sraka	19. 2. 2013	Nina Bešič	22. 3. 2013
Maja Kanič	22. 2. 2013	Zala Mravljak	25. 3. 2013
Teja Budihna	25. 2. 2013	Tina Pogačnik	25. 3. 2013
Anja Praprotnik	25. 2. 2013	Marja Biščak Hafner	25. 3. 2013
Domen Kogler	26. 2. 2013	Jasmina Staroveški	26. 3. 2013
Neža Korošec	26. 2. 2013		

Diplomanti dentalne medicine

Tea Malnar	4. 1. 2013	Anja Lomšek	26. 2. 2013
Matic Koren	7. 1. 2013	Maja Kalister	27. 2. 2013
Ida Košir	14. 1. 2013	Ana Marion	1. 3. 2013
Štefka Gladek	18. 1. 2013	Ivana Muri	5. 3. 2013
Špela Nastran	18. 1. 2013	Maja Šercer	6. 3. 2013
Dunja Selan	22. 1. 2013	Lucija Strmšek	8. 3. 2013
Tjaša Božič	12. 2. 2013	Katja Hleb	14. 3. 2013
Andrej Hudovernik	19. 2. 2013	Boris Sapač	19. 3. 2013
Matej Kurnik	22. 2. 2013	Mojca Zupančič	22. 3. 2013
Hana Amon	25. 2. 2013		

Navodila sodelavcem Medicinskih razgledov

Uredništvo sprejema v obdelavo samo članke, ki še niso bili in ne bodo objavljeni drugje. Dele članka, ki so povzeti po drugi literaturi (predvsem slike in tabele) mora spremljati dovoljenje avtorja in založnika prispevka za reprodukcijo.

Navodila so v skladu z *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. Popolna navodila so objavljena na spletnem naslovu: <http://www.icmje.org/>.

AVTORSTVO

Avtorji morajo izpolnjevati pogoje za avtorstvo. Prispevati morajo k zasnovi in oblikovanju oziroma analizi in interpretaciji podatkov, članek morajo intelektualno zasnovati oziroma ga kritično pregledati, strinjati se morajo s končno verzijo članka. Samo zbiranje podatkov ne zadostuje za avtorstvo.

Prispevku priložite izjavo o avtorstvu in avtorskih pravicah, ki je objavljena na spletni strani revije <http://www.medrazgl.si>. Izjavo morajo lastnoročno podpisati vsi avtorji. Dokler izjave ne prejmemo, prispevka ne bomo uvrstili v uredniški postopek. V sprememnem pismu naj bo naveden odgovorni avtor (s polnim naslovom, telefonsko številko in elektronskim naslovom), ki bo skrbel za komunikacijo z uredništvom in ostalimi avtorji. Kakršnekoli spremembe v avtorstvu članka (po oddaji članka v uredništvo) morajo s podpisom potrditi vsi avtorji prvotno oddanega članka.

ETIČNA NAČELA

Pri prispevkih, ki obravnavajo raziskave na ljudeh, mora biti iz besedila razvidno, da so bile raziskave opravljene v skladu z načeli Helsinško-tokijske deklaracije. Pri prispevkih, ki obravnavajo poskuse na živalih, mora biti iz besedila razvidno, da so bili opravljeni v skladu z etičnimi načeli.

TIPKOPIS

Prispevke pošljite na naslov uredništva: Medicinski razgledi, Korytkova 2, 1000 Ljubljana. Pošljite natisnjeno verzijo prispevka, datoteko prispevka na zgoščenki in originalne sli-

ke. Tipkopis naj bo natisnjen na belem pisarniškem papirju (pisava Times New Roman, velikost črk 12 pt, razmik med vrsticami 1,5, širina robov najmanj 25 mm), obsega naj največ 30 strani. Zgoščenka naj bo označena s priimkom prvega avtorja in imenom prispevka. Prispevke lahko pošljete tudi po elektronski pošti na naslov info@medrazgl.si.

Naslovna stran naj obsega naslov članka v slovenskem in angleškem jeziku. Naslov naj bo kratek in natančen, opisen in ne trdilen (povedi v naslovih niso dopustne). Navedena naj bodo imena piscev z natančnimi akademskimi in strokovnimi naslovi ter popoln naslov ustanove, inštituta ali klinike, kjer je delo nastalo. Avtorji, ki so v objavo poslano raziskovalno delo opravili s pomočjo določenega podjetja, naj le-to tu navedejo.

Izvleček in ključne besede. Druga stran naj obsega izvleček v slovenskem in angleškem jeziku. Izvleček naj obsega 150 do 250 besed. Izvleček raziskovalnega članka naj bo strukturiran (izhodišča, metode, rezultati, zaključki), izvlečki ostalih člankov naj bodo nestrukturirani. V izvlečku naj bo predstavljen osnovni namen članka, vsebinsko naj povzema in ne le našteva bistvene vsebine dela. Izvleček ne sme vsebovati kratic in okrajšav. Avtorji naj navedejo do sedem ključnih besed, ki natančneje opredeljujejo vsebino prispevka.

Struktura članka. Raziskovalni članki naj bodo členjeni na naslednja poglavja: izhodišča, metode, rezultati, razpravljanje in zaključki. Pregledni članki in primeri iz klinične prakse so lahko zasnovani drugače, vendar naj bo razdelitev na poglavja in podpoglavja jasno razvidna.

Tabele naj bodo vstavljene v besedilo članka na mestu, kamor sodijo. Ločeno jih oštevilčite po vrstnem redu, vsaka tabela mora biti navedena v besedilu. Pod tabelo sodi besedilo, ki naj vsebuje kratek naslov, v njem naj bodo pojasnjene tudi vse kratice, okrajšave in nestandardne enote, ki se pojavljajo v tabeli.

Slike morajo biti profesionalno izdelane ali fotografirane. Če so slike priložene v digitalni obliki, naj bodo zadostne kakovosti za tisk. Fotografije iz radioloških posnetkov in diapozitivov naj priskrbi avtor sam. Oddajte originalne slik oziroma fotografije, slik ne skenirajte sami. Črke, številke ali simboli na sliki morajo biti jasni, enotni in dovolj veliki, da so berljivi tudi na pomanjšani sliki. Fotografijam, na katerih se lahko prepozna identiteta bolnika, priložite pisno dovoljenje bolnika.

Na zadnji strani slike naj bo napisana zaporedna številka slike, ime prvega avtorja in naslov članka, v dvomljivih primerih naj bo označeno, kaj je na sliki zgoraj oziroma spodaj. Slike v digitalni obliki naj imajo zaporedno številko slike ter ime prvega avtorja.

Vsaka slika mora biti navedena v besedilu. Besedilo k sliki naj se nahaja v članku na mestu, kjer naj bi slika bila. Vsebuje naj zaporedno številko slike, naslov slike in potrebno razlago vsebine. Slika mora biti razumljiva, tudi brez branja ostalega besedila. Pojasniti morate vse okrajšave s slike.

Merske enote naj bodo v skladu z mednarodnim sistemom enot (SI).

Kratic in okrajšav naj v besedilu ne bo preveč, saj se lahko izgubi preglednost nad njimi. Izjema so mednarodno veljavne oznake merskih enot in splošno uveljavljene okrajšave (npr. DNA, EKG ipd.). V naslovih in izvlečku naj ne bo kratic. Na mestu, kjer se kratica prvič pojavi v besedilu, naj bo le-ta polno izpisana, kratica pa naj bo napisana v oklepaju.

Literatura. Vsako navajanje trditev ali dognanj drugih morate podpreti z referenco. Reference naj bodo v besedilu navedene po vrstnem redu, tako kot se pojavljajo. Referenca naj bo navedena na koncu citirane trditve. Reference v besedilu, slikah in tabelah navedite ležeče v oklepaju z arabskimi številkami. Reference, ki se pojavljajo samo v tabelah ali slikah, naj bodo oštevilčene tako, kot se bodo pojavile v besedilu. Osebni dogovori (lahko je navedeno v besedilu) naj ne bodo navedeni kot reference. Seznam citirane literature naj bo na koncu prispevka. Literaturo citirajte po navodilih, ki so v skladu s tistimi, ki jih uporablja ameriška *National Library of Medi-*

cine v *Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=citmed>). Imena revij krajšajte tako, kot določa *Index Medicus* (popoln seznam je objavljen na spletnem naslovu <http://www.nlm.nih.gov/>).

V citatu navedite vse avtorje. V primeru, da so avtorji več kot trije, navedite le prve tri in pripišite »et al«. Isto velja za navajanje urednikov knjig.

Primeri:

• **članek v reviji:**

Petek Šter M, Švab I. Bolniki s sočasnimi boleznimi v družinski medicini. *Med Razgl.* 2008; 48 (2): 205–11.

Bajuk Studen K, Preželj J, Kocjan T, et al. Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdrav Vestn.* 2009; 78: 129–35.

Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, et al. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005; 62 (1): 112–6.

• **članek v reviji, kjer je avtor organizacija:**

American Diabetes Association. Diabetes update. *Nursing.* 2003; Suppl: 19–20, 24.

• **volumen s suplementom:**

Vesel S. Spremembe na srcu pri Kawasakijski bolezni. *Med Razgl.* 2002; 41 Suppl 2: 139–43.

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 Suppl 2: 275–82.

• **številka s suplementom:**

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol.* 1996; 23 (1 Suppl 2): 89–97.

• **posamezni deli članka (izvlečki, pisma uredništvu ipd.):**

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [izvleček]. *Kidney Int.* 1992; 42: 1285.

Jackson B, Fleming T. A drug is effective if better than a harmless control [pismo uredništvu]. *Nature.* 2005; 434 (7037): 1067.

- **knjiga:**

Ahčan U. Prva pomoč: priročnik s praktičnimi primeri. Ljubljana: Rdeči križ Slovenije; 2007.

Jenkins PF. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005.

Eyre HJ, Lange DP, Morris LB. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; c2002.

Advanced Life Support Group. Acute medical emergencies: the practical approach. London: BMJ Books; 2001.

- **poglavje v knjigi:**

Možina M, Jamšek M, Šarc L, et al. Zastrupitve. In: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. Interna medicina. Ljubljana: Littera picta; 2005. p. 1143–507.

Rojko JL, Hardy WD Jr. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: Sherding RG, ed. The cat: diseases and clinical management. New York: Churchill Livingstone; 1989. p. 229–332.

Kone BC. Metabolic basis of solute transport. In: Brenner BM, Rector FC, eds. Brenner and Rector's the kidney. 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders Elsevier; c2008. p. 130–55.

- **poročila s kongresov:**

Ferreira de Oliveira MJ, ed. Accessibility and quality of health services. Proceedings of the 28th Meeting of the European Working Group on Operational Research Applied to Health Services (ORAHS); 2002 Jul 28–Aug 2; Rio de Janeiro, Brazil. Frankfurt (Germany): Peter Lang; c2004.

10th International Psoriasis Symposium; 2004 Jun 10–13; Toronto, ON. Chicago: Skin Disease Education Foundation; 2004.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, et al. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, eds. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17–22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. p. 437–68.

- **doktorska in magistrska dela, raziskovalne naloge:**

Šabovič M. Mehanizem fiziološkega in farmakološkega raztapljanja krvnih strdkov [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1992.

Liu-Ambrose TY. Studies of fall risk and bone morphology in older women with low bone mass [doktorsko delo]. Vancouver (BC): University of British Columbia; 2004.

Weisbaum LD. Human sexuality of children and adolescents: a comprehensive training guide for social work professionals [magistrsko delo]. Long Beach (CA): California State University, Long Beach; 2005.

- **pravne listine in zakoni:**

Zakon o zdravniški službi 1999. Uradni list RS št. 98/1999.

- **internetna stran:**

AMA: helping doctors help patients [internet]. Chicago: American Medical Association; c1995–2007 [citirano 2007 Feb 22]. Dosegljivo na: <http://www.ama-assn.org/>

- **članek na internetu:**

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [internet]. 2006 [citirano 2007 Jan 5]; 27 (1): 34–7. Dosegljivo na: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>

- **knjiga na internetu:**

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al., eds. Harrison's online [internet]. 16th ed. Columbus (OH): McGraw-Hill Companies; c2006 [citirano 2006 Nov 20]. Dosegljivo na: <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=4>

- **podatkovna baza na internetu:**

Online Archive of American Folk Medicine [internet]. Los Angeles: Regents of the University of California. 1996 [citirano 2007 Feb 1]. Dosegljivo na: <http://www.folkmed.ucla.edu/>

- **članek na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Kauffman CA, Bonilla HF. Trends in antibiotic resistance with emphasis on VRE. FPR [CD-ROM]. 1998; 20 (10).

- **knjiga na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Kacmarek RM. Advanced respiratory care [CD-ROM]. Verzija 3.0. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000.

- **računalniški program na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Meader CR, Pribor HC. DiagnosisPro: the ultimate differential diagnosis assistant [CD-ROM]. Verzija 6.0. Los Angeles: MedTech USA; 2002.

- **neobjavljeni prispevek:**

Laking G, Lord J, Fischer A. The economics of diagnosis. Health Econ. V tisku 2006.

UREDNIŠKO DELO

Uredništvo vsak prispeli članek pregleda. Nato vsebino prispevka oceni strokovni recenzent, ki avtorjem ni znan, prav tako strokovni recenzent ni seznanjen z identiteto avtorjev. Članek da uredništvo v pregled tudi lektorju za slovenski jezik, izvleček v angleškem jeziku pa lektorju za angleški jezik. Avtor na koncu dobi vpogled prve krtačne odtise, vendar na tej stopnji upoštevamo samo popravke tiskarskih napak. Krtačne odtise morate vrniti v treh dneh, sicer menimo, da se s popravki strinjate.

