

Mateja Erdani Kreft¹, Bojan Tršinar²

Morfološko-molekularne značilnosti urotelija in genetske spremembe pri bolnikih z vezikoureteralnim reflukso

Morphological and Molecular Characteristics of Urothelium And Genetic Changes in Patients with Vesicoureteral Reflux

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: vezikoureteral refluks – genetika, urotelij – patologija

Primarni vezikoureteralni refluks (VUR) je ena najpogostejših boleznih sečil pri otrocih. Pri prizadetih osebah se pojavi retrogradni tok seča, to je iz sečnega mehurja v sečevod, in lahko seže tudi do ledvic. Nasproten tok seča olajša pot patogenim bakterijam do ledvic, zato je VUR eden glavnih vzrokov za bakterijske okužbe sečevodov in ledvic. Pravočasno odkrivanje VUR in čim hitrejša zdravljenje okužb sečil lahko pomembno preprečita ali vsaj zmanjšata možnost nastanka ledvičnih sprememb in njihovih posledic. Pričujoči prispevek opisuje morfološke in molekularne značilnosti urotelija pri bolnikih z VUR ter doslej poznane genetske spremembe pri teh bolnikih. Predstavljeni so možni molekularno-genetski vzroki in celično-biološki mehanizmi za nastanek VUR. Sedanje študije stremijo k razvoju neinvazivne metode za diagnosticiranje VUR, ki bi temeljila le na analizi preiskovančeve DNA ali na analizi odluččenih urotelijskih celic.

ABSTRACT

KEY WORDS: vesico-ureteral reflux – genetics, urothelium – pathology

Primary vesicoureteral reflux (VUR) is one of the most common diseases of the urinary tract in children. Such children develop retrograde flow, i.e. backward flow of urine from the urinary bladder to the ureter, which may reach as high as the kidneys. The backward flow of urine facilitates the travel of pathogenic bacteria to the kidneys; therefore VUR is one of the main reasons for bacterial infections of the ureters and kidneys. Timely detection of VUR and quickest possible treatment of urinary tract infections may significantly prevent or at least reduce the possibility of developing renal lesions and their consequences. This paper describes the morphological and molecular characteristics of the urothelium in patients with VUR and the genetic changes in these patients known to date. Possible molecular-genetic causes and cellular-biological mechanisms for the development of VUR are presented. Current studies are aimed at the development of a noninvasive method for the diagnosis of VUR that would be based only on the analysis of the person's DNA or on the analysis of urothelial cells found in urine.

¹ Asist. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Bojan Tršinar, dr. med., Klinični oddelek za urologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1000 Ljubljana.

UVOD

Normalno potuje seč iz votlega sistema ledvic preko sečevodov v sečni mehur. Kadar se pojavi tok seča v nasprotni smeri, to je iz sečnega mehurja nazaj v sečevod (ureter) in v ledvični votli sistem, govorimo o vezikoureteremnem refluksu (VUR).

Refluks seča se lahko pojavlja enostransko (v en sečevod) ali obojestransko (v oba sečevoda). Stopnja VUR se po mednarodni razvrstitvi (1) ocenjuje od najnižje I. stopnje (refluks seča iz sečnega mehurja v sečevod) do najvišje V. stopnje. Pri VUR od II. do V. stopnje zateka seč iz sečnega mehurja vse do ledvičnega meha in ledvičnih čašic (slika 1).

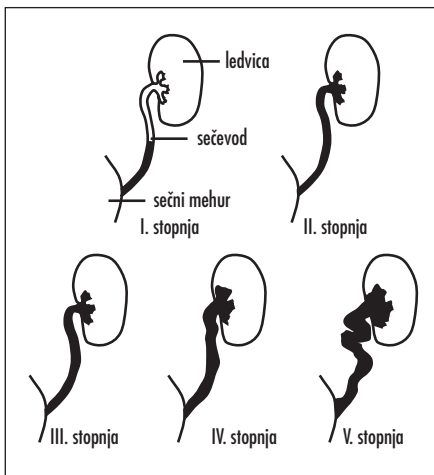
Ločimo primarni in sekundarni VUR. Primarni VUR se pojavi zaradi prirojenih nepravilnosti v stiku med sečnim mehurjem in sečevodom (vezikoureteremnem stiku). Pri normalnem vezikoureteremnem stiku je sečevod prisoten tudi v podsluzničnem delu sečnega mehurja, njegovo ustje pa se odpira v svetli-

no sečnega mehurja. Takšen vezikoureterni stik omogoča prehajanje seča iz sečevoda v sečni mehur in preprečuje tok seča v nasprotni smeri. V primeru, ko je podsluznični del sečevoda prekratek in se ustje sečevoda konča že znotraj stene sečnega mehurja, pa postane vezikoureterni stik nefunkcionalen (slika 2). Takrat je delovanje enosmerne zaklopke na mestu stika sečevoda in mehurja oslabiljeno in dopušča tok seča nazaj v sečevod, ledvični meh in celo do ledvičnih čašic. Natančne anatomske meritve so pokazale, da mora biti razmerje med dolžino podsluzničnega dela sečevoda in premerom sečevoda vsaj 5 : 1, da se prepreči refluks in da lahko ob mikciji (uriniranju) skrčenje sečnega mehurja učinkovito zapre ustje sečevoda in prepreči zatekanje seča nazaj v sečevod (2).

Incidenca primarnega VUR je odvisna od starosti in rase pripadnosti. Pojavlja se v 70 % pri otrocih, starih manj kot 1 leto, v 25 % pri otrocih, starih 2–4 leta, v 15 % pri otrocih, starih 5–12 let, in le v 5 % pri odraslih (4). Razlog, da se VUR pogosteje pojavlja pri mlajših otrocih in pogosto s starostjo izzveni ali se omili, je v tem, da se z leti in rastjo podaljšuje tudi del sečevoda znotraj mehurja in se tako ob uriniranju, ko se sečni mehur skrči, uspešno zapre tudi ustje sečevoda in prepreči refluks seča. VUR in refluksne nefropatije so pogostejše pri belcih. Refluks se pojavlja enako pogosto pri dečkih kot deklicah, a je zaradi krajše sečnice in posledično večje pojavnosti okužb sečil prisotnost refluksnih nefropatij pri deklicah pogostejša.

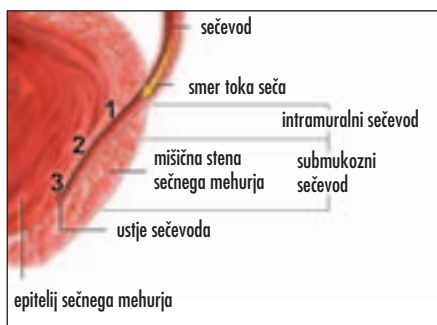
Vzroki za nastanek sekundarnega VUR so nepravilnosti v drugih delih sečil, kot so npr. posteriorna sečnična (uretralna) zaklopka, odtočna motnja znotraj mehurja (prekinitev ali oviranje pretoka seča v sečnem mehurju) ter nevrogeni sečni mehur (3). Te anatomske in funkcionalne motnje povzročajo povišane tlake v sečnem mehurju in posledično zatekanje seča v sečevod ali še višje v ledvice.

VUR je zaradi svoje pojavnosti (incidenca primarnega VUR je ocenjena na 1–2 % vseh živorojenih otrok) tudi ena najpogostejših napak sečil in zato eden glavnih problemov v otroški urologiji. VUR je eden glavnih vzrokov za bakterijske okužbe sečevodov in ledvic. Okužbe sečil v približno 80 % povzroča uropatogeni sev *Echerichie coli* (UPEC) (4). Ti



Slika 1. Stopnje VUR po mednarodni razvrstitvi (1):

I. stopnja – refluks seča (črno obarvanje) v sečevod; **II. stopnja** – refluks seča do ledvičnega meha in ledvičnih čašic, vendar brez razširitev (dilatacije) votlega sistema sečil in brez deformacij ledvičnih čašic; **III. stopnja** – prisotna je blaga do zmerna razširitev votlega sistema sečil, brez deformacij ledvičnih čašic; **IV. stopnja** – prisotna je zmerna razširitev in zavijanje votlega sistema sečil, prisotne so tudi deformacije ledvičnih čašic; **V. stopnja** – izrazita razširitev in zavijanje votlega sistema sečil in močna deformacija ledvičnih čašic, ki lahko povsem izgubijo svojo obliko.



Slika 2. Potek sečevoda v steni sečnega mehurja. Pri bolnikih z VUR je dolžina podsluzničnega dela (submukoznega) sečevoda krajša. Številke prikazujejo možne konce (ustje) sečevoda in vpliv na pojav VUR: 1 – VUR je zelo verjeten; 2 – VUR je možen; 3 – VUR ni verjeten.

bakterijski sevi so odporni na številne obrambne mehanizme sečil, nasproten tok seča pa jim pot do ledvic še olajša. VUR zato pogosto vodi v razvoj akutnega in kroničnega pielonefritisa (vnetje ledvičnega meha in ledvičnega parenhima), povzroča refluksne nefropatije (kliničnopatološke spremembe v ledvičnem parenhimu, kot so npr. brazgotine, v katerih vezivno tkivo zamenja ledvični parenhim), rastno zaostalost ledvic, povišan krvni tlak in v nekaterih primerih tudi odpoved ledvic (2). Povezanost med VUR, okužbami sečil in refleksno nefropatijo je dokazana. Kar 30–50% otrok z okužbo sečil ima tudi primarni VUR (3, 5, 6). Pravočasno odkrivanje VUR in čim hitrejšo zdravljenje uroinfektov lahko pomembno prepreči ledvične brazgotine in njihove posledice ali vsaj zmanjša možnost njihovega nastanka (7). Znano je, da je kar 10–15% bolnikov z VUR kandidatov za dializo in/ali presaditev ledvic. Otroci z VUR imajo pogosto preventivno antibiotično zaščito, redne zdravniške kontrole in po potrebi tudi kirurško zdravljenje bolezn (3).

Preiskave, ki omogočajo odkrivanje VUR, so klasični rentgenski mikcijski cistouretrogram (MCUG), radioizotopni mikcijski cistogram (RIMCG) ali v zadnjem času kontrastno ojačani ultrazvočni mikcijski cistogram (UMCG) (7, 8). Občutljivost vseh treh metod se pomembno izboljša s cikličnim postopkom, pri katerem se polnjenje in praznjenje sečnega mehurja z ustreznim kontrastnim sredstvom dvakrat ali celo večkrat ponovi (9–11). S pojavom nove generacije kontrastnih sred-

stev se pri diagnozi VUR vse bolj uveljavlja UMCG (12). Žal so vse tri metode za preiskovanje neprijetne, prvi dve metodi pa tudi sevalno obremenjujeta preiskovance. Ustrezna neinvazivna metoda za odkrivanje VUR, ki bi temeljila le na analizi preiskovančeve DNA ali na analizi odluščenih epiteljskih celic iz sečil (npr. iz sečnega mehurja), bi imela zato pomembno klinično uporabnost. V prispevku bomo predstavili možne molekularno-genetske vzroke in celično-biološke mehanizme za nastanek VUR ter nekatere morfološke in molekularne značilnosti epitelija sečnega mehurja (urotelija) pri bolnikih z VUR.

MOLEKULARNO-GENETSKI IN CELIČNO-BIOLOŠKI VZROKI ZA VUR

VUR je družinska bolezen, ki jo je mogoče ugotoviti pri 30–45% sorojencev in do 50% otrok, katerih starši imajo tudi VUR (13). Čeprav način dedovanja bolezn (13) še ni povsem jase, je najverjetnejši avtosomno dominantni način dedovanja z zmanjšanim izražanjem (penetranco). Podatkov o možnih genetskih dejavnikih, ki bi bili udeleženi pri nastanku VUR, je malo. Analiza dedovanja VUR je namreč problematična zaradi narave bolezn, saj pogosto izzveni sama od sebe in je zato pridobivanje zanesljivih podatkov o bolezn pri starejših sorodnikih otrok z VUR težavno. Feather in sodelavci (2000) domnevajo, da je VUR poligenska bolezen, pri nastanku katere je neodvisno vpletenih več genov. Le pri eni družini so ugotovili lokus na kromosomu 1 (1p13), ki naj bi bil povezan z nastankom VUR, zaradi česar bi lahko sklepali, da je VUR monogenska bolezen. Vendar so poleg tega našli še 12 lokusov na drugih kromosomih, povezanih z nastankom VUR (14). Rezultati študije so tudi pokazali, da so posamezni lokusi povezani z nastankom VUR samo pri nekaterih družinah ter da nobeden od lokusov ni povezan z nastankom VUR pri vseh analiziranih družinah.

Hipotezo, da pri nastanku in poteku VUR sodeluje več genov, ki najverjetneje uravnavajo embrionalni razvoj sečil in so v primeru okvare sposobni samostojno in neodvisno drug od drugega povzročiti nastanek VUR (15), podpirajo tudi transgenski modelni organizmi

z VUR. Leta 1999 so Nishimura in sodelavci (16) razvili transgensko miš brez gena *Agtr2* (gen za angiotenzin II receptor), leta 2000 Hu in sodelavci (17) transgensko miš brez gena za uroplakin IIIa (UPIIIa) in leta 2004 Kong in sodelavci (18) transgensko miš brez gena za uroplakin II (UPII). Pri vseh treh oblikah transgenskih miši se je razvil VUR, ki spominja na klinično sliko VUR pri človeku. Glede na očiten vpliv genetskih dejavnikov na pojav VUR so bile v zadnjih sedmih letih številne študije usmerjene v odkrivanje možnih mutacij v vseh treh kandidatnih genih (*Agtr2*, UPIIIa, UPII) pri bolnikih z VUR in tudi pri genih za kodiranje proteinov, ki sodelujejo pri znotrajceličnem prenosu sporočil.

Protein G in VUR

Proteini G so posredniki znotrajceličnega prenosa sporočil. Polimorfizem v genu *GNB3*, ki kodira eno od podedenot heterotrimernih proteinov G, je statistično značilno izražen pri bolnikih z VUR (19). Najverjetneje polimorfizem v genu *GNB3* vpliva na izraženost klinične slike VUR. Sprememba v genu *GNB3* namreč lahko vpliva na delovanje najrazličnejših signalnih poti, ki vključujejo receptorje, katerih delovanje je vezano na proteine G. Natančen celično-biološki mehanizem izražanja VUR, v odvisnosti od polimorfizma v genu *GNB3*, zaenkrat še ni poznan (19).

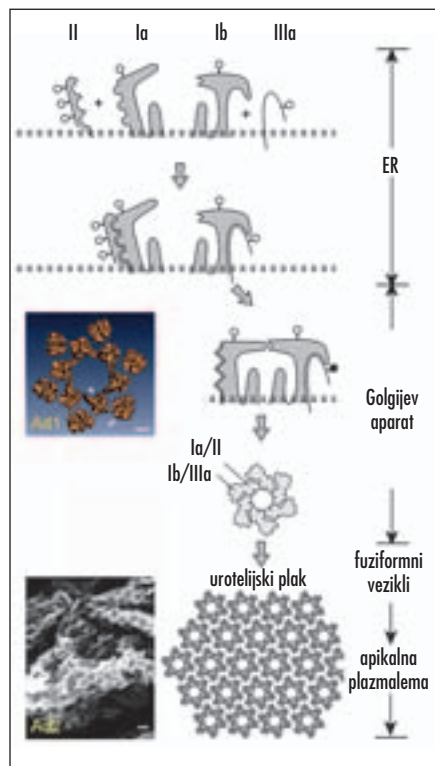
Receptor za angiotenzin II (*Agtr2*) in VUR

Za gen *Agtr2* je znano, da sodeluje pri razvoju sečil, tako da uravnava proces programirane celične smrti odvečnih mezenhimske celice. V primeru, da gen ne deluje, nastanejo nepravilnosti zaradi fizične ovire, ki jo predstavljajo odvečne mezenhimske celice (20). Čeprav so se pri transgenskih miših gena *Agtr2* pojavile številne prirojene spremembe ledvic in sečil, med drugim tudi VUR, dosedanje analize genomske DNA niso odkrile mutacij v genu *Agtr2* pri bolnikih z VUR (21).

Uroplakini (UP) in njihova vloga v sečilih

Uroplakini so skupina štirih integralnih membranskih proteinov (UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa) (slika 3), ki jih sintetizirajo diferen-

cirane celice v uroteliju. Pri sesalcih je urotelij zgrajen iz treh ali več skladov celic. V normalnem uroteliju si od bazalne lamine proti svetlini sečil sledijo nediferencirane bazalne celice, delno diferencirane vmesne celice in v stiku s svetlino in sečem diferencirane površinske celice. Kar 70–90 % apikalne površine urotelija, ki prekriva večino spodnjega dela sečil, to je proksimalno sečnico, sečni mehur, sečevod in ledvični meh, gradijo uroplakini (22). Uroplakini se sintetizirajo v endo-



Slika 3. Model nastanka vseh štirih uroplakinov (UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa) v diferenciranih površinskih urotelijskih celicah. Uroplakini se na membranah ER sintetizirajo in nato povezujejo v heterodimere (UPIa/UPII in UPIb/UPIIIa). Heterodimeri se domnevno v Golgijevem aparatu združujejo v uroplakinske partikle, ki se nato s pomočjo fuziformnih veziklov prenesejo do apikalne plazmalemata, kjer oblikujejo urotelijske plake. Ad1: 16 nm uroplakinski partikel, zgrajen iz šestih heterotetramerov UPIa/UPII (glava puščice) UPIb/UPIIIa (puščica). Merilce 2 nm. Ad2: Z vrstičnim elektronskim mikroskopom slikana močno nagubana apikalna površina površinske urotelijske celice z značilno konkavno obliko urotelijskih plakov. Okrog urotelijskih plakov so mikrogrebeni brez uroplakinov. Urotelijski plak (puščica). Merilce 0,5 μ m.

plazemskem retikulumu (ER), kjer se tudi povezujejo v heterodimere, UPIa se povezuje z UPII in UPIb z UPIIIa. Takšni heterodimeri se v Golgijevem aparatu med seboj povezujejo in šest heterotetramerov UPIa/UPII/UPIb/UPIIIa oblikuje 16 nm velike partikle (slika 3 ad1). Ti partikli se s pomočjo posebnih veziklov (fuziformnih veziklov) prenašajo do plazmaleme urotelijskih celic in se tam z njo tudi zlivajo (23, 24). V apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic uroplakinski partikli oblikujejo odebeljena področja konkavne oblike – urotelijske plake (od tod tudi poimenovanje uroplakinov, ker tvorijo urotelijske plake) (slika 3 ad2) (18, 25). Natančna pot uroplakinov od endoplazemskega retikuluma do Golgijevega aparata in prek fuziformnih veziklov do plazmaleme še ni povsem pojasnjena. Pojasnjeno pa je njihovo osnovno delovanje v uroteliju. Skupaj z dobro razvitimi tesnimi stiki med površinskimi urotelijskimi celicami uroplakini zagotavljajo učinkovito pregrado med sečem in krvjo (krvno-urinsko bariero) (26). Uroplakini so glikoproteini. Njihovi sladkorji so sestavina glikokaliksa na površini urotelija, ki še dodatno preprečuje vdor bakterij iz svetline sečnega mehurja v urotelij. Izjema je uropatogeni sev *E. coli*, ki se lahko s fimbriji tipa 1 veže na UPIa. Tako vezane bakterije se z uriniranjem ne izločijo in v področjih lipidnih raftov (s holesterolem in glikosfingolipidi bogatih mikrodomenah v plazmalemii) vstopijo v urotelijske celice. V urotelijskih celicah v tako imenovani mirujoči stopnji čakajo in so kot rezervoar bakterij za ponavljajoče se okužbe sečil (27).

Uroplakini in VUR

Transgenske miši, ki ne izražajo UPIIIa (–/–UPIIIa) oziroma UPII (–/–UPII), imajo močno povečano prepustnost za vodo in sečnino, zmanjšano število in povprečno velikost urotelijskih plakov in razširjeno ustje sečevodov. Njihove površinske celice so majhne, kar pomeni, da so uroplakini nujni za neprekinjeno zlivanje fuziformnih veziklov z apikalno plazmalemo teh celic, tako med polnjenjem mehurja s sečem kot med razvojem, ko sečni mehur še raste. Poleg VUR se je pri nekaterih miših razvila hidronefroza (razširjenje ledvičnega meha in ledvičnih čašic), renalna disfunkcija (motnja v delovanju ledvic), pri

nekaterih mladičih pa celo odpoved delovanja ledvic in neonatalna smrt (18).

Genetske preiskave vseh štirih genov za uroplakine pri 76 bolnikih s primarnim VUR so odkrile 18 polimorfizmov v uroplakinskih genih (spremenjen je bil po en nukleotid v kodirajočem delu uroplakinskih genov), niso pa bile potrjene delecije ali mutacije v premiku bralnega okvira v teh genih. Večina odkritih polimorfizmov ni bila statistično značilno povezana z VUR. Šibko povezavo z VUR so dokazali le za dva polimorfizma, in sicer v genu za UPIa, kjer je prišlo do zamenjave C v T in zato v proteinu do zamenjave alanina na mestu 7 v valin (Ala7Val), in v genu za UPIIIa, kjer je prišlo do zamenjave C v G in posledično do spremembe prolina na mestu 154 v alanin (Pro154Ala) (15). Slednji polimorfizem je pred kratkim dobil tudi možno razlago za svoj vpliv na nastanek VUR. Jenkins in Woolf (2006) (28) sta s transfekcijo, to je z vnosom DNA za UPIb in UPIIIa v COS-1 celice (celična linija ledvičnih celic), ki normalno ne sintetizirajo uroplakinov, dokazala, da se UPIIIa vgradi v plazmalemo le, če je gen za UPIIIa divjega tipa in je v celicah prisoten tudi UPIb. Ko sta v COS-1 celice vnesla DNA za UPIIIa s polimorfizmom Pro154Ala, se UPIIIa ni pojavil v plazmalemii celic, temveč je ostal znotraj celice (28). Če je torej eden od uroplakinov zaradi polimorfizma v genu spremenjen, je nastajanje uroplakinskih heterotetramerov in nadalje uroplakinskih plakov ovirano. Podobno se verjetno zgodi tudi pri transgenskih miših brez gena za UPIIIa. Pri njih se UPIIIa ne izraža in to je verjetno vzrok za zmanjšano število in velikost urotelijskih plakov ter posledično nastanek VUR.

Ali uroplakini uravnavajo zgodnji embrionalni razvoj sečil in povzročajo deformiranost ledvic (renalne displazije)?

Najnovejše raziskave postavljajo v ospredje še eno vlogo uroplakinov. Domnevno uroplakini niso le ključni elementi krvno-urinske pregrade, temveč tudi uravnavajo zgodnji embrionalni razvoj sečil. Genetske preiskave 17 bolnikov z odpovedjo ledvic zaradi renalne displazije so pokazale, da je kar pri štirih prišlo do *de novo* (pri starševski generaciji ni

bila prisotna) mutacije v genu za UPIIIa (28). Pri dveh, ki sta imela tudi VUR, so odkrili polimorfizem (drugačnosmiselno mutacijo: Pro273Leu) v genu za UPIIIa. Predpostavlja se, da takšna mutacija lahko spremeni konformacijo UPIIIa in zmanjša dostopnost Tyr266 za fosforilacijo. Predvideva se, da bi bila lahko fosforilacija Tyr266 v citoplazmatski domeni UPIIIa ključna za normalen znotrajcelični prenos sporočil (29).

Čeprav natančen mehanizem vpliva mutacij UPIIIa pri ljudeh še ni poznan, se zdi, da mutacije v genih za uroplakine lahko zmotijo normalen razvoj sečil. Po sedaj znanih podatkih, se uroplakini pri ljudeh pojavijo v urogenitalnem sinusu in ledvičnem mehu v 7. tednu embrionalnega razvoja. Nadaljnje imunocitokemične analize zgodnjih embrionalnih stadijev bodo pokazale, če se uroplakini izražajo že prej, npr. v 4. tednu razvoja, ko se iz mezonefričnega izvodila (Wolffov vod) prične brstenje ureternega brstiča (metanefrogen divertikel). Po eni od hipotez je namreč za razvoj primarnega VUR ključno, kje v embrionalnem obdobju iz mezonefričnega izvodila izhaja uretorni brstič (30). Če mesto izhajanja ureternega brstiča iz mezonefričnega izvodila odstopa od normale, to lahko vodi do nastanka refluksa. Za uretorni brstič, ki izhaja iz mezonefričnega izvodila preblizu bodočega sečnega mehurja, obstaja velika verjetnost, da bo razvil prekratek podsluznični del sečevoda, ki bo dopuščal refluks seča.

Če imajo uroplakini v razvoju sečil res vlogo signalnih molekul, ki lahko spremenijo izražanje drugih genov, potem je možno, da vplivajo tudi na morfogenezo gladke mišičnine. Študije *in vitro* so potrdile, da signali iz urotelija vplivajo na rast in diferenciacijo gladke mišičnine (31). Med razvojem ploda pa so miogena krčenja sečevoda ključna za potiskanje seča od razvijajočih ledvic proti sečnemu mehurju. To je še posebej pomembno v zadnjih tednih znotrajmaterničnega razvoja, ko se plod obrne z glavo navzdol. Mutacija v genih za uroplakine bi lahko povzročila nepravilen razvoj gladke mišičnine v sečevodu. V takem primeru bi bil hidrostatski tlak brez krčenj gladke mišične sečevoda nezadosten za premikanje seča proti sečnemu mehurju. Napačen tok seča pa bi lahko povzročil poškodbe v razvijajočih se ledvicah. Nadaljnje raziskave na

živalskih modelih bodo zato usmerjene v proučevanje krčljivosti sečevodov v plodih z izraženimi mutacijami v genih za uroplakine.

Sklepi I

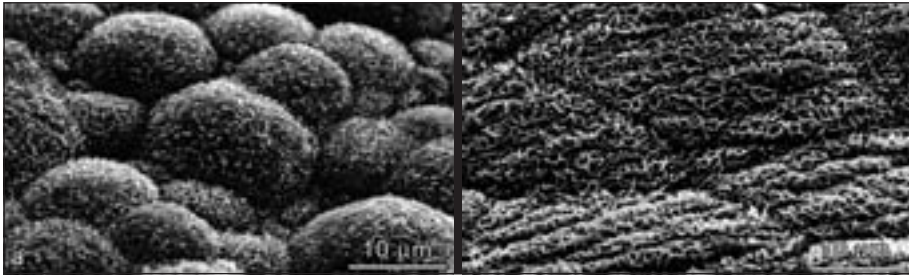
VUR je genetsko zelo heterogena bolezen. Pri njenem nastanku in poteku sodeluje več genov, ki so lahko tudi polimorfni. Različni transgenski modelni organizmi z VUR so v zadnjem desetletju omogočili nov pristop odkrivanja vzrokov za VUR in obenem odprli številna nova vprašanja o molekularno-genetskih vzrokih in celično-bioloških mehanizmi nastanka VUR.

MORFOLOŠKE IN MOLEKULARNE ZNAČILNOSTI UROTELIIJA PRI VUR

Klinična slika VUR pri transgenskih miših brez gena za UPIIIa ($-/-$ UPIIIa) oziroma UPII ($-/-$ UPII) je povezana z določenimi strukturnimi in funkcionalnimi nepravilnostmi v uroteliju (npr. zmanjšano število in povprečna velikost urotelijskih plakov, močno povečana prepustnost za vodo in sečnino ...) (17, 18). Tudi genetske preiskave bolnikov z VUR so odkrile med seboj neodvisne polimorfizme v genu za UPIIIa. Zato se postavlja vprašanje, ali sta izražanje uroplakinov in njihova lokalizacija v uroteliju spremenjeni tudi pri bolnikih z VUR. Do sedaj sta bili narejeni dve študiji, ki sta proučevali stopnjo diferenciacije urotelijskih celic pri bolnikih z VUR (32, 33). Če bi se izkazalo, da je pri bolnikih z VUR izražanje uroplakinov in diferenciacija urotelijskih celic spremenjena, bi to pojasnilo vpliv genetskih sprememb na izražanje VUR pri ljudeh in omogočilo razvoj neinvazivnih testov odkrivanja VUR. Nenormalno diferenciacijo urotelijskih celic bi lahko ugotovili že z morfološko (ultrastrukturno) in imunocitokemično analizo odluščenih površinskih urotelijskih celic iz seča.

Ultrastrukturne značilnosti urotelija pri VUR

Urotelij je pri bolnikih s primarnim VUR (višje stopnje) raznolik (32). Opazna so področja, kjer je urotelij normoplasten in visoko diferenciran, ter področja, kjer je urotelij hiperplasten



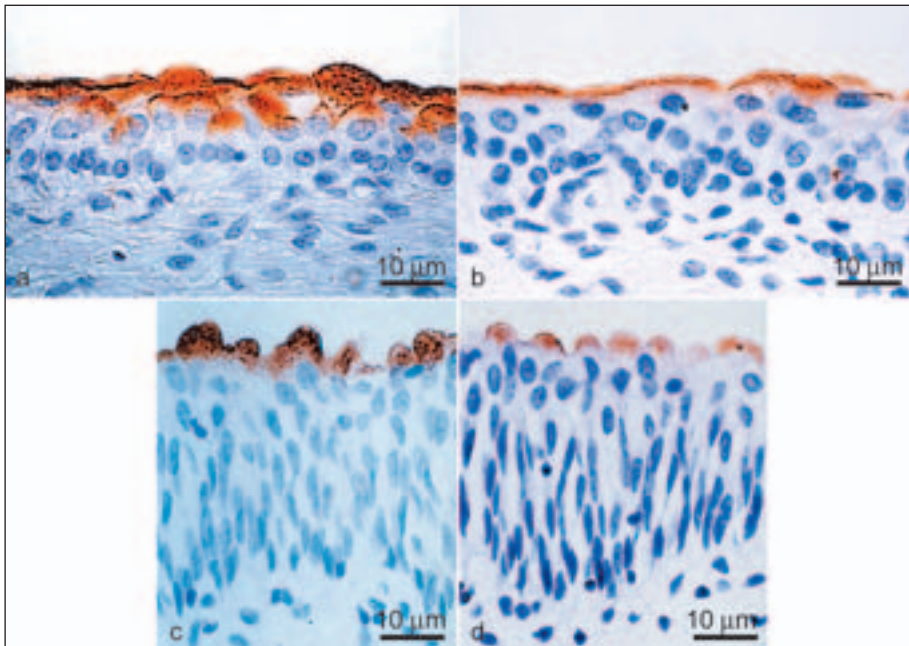
Slika 4. Vrstična elektronska mikroskopija. (a) Površinske urotelijske celice so v hiperplastičnem uroteliju pri VUR majhne in slabo diferencirane. Apikalna površina teh celic je oblikovana v mikrovile. (b) V normoplastnem uroteliju pri VUR so površinske urotelijske celice večje kot pri hiperplastičnem uroteliju in tudi bolj diferencirane, njihova apikalna površina je zaradi urotelijskih plakov značilno nagubana.

in slabo diferenciran. S presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom je bilo dokazano, da imajo visoko diferencirane površinske urotelijske celice na apikalni površini urotelijske plake, slabše diferencirane urotelijske celice v hiperplastičnem uroteliju pa mikrovile (slika 4). V apikalni citoplazmi diferenciranih celic so tudi fuziformni vezikli, ki skrbijo za prenos uroplakinskih partiklov do apikalne

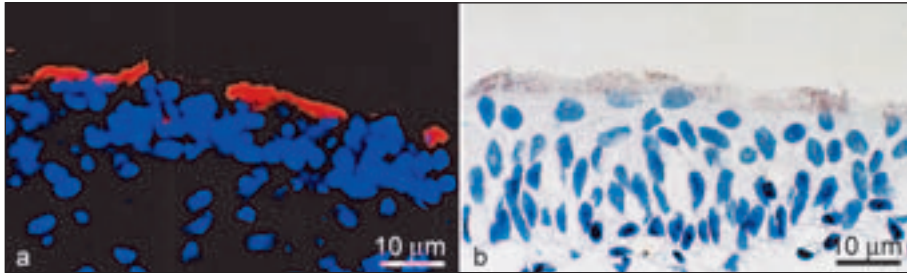
plazmaleme, zelo številni, medtem ko so v apikalni citoplazmi slabše diferenciranih celic fuziformni vezikli redki.

Izražanje in razporeditev uroplakinov v uroteliju bolnikov z VUR

Kljub morfološko različnemu uroteliju pri bolnikih z VUR pa so uroplakini izraženi tako



Slika 5. Imunohistochemsko obarvanje normoplastnega (a in b) in hiperplastičnega urotelija pri VUR (c in d) s protitelesi proti vsem štirim uroplakinom (a in c) in s protitelesi le proti UPIIIa (b in d). Rjavo obarvanje z reagentom 3,3'-diaminobenzidin (DAB) na parafinskih rezinah označuje prisotnost uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah in pri (a) tudi v posameznih vmesnih urotelijskih celicah. Opazna je močnejša imunoreakcija proti vsem štirim uroplakinom, kot tudi samo proti UPIIIa, v normoplastnem uroteliju v primerjavi s hiperplastičnim urotelijem. Jedra celic v uroteliju in spodaj ležeči lamini propriji so modro obarvana.



Slika 6. Pozitivna imunoreakcija proti vsem štirim uroplakinom v uroteliju pri VUR. Rdeče obarvanje s fluorescentnim barvilom TRITC označuje prisotnost uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah na kriorezinah (a). Majhne rjave pike (zrnca zlata) označujejo prisotnost uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah na parafinskih rezinah (b). Jedra celic v uroteliju in spodaj ležeči lamini propriji so modro obarvana.

v področjih z urotelijskimi plaki kot tudi v področjih z mikrovili. Razlika je le v intenziteti imunocitokemijske reakcije (32). Kjer so na površini celice z urotelijskimi plaki, je reakcija močnejša, kjer pa so na površini mikrovili, je reakcija šibkejša (slika 5). Različne tehnike imunooznačevanja so potrdile prisotnost uroplakinov v uroteliju pri bolnikih z VUR (slika 5 in 6). Tudi natančna primerjalna analiza vzorcev urotelija otrok s primarnim VUR z vrsto drugih uroloških motenj in kontrolnimi vzorci ni dokazala statistično značilnih razlik v izražanju uroplakinov. Ugotovljeno je bilo, da se UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa pojavljajo na apikalni površini urotelijskih celic, pri nekaterih vzorcih pa tudi samo v citoplazmi urotelijskih celic (33).

Sklepi II

Pri bolnikih z VUR je urotelij morfološko raznolik. V uroteliju se pojavljajo področja, ki se med seboj razlikujejo tako v številu celičnih skladov kot tudi v stopnji celične diferenciacije. Različna intenziteta izražanja uroplakinov se jasno odraža v oblikovanju apikalne površine urotelijskih celic. Vendar v primerjavi z urotelijem kontrolnih vzorcev brez VUR statistično značilne morfološke razlike kot tudi razlike v izražanju uroplakinov niso bile dokazane. Možnih razlag je več: prvič, da spremembe v uroplakinskih genih niso glavni razlog za nastanek VUR; drugič, da morda mutacija v uroplakinskih genih ne vpliva na sintezo in transport uroplakinov v apikalno plazmalemo, vpliva pa na njihovo delovanje. Ne moremo izključiti, da mutacija v genih za uroplakine povzroči spremenjeno delova-

nje ali celo nedelovanje uroplakinov. V prihodnje bi bilo zato smiselno raziskati, ali lahko točno določene drugačnosmiselne mutacije v genih za uroplakine spremenijo njihovo nalogo pregrade in stopnjo celične diferenciacije v ustreznih modelnih sistemih, kot so npr. urotelijske celice v kulturi. Tretja in na osnovi genetskih raziskav ena zelo verjetnih možnosti pa je, da so večje mutacije v uroplakinskih genih embrionalno ali postnatalno smrtne pri ljudeh in jih zato pri bolnikih z VUR ne najdemo. Znano je, da je tudi pri nekaterih transgenskih miši brez UPIIIa prišlo do odpovedi delovanja ledvic in neonatalne smrti (18). Zaenkrat so rezultati morfološko-molekularne študije urotelijskih celic pri bolnikih z VUR preliminarni in premalo značilni, da bi bila ultrastrukturalna in imunocitokemična analiza odluščenih površinskih urotelijskih celic iz seča že primerna metoda za odkrivanje VUR.

ZAKLJUČEK

V prispevku smo predstavili najnovejše genetske in celično biološke pristope odkrivanja vzrokov za VUR. Rezultati naše študije in drugih avtorjev kažejo, da obstajajo različne podskupine bolnikov z VUR z enako ali zelo podobno klinično sliko. Verjetno pri nastanku in poteku VUR sodeluje več genov, ki najverjetneje uravnavajo embrionalni razvoj sečil in so v primeru okvare sposobni samostojno in neodvisno drug od drugega povzročiti nastanek VUR. Možnih kandidatnih genov je več, med njimi so tudi geni za uroplakine. Dva polimorfizma v genu za UPIIIa sta statistič-

no značilno povezana s pojavom VUR pri otrocih, vendar natančen mehanizem vpliva teh genetskih sprememb na pojav VUR še ni poznan. Začete raziskave dajejo upanje, da bo v prihodnosti odkrivanje VUR in drugih uroloških patologij pri otrocih zgodnejše in manj invazivno.

ZAHVALA

Avtorja se zahvaljujeva prof. dr. Kristijanu Jezerniku za strokovno pomoč in koristne predloge ob pisanju članka.

LITERATURA

1. International Reflux Study Committee. Medical versus surgical treatment of primary vesicoureteral reflux: report of the International Reflux Study Committee. *Pediatrics* 1981; 67: 392-400.
2. Nelson CB, Koo HP. Vesicoureteral reflux. Dosegljivo na: <http://www.emedicine.com/ped/topic2750.htm>.
3. Ramirez-Seijas F, Gugig R, Cepero-Akselrad A, et al. Vesicoureteral reflux in children. *International Pediatrics* 1999; 14 (2): 94-8.
4. Kanellopoulos TA, Salakos C, Spiliopoulou I, et al. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study. *Pediatr Nephrol* 2006; 21 (8): 1131-7.
5. Supavekin S, Kucivilize K, Hunnangkui S, et al. The relation of vesicoureteral reflux and renal scarring in childhood urinary tract infection. *J Med Assoc Thai* 2006; 89 (Suppl 2): S41-7.
6. Smellie J, Edwards D, Hunter N, et al. Vesicoureteral reflux and renal scarring. *Kidney Int* 1975; 8: S65-72.
7. Kenda RB. Imaging techniques for the detection of vesicoureteric reflux: what and when? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 4-7.
8. Kenda RB, Novljan G, Kenig A, et al. Echo-enhanced ultrasound voiding cystography in children: a new approach. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 297-300.
9. Polito C, Moggio G, La Manna A, et al. Cyclic voiding cystourethrography in the diagnosis of occult vesicoureteric reflux. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 39-41.
10. Feticch JJ, Kenda RB. Cyclic direct radionuclide voiding cystography: increasing reliability in detecting vesicoureteral reflux in children. *Pediatr Radiol* 1992; 22: 337-38.
11. Novljan G, Kenig A, Rus R, et al. Cyclic voiding urosonography in detecting vesicoureteral reflux in children. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 992-5.
12. Darge K, Riedmiller H. Current status of vesicoureteral reflux diagnosis. *World J Urol* 2004; 22 (2): 88-95.
13. Noe HN. The long-term results of prospective sibling reflux screening. *J Urol* 1992; 148 (5Pt 2): 1739-42.
14. Feather SA, Malcolm S, Woolf AS, et al. Primary, nonsyndromic vesicoureteric reflux and its nephropathy is genetically heterogeneous, with a locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1420-5.
15. Jiang S, Gitlin J, Deng F-M, et al. Lack of major involvement of human uroplakin genes in vesicoureteral reflux: implication for disease heterogeneity. *Kidney Int.* 2004; 66: 10-9.
16. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, et al. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 1999; 3: 1-10.
17. Hu P, Deng F-M, Liang F-X, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol* 2000; 151 (5): 961-71.
18. Kong X-T, Dend F-M, Hu P, et al. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *J Cell Biol* 2004; 167 (6): 1195-204.
19. Zagradišnik B, Bračić K, Varda NM, et al. G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism in patients with vesico-ureteric reflux. *Ann Genet* 2004; 47 (3): 209-16.
20. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93: 156-60.
21. Hohenfellner K, Hunley TE, Yerkes E, et al. Angiotensin II, type 2 receptor in the development of vesico-ureteric reflux. *BJU Int* 1999; 83 (3): 318-22.
22. Romih R, Korosec P, de Mello W, et al. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res* 2005; 320 (2): 259-68.
23. Hu A C-C, Liang F-X, Zhou G, et al. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 3937-50.
24. Min G, Wang H, Sun T-T, et al. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *J Cell Biol* 2006; 173 (6): 975-83.
25. Hicks RM. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev* 1975; 50: 215-46.
26. Hu P, Meyers S, Liang F-X, et al. Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F1200-7.
27. Zhou G, Mo W-J, Sebbel P, et al. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro Fim H binding. *J Cell Sci* 2001; 114: 4095-103.

28. Jenkins D, Woolf AS. New molecular players in the biology of urinary tract malformations. *Kidney Int* 2007; 71 (3): 195-200.
29. Mahbub Hasan AK, Sato K, Sakakibara K, et al. Uroplakin III, a novel Src substrate in *Xenopus* egg rafts, is a target for sperm protease essential for fertilization. *Dev Biol* 2005; 286: 483-92.
30. Mackie GG, Awang H, Stephens FD. The ureteric orifice: the embryologic key to radiologic status of duplex kidneys. *J Pediatr Surg* 1975; 10: 473-81.
31. Master VA, Wei G, Liu W, et al. Urothelium facilitates the recruitment and trans-differentiation of fibroblasts into smooth muscle in acellular matrix. *J Urol* 2003; 170: 1628-32.
32. Kreft ME, Tršinar B, Jezernik K. Heterogeneous urinary bladder urothelium in patients with primary vesicoureteral reflux. Proceedings of the 7th Multinational Congress on Microscopy, Portorož, Slovenia. 2005 June 26-30: 261-2.
33. Garthwaite MAE, Thomas DFM, Subramaniam R, et al. Urothelial differentiation in vesicoureteric reflux and other urological disorders of childhood: a comparative study. *Eur Urol* 2006; 49: 154-60.

Prispelo 26. 1. 2007

Roman Trobec¹, Marjan Šterk², Said Al Mawed³, Matjaž Veselko⁴

Računalniška simulacija ohlajanja kolena

Computer simulation of knee cooling

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kolenski sklep – kirurgija, kolenske poškodbe, krioterapija, računalniška simulacija

Koleno pogosto ohlajamo po kirurških posegih ali poškodbah na kolenskega sklepu. Nekatere izkušnje kažejo, da znižanje temperature tkiv zmanjša porabo analgetikov in skrajša čas, potreben za okrevanje. Mnenja o primernosti hlajenja tkiv niso soglasna, saj pretirano hlajenje lahko poškoduje vrhnje plasti tkiv. Namen članka je predstaviti računalniški prostorski model kolena, na katerem smo simulirali in raziskali dve različni metodi ohlajanja po kirurškem posegu: lokalno hlajenje s tekočo vodo stalne temperature, ki kroži v hladilni manšeti (angl. *cryo-cuff*), in lokalno hlajenje s paketi ledu (angl. *ice-pack*). Da bi opisali, kako se spreminja temperatura zunanjih in notranjih delov kolena v obdobju ohlajanja, smo sestavili prostorski model kolena z ločljivostjo 1 mm ter uporabili matematični model, ki opisuje prenos toplote skozi različna tkiva v kolenu. Simulacijski program smo zaradi obsežnih izračunov izvedli tudi na vzporednem računalniku, sestavljenem iz 32 procesorjev, da bi na ta način skrajšali simulacijski čas. Dobljeni rezultati so skladni z našimi pričakovanji in se tudi dobro ujemajo z redkimi objavljenimi meritvami temperatur v kolenskem sklepu. Naši rezultati kažejo, da je hlajenje s hladilno manšeto učinkovitejše od hlajenja z ledom. S simulacijo na računalniškem modelu kolena dobljeni rezultati se ujemajo z doslej objavljenimi meritvami. Predstavljeni matematični model in metodo lahko uporabljamo tudi za simulacijo ohlajanja kolena pri različnih drugih poškodbah ali kirurških posegih.

ABSTRACT

KEY WORDS: knee joint – surgery, knee injuries, cryotherapy, computer simulation

Local topical cooling is often applied after surgery or after knee injuries. It is agreed that lowering of knee tissue temperatures reduces the need for medicaments and shortens the rehabilitation period. However, some recent findings put the benefit of topical cooling under question because of possibly injured surface tissue layers. Two different simulations were analyzed: cooling with a liquid at constant temperature circulating in cryo-cuff, and topical cooling with ice-packs. The simulation of both cooling methods with the use of computer programs showed how temperature varies within outer and inner knee tissue layers during the entire cooling period. A three-dimensional computer model of a knee with a spatial resolution of 1 mm was derived and mathematical model used for the heat transfer in knee tissues. Since extensive calculations have been required for the simulation the computer program was implemented on a parallel computer composed of 32 processors to shorten the simulation time.

¹ Doc. dr. Roman Trobec, univ. dipl. ing. elekt., Institut Jožef Stefan, Odsek za komunikacijske sisteme, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija.

² Dr. Marjan Šterk, univ. dipl. ing. rač., Xlab d. o. o., Teslova 30, 1000 Ljubljana, Slovenija.

³ Said Al Mawed, dr. med., Klinični center Ljubljana, Travmatološka klinika, Zaloška 2, 1525 Ljubljana, Slovenija.

⁴ Prof. dr. Matjaž Veselko, dr. med., Klinični center Ljubljana, Travmatološka klinika, Zaloška 2, 1525 Ljubljana, Slovenija.

The obtained simulation results are in accordance with our expectations and similar to rare in-vivo measured temperatures in the knee joint. The cooling with cryo-cuff is more effective than the cooling with ice-pack. The simulation presented are in a good accordance with published measurements. The same model and methods can be applied also for simulation of knee cooling by other knee injuries or surgery.

UVOD

Po kirurških posegih na kolenskem sklepu ali po poškodbah koleno ohlajamo z zavoji ledu ali s hladilno tekočino enakomerne temperature. Znižanje temperature tkiv namreč zmanjša porabo analgetikov in skrajša čas, potreben za okrevanje (1). Obstajajo različni načini in trajanja hlajenja (2). Mnenja o primernosti hlajenja tkiv niso soglasna (3-5). Pretirano hlajenje lahko poškoduje vrhnje plasti tkiv (6). Zanima nas, kaj se dogaja s kolenskimi tkivi med ohlajanjem, kako se temperatura zunanjih in notranjih delov kolena spreminja s časom in načinom ohlajanja. Današnji računalniki so dovolj zmogljivi, da lahko s njimi simuliramo in analiziramo različne postopke ohlajanja (7).

Že dolga leta si z računalniki pomagamo pri reševanju številnih problemov v znanosti. Klinični poskusi v medicini so pogosto težavni, vzamejo veliko časa, rezultati pa dostikrat niso dovolj natančni, ker moramo upoštevati veliko spremenljivk, ki jih često ne moremo nadzorovati (8). Pogosto tudi natančna meritev ni možna, saj bi bila ta preveč invazivna. Tako na primer le težko spremljamo spremembe temperature posameznih delov kolena med ohlajanjem. Z računalniško simulacijo pa lahko relativno enostavno izračunamo in prikazemo spremembe za katerokoli mesto v kolenu (9).

Prikazali bomo praktično uporabo naših raziskav s področja biomedicinskih simulacij. Deli človeškega telesa so nepravilni tridimenzionalni objekti. Predstavimo jih lahko s prostorskim geometričnim modelom. Velik tridimenzionalni model razdelimo na številne majhne delčke, znotraj katerih z uporabo fizikalnih zakonov opišemo zveze med izbranimi spremenljivkami in njihovimi spremembami v času in prostoru v obliki parcialnih diferencialnih enačb. Z rešitvijo teh enačb lahko izračunamo obnašanje celotnega mode-

la (10, 11). Pri opisu predstavimo fizikalno dogajanje z matematičnim modelom. S pomočjo rezultatov matematičnega modela na manjših področjih lahko izračunamo rezultate za katerokoli mesto na modelu.

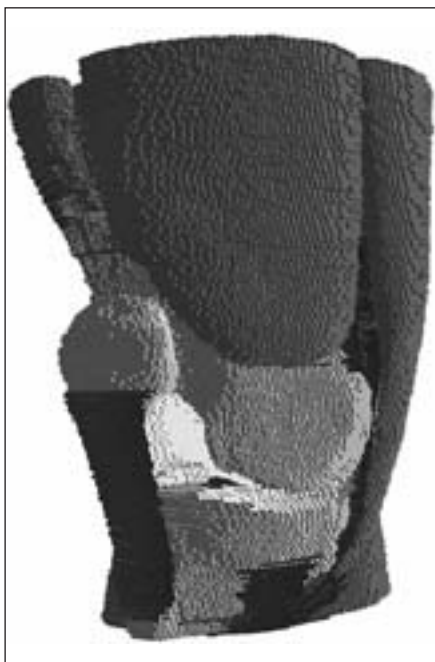
Raziskali smo dve različni metodi ohlajanja kolena po kirurškem posegu: lokalno hlajenje s tekočo vodo stalne temperature, ki kroži v hladilni manšeti (angl. *cryo-cuff*), in lokalno hlajenje s paketi ledu (angl. *ice-pack*) (12, 13). V članku bomo predstavili simulacijo lokalnega ohlajanja kolena in porazdelitev temperature v izbranem časovnem intervalu in v različnih delih kolena pri obeh metodah.

MATERIALI IN METODE

Geometrijski model kolena

Da bi lahko obliko kolena ponazorili kar se da natančno, si zamislimo model, ki je sestavljen iz majhnih delčkov pravilnih oblik. Uporabili smo kockice z robom 1 mm (angl. *voxel*).

Anatomske podatke za model kolena smo dobili iz podatkovne baze *Visible Human Dataset* (10), ki je javno dostopna na internetu. Uporabili smo 200 rezin kolena v medsebojnem razmaku 1 mm. Na vsaki rezini smo določili tkiva in jih barvno označili. S tem smo računalniškemu programu omogočili ločevanje struktur z različnimi snovnimi lastnostmi. Ločljivost segmentirane rezine smo zmanjšali na velikost $X \times Y = 175 \times 195$ točk, tako da je bila vsaka točka velika 1×1 mm. Z Y je označena smer od pogačice proti zadnji strani kolena, smer X pa je pravokotna nanjo. Nato smo s polaganjem ene rezine na drugo sestavili tridimenzionalni (3D) model, ki je sestavljen iz $N = 175 \times 195 \times 200 = 6.825.000$ kockic prostornine 1 mm^3 (slika 1). Ta velika številka nam pove, da bo simulacija računsko zahtevna in da bo morda treba za učinkovito računanje uporabiti vzporeden računalnik, to je več računalnikov hkrati.



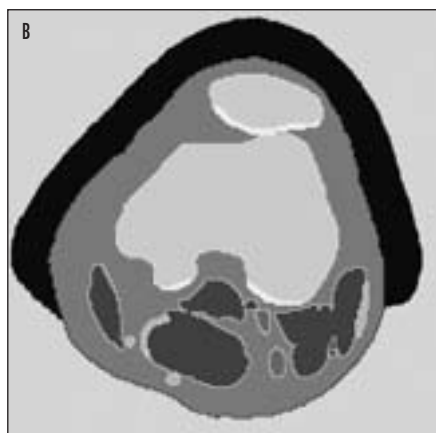
Slika 1. Prostorski model kolena, sestavljen iz 200 rezin in majhnih kockic. Različna tkiva (mišice, kosti, hrustanec in vezi) so označena z različnimi svinami. Mehka maščobna tkiva niso prikazana, so pa upoštevana v simulaciji.

Matematični model

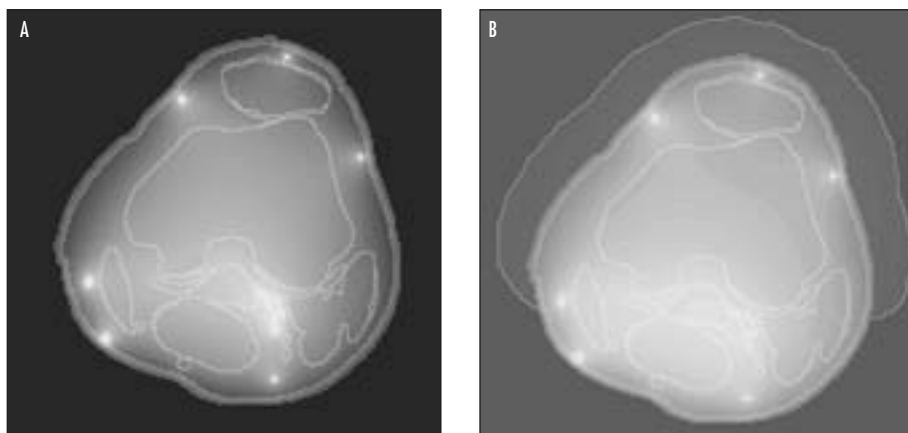
Iz sestave modela sledi, da vsaka kockica predstavlja različno snov ali tkivo z različni-

mi toplotnimi lastnostmi, katerih vpliv je združen v difuzijskem količniku $D = \lambda / c_p \rho$, kjer λ pomeni toplotno prevodnost, c_p specifično toploto in ρ gostoto tkiva. Ker je model že po svoji sestavi diskreten, sestavljen iz kockic enakih dimenzij z različnimi toplotnimi lastnostmi, smo za simulacijo uporabili metodo končnih razlik (angl. *Finite Difference Method*), ki računa za vsak časovni interval novo temperaturo vsake kockice iz njene stare temperature in starih temperatur okoliških kockic. Časovno os razdelimo na korake, v našem primeru dolge nekaj tisočink sekunde. Tako imamo na koncu podatke ne samo o končnih temperaturah, temveč tudi o vseh temperaturah v času simulacije. Nadaljevanje podrobnejšega opisa matematičnega modela in izvedbe simulacije na vzporednem računalniku je podano v dodatku.

Model kolena smo postavili v toplotno izoliran kvader, ki je določil robne pogoje. Izvedli smo simulaciji dveh metod hlajenja. V prvi simulaciji smo okolje prilagodili hladilni manšeti, celotna okolica kolena je imela stalno temperaturo 0°C (slika 2a). V drugi smo simulirali ledene zavoje. Model smo spredaj obložili s plastjo kockic, ki so imele začetno temperaturo 0°C in vse lastnosti ledu, ostanek kolena pa je bil v stiku s sobno temperaturo 20°C (slika 2b). Začetno temperaturo tkiv in krvi v žilah smo v obeh primerih nastavili na 37°C . Simulirali smo 2 uri hlajenja.



Slika 2. Prerez kolena na rezini 101, ohlajenega s hladilno manšeto (a) in z ledenimi zavoji (b). Smer X je vodoravna, smer Y pa navpična. Različne snovi so predstavljene s svinami (maščoba – bela, kost, hrustanec in žile – svetlo siva, mišica – temno siva).



Slika 3. Temperatura v prerezu kolena na rezini 101 po dveh urah hlajenja s hladilno manšeto (a) in ledenimi zavoji (b). Bela barva označuje temperaturo 37 °C, temno siva 0 °C, vse vmesne temperature pa so predstavljene s sivinami.

REZULTATI

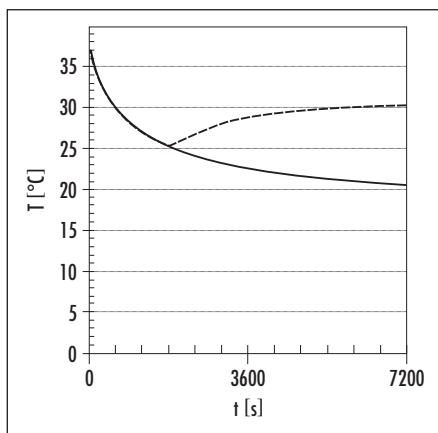
Primerjava obeh metod ohlajanja

Slika 3 prikazuje razporeditev temperature v kolenu po dveh urah simulacije. Temperature so predstavljene s sivinami, svetlejši deli so toplejši. Najsvetlejša področja predstavljajo žile, ki imajo stalno temperaturo 37 °C in segrevajo okoliška tkiva. Hladilna manšeta (slika 2a) vzdržuje stalno temperaturo, notranjo temperaturo kolena zniža bolj kot zavoji ledu

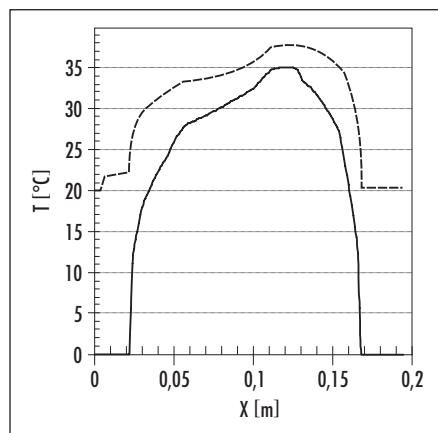
(slika 3b), saj ti po dveh urah skoraj dosežejo sobno temperaturo.

Poglejmo razvoj temperature (slika 4) na kockici ($X = 105, Y = 27$) na zadnji strani kolena okrog 2 cm globoko (slika 4). Pri uporabi hladilne manšete se ta kockica postopoma shladi do temperature 21 °C, pri uporabi ledenih zavojev pa se začne po 30 minutah ponovno segrevati in po dveh urah doseže temperaturo preko 30 °C.

Slika 5 prikazuje razporeditev temperature kolena na prerezu po Y-osi v širini $X = 90$ (približno od sredine pogačice proti zadnjemu



Slika 4. Časovni potek temperature v kockici iz sredine kolena, hlajenega s hladilno manšeto (polna črta) in z ledenimi zavoji (črtkana).



Slika 5. Razporeditev temperature na prerezu skozi sredino kolena po dveh urah hlajenja s hladilno manšeto (polna črta) in z ledenimi zavoji (črtkana).

delu kolena) po dveh urah simulacije. Ponovno ugotovimo, da je hladilna manšeta bolj učinkovita, saj se ledeni zavoj segreva in po dveh urah dosega okoliško temperaturo. Zunanje plasti kolena ob koži se ob uporabi hladilne manšete ohladijo tudi pod 10 °C, precej bolj kot pri ledenih zavojih. Povprečna temperatura v prikazanem področju je bila po dveh urah ohlajanja za približno 4 °C nižja, če smo uporabili hladilno manšeto namesto ledenih zavojev.

ZAKLJUČKI

Simulirali – in na ta način primerjali – smo dva načina ohlajanja kolena. Tkiva se ohlajajo zaradi lokalnega hlajenja in segrevajo zaradi presnove in pritoča tople krvi preko žil. Naši rezultati kažejo, da je pri ohlajanju s hladilno manšeto po ohladitev tkiv bistveno bolj izrazita in stalna, ravnovesje je doseženo po približno dveh urah. Pri ohlajanju z ledenimi zavoji je najnižja temperatura dosežena po eni uri, nato pa se učinkovitost hlajenja manjša in temperatura tkiv se prične dvigati, po dveh urah skoraj doseže normalno telesno temperaturo. Ta razlika je pomembna, saj lahko dolgotrajno hlajenje s stalno nizkimi temperaturami močno ohladi povrhnja tkiva, zlasti kožo, kjer temperatura pade tudi pod 10 °C, kar je že nevarno za nastanek poškodb tkiva zaradi mraza.

Zaradi računске zahtevnosti simulacije smo izvedli tudi računanje na 32 vzporednih računalnikih. Pospešitev je bila 8 pri 12 in 12,3 pri 32 računalnikih. Z 32 računalniki je bila simulacija za 20 odstotkov hitrejša od resničnega dogajanja.

Temperature, ki smo jih dobili s simulacijo, smo prikazali grafično. Vidimo, da se njihova oblika ujema z našimi pričakovanji. Tudi količinsko se naši rezultati ujemajo z nekaterimi objavljenimi meritvami (14, 15). Z opisano metodo lahko predvidimo temperaturo na določenem kritičnem mestu oziroma tkivu v kolenskem sklepu in ocenimo učinkovitost morebitnih novih metod ohlajanja.

Opisana metoda še ni zrela za rutinsko uporabo ter ima še nekaj pomanjkljivosti, ki bi jih bilo treba v prihodnje odpraviti. 3D-model kolenskega sklepa vsebuje zaradi zahtevne segmentacije (določanje tkiv iz slike prereza

kolena) še nekaj napak, na primer prekinjene kolenske vezi (glej sliko 1). Nekatere manjše žile niso vključene v model in tudi presnova je upoštevana samo približno. Matematični model bi lahko še izboljšali oziroma izpopolnili, dodali bi lahko na primer simulacijo pretoka temperature skozi kapilare.

Z opisanimi postopki lahko proučujemo nove metode ohlajanja različnih delov telesa in ob različnih zunanjih pogojih. V prihodnje bo treba podrobneje analizirati simulacijske rezultate. Poskusili bomo pojasniti vpliv temperature hladilne tekočine na dolgoročno ohlajanje kolena (16) in najti optimalno temperaturo hladilne tekočine (17). Isti model, z manjšimi prilagoditvami, lahko uporabljamo tudi za simulacije drugih dogajanj v kolenu, npr. simuliranje prenosa sil med hojo ali simulacijo obremenitve posameznih delov sklepa pri normalni ali spremenjeni anatomiji, po poškodbah ali operacijskih posegih ipd. Na enak način je pripravljen tudi model srca. Prostorska modela kolena in srca sta, za raziskovalne namene, na voljo pri avtorjih članka.

DODATEK

Podrobnejši opis matematičnega modela

Celoten izračun smo izpeljali iz difuzijske enačbe, ki opisuje prenos toplote v trdnih snoveh zaradi temperaturnih razlik. Enačba predpisuje, da topli deli segrevajo hladnejše in hladnejši ohlajajo toplejše, dokler se ne vzpostavi ravnotežno stanje. Uporaba metode končnih razlik nam da toliko enostavnih linearnih enačb, kolikor je kockic. Enačbo za posamezno kockico s prostorskimi koordinatami (i, j, k), ki je iz enake snovi kot njene sosedice, lahko zapišemo kot

$$\frac{T_{i,j,k}^{(h+1)} - T_{i,j,k}^{(h)}}{\Delta t} = D_{i,j,k} \left[\frac{T_{i+1,j,k}^{(h)} - 2T_{i,j,k}^{(h)} + T_{i-1,j,k}^{(h)}}{\Delta x^2} + \frac{T_{i,j+1,k}^{(h)} - 2T_{i,j,k}^{(h)} + T_{i,j-1,k}^{(h)}}{\Delta y^2} + \frac{T_{i,j,k+1}^{(h)} - 2T_{i,j,k}^{(h)} + T_{i,j,k-1}^{(h)}}{\Delta z^2} \right],$$

kjer je $T_{i,j,k}^{(h)}$ približna vrednost temperature v točki (i, j, k) v h -tem časovnem koraku, torej $T(i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z)$ v času $h\Delta t$, $D_{i,j,k}$ pa difuzijski količnik te kockice. Z Δx , Δy in Δz so označene razdalje med dvema sosednjima točkama v prostoru in z Δt dolžina časovnega koraka med dvema zaporednima izračunoma. Gornjo enačbo zapišemo za vse kockice v matrični obliki

$$\mathbf{M}T^{(h)} + T_b = T^{(h+1)},$$

kjer je \mathbf{M} matrika količnikov, $T^{(h)}$ vektor približkov temperatur $T_{i,j,k}^{(h)}$ vseh kockic in T_b vektor temperatur robnih kockic, ki predpisujejo robne pogoje. Matrika \mathbf{M} je redka, saj ima v vsaki vrstici le 7 od nič različnih elementov, to je tistega, ki pripada izbrani kockici, in tiste, ki predstavljajo vpliv sosednjih kockic. Če začnemo z začetnim vektorjem temperatur $T^{(0)}$, lahko z zaporedno uporabo enačbe izračunamo temperaturo $T^{(h)}$ za katerikoli $h > 0$. V vsakem koraku moramo pomnožiti matriko z vektorjem in rezultatu prišteti vektor, zato je število potrebnih izračunov v vsakem časovnem koraku enako kar $7 \times N$, pri čemer je N število vseh kockic.

Časovni korak mora biti dovolj majhen, da ostane računanje stabilno. Iz teorije sledi, da je časovni korak simulacije Δt v 3D omejen z naslednjo neenačbo

$$\Delta t \leq \frac{(\min\{\Delta x, \Delta y, \Delta z\})^2}{6 \max D(x, y, z)},$$

ki je v našem primeru zahtevala časovni korak $\Delta t = 0,005$ sekunde.

Izvedba na vzporednem računalniku

Če uporabimo le en računalnik, ki ima toliko pomnilnika, da so v njem shranjeni vsi podatki in rezultati, lahko računanje traja zelo dolgo. Iz opisa v prejšnjem poglavju lahko razberemo, da so izračuni v vsakem časovnem koraku neodvisni in jih lahko opravimo vzporedno. Podatke razdelimo med procesorje tako, da vsakemu dodelimo enako število zaporednih rezin. Po vsakem koraku je potrebna izmenjava vrednosti na kockicah mejnih rezin, ki so nameščene na sosednjih procesorjih. Izmenjavo

vrednosti izvedemo s prenosom sporočil med procesorji.

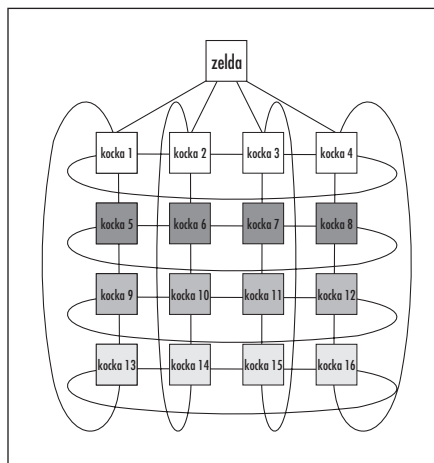
Za izračun simuliranih vrednosti modela velikosti N kockic na P vzporednih procesorjih, povezanih v mrežo, potrebujemo za vsak korak približno $7 \times N/P$ operacij s plavajočo vejico in izmenjavo podatkov ene rezine med dvema neposredno povezanima procesorjema, ki jih je v našem primeru $175 \times 195 = 14625$.

Pospešitev z vzporednim računalnikom

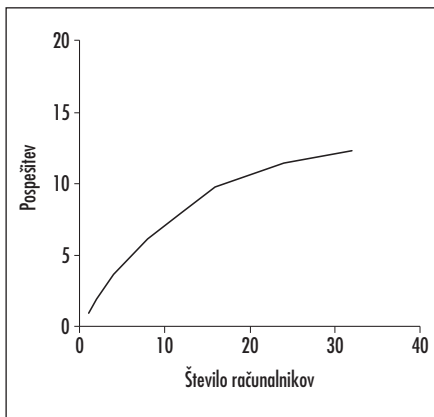
Najprej smo napisali simulacijski program, ki smo ga izvajali le na enem procesorju. Ker je izvajanje programa trajalo zelo dolgo (nekaj deset ur), smo naš program predelali tako, da smo ga lahko izvajali tudi na vzporednem računalniku, sestavljenem iz sedemnajstih dvoprocorskih računalnikov, povezanih z gigabitnimi povezavami (slika 6). Vsak računalnik vsebuje:

- dva 64-bitna procesorja (AMD Opteron 244),
- 1024 MB RAM,
- 160 GB trdi disk,
- šest gigabitnih Ethernet vmesnikov ($2 \times$ Broadcom BCM5704C + $4 \times$ Intel Pro 1000 MT),
- en Fast Ethernet port.

Na vseh računalnikih je nameščen operacijski sistem Fedora Core 2 Linux z jedrom 2.6.8-1.521smp. Za prenos sporočil in podatkov smo uporabili knjižnico LAM/MPI v3.0.7.



Slika 6. Shematski prikaz vzporednega računalnika z 32 procesorji, povezanimi v mrežo.



Slika 7. Pospešitev računanja na vzporednem računalniku.

Podatke smo razporedili na vse procesorje, kot smo opisali v prejšnjem poglavju. Izvajanje programa na enem procesorju je bilo 11-krat počasnejše od realnosti, torej 22 ur. Z vzporednim računalnikom pa je bila simulacija na 32 procesorjih končana približno v 100 minutah, kar je 1,2-krat hitreje od realnosti. Pospešitev vzporednega računanja, ki je razmerje med časoma računanja na enem računalniku in na vzporednih računalnikih, je prikazana na sliki 7 in je pri 32 procesorjih enaka malo več kot 12. Vidimo, da pospešitev ni neposredno sorazmerna številu procesorjev, saj se pri večjem številu čas računanja zmanjša, čas potreben za prenos podatkov med procesorji pa ne.

LITERATURA

1. Barber FA. A comparison of crushed ice and continuous flow cold therapy. *Am J Knee Surg* 2000; 13 (2): 97-101.
2. Knight KL. *Cryotherapy: theory, technique and physiology*. Chattanooga: Chatanooga Corporation; 1985.
3. Ho SS, Coel MN, Kagawa R, et al. The effects of ice on blood flow and bone metabolism in knees. *Am J Sports Med* 1994; 22 (4): 537-40.
4. Hubbard TJ, Denegar CR. Does cryotherapy improve outcomes with soft tissue injury. *J Athl Train* 2004; 39 (3): 278-9.
5. Shelbourne K, Nitz P. Accelerated rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction, *Am J Sports Med* 1990; 18 (3): 292-9.
6. McGuire DA, Hendricks SD. Incidences of frostbite in arthroscopic knee surgery postoperative cryotherapy rehabilitation. *Arthroscopy* 2006; 22 (10): 1141e1-e6.
7. Kumar V, Grama A, Gupta A, et al. *Introduction to parallel computing - design and analysis of algorithms*. Redwood City: Benjamin/Cummings; 1994.
8. Heath MT. *Scientific computing: an introductory survey*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.
9. Donahue TLH, Hull ML, Rashid MM, et al. A finite element model of the human knee joint for the study of tibio-femoral contact. *J Biom Eng-Trans Asme* 2002; 124 (3): 273-80.
10. Visible human dataset. National Library of Medicine, Bethesda; 1997.
11. Trobec R, Slivnik B, Gersak B, et al. Computer simulation and spatial modelling in heart surgery. *Comp Biol Med* 1998; 28 (4): 393-403.
12. Grana WA. Cold modalities. In: DeLee JC, Drez D, eds. *Orthopaedic sports medicine: principles and practice*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994. p. 203-7.
13. McMaster WC, Liddle S, Waugh TR. Laboratory evaluation of various cold therapy modalities. *Am J Sports Med* 1978; 6 (5): 291-4.
14. Trunk P, Trobec R, Gersak B. Measurement of porcine heart temperatures. *Pflügers Arch.* 2000; 440 (5 Suppl): R132-3.
15. Inchausti GS, Martín JV, Fernández CV. Effect of Arthroscopy and Continuous Cryotherapy on the Intra-articular Temperature of the Knee. *Arthroscopy* 2005; 21 (5): 552-6.
16. Dervin GF, Taylor DE, Keene GC. Effects of cold and compression dressings on early postoperative outcomes for the arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction patient. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998; 27 (6): 403-6.
17. Dahlstedt L, Samuelson P, Dalén N. Cryotherapy after cruciate knee surgery. Skin, subcutaneous and articular temperatures in 8 patients. *Acta Orthop Scand* 1996; 67 (3): 255-7.

Ksenija Kocijančič¹

Rentgensko slikanje prsnih organov pri kritično bolnem

Chest X-Ray in Critically Ill Patients

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kritično bolni, prsni organi radiografija, intenzivna oskrba enote

Kritično bolnih ni mogoče slikati na radiološkem oddelku, zato jih slikamo ležeče v postelji s pomičnim rentgenskim aparatom. Ta način slikanja ima svoje zakonitosti, ki jih mora poznati zdravnik, da lahko sodeluje z radiološkim inženirjem pri izvedbi slikanja. Pri tem je pomembno, da je končen rezultat (dobra slika in uporaben izvid) koristen za klinika in, še pomembneje, za bolnika. Navedene so posebne zahteve pri interpretaciji teh posnetkov: zlasti pri resno bolnih je poleg opisa sprememb na slikah praviloma potrebno tudi jasno izraziti mnenje glede vprašanj, ki mu jih zastavi klinik.

ABSTRACT

KEY WORDS: critical illness, thoracic radiography, intensive care units

In critically ill patients, it is often impossible to transport them to the radiology department. For this reason, they are regularly examined in bed, using a movable X-ray device. This technique has its own specific features which the physician should be familiar with in order to be able to cooperate with the radiographer in the imaging procedure. It is important to make sure that the final result (a good image and a useful report) is beneficial for the clinician and, even more importantly, for the patient. There are special demands regarding film reading: in addition to the description of changes, it is also necessary to state the possible diagnosis and answer clinician's questions.

169

¹ Asist. mag. Ksenija Kocijančič, dr. med., Klinični inštitut za radiologijo, Univerzitetni Klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1000 Ljubljana.

UVOD

Ležeče bolnike, ki jih ne moremo pripeljati na radiološki oddelek, slikamo na oddelku s premičnim rentgenskim aparatom (slika 1). Kljub slabemu telesnemu in pogosto tudi psihičnemu stanju takih bolnikov ter slabšim tehničnim zmogljivostim premičnega rentgenskega aparata, se je tudi v teh pogojih potrebno čim bolj držati običajnih zahtev pri slikanju.

Najpogosteje slikamo v anteroposteriorni (AP) smeri, če se le da sede ali poldsede (slika 2). Bolnika slikamo leže le, če je to edina možnost. Tiste, ki lahko sedijo s pomočjo visokega vzglavja, je mogoče povsem korektno slikati tudi v stranski projekciji. Izvedljivo je tudi slikanje v ležečem stranskem položaju.

V vseh teh primerih bolnik s svojim telesom (hrbtom) pritisne na kaseto s filmom in jo tako fiksira. Bolnika poskušamo namestiti čim bolj podobno kot pri slikanju s stoječim stativom.

Osrednji snop rentgenskih žarkov mora biti pravokoten na kaseto s filmom (slika 3).

TEHNIČNA OPREMA PRI SLIKANJU S PREMIČNIM RENTGENSKIM APARATOM

- filmi – nizkokontrastni, primerni samo za slikanje prsnih organov, običajno velikosti 35 × 43 cm,
- ojačevalne folije (medium) oziroma za prsne organe ustrezno prirejeni sistem folija–film,



Slika 2. Poldsedeč položaj bolnika pri slikanju prsnih organov v anteroposteriorni (AP) smeri. Kaseto s filmom podložimo bolniku pod hrbet in jo na ta način fiksiramo.



Slika 1. Premični rentgenski aparat za slikanje prsnih organov pri ležečih bolnikih.

- rešetka za absorpcijo sipanega sevanja (sekundarnih žarkov) mora biti vgrajena v kaseti. Tehnične zahteve za rešetko so $r = 10, 40$ lamel/cm, fokusirana na razdaljo fokus–film (FFD) od 130 do 150 cm. Slikanje brez rešetke je primerno le za suhe bolnike, saj je v ostalih primerih preveč sekundarnega sevanja,
- razdalja fokus–film (FFD) mora biti taka, kot je označeno na kaseti z rešetko, torej od 130 do 150 cm,
- anodna napetost 125 kV, kar omogoča večina premičnih aparatov,
- množina rentgenskih žarkov (sevanja) – izkustveno najpogosteje 1,6–6 mAs,
- zaščita – gonadna. Ostalim osebam v sobi naročimo, da se za čas izpostavitve odstranijo, nepokretne bolnike pa, če je le mogoče, zaščitimo s premičnimi svinčeni pregradami.

Pojasnila

Navedene zahteve so osnovni pogoj za tehnično ustreznost posnetkov prsnih organov v enoti intenzivnega zdravljenja. V vsakodnevni praksi je najpogostejši vzrok, ki pripomore k slabšim posnetkom, neupoštevanje zgoraj navedenih Evropskih priporočil za optimalne vrednosti v pljučni radiološki diagnostiki (1).