Olga Zaikovska

**NAGA FUNKCIONĀLĀS
VIENĪBAS PĀRMAIŅAS
ONIHOMIKOZES PACIENTIEM**

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2015

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Olga Zaikovska

NAGA FUNKCIONĀLĀS
VIENĪBAS PĀRMAIŅAS
ONIHOMIKOZES PACIENTIEM

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā, Morfoloģijas katedrā

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētais profesors **Jānis Ķīsis**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. asociētā profesore **Marina Aunapū** (*Aunapuu*),

Tartu universitāte, Igaunija

Dr. med. asociētā profesore **Ilze Štrumfa**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesore **Matilda Bīlaite-Bucinskiene** (*Bylaite-Bucinskiene*),

Viļņas universitāte, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 1. jūnijā plkst. 9.00

Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes

atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:

www.rsu.lv

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. docents **Andrejs Vanags**

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....	5
1. IEVADS.....	6
2. MATERIĀLS UN METODES.....	10
2.1. Pētāmie audi.....	10
2.2. Morfoloģiskās metodes.....	11
2.2.1. Audu fiksācija un rutīnās krāsošanas metodes.....	11
2.2.2. Periodiskas skābes <i>Shiff</i> reakcija.....	12
2.2.3. Bioķīmiskā streptavidīna imūnhistoķīmijas metode un reaktīvi.....	13
2.2.4. TUNEL metode.....	15
2.3. Datu apstrādes metodes.....	16
2.3.1. Puskvantitatīvā metode.....	16
2.3.2. Statistiskās datu apstrādes metodes.....	17
3. REZULTĀTI.....	18
3.1. Vispārējs klīnisko datu raksturojums.....	18
3.2. Morfoloģijas dati.....	18
3.2.1. Rutīnas histoloģijas dati.....	18
3.2.2. Periodiskās skābes <i>Shiff</i> reakcijas dati.....	20
3.3. Audu iekaisuma un remodelācijas marķieru dati.....	21
3.3.1. Interleikīns-1.....	22
3.3.2. Interleikīns-6.....	23
3.3.3. Interleikīns-10.....	24
3.3.4. Matrices metaloproteināze-2.....	25
3.3.5. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors.....	25
3.3.6. Neuropeptīdus saturošās inervācijas marķieris PGP9,5.....	26
3.3.7. Apoptoze.....	27
3.4. Dati par antimikrobiem peptīdiem.....	27
3.4.1. Defensīns-2.....	28

3.4.2. Defensīns-3	29
3.4.3. Defensīns-4	30
3.5. Datu statistiskās korelācijas	30
4. DISKUSIJA.....	32
5. SECINĀJUMI	43
PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	45
LITERATŪRAS SARAKSTS	49
PATEICĪBAS.....	54
<i>Pielikums. Histoloģijas datu pārskats</i>	<i>55</i>

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Tulkojums latviešu valodā
AI	Apoptotic index	Apoptozes indekss
AIF	Apoptosis inducing factor	Apoptozi inducējošais faktors
AMP	Antimicrobial peptides	Antimikrobie peptīdi
DNS	Deoxyribonucleic acid	Dezoksiribonukleīnskābe
FasL	Fas ligand	<i>Fas</i> ligands
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Granulocītu–makrofāgu koloniju stimulējošais faktors
H/E	Hematoxylin and eosin	Hematoksilīns un eozīns
hBD-2	Human beta defensin-2	Cilvēka beta defensīns-2
hBD-3	Human beta defensin-3	Cilvēka beta defensīns-3
hBD-4	Human beta defensin-4	Cilvēka beta defensīns-4
IFN	Interferon	Interferons
IL-1	Interleukin-1	Interleikīns-1
IL-2	Interleukin-2	Interleikīns-2
IL-3	Interleukin-3	Interleikīns-3
IL-6	Interleukin-6	Interleikīns-6
IL-8	Interleukin-8	Interleikīns-8
IL-10	Interleukin-10	Interleikīns-10
IL-22	Interleukin-22	Interleikīns-22
KOH	KOH test	Kālija hidroksīda tests
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2	Matrices metalloproteināze-2
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern	Ar mikrobiem saistīto molekulu veids
PAS	Periodic acid-Schiff	Periodiska skābes <i>Schiff</i> reakcija
PCR	Polymerase chain reaction	Polimerāzes ķēdes reakcija
PGP9,5	Protein gene product 9.5	Proteīna gēna produkts 9,5
SCIO	Scoring clinical index for onychomycosis	Onihomikozes klīniskā novērtējuma indekss
TLRs	Toll Like Receptors	<i>Toll</i> līdzīgie receptori
TGF	Transforming growth factor	Transformējošais augšanas faktors
T _h	T helpers	T līdzētājšūnas
TNF	Tumor Necrosis Factor	Audzēju nekrozes faktors
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor	Audzēju nekrozes faktora receptors
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	Deoksinukleotidiltransferāzes mediētās DNS terminālo 3-galu marķēšana ar deoksiuridinofosfātu
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

IEVADS

Onihomikoze ir hroniska, plaši izplatīta, grūti ārstējama sēnīšu infekcija, kas rada pakāpenisku naga plātnītes destrukciju. Slimība saistīta ar dažāda rakstura kosmētiskiem un psiholoģiskiem sarežģījumiem, kā arī biežiem recidīviem un ne vienmēr sekmīgu terapiju.

Pēdu onihomikoze ir sastopama septiņas reizes biežāk nekā roku onihomikoze. Onihomikozes biežums palielinās līdz ar vecumu, kas tiek skaidrots ar naga augšanas ātruma un asins cirkulācijas izmaiņām ekstremitāšu distālās daļās [Szepietowski, 2007]. Onihomikozes attīstību nosaka vairāki predisponējoši faktori. Vācu onihomikozes vadlīnijās kā galvenos faktorus izdala ģenētisku predispozīciju, angiopātijas, perifēras neiropātijas, ciešu apavu valkāšanu, pēdas deformācijas, atkārtotas traumas, *diabetes mellitus* un citas metaboliskas izmaiņas [Seebacher, 2007; Nenoff, 2014]. R. Novickis (R. Nowicki) ar līdzautoriem min arī imūnā stāvokļa pavājināšanos un psoriāzi [Faergemann, 2005].

Jāpiebilst, ka *Pub Med* datu bāzē lielā skaitā ir pieejami informācijas avoti par patogēno sēnīšu izplatību dažādos pasaules reģionos, par ierosinātāju spektra iedalījumu un biežākajiem ierosinātājiem. Diemžēl ļoti maz ir rakstu par mūsdienīgiem morfoloģiskās pētījumiem patogēno sēnīšu skartos nagos. Iespējams, tas ir saistīts ar relatīvu paraugu iegūšanas sarežģītību (ārsta iemaņas, pacienta piekrišana invazīvai procedūrai). Tomēr tiek piedāvāts veikt naga biopsijas situācijās, kad nevar klīniski atšķirt onihomikotiski izmainītus nagus no citām slimībām, kas skar nagus (psoriāze, *lichen planus*, longitudināla melanonīhija, trahionīhija, audzēji) [Grover, 2005; Hamsa, 2006].

Pēdējos gados zinātnieki ir aktīvi pievērsušies organisma dabīgās pretmikrobu aizsardzības pētījumiem. Aizsardzībai organisms ražo mikrobu

patogēniem toksiskas molekulas – antimikrobus peptīdus. Cilvēkiem atrod ketelicidīnu un defensīnu saimes antimikrobus peptīdus [Rodrigues, 2009; Lai, 2010]. Naga vienība jau ir pētīta no dabīgās iedzimtās imunitātes viedokļa, pierādot nagu ekstrakta pretmikrobu darbību pret *Candida albicans* [Dorschner, 2004].

Tinea corporis infekcijas gadījumā tika atklāta nozīmīga hBD-2 proteīna ekspresija. Histoloģiskos griezumos redzēja visas epidermas iesaistīšanos ādas reakcijā pret dermatofītiem, kas izpaudās kā epidermas sabiezēšana uz hiperkeratozes, akantozes rēķina. Dermas kārpīņu slānī vēroja T šūnu un neitrofilu infiltrāciju. Ir pierādīta hBD-2 antifungicīda darbība pret *Trichophyton rubrum* [Jensen, 2007].

Iespējams, ka līdzīgi iedzimtās imunitātes procesi notiek arī onihomikozes skartos nagos. Keratinocīti cīņai pret patogēnām sēnītēm varētu izstrādāt antimikrobus peptīdus.

Kopumā jāpiebilst, ka pie nagu dabīgās imunitātes pieder naga plātnītes sabiezēšana nelabvēlīgos apstākļos, šādas izmaiņas ir raksturīgas arī onihomikozes gadījumā. Var teikt, ka onihomikozes skartā naga vienība morfoloģiski būtiski atšķiras no veselas naga plātnītes, kad vēro normālās pārragošanās traucējumus, sēņu elementu ieslēgumus, dažos gadījumos vēro limfocītu infiltrāciju [Stewart, 2012]. Savukārt patogēno sēnīšu radītās intentīvās pārmaiņas slimos nagos varētu pavadīt arī iekaisuma citokīnu izdale un asinsvadu paplašināšanās, iespējams, neoangiogēnēze. Pie tik intensīvām pārmaiņām audos vērojami arī audu restrukturizācijas procesi, bet masīvs infekcijas perēklis audos palaiž šūnu programmēto nāvi, savukārt visu minēto pavada pārmaiņas naga funkcionālās vienības antimikrobiālajā aizsardzības sistēmā. Iepriekšminētais liecina, ka nepieciešama kompleksa dažādu naga veselību ietekmējošo / regulējošo faktoru izpēte.

Šī darba **mērķis** bija izpētīt naga funkcionālo vienību onihomikozes gadījumā, vērtējot iekaisuma, vaskularizācijas, inervācijas, deģenerācijas, apoptozes, kā arī dabīgās antimikrobās aizsardzības norises.

Darba hipotēzes:

1. Onihomikozes skartos nagos notiek cilvēka beta defensīnu izdale.
2. Onihomikozes skartos nagos notiek audu restrukturizācijas procesi, ko raksturo citokīnu izdale un šūnu bojāeja.

Pētījumam ir izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Iegūt naga audu paraugus no onihomikozes pacientiem, kā arī kontroles materiālu, un izpētīt histoloģisku pārskata ainu naga funkcionālajā vienībā.
2. Noteikt interleikīnus -1, -6, -10 un cilvēka beta defensīnus -2, -3, -4 onihomikozes skartos un kontroles naga vienības audos noritošo iekaisuma procesu un lokālās antimikrobās aizsardzības raksturošanai.
3. Noteikt PGP9,5 un VEGF onihomikozes skartos un kontroles naga vienības audos neuropeptīdus saturošās inervācijas un audu išēmijas analīzei.
4. Noteikt MMP-2 un apoptozi onihomikozes skartos un kontroles naga vienības audos audu deģenerācijas procesu un programmētās šūnu nāves norises analīzei.
5. Veikt statistisko analīzi un noteikt datu savstarpējo korelāciju.

Darba novitāte

Pirmo reizi tiek veikts onihomikozes skartu un veselu nagu morfoloģijas salīdzinājums, izmantojot imūnhistoķīmiskās metodes. Turklāt pirmo reizi onihomikozes skartos nagos nosaka cilvēka beta defensīnus.

Pētījuma nozīmība

Pētījumus sniedz ieskatu onihomikozes morfopatogēnēzes procesā, ļaujot dziļāk izprast nagu veselību regulējošos faktoros.

Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs sastāv no piecām nodaļām: “Literatūras apskats”, “Materiāls un metodes”, “Rezultāti”, “Diskusija” un “Secinājumi”. Literatūras apskatā tiek apkopota informācija par onihomikozes prevalenci un aktualitāti, naga funkcionālās vienības anatomiju un histoloģiju, dažādu sēnīšu formu patofizioloģiju, sēnīšu infekcijas diagnostikas iespējām un naga biopsijas metodi.

Promocijas darbs tiek balstīts uz 163 literatūras avotiem. Darbā ir 49 attēli un 23 tabulas.

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Pētāmie audi

Pētījumā tika izmantots 30 onihomikozes pacientu slimu nagu biopsiju materiāls. Nagu punktveida (*punch*) biopsijas tika veiktas pacientiem standarta procedūras veidā, izmantojot “divu *punch*” metodi – 5 un 3 mm lielus biotātus SIA “J. Ķīsis” diagnostiskos nolūkos:

- 1) veicot psoriāzes / onihomikozes diferenciāldiagnozi, t. i., gadījumos, kad redzēja tikai klīniski izmainītus nagus bez tipiskām psoriāzes pazīmēm uz ādas;
- 2) gadījumos, kad tipiskas onihomikozes klīnikas ainas apstākļos vēroja negatīvus mikroskopijas / uzsējuma rezultātus, lai apstiprinātu diagnozi.

Kopumā naga biopsija tika veikta 40 pacientiem, bet 10 no viņiem diagnoze izrādījās *psoriasis*, *nevis onychomycosis*.

Materiāls iegūts laikposmā no 2012. līdz 2014. gadam.

Pētījums tika veikts saskaņā ar RSU Ētikas komisijas atļauju (26.01.2012.), un tā laikā netika nodarīts kaitējums pacientu veselībai.

Pacientu anamnēzē tika izslēgti šādi faktori: sistēmiskas saslimšanas, antimikotisko preparātu lietošana, sistēmisko antibakteriālo līdzekļu lietošana pēdējā mēneša laikā, ilgstoša atrašanās saulē pēdējā mēneša laikā.

Kontrolei tika izmantots liķu nagu materiāls. 5 nagu paraugi tika iegūti standarta nekropsijas procedūras veidā RAKUS struktūrvienībā SIA “Valsts Patoloģijas centrs” 2013. gadā. Mirušie bija vecumā no 36 līdz 57 gadiem, abu dzimumu, bez klīniskām kāju vai roku nagu izmaiņām. Grupas atlases kritēriji bija šādi: neinfekciozas dabas nāves iemesls, infekciju slimību trūkums anamnēzē, pirms naves patients nebija saņēmis antibakteriālo līdzekļu kursu, pacientam anamnēzē nav sistēmisku saslimšanu, viņš nav iededzis, turklāt viņam nav onihomikozes klīnisko pazīmju.

2.2. Morfoloģiskās metodes

2.2.1. Audu fiksācija un rutīnās krāsošanas metodes

Audu fiksācija uz 24 stundām tika veikta SIA “J. Ķīsis” uzreiz pēc ķirurģiskās manipulācijas – naga biopsijas. Šim nolūkam tika izmantots piesātināts Stefanini šķīdums (2% formaldehīda un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātbuferī pH 7,2). Pēc fiksācijas audu gabaliņus nogādāja RSU AAI Morfoloģijas katedrā, kur pēc apstrādes spirtos pieaugošā secībā un ksilolos paraugus iegremdēja parafīnā.

No katra pacienta biopsijas laikā iegūtā audu materiāla tika sagatavoti 3–4 µm biezi griezumumi, kurus krāsoja ar hematoksilīnu un eozīnu [Lillie, 1976; Avwioro, 2011]. Nokrāsotie preparāti tika analizēti, izmantojot gaismas mikroskopijas tehniku, lietojot *Leica DM RB* (Vācija) mikroskopu. Histoloģiskā aina tika analizēta, izmantojot *Leica microsystem AG* (Vācija) digitālo kameru.

Pārskata griezumos visi preparāti tika vērtēti no šādām pozīcijām:

- ir vai nav naga plātnītes hipertrofija (naga plātnītes sabiezējums);
- ir vai nav akantoze – naga gultnes dzeloņainā slāņa hiperplāzija (šūnu skaita palielināšanās);
- ir vai nav parakeratoze – kodolaino šūnu klāsteri (grupējumi) raga slānī (plātnītē);
- ir vai nav hipergranuloze – granulozā slāņa šūnu hiperplāzija (šūnu skaita palielināšanās), šūnu rindu skaits 4 un augstāks;
- ir vai nav epiteliocītu vakuolārs bojājums – parenhimatozs bojājums, ko raksturo šūnu struktūras pārmaiņas;
- ir vai nav gultnes šūnu pericelulāra tūska;

- ir vai nav ieslēgumi – amorfas, blīvas struktūras raga slānī;
- kāds ir kolagēno šķiedru raksturojums (hipo-, normo- vai hipertrofiskas);
- kāda ir dermas vaskularizācija salīdzinājumā ar kontroles grupu;
- fibrocītu skaits naga saistaudu daļā vienā redzes laukā.

Lai novērtētu parakeratozes un akantozes izteiktības pakāpi, ieslēgumu daudzumu, vakuolāra bojājuma un pericelulāras tūskas izplatību preparātā un varētu šos datus apstrādāt statistiski, tika lietota šāda mūsu izstrādāta novērtējuma shēma:

- 1 – nav pazīmes
- 2 – sīkperēklaina izplatība (< 10%)
- 3 – lielperēklaina izplatība (< 50%, lielāka nekā 10%)
- 4 – totāla izplatība (> 55%)

Hiperkeratozes raksturošanai izmantoja vienkāršāku shēmu (1 – ir; 2 – nav).

Granulozes raksturošanai izvēlējās: 1– hypo-; 2– normo-; 3 – hipergranuloze.

2.2.2. Periodiskas skābes *Shiff* reakcija

Periodiska skābes *Shiff* (PAS) reakcija ļauj noteikt audos glikoproteīnus, polisaharīdus, dažus mukopolisaharīdus, glikolipīdus un taukskābes [McManus, 1946].

Deparafinizētus un dehidratētus audu griezumus preparātus iegremdēja 0,5% jodskābes šķīdumā uz 10 minūtēm, pēc tam tos skaloja destilētā ūdenī. Liekais ūdens tika savākts ar filtrpapīru, un uz 20 minūtēm preparātus ievietoja līdz 4 °C temperatūrai atdzesētā *Schiff* reaktīvā, pēc tam preparātus skaloja ar destilētu ūdeni. Trešo reaģentu (*Potassium metabisulphite*) pievienoja uz 2 minūtēm. To nenomazgāja, bet izžāvēja, pēc tam uz 2 minūtēm pielika ceturto reaģentu – fiksatoru. Preparātus skaloja destilēta ūdenī. *Mayer's Hemalum*

šķīdumu atstāja uz 3 minūtēm kodolu diferencēšanai, pēc tam griezumus skaloja krāna ūdenī 5 minūtes. Pēc tam tika veikta preparātu dehidratācija caur spirtiem pieaugošā secībā, tad griezumus ievietoja ksilolā un ieslēdza histoloģiskā līmē.

2.2.3. Biotīna streptavidīna imūnhistoķīmijas metode un reaktīvi

Imūnhistoķīmijas analīzei tika izmantota biotīna streptavidīna metode [Hsu, 1981]. Deparafinizēti paraugi tika ievietoti turētājā, ko ievietoja konteinerā ar EDTA buferi (DIAPATH, LOT 0713311). Konteineru ar paraugiem uz 20 minūtēm ievietoja mikroviļņu krāsnī, pēc tam izņēma no krāsns, atdzesēja un ievietoja mazgāšanas buferī divas reizes pa 5 minūtēm. 10 minūtes tika veikta bloķēšana ar peroksidāzi, tad divas reizes pa 5 minūtēm tika veikta skalošana ar TRIS buferi (DIAPATH, LOT 0713513). 30 minūtes audi tika apstrādāti ar primārām antivielām, pēc tam divas reizes pa 5 minūtēm tos mazgāja TRIS buferī. 30 minūtes tika izmantots *En Vision* (Dako, Dānija) vai *Immuno Cruz SC-2053* (ASV) krāsojošais komplekss. Tika lietots hromogēns diaminobenzidīns (DAB), kuru noskaloja, un griezumus kontrastēja 2 minūtes ar hematoksilīnu. Par imūnpozitīvām uzskatīja struktūras, kas diaminobenzidīna (DAB) ietekmē iekrāsojās brūnas. Antivielas, kas tika izmantotas defensīnu, citokīnu un citu faktoru imūnhistoģiskai noteikšanai, ir aprakstītas 2.1. tabulā.

Pētījumā izmantotās antivielas

Faktors	Kods	No kā iegūts	Darba atšķaidījums	Ražotājs
hBD-2	AF2758	kazas, poliklonālas	1 : 100	<i>R&D systems</i> , Mineapole, ASV
hBD-3	NB200-117	truša, poliklonālas	1 : 1000	<i>Novus Biologicals</i> , Litltona, ASV
hBD-4	(L13-10- D1): sc- 59496	peles, monoklonālas	1 : 100	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Dalasa, ASV
IL-1	(B-7): sc9983	peles, monoklonālas	1 : 50	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Dalasa, ASV
IL-6	NYRhlL6	peles, monoklonālas	1 : 50	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Dalasa, ASV
IL-10	ab34843	truša, poliklonālas	1 : 400	<i>Abcam</i> , Kembridža, Lielbritānija
PGP 9,5	Z511601	truša, poliklonālas	1 : 600	<i>DAKOCytomation</i> , Glostrupa, Dānija
VEGF	SC-7269	peles, monoklonālas	1 : 50	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Dalasa, ASV
MMP-2	AF902	kazas, poliklonālas	1 : 100	<i>R&D Systems</i> , Mineapole, ASV

Saīsinājumi: hBD-2 – cilvēka beta defensīns- 2; hBD-3 – cilvēka beta defensīns-3; hBD4 – cilvēka beta defensīns-4; IL-1 – interleikīns-1; IL-6 – interleikīns-6; IL-10 – interleikīns-10; PGP9,5 – proteīna gēna produkts 9,5; VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors; MMP-2 – matricas metaloproteināze-2

Katrai preparātu sērijai tika pagatavotas pozitīvās kontroles (audi, kuros vienmēr ir pozitīva reakcija, piemēram, plaušas, zarnas, mandeles, *colon* vēzis, olnīcu vēzis) un negatīvās kontroles paraugi (negatīva reakcija, kad nepilina primāro antivieliu). Nokrāsotie preparāti tika analizēti, izmantojot gaismas mikroskopijas tehniku, respektīvi, *Leica DM RB* (Vācija) mikroskopu, pēc tam apstrādāti ar programmu *Image Pro Plus* videoattēlu analizatoru sistēmā. Histoloģiskā aina tika fiksēta ar *Leica Microsystem AG* (Vācija) digitālo kameru.

2.2.4. TUNEL metode

Apoptozes noteikšanai tika izmantots standartizēts tehnikas komplekts *In Citu Cell Death Detection, POD Cat. No. 11684817910 Roche Diagnostics* [Negoescu, et al., 1998]. Deparafinizētie audu paraugi 10 minūtes tika turēti TRIS buferšķīdumā. Pēc tam 30 minūšu laikā ar 3% ūdeņraža peroksīdu tika veikta endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšana, un paraugi trīs reizes 5 minūšu laikā tika skaloti TRIS buferšķīdumā. Audu griezumus tika ievietoti EDTA buferšķīdumā, pēc tam uz 10 minūtēm ielikti mikroviļņu krāsnī (lai atmaskotu antigēnu) un istabas temperatūrā atdzesēti. Atdzesētos preparātus trīs reizes pa 5 minūtēm mazgāja TRIS buferšķīdumā.

Kontroles preparātu griezumus pārklāja ar DNaseI uz 10 minūtēm un nomazgāja PBS šķīdumā.

Preparāti tika mazgāti TRIS buferšķīdumā un uz 10 minūtēm ievietoti 0,1 % govs seruma albumīna fosfāta buferšķīdumā.

Audu griezumus 60 minūtes 37°C temperatūrā inkubēja ar TUNEL reaģentu. Pēc tam divas reizes pa 5 minūtēm skaloja TRIS buferšķīdumā un 37°C temperatūrā inkubēja 30 minūtes ilgi ar POD (satur mārutku peroksidāzi). Pēc divkārtas skalošanas pa 5 minūtēm TRIS buferšķīdumā griezumus uz 7 minūtēm pārklāja ar diamonobenzidīna (DAB) homogēnu šķīdumu peroksidāzes noteikšanai, tad 5 minūtes skaloja destilētā ūdenī.

Kontrasta krāsošanai izmantoja hematoksilīnu.

2.3. Datu apstrādes metodes

2.3.1. Puskvantitatīvā metode

Imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā biežuma apzīmēšanai tika lietota puskvantitatīvās skaitīšanas metode [Tobin, et al., 1990; Pilmane, et al., 1998; Pilmane, et al. 1999]. Struktūru daudzums tika analizēts nejauši izvēlētos viena griezuma piecos redzes laukos. Turpmākai analizēšanai izvēlējamies vidējo struktūru daudzumu.

Puskvantitatīvai metodei tika izmantoti 2.2. tabulā dotie apzīmējumi.

2.2. tabula

Puskvantitatīvās metodes apzīmējumi

Apzīmējums	Skaidrojums
0	redzes laukā netika redzēta neviens pozitīva struktūra
0 / +	redzes laukā retas pozitīvas struktūras
+	redzes laukā maz pozitīvu struktūru
++	redzes laukā vidēji daudz pozitīvu struktūru
+++	redzes laukā daudz pozitīvu struktūru
++++	redzes laukā ļoti daudz pozitīvu struktūru

Izmantojot TUNEL metodi, nejauši tika izvēlēti 5 redzes lauki, kuros no 100 redzamām šūnām tika skaitītas pozitīvās apoptotiskās šūnas (pozitīvais krāsojums kodolos). Tika noteikts arī apoptotiskais indekss [Itoh, et al., 2001].

2.3.2. Statistiskās datu apstrādes metodes

Sakarā ar nelielo pētāmo audu paraugu skaitu statistiskai apstrādei tika izvēlētas neparametriskās statistikas metodes. Neparametriskā t-testa alternatīva ir Manna–Vitnija U tests (angļu. val. *the Mann-Whitney U test*) un Kolmogorova–Smirnova divu izlašu tests (angļu. val. *the Kolmogorov-Smirnov two-sample test*) [Mitchell, 1986; Neely, 2003]. Manna–Vitnija U tests tika izmantots, lai pārbaudītu, vai vērtību izvietojums divās izlasēs ir vienāds. Abu grupu novērojumi tika apvienoti un saranžēti, summējot rangus katrā no divām grupām atsevišķi un aprēķinot vidējo rangu katrai grupai. Ja abās grupās vērtību iedalījums ir līdzīgs, tad lielākiem un mazākiem rangiem vajadzētu būt vienmērīgi izvietotiem abās grupās, līdz ar to arī vidējiem rangiem grupās vajadzētu būt līdzīgiem.

Lai izveidotu rangų skalas, puskvantitatīvās metodes rezultāti tika pārveidoti par cipariem.

Datu analizēšanai izmantoja ticamības līmeni. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja $p < 0,05$. Aprēķiniem izmantota statistikas pakete SPSS 17 (SPSS Inc. USA).

Korelācijas koeficients ir divu vai vairāku mainīgu lielumu saistības ciešuma kvantitatīvs rādītājs. Pēc rangų skalas lielumiem tika aprēķināts t. s. Spīrmena korelācijas koeficients un Kendela (Kendall) tau-b tests [Christensen, 1996]. Pētījumā kvalitatīvā saistība starp mainīgajiem, balstoties uz korelācijas koeficienta lielumu, tika novērtēta kā vāja, vidēja vai cieša [Krastiņš, 1990].

3. REZULTĀTI

3.1. Vispārējs klīnisko datu raksturojums

Vidējais onihomikozes pacientu vecums bija 55,8 gadi, vidējā SCIO vērtība – 22,56.

Klīniski katram pacientam bija vairāki izmainīti abu kāju nagī, vidēji 2–4, turklāt naga biezuma un krāsas pārmaiņas skāra vairāk nekā 2/3 no naga plātnītes garuma. Nozīmīgākās izmaiņas skāra lielo kāju pirkstu nagus (naga krāsa dzeltenbūna, zaļgana, plātnītes sabiezējums, oniholīze).

27 gadījumos mikroskopija (KOH tests) bija pozitīva. Septiņos gadījumos pacientiem uzsējumā izauga dermatofītu grupas sēnītes, četros gadījumos – rauga sēnītes un trīs gadījumos – pelējuma sēnītes, deviņos gadījumos pacientiem uzsējums netika veikts, bet septiņos gadījumos uzsējums izrādījās negatīvs.

3.2. Morfoloģijas dati

3.2.1. Rutīnas histoloģijas dati

Gandrīz visos preparātos bija labi redzamas visas trīs naga vienības struktūras: naga plātnīte, gultne un saistaudi (sk. pielikuma tabulu).

Tādējādi, izvērtējot pagatavoto preparātu pārskata griezumus, 18 onihomikozes gadījumos redzējām raga slāņa jeb naga plātnītes sabiezēšanu, kā arī vairākus (14) epidermas graudainā slāņa hipertrofijas fragmentus līdz 5–8 šūnu rindām (sk. 1. att.). 12 gadījumos vēroja normogranulozi, un četros gadījumos granulozais epitēlija slānis bija pat reducēts. 29 preparātos naga

plātnītes virspusējā un dziļākā slānī tika atrasti dažāda izmēra un formas parakeratozes perēkļi. Kopumā parakeratozi varēja novērtēt kā sīkperēkļainu 19 gadījumos, bet lielperēkļainu – 10 gadījumos. Parakeratozes fragmenti lielākoties bija atrodamī kombinācijā ar homogēnas, eozinofilas masas ieslēgumiem (sk. 2. att.). 11 preparātos šos ieslēgumus varēja raksturot kā sīkperēkļainus, bet 10 preparātos – kā lielperēkļainus.

Naga plātnītes parakeratozes fokusos vēroja ne tikai amorfos eozinofilos ieslēgumus, bet vairākos preparātos redzēja arī sēnīšu mikroorganismu elementus kā punktveida, homogēnas, bazofilas struktūras. Atsevišķos preparātos redzēja izteiktu naga gultnes atrofiju.

1. attēls. Onihomikozes skarta naga gultnes šūnu hipertrofija, perēkļaina graudainā slāņa hiperplāzija. H/E, $\times 200$

2.attēls. Onihomikozes skartā naga plātnīte. Parakeratozes perēklis ar multipliem ieapaļas formas homogēniem, acidofiliem ieslēgumiem. H/E, $\times 200$

Akantoze bija vērojama tikai astoņos gadījumos, turklāt gan PAS pozitīvos, gan PAS negatīvos preparātos. Lielākajā daļā gadījumu akantoze bija lielperēkļaina.

Onihomikozes skarta naga gultnes šūnām redzēja arī vakuolāru jeb deģeneratīvu bojājumu un pericelulāru tūsku. Vakuolārs bojājums bija izteikts 16 gadījumos, bet pericelulāra tūska – 22 gadījumos.

Salīdzinājumā ar kontroles grupas preparātiem onihomikozes skarto nagu saistaudu daļā vēroja asinsvadu hiperplāziju, tūsku, lielperēkļainu, kā arī

dažos gadījumos difūzu iekaisuma šūnu (limfocītu, plazmocītu, makrofāgu) infiltrāciju. Dažos preparātos subepidermāli redzēja arī neoangioģenēzi. Kolagēnās šķiedras 12 gadījumos bija hipertrofiskas, bet sešos gadījumos – atrofiskas. Fibrocītu daudzums vienā redzes laukā variēja no 30 līdz 120.

Kontroles grupas nagos plātnītes sabiezēšanu, hipergranulozi vai akantozi nenovēroja. Amorfas vielas ieslēgumi netika atrasti. Granulozais slānis vienā gadījuma bija hipotrofisks, bet pārējos gadījumos – normotrofisks. Trīs gadījumos redzēja gultnes šūnu deģeneratīvu bojājumu, un vienā preparātā bija arī pericelulāra tūska. Dermā vēroja retus, difūzi izsētus makrofāgus, redzēja retus, maza izmēra asinsvadus. Kopumā derma bija bez iekaisuma pazīmēm. Dermal kolagēnās šķiedras varēja raksturot kā normotrofiskas. Fibrocītu daudzums variēja no 35 līdz 50 redzes laukā. Asinsvadi netika konstatēti.

Salīdzinājumā ar kontroles grupas nagiem onihomikozes skartos nagos **statistiski ticami** vairāk ir izteikta **parakeratoze** ($p = 0,000$), **ieslēgumu daudzums** ($p = 0,008$), **PAS pozitivitāte** ($p = 0,000$), **vaskularizācija** ($p = 0,001$), kā arī ir ievērojami lielāks **fibrocītu daudzums** ($p = 0,015$).

3.2.2. Periodiskās skābes *Shiff* reakcijas dati

Kopumā PAS reakcija bija pozitīva 24 gadījumos. No tiem 21 preparātā naga plātnītē bija redzamas apaļīgas, homogēnas, eozinofilas PAS pozitīvas struktūras, apkārt vairākiem PAS pozitīviem agregātiem redzēja naga plātnītes parakeratozes fragmentus. Negatīvas PAS reakcijas gadījumā ieslēgumus nenovēroja.

Visos PAS pozitīvos preparātos redzēja iegarenas formas sēnīšu kolonijas. Vairākos preparātos vienā redzes laukā novēroja gan diegveida sēnīšu kolonijas, gan arī homogēnos, apaļīgos PAS pozitīvos elementus,

visticamāk, sporas, turklāt sēnīšu elementi bija dažādās attīstības stadijās: sporas un hifas (sk. 3. att.).

Kontroles naga plātnītē PAS pozitīvos elementus nekonstatēja, gultne arī bija bez redzamas morfolopatoloģijas (sk. 4. att.).

3.attēls. Onihomikozes skartā naga plātnītē redzamas multiplas ieapaļas uzbūves PAS pozitīvas homogēnas sporas un hifas dažādās attīstības fāzēs.PAS, $\times 250$

4.attēls. Kontroles naga gultne ar perēkļainu akantozi. Subepiteliālos audos reti limfocīti un makrofāgi. H/E, $\times 100$

3.3. Adu iekaisuma un remodelācijas marķieru dati

Reakcijas intensitāte dažādos preparātos variēja, tomēr lielākajā daļā preparātu vēroja izteiktu krāsojuma intensitāti.

Kopējie rezultāti atklāja galveno iekaisuma procesu norisi onihomikozes skarto nagu gultnē un dermas saistaudu daļā, kamēr kontroles nagu grupā pozitīvas reakcijas vēroja pārsvarā tikai naga gultnes daļā.

Izteikti pozitīvas reakcijas onihomikozes skarto nagu preparātos vēroja IL-6, IL-10 un MMP-2 gadījumos.

Reakcijās uz VEGF un PGP9,5 lielas atšķirības starp onihomikozes skarto un kontroles nagu grupu neredzēja.

Datu apkopojumu par visām reakcijām onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos var apskatīt 3.1. tabulā.

Citokīnu, deģenerācijas enzīmu, asinsrites un intervāciju raksturojošo faktoru relatīvā daudzuma pārskats onihomikozes skartos un kontroles nagos

Reakcija	Onihomikozes skarti nagi (n = 30)			Kontroles grupas nagi (n = 5)		
	Gultne	Saistaudi	Plātnīte	Gultne	Saistaudi	Plātnīte
IL-1	0	0	0	+ / ++	0 / +	0 / +
IL-6	++ / +++	+ / ++	+	+	0 / +	0 / +
IL-10	+ / ++	+	+	++	+	0 / +
MMP-2	+ / ++	+ / ++	+	+	0	0 / +
VEGF		+			0	
PGP9,5	+	+	0	+ / ++	+	0 / +

Apzīmējumi: 0 – redzes laukā nav nevienas pozitīvas struktūras; 0 / + – redzes laukā retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā maz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā vidēji daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā daudz pozitīvu struktūru

Saīsinājumi: IL-1 –interleikīns-1; IL-6 – interleikīns-6; IL-10 – interleikīns-10; MMP-2 – matricē metaloproteināze-2; VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors; PGP9,5 – proteīna gēna produkts 9,5

3.3.1. Interleikīns-1

IL-1 netika konstatēts onihomikozes nagu grupā nevienā no naga vienības daļām (sk. 5. att.). Kontroles grupā maz līdz vidēji daudz IL-1pozitīvo struktūru tika atrastas naga gultnē, bet saistaudos un naga plātnītē konstatēja tikai dažas pozitīvas struktūras redzes laukā (sk. 6. att.).

Abi testi apstiprināja, ka onihomikozes skartā naga gultnē ($p = 0,000$) un saistaudos ($p = 0,002$) esošo pozitīvo struktūru daudzuma starpības, salīdzinot ar to daudzumu kontroles nagos, **ir statistiski atšķirīgas**. Tomēr IL-1 pozitīvas struktūras tika atrastas tikai kontroles grupas nagos.

5.attēls. IL-1 pozitīvu struktūru trūkums onihomikozes skarta naga gultnes un plātnītes audos. IL-1, IMH, $\times 200$

6. attēls. Maz līdz vidēji daudz IL-1 pozitīvu epiteliocītu kontroles naga gultnes audos. IL-1, IMH, $\times 100$

3.3.2. Interleikīns-6

IL-6 saturošas šūnas onihomikozes skartos nagos tika atrastas nozīmīgā daudzumā. Gultnē konstatēja vidēji daudz līdz daudz IL-6 pozitīvo struktūru redzes laukā. Saistaudos redzēja maz līdz vidēji daudz pozitīvo struktūru (izteikti pozitīvas struktūras bija redzamas dermas asinsvadu sienīņās), bet naga plātnītes daļā konstatēja maz pozitīvu struktūru (sk. 7. att.).

Kontroles grupas nagiem maz IL-6 pozitīvo struktūru tika atrastas gultnes audos, pārsvarā fokālu perēkļu veidā, bet saistaudu un plātnītes daļā redzēja tikai dažas pozitīvas struktūras redzes laukā.

Abi statistiskie testi apstiprināja, ka onihomikozes skartā naga saistaudos esošo pozitīvo struktūru daudzuma starpības ($p = 0,010$), salīdzinot ar to daudzumu kontroles nagos, **ir statistiski atšķirīgas**.

3.3.3. Interleikīns-10

Kopumā maz līdz vidēji daudz IL-10 pozitīvo struktūru onihomikozes skartos nagos atrada gultnes audos, dažos preparātos redzēja pat lielu daudzumu IL-10 pozitīvo struktūru redzes laukā. Vienlaikus dažos preparātos vēroja arī totālu onihomikozes skarta naga gultnes šūnu IL-10 pozitīvu citoplazmas reakciju (sk. 8. att.). Saistaudos un naga plātnītē IL-10 konstatēja mazos daudzumos.

Kontroles grupas nagos IL-10 imūnreaktīvās struktūras gultnes audos tika atrastas maz līdz vidēji daudz, saistaudos – maz, bet naga plātnītē redzēja tikai dažas pozitīvas struktūras.

Statistiski nozīmīga atšķirība tika atrasta tikai Manna–Vitnija testa gadījumā naga gultnē ($p = 0,021$). Tātad kopumā **nevar apgalvot, ka starp kontroles un eksperimenta grupu pastāv atšķirība.**

7.attēls. Viss onihomikozes skarta naga gultnes epitēlijs, kā arī lielākā daļa dermas saistaudu šūnu ekspresē IL-6. IL-6 pozitīvas saistaudu šūnas veido arī perivaskulārus infiltrātus (→). IL-6, IMH, $\times 100$

8.attēls. Izteikti IL-10 pozitīvs naga gultnes epitēlijs. IL-10, IMH, $\times 200$

3.3.4. Matrices metaloproteināze-2

MMP-2 onihomikozes skartos nagos tika konstatēta maz līdz vidēji daudz struktūrās naga gultnē un saistaudos (ļoti daudz struktūrās to konstatēja ādas derivātos un asinsvadu sienīņā). Plātnītē šādas struktūras konstatēja variablā skaitā.

Kontroles grupas nagos gultnē MMP-2 redzēja maz struktūrās, saistaudos enzīms vispār netika konstatēts, bet naga plātnītē to gandrīz neatrada, izņemot tikai dažas pozitīvas struktūras.

Statistiski nozīmīga atšķirība starp MMP-2 pozitīvo struktūru daudzumu onihomikozes skarto un kontroles grupas nagu audos (gultne, saistaudi, plātnīte) abu testu gadījumā tika **atrasta tikai naga saistaudos** ($p = 0,000$).

3.3.5. Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (VEGF) tika apskatīts tikai naga saistaudu daļā. Onihomikozes skartos nagos tika atrasts daudz VEGF pozitīvo struktūru, bet kontroles grupas nagos VEGF pozitīvas struktūras netika atrastas (sk. 9. un 10. att.). Abi statistiskie testi apstiprina, ka **starpība** starp VEGF saturošo struktūru daudzumu onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos **ir statistiski atšķirīga** ($p = 0,010$).

9.attēls. Daudz VEGF pozitīvo šūnu asinsvadu endotēlijā onihomikozes skarta naga saistos. VEGF, IMH, $\times 200$

10.attēls. Naga vienības saistaudu daļas endotēlijs kontroles naga preparātā neuzrāda VEGF. VEGF, IMH, $\times 100$

3.3.6. Neuropeptīdus saturošās inervācijas marķieris PGP9,5

Maz PGP9,5 pozitīvu struktūru onihomikozes skartos nagos tika atrastas naga gultnes un saistaudu daļā. Tomēr dažos preparātos vēroja arī vidēji daudz līdz daudz PGP9,5 pozitīvu struktūru. Savukārt naga plātnītē tās netika konstatētas.

Kontroles grupas nagos maz līdz vidēji daudz PGP9,5 pozitīvu struktūru tika atrastas naga gultnē. Saistos PGP9,5 tika konstatēts mazā struktūru daudzumā, bet naga plātnītē redzēja tikai dažas pozitīvas struktūras.

PGP9,5 pozitīvu struktūru daudzuma ziņā naga **gultnē** pēc Manna–Vitnija testa starpība bija statistiski nozīmīga pie 5% ticamības līmeņa ($p = 0,021$), tomēr pēc Kologorova–Smirnova testa šī starpība bija **statistiski nozīmīga tikai pie 10% ticamības līmeņa**. Naga saistos un naga plātnītē novēroto struktūru daudzums **nebija statistiski atšķirīgs**. Tas nozīmē, ka, visticamāk, PGP9,5 gadījumā statistiskā atšķirība starp onihomikozes skarto nagu un kontroles grupas nagu nav atrodama.

3.3.7. Apoptoze

Analizējot apoptotisko šūnu skaitu naga gultnes audos, tika konstatēts, ka onihomikozes skartos nagos AI vidēji bija 49%, bet kontroles grupas nagos – 18% (sk. 11. un 12. att.). Onihomikozes pacientu grupā AI bija 12–79% apoptotisko šūnu redzes laukā. Kontroles grupā vēroja 11–27% apoptotisko šūnu redzes laukā.

11. attēls. Izteikti daudz apoptotisko keratinocītu onihomikozes skarta naga gultnes audos (AI=71). TUNEL, $\times 250$

12. attēls. Maz (<15%) apoptotisko šūnu kontroles grupas naga gultnes audos. TUNEL, $\times 200$

Abi statistiskie testi apstiprināja, ka starpība starp apoptotisko šūnu daudzumu onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos **ir statistiski atšķirīga** ($p = 0,005$). Tas nozīmē, ka apoptozes procesi ir vairāk izteikti onihomikozes skartos nagos.

3.4. Dati par antimikrobiem peptīdiem

Reakcijas intensitāte dažādos preparātos variēja, tomēr lielākajā preparātu daļā vēroja izteiktu krāsas intensitāti.

Kopējie rezultāti atklāja pārliecinošu hBD-2 daudzumu onihomikozes skartos nagos salīdzinājumā ar šī defensīna daudzumu kontroles grupas nagos.

Visvairāk hBD-2 pozitīvo struktūru tika atrasts tieši onihomikozes skarto nagu gultnes un saistaudu daļā, tomēr arī plātnītē tas tika konstatēts nelielā struktūru daudzumā. Kontroles grupas nagos hBD-2 tika atrasts gan gultnes, gan arī plātnītes daļā, taču nelielā struktūru skaitā.

hBD-3 tika atrasts gan onihomikozes skartos, gan kontroles grupas nagos, tomēr tikai ļoti retās pozitīvās struktūrās.

Tikai retas hBD-4 pozitīvas struktūras tika atrastas onihomikozes skarto nagu gultnes daļā. Kontroles grupā hBD-4 netika konstatēts.

Datu apkopojumu par visām reakcijām onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos var apskatīt 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Beta defensīnu klātbūtne onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos

Defensīns	Onihomikozes skarti nagi (n = 30)			Kontroles grupas nagi (n = 5)		
	Gultne	Saistaudi	Plātnīte	Gultne	Saistaudi	Plātnīte
hBD-2	++ / +++	+ / ++	+	0 / +	0	0 / +
hBD-3	0	0 / +	0	0 / +	0	0
hBD-4	0 / +	0	0	0	0	0

Apzīmējumi: 0 – redzes laukā nav nevienas pozitīvas struktūras; 0 / + – redzes laukā retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā maz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā vidēji daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā daudz pozitīvu struktūru

Saīsinājumi: hBD-2 – cilvēka beta defensīns-2; hBD-3 – cilvēka beta defensīns-3; hBD-4 – cilvēka beta defensīns-4

3.4.1. Defensīns-2

Defensīns-2 tika atrasts daudz onihomikozes skartu nagu struktūrās gultnes un saistaudu daļā. Gultnē tās tika atrastas vidēji daudz līdz daudz, bet

saistaudu daļā – maz līdz vidēji daudz (sk. att. 13.). Naga plātnītes daļā tās konstatēja maz struktūrās.

Kontroles grupas nagos redzēja tikai dažas defensīnu-2 pozitīvas struktūras redzes laukā naga plātnītes un gultnes daļā. Saistaudos defensīns-2 netika konstatēts (sk. att. 14.).

Attēls 13. Daudz hBD-2 pozitīvu šūnu onihomikozes skarta naga gultnē un vidēji daudz hBD-2 pozitīvu šūnu naga vienības saistaudu daļā. hBD-2, IMH, x 200

Attēls 14. Vājas intensitātes, vietām, vidējās intensitātes krāsoti hBD-2 saturoši keratinocīti kontroles naga gultnes virspusējos slāņos. hBD-2, x 200

Abi statistiskie testi ļāva **pierādīt statistiski nozīmīgu atšķirību** starp onihomikozes skarto nagu un kontroles nagu **gultnes** ($p = 0,001$) un **saistaudu** ($p = 0,006$) pozitīvu struktūru daudzumu. Tas nozīmē, ka hBD-2 pārliecinoši lielākā daudzumā atrod onihomikozes skartos nagos (salīdzinājumā ar kontroles grupas nagiem).

3.4.2. Defensīns-3

Retas defensīna-3 pozitīvas struktūras tika atrastas onihomikozes skarto nagu saistaudu daļā, bet gultnē un naga plātnītē tās netika atrastas.

Kontroles grupas nagos dažas defensīna-3 pozitīvas struktūras tika atrastas naga gultnes daļā, bet saistaudos un naga plātnītē tās netika atrastas.

Abi statistiskie testi uzrāda, ka nulles hipotēzi par rādītāju atšķirību eksperimenta un kontroles grupās var noraidīt, t. i., nevar apgalvot, ka onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos ir dažāds novērojamo struktūru daudzums (**statistiska atšķirība netika atrasta**).

3.4.3. Defensīns-4

Defensīns-4 netika konstatēts ne onihomikozes skartos nagos, ne arī kontroles grupas nagos.

Abi statistiskie testi uzrāda, ka nulles hipotēzi par rādītāju atšķirību eksperimenta un kontroles grupā var noraidīt, t. i., nevar apgalvot, ka onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos ir dažāds novērojamo struktūru daudzums (**statistiska atšķirība netika atrasta**).

3.5. Datu statistiskās korelācijas

Tā kā mainīgie, starp kuriem tiek meklētas sakarības, neatbilst normālam sadalījumam, tad tika izmantots neparametriskais tests – Kendela tau-b tests, lai pārbaudītu, vai starp diviem mainīgiem pastāv statistiska sakarība. Ar šo testu tika novērtēta rangu korelācija. Savukārt Spīrmena korelācijas tests tika veikts datu kontrolei.

Tātad pētījumā tika atrastas šādas korelācijas:

- 1) **cieša, pozitīva korelācija** starp PAS reakcijas pozitivitāti un ieslēgumu atradi onihomikozes skartos nagos;
- 2) **vāja, pozitīva korelācija** starp citokīna IL-10 daudzumu onihomikozes skarto saistaudu daļā un pacientu vecumu;

- 3) **vāja līdz vidēji cieša, bet negatīva korelācija** starp onihomikozes smagumu un hBD-2 saturošo struktūru daudzumu naga vienības saistaudu daļā;
- 4) **vāja, negatīva korelācija** starp hipertrofiju un akantozi onihomikozes skartā nagā.

4. DISKUSIJA

Jāuzsver, ka literatūrā nebija pieejami dati par līdzīgiem pētījumiem, kur būtu aprakstīti onihomikozes skarto nagu dažādu faktoru imūnhistoķīmisko izmeklējumu rezultāti. Ir vairāki darbi par mikožu radītām izmaiņām audos, lielākoties darbi par mikozēm HIV vai imūnsupresētiem pacientiem un darbi veterinārajā medicīnā [Mitchell, 2007; Nishikaku, 2009; Yuan, 2009; Marangon, 2009; Villar, 2012]. Ir atrodami daži pētījumi par defensīnu atradi dzīvnieku nagos un mikožu skartā ādā.

Šajā pētījumā noskaidrojām, ka no 30 onihomikozes pacientiem septiņiem pacientiem slimības ierosinātājs bija dermatofīts, četros gadījumos – raugveida sēnītes un trīs gadījumos – pelējuma sēnītes. Kopumā 14 gadījumos no 30 bija izdevies noskaidrot precīzu slimības ierosinātāju. 16 gadījumos uzņēmums infekcijas ierosinātāja diagnostikai vai nu nebija veikts, vai arī tas bija negatīvs.

Trychophyton rubrum bija slimības ierosinātājs divos gadījumos, bet vēl piecos gadījumos tas bija *Trychophyton spp.* Šie dati saskan ar Igaunijas gadiem par *Trichophyton rubrum* kā biežāko dermatofītu – onihomikozes ierosinātāju [Järv, 2004].

Pētījumā iekļauto onihomikozes pacientu vidējais vecums ir 55,8 gadi. Šajā vecumā nagu ataugšanas ātrums ir ievērojami lēnāks nekā jaunākiem pacientiem [Abdullah, 2011; Baran, 2011]. Novērojot naga plātnītes keratinocīti palielinās izmēros, naga gultnes saistaudu daļa sabiezē, parādās asinsvadu un elastīgo šķiedru deģenerācijas pazīmes [Singh, 2005].

Mūsu pētījumā piedalījās abu dzimumu pārstāvji ar nelielu sieviešu dzimuma pārsvaru. Dažādu autoru domas par dzimumu saistību ar šo slimību ir

atšķirīgas. Vieni uzskata, ka ar onihomikozi vienlīdz bieži slimo gan sievietes, gan vīrieši [Cohen, 1992], citi uzsver sieviešu dzimuma prevalenci [Pires, 2014] vai tieši pretēji – vīriešu īpatsvaru [Lone, 2013].

Mūsu pētījuma pacientu vidējā SCIO indeksa vērtība ir 22,56, kas nozīmē, ka nepieciešama ilgstoša sistēmiska terapija, un liecina par smagu onihomikozes klīnisko formu. Visbiežākā onihomikozes forma pētījuma pacientiem ir bijusi distāli laterālā. Liela SCIO vērtība parāda arī to, ka pārsvarā visiem pacientiem ir bijusi izteikta zemnaga hiperkeratoze, kas prasa papildus speciālu pieeju terapijai (keratolītiķi vai regulāras ārstnieciskā pedikīra procedūras). Spriežot pēc publikācijām, arī citi autori ir izmantojuši SCIO savos pētījumos, lai iedalītu pacientus pa grupām un novērtētu izārstēšanos [Sumikawa, 2007; Kawai, 2014].

Kā apstiprinošā onihomikozes diagnostika mūsu pētījumā tika pielietota naga biopsija jeb tā saucamā “*punch*” biopsija, kas pierādīja sevi kā precīza un galvenais droša metode onihomikozes diagnostikai. Tika analizēti specifiskā PAS krāsojuma rezultāti visiem nagu preparātiem. No 30 onihomikozes gadījumiem PAS reakcija bija pozitīva 24 gadījumos, t. i., 80%. Jāpiebilst, ka visos gadījumos, kad PAS reakcija bija pozitīva, kā blakus pozitīva atrade bija arī ieslēgumi naga plātnītē un parakeratoze krāsojumā ar hematoksilīnu / eozīnu. Jāuzsver, ka visos gadījumos naga biopsijas vieta pacientiem sadzījusī labi, bez blaknēm. Pēc pacientu vārdiem, viņi juta diskomfortu tikai pirmās dienas pēc procedūras, dažiem novēroja asiņošanu no brūces manipulācijas dienā. Šie dati saskan ar vairākiem literatūras avotiem, kas pamato biopsijas nepieciešamību pie onihomikozes izteiktas klīnikas, bet pie negatīviem mikroskopijas un / vai uzsējumu rezultātiem [Karimzadegan-Nia, 2007; Barber, 2009; Moreno-Coutiño, 2010].

Kopumā pozitīva un cieša korelācija pastāv tieši starp ieslēgumu daudzumu onihomikozes skarto nagu plātnītē un PAS reakcijas pozitivitāti. Jāsecina, ka gadījumos, kad PAS reakcija ir negatīva, bet tomēr redz ieslēgumus, tāpat jādomā par onihomikozes diagnozi pacientam (iespējams, tā bijusi jau iepriekš ārstēta slimība).

Mēs, līdzīgi kā citi autori [Stewart, 2012; André, 2013], pozitīvās PAS reakcijas gadījumā konstatējām sēņu elementus dažādās attīstības stadijās. Bija redzamas gan hifas, gan arī sporas. Pārsvārā šos elementus vēro naga plātnītes virspusējā daļā.

Precīzi slimības ierosinātāju var noteikt tikai ar kultūras metodi, tomēr pēc sēņu elementu vizuālām pazīmēm var aptuveni noteikt slimības ierosinātāja grupu. Regulāras, taisnas, septētas hifas ar tendenci novietoties paralēli naga plātnītes virsmai ir raksturīgas dermatofītiem, bet mazas, apaļīgas sporas, pseidohifas un īsi filamenti ir raksturīgi raugveida sēnītēm. Tiek uzskatīts, ka sporas bez pseidohifām ir piesārņotājs un ka tās nevar patstāvīgi ierosināt onihomikozi. Saīsinātas sporas un neregulāras hifas, no kurām atiet sīki, īsi filamenti, vairāk ir raksturīgas pelējumu infekcijai [André, 2013].

Šajā pētījumā mēs nenovērtējām sporu vizuālo izskatu katrā konkrētajā gadījumā, kā arī mums nebija precīzu datu par slimības ierosinātājiem katrā no 30 onihomikozes gadījumiem. Tomēr tas varētu būt jauns, interesants pētījumu virziens nākotnē.

Novērtējot onihomikozes skarto nagu morfoloģiju, tika apskatīti preparāti, kas bija nokrāsoti ar hematoksilīnu / eozīnu, kā arī PAS. Vairākos preparātos ieslēgumus varēja labāk novērtēt tieši PAS reakcijā. Mūsu pētījumā statistiski ticami pierādīts, ka onihomikozes skartos nagos salīdzinājumā ar kontroles grupas nagiem ir ievērojami vairāk izteikta naga plātnītes

parakeratoze, ieslēgumu daudzums naga plātnītē, pericelulāra tūska naga gultnes šūnās, kā arī vaskularizācija un fibrocītu daudzums dermas daļā. Onihomikozes skartos nagos 18 preparātos tika atrasta naga plātnītes hiperkeratoze. Novērtējot onihomikozes skarto nagu gultni, var teikt, ka lielākajā preparātu daļā ir gultnes epitēlija granuloze, pusei preparātu redz sīkperēkļainu epitēlija vakuolāru bojājumu, 22 preparātos redz pericelulāru tūsku. Dermai ir izteikta normotrofisko un hipertrofisko kolagēno šķiedru un sīko asinsvadu klātbūtne. Fibrocītu daudzums dermā variē no 30 līdz 120 šūnām redzes laukā.

Mūsu pētījuma dati par pārragošanās traucējumiem patogēno sēnīšu skartā nagā pilnībā saskan ar Jensena publicētiem datiem par dermatofītu radītām izmaiņām gludā ādā. Gandrīz katrā preparātā redzēja parakeratozes perēkļus ar sēņu elementu ieslēgumiem tajos [Jensen, 2007].

Par onihomikozes skarto nagu morfoloģiju nav daudz publikāciju, toties esošie dati liecina par citu autoru atrades līdzīgumu. Histoloģiskās pārmaiņas onihomikozes gadījumā visbiežāk raksturo kā psoriaziformas, kam izteikta naga gultnes epitēlija hiperplāzija, neitrofilo leukocītu ekzocitoze, šūnu spongioze un parakeratoze [André, 2013; Martin, 2013].

Mūsu pētījumā gandrīz visos onihomikozes gadījumos tika novērota *stratum corneum* sabiezēšana, ko varētu uzskatīt par pirmo un svarīgāko audu aizsargreakciju onihomikozes gadījumā.

Slimības smaguma pakāpi un progresiju nosaka divi imūnās sistēmas aspekti: ātrā tipa alerģiska reakcija un aizkavēta tipa hipersensitivitātes reakcija [Zahur, 2014]. Faktori, kas nosaka sēņu invāzijas iznākumu, ir Langerhansa šūnu realizētā antigēna prezentācija un efektoršūnu akumulācija. Citotīnu

produkcija pastiprina neitrofīlo leukocītu darbību, aktivē keratinocītus ekspresēt HLA-DR un izstrādāt vēl vairāk citokīnus, piemēram, IL-1 [Hay, 1992].

Sistēmiskās sēņu infekcijas gadījumā uzsvērtā tieši IL-1 nozīme imunoloģiskās atbildes veidošanā pret sēņu mikroorganismiem. Ir pierādīts, ka sistēmiskās sēņu infekcijas gadījumā IL-1 paaugstina T šūnu diferenciēšanos par Th17 [Wüthrich, 2013]. Kampos (*Campos*) un līdzautori uzsver tieši TNFα un IL-10 paaugstināšanos audos *Trichophyton rubrum* infekcijas gadījumā [Campos, 2006].

Literatūrā nebija rodami dati par IL-1 klātbūtni onihomikozes skartos nagos. Tomēr bija dati, kas liecina par IL-1β un IL-6 daudzuma palielināšanos audos sēņu izcelsmes keratīta gadījumā [Zhong, 2009], kā arī monocītu veiktu pastiprinātu IL-1, IL-6 un IL-10 produkciju asinīs *Paracoccidioides brasiliensis* infekcijas gadījumā [Kurokawa, 2007]. *Candida* infekcijas sakarā tiek minēta arī komplementa aktivācijas fragmenta C5a svarīgā loma. Šis aktivācijas fragments veidojas kā atbildes reakcija uz *Candida* infekciju un ierosina šūnu atbildi ar IL-6 un IL-1 β citokīnu starpniecību [Zipfel, 2012].

Mūsu pētījumā IL-1 nebija atrodams onihomikozes skartos nagos nevienā no apskatītajām naga vienības struktūrām. Kontroles grupas nagos IL-1 pozitīvās struktūras bija maz līdz vidēji daudz naga gultnē, kā arī retas pozitīvas struktūras bija redzamas veselo nagu saistaudu un plātnītes daļā. Šāda mūsu atrade norāda uz to, ka IL-1, kurš ir viens no visaktīvākajiem proiekaisuma rādītājiem [Gabay, 2010; Weber, 2010], naga onihomikozes gadījumā nav par tādu uzskatāms.

Toties IL-6 mūsu pētījumā tika atrasts ļoti lielā struktūru daudzumā tieši onihomikozes skarto nagu gultnes un saistaudu daļā, savukārt plātnītē bija

redzamas maz IL-6 pozitīvo struktūru. Kontroles nagos IL-6 konstatējām mazos daudzumos visās naga vienības daļās. IL-6 klātbūtne naga gultnē un asinsvados liecina par aktīvu organisma imūnās sistēmas līdzdalību cīņā ar sēnīšu infekciju. Patogēno mikroorganismu izraisīts audu bojājums rada tūlītēju IL-6 sintēzi [Heinrich, 2003]. Tādējādi IL-6 raksturojams kā viens no aktīvākajiem proinflammatorajiem citokīniem cilvēka organismā, ko sintezē aktivizētie monocīti, makrofāgi, T-limfocīti, endoteliocīti un arī fibroblasti.

IL-10 pozitīvas struktūras onihomikozes skartos nagos maz līdz vidēji daudz tika atrastas naga gultnes audos, dažos preparātos vēroja ļoti lielu IL-10 pozitīvo struktūru daudzumu redzes laukā līdz pat totālai gultnes šūnu citoplazmas reakcijai. Naga saistaudos un plātnītē IL-10 arī bija, bet maz struktūrās. Kontroles grupas nagu gultnē un saistaudos IL-10 tika atrasts maz līdz vidēji daudz, bet plātnītē vēroja tikai dažas pozitīvas struktūras. IL-10 vairumā gadījumu ir citokīns, kas darbojas pret iekaisumu [Zdanov, 1995; Ouyang, 2011]. Pieļaujam, ka mūsu onihomikozes pacientiem tas ir viens no galvenajiem naga pretestības rādītājiem.

Tādējādi mūsu pētījuma dati tikai daļēji saskan ar Žong (*Zhong*) un citu autoru darbu rezultātiem par iekaisuma citokīnu atradi audos pie mikotiskās infekcijas. Onihomikozes skarto nagu gadījumā nepārprotami liela iekaisuma citokīnu produkcija novērojama nagu gultnē, kur pārliecinošu īpatnību veido IL-6 un IL-10.

Viens no svarīgākajiem audu restrukturizācijas komponentiem ir matricas metaloproteināzes. MMP-2 kopā ar MMP-9 degradē IV tipa kolagēnu, kas visvairāk atrodas saistaudu pamatvielā [McCawley, 2001].

Matricas metaloproteināzes, specifiski audu proteolītiski fermenti, tiek plaši pētīti sakarā ar mikotiskām infekcijām. Diemžēl nebija atrodams neviens darbs, kurā būtu apskatīts audu restrukturizācijas jautājums tieši onihomikozes

gadījumā, toties veterinārajā medicīnā aktuāls ir mikotiskais radzenes iekaisums. Vairāki autori mikotisko radzenes audu bojājumu gadījumā min tieši MMP-2 un MMP-9 nozīmi [Mitchell, 2007; Boveland, 2010; Pärnänen, 2010].

Mūsu pētījumā tika apskatīta tikai MMP-2 atrade audos un konstatēts, ka onihomikozes skartos nagos salīdzinājumā ar kontroles grupas nagiem šo proteolītisko enzīmu atrod pārliecinoši vairāk. Onihomikozes skarta naga gultnē un saistaudu daļā bija konstatējamas maz līdz vidēji daudz MMP-2, plātnītes daļā – maz MMP-2 pozitīvo struktūru. Kontroles grupas nagos MMP-2 gultnē bija maz šūnās, bet saistaudos un plātnītē gandrīz nebija. Tādējādi mūsu MMP-2 atrade onihomikozes skartos nagos līdzinās citu autoru domām par intensīviem restrukturizācijas procesiem patogēno sēnīšu skartos audos.

Ja audos ir hronisks iekaisums, tad vēro asinsvadu gultnes izmaiņas, un šajā procesā ir iesaistīti gan citokīni (IL-6 un IL-10) un augšanas faktori, gan arī audu MMP. Ir aprakstīta arī MMP loma angiogēnēzes procesā [Sariahmetoglu, 2007].

Par vienu no vaskuloģenēzes rādītājiem min VEGF. Šo augšanas faktoru šūnas izstrādā situācijās, kad audi cieš no skābekļa bada un nepieciešams veidot jaunus asinsvadus [Karkkainen, 2000].

Par asinsvadu gultnes izmaiņām pie onihomikozes nav nekādu datu. Mikotiskās izcelsmes keratīta gadījumā audos strauji pieaug VEGF-A daudzums, tāpēc attīstās progresīva radzenes asinsvadu jaunveidošanās [Yuan, 2009].

Mūsu pētījumā iesaistīto onihomikozes pacientu nagu biopsiju materiālā VEGF tika pētīts naga vienības saistaudu daļā. Veselajos nagos

VEGF nebija atrodams, turpretī onihomikozes skartos nagos atrada maz VEGF pozitīvu struktūru, un tomēr ir pierādījusies statistiska atšķirība starp abām pētījumā iesaistītajām grupām. Šī atrade ļauj pieņemt, ka onihomikozes gadījumā naga saistaudu daļā notiek vaskuloģenēzes procesi.

Lai saprastu, vai onihomikozes izmanītos audos mainās nervu šķiedru daudzums, tika veikts preparātu krāsojumu uz PGP9,5. Neuropeptīdus saturošās inervācijas marķieris 9,5 ir proteīns, kas tiek uzskatīts par galveno neironu un neiroendokrīno šūnu marķieri [Day, 2010].

Mūsu dati liecina, ka statistiski lielas atšķirības PGP9,5 daudzuma ziņā onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos nav. Datu bāzēs nav pieejama informācija par PGP9,5 daudzuma noteikšanu audos pie onihomikozēm un mikožēm vispār. Jādomā, ka onihomikozes gadījumā audu inervācija saglabājas nemainīga.

Par audu restrukturizāciju liecina arī apoptoze. Apoptozes galvenā funkcija ir likvidēt defektīvas, t. i., izmainītas vai inficētas šūnas [Kerr, 2002; Diamantis, 2008]. Atšķirībā no nekrozes apoptozes laikā šūnai ir raksturīga kodola fragmentācija un DNS degradācija [Ramsdale, 2008]. Šī speciālā šūnas nāves signāla pārvadīšana kā atbilde uz mikrobu organismu iedarbību nodrošina svarīgu lomu dažādu infekcijas slimību patogēnēzē.

Diemžēl par apoptozes procesa klātbūtni un izteiktību pie onihomikozes dati nav atrodami, tomēr mikožu sakarā šī tēma ir plaši pētīta.

Pētot *Fusarium oxysporum* infekcijas izpausmes peļu ādā, pozitīvu TUNEL reakciju vēroja keratinocītos, fibroblastos, endoteliālās šūnās, muskuļos un iekaisuma infiltrātā šūnās. Autori šīs izmaiņas audos saista ar sēņu toksisko metabolītu iedarbību [Marangon, 2009].

Zināms, ka *Candida albicans* inducē apoptozi epiteliālās šūnās, tostarp keratinocītos, ar Trojas zirga sistēmas palīdzību. Sākumā šie enzīmi piesaistās pie šūnas virsmas receptoriem, pēc tam tiek endocitēti un tikai tad atbrīvojas no lizosomālām membrānām, palaižot apoptozes procesu šūnā [Wu, 2013].

Ir izpētīts, ka agrīnās apoptotiskās pazīmes pēc *Candida albicans* infekcijas vēro vairāk nekā 50% epiteliālo šūnu, bet vēlīnās apoptotiskās alterācijas vēro tikai 15% šūnu [Villar, 2012].

Šajā pētījumā noteicām apoptotisko šūnu skaitu onihomikozes skarto nagu gultnes daļā. Tika atrasts, ka onihomikozes skartos nagos AI vidēji ir 49%, bet kontroles grupas nagos – 18%. Tas pierāda intensīvu apoptozes procesu norisi onihomikozes skartos nagos salīdzinājumā ar veselajiem nagiem.

Pētot *Candida albicans* ietekmi uz makrofāgiem sēņu infekcijas laikā, tika novērotas agrīnās apoptozes pazīmes, vēlāk par divām stundām – jau nekrozes pazīmes šūnās. Savukārt 24 stundas pēc makrofāgu inkubācijas sākuma peļu peritoneālos dobumos vēroja izteiktu neitrofilo leukocītu daudzuma palielināšanos un IL-10 pieaugumu eksudātā [Gasparoto, 2004].

Iepriekšminētajiem līdzīgus datus ieguvām arī mēs, jo onihomikozes skartos nagos vēroja gan izteiktu IL-10 klātbūtni, gan arī līdztekus lielu daudzumu apoptotisko šūnu. Visvairāk šīs pazīmes bija izteiktas tieši naga gultnē. Programmētās šūnu nāves vizualizācija mūsu pacientu biopātū preparātos liecina par intensīvu defektīvo un nepilnvērtīgo naga gultnītes šūnu likvidācijas procesu.

Kā atbilde uz svešu organismu invāziju cilvēka organisma šūnas izstrādā ne tikai interleikīnus, kas palaiž iekaisuma reakciju, bet arī

antimikrobo peptīdus, kas ir mūsu dabīgās antibiotikas un pasargā organismu no potenciālas inficēšanās.

Līdz šim cilvēka nagos tika atrasti tikai tādi antimikrobie peptīdi kā katelidīni [Dorschner, 2004], turklāt tika pētīti veselie nagi. Plašāki pētījumi par antimikrobo peptīdu izdali pie patogēno sēnīšu infekcijas veikti tikai sakarā ar ādu vai gļotādu [Jensen, 2007; Kawai, 2006]. Interesanti, ka cilvēka antimikrobie peptīdi tika pieminēti arī kā keratinocītu apoptozes regulatori [Chamorro, 2009].

Mūsu pētījumā tika noteikta cilvēka defensīnu -2, -3 un -4 klātbūtne onihomikozes skartos nagos. Pārlicinoši liela atšķirība starp pētāmiem un kontroles grupas nagiem tika iegūta tieši hBD-2. Šo AMP onihomikozes skartos nagos konstatējām ļoti daudz struktūrās gan naga gultnes, gan saistaudu daļā. Kontroles grupas nagos hBD-2 netika novērots.

Līdzīgi kā mūsu pētījumā, tikai dermatofītu skartā ādā, nevis nagos tika atrasts hBD-2. Graudainā un dzeloņainā epidermas slānī bija vērojama ļoti stipra hBD-2 ekspresija [Jensen, 2007]. Ir arī citi dati par peļu defensīna-3 (Mdb3), kas tiek uzskatīts par cilvēku hBD-2 analogu, izdali, tikai pie lipopolisaharīdu stimulācijas. Mdb3 ekspresija tika noteikta ādā un gļotādā, bet lielos daudzumos – mēlē un peļu pēdīņu ādā. Šim AMP tika noteikta plaša spektra aktivitāte, tostarp pret rauga sēnītēm un dermatofītiem [Jiang, 2010].

hBD-3 un hBD-4 gadījumā statistiska atšķirība starp antimikrobo peptīdu daudzumu onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos netika atrasta. Abos gadījumos defensīni nebija atrodami nemaz vai tika atrasti ļoti mazā daudzumā.

Tādējādi mūsu darbs pamato, ka onihomikozes skartā naga vienība būtiski atšķiras no veselas naga plātnītes. Slimības skartos nagos ir izteikta hiperkeratoze, ieslēgumi, ir palielināts germinatīvā slāņa biezums un akantoze, kas liecina tieši par naga pārragošanās traucējumiem. Onihomikozes skarto nagu dermā salīdzinājumā ar veselīgiem nagiem ir vairāk atrodamas hipertrofētās kolagēnās šķiedras un daudz vairāk ir izteikta vaskularizācija. Kopumā varam teikt, ka onihomikozes infekcija nagā izraisa neoangiogēnēzes procesu, bet nerada inervācijas pārmaiņas. Audos vēro izteiktas restrukturizācijas norises un defektīvo šūnu apoptotisko bojāeju. Atbildei uz sēnīšu infekciju audos notiek intensīva citokīnu, īpaši IL-6 un IL-10, produkcija, kā arī dabīgo cilvēka antimikrobo peptīdu hBD-2 izdale.

5. SECINĀJUMI

1. Sievietēm onihomikozi diagnosticē biežāk, turklāt **novecošanās** ir uzskatāma par slimības veicinošu faktoru. Saslimšanas ierosinātāji visbiežāk ir **dermatofiti**, kam seko rauga sēnes, pēdējā vietā atstājot pelējuma sēnītes.
2. Onihomikozes skarto nagu funkcionālajām vienībām visvairāk ir izteikti tieši naga **pārragošanās traucējumi**. Iepriekšminēto pamato pārmaiņas gan nagu gultnes, gan naga plātnītes struktūrās: šūnu hiperplāzija un hipertrofija, naga plātnītes sēņu ieslēgumi (cieša korelācija ieslēgumu diagnostikai ar histoķīmisko diagnostikas metodi – PAS reakciju), parakeratozes perēkļi, izteikta gultnes šūnu deģenerācija, dermas hipertrofētas kolagēnās šķiedras un neoangiogēze.
3. Onihomikozes skarta naga gultnē notiek intensīva cilvēka **antimikrobo peptīdu beta defensīnu-2** izdale, kas nosaka šī proteīna selektīvo līdzdalību minētās slimības patoģenēzes shēmā. Savukārt cilvēka beta defensīns-3 un cilvēka beta defensīns-4 nav saistāmi ar sēņu invāziju cilvēku nagos.
4. Līdzīgā **PGP9,5** nervšķiedru un pozitīvo struktūru atrade onihomikozes skartos un kontroles grupas nagos norāda uz inervācijas iesaistes trūkumu slimības patoģenēzē.
5. **VEGF** saturošo endoteliocītu nelielais skaits naga gultnes audos onihomikozes gadījumā tomēr ir pietiekams perēkļveida neoangiogēzes inducēšanai un audu išēmijas apstiprināšanai, kas norāda uz asinsvadu komponentes iesaisti slimības patoģenēzē naga vienības saistaudu daļā.

6. Maz līdz vidēji daudz **MMP-2** saturošo struktūru atrade onihomikozes skartu nagu gultnē un naga vienības saistaudos liecina par intensīviem restrukturizācijas procesiem patogēno sēnīšu skartos audos.
7. Onihomikozes gadījumā liela atsevišķu specifisku **iekaisuma citokīnu produkcija** notiek tieši nagu gultnē, kur noris visaktīvākie slimības morfoloģiskās izmaiņu procesi. No citokīniem IL-6 ir galvenais onihomikozes pro-inflamatorais, bet IL-10 – galvenais anti-inflamatorais faktors, savukārt IL-1 nav saistāms ar patogēno sēnīšu invāziju nagos.
8. Izteikts un statistiski ticams apoptotisko šūnu pieaugums onihomikozes skartās naga vienībās, īpaši nagu gultnes audos, pamato **programmētās šūnu nāves procesa** intensifikāciju kā kompensācijas mehānismu defektīvo un nepilnvērtīgo šūnu likvidācijai naga funkcionālajā vienībā.
9. **Statistiski ticamas korelācijas** starp onihomikozes smagumu un hBD-2 pozitīvo struktūru daudzumu audos, kā arī starp pacientu vecumu un IL-10 saturošo struktūru daudzumu naga audos pamato **onihomikozes klīniskā novērtējuma indeksu un vecumu** kā imūnās audu atbildes modulētājus / inducētājus tieši šai slimībai.

PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas – raksti (4)

1. **Murashko O.**, Kisis J., Kroica J. Causative agents of onychomycosis in Latvia // Dermatovenerologie, 2009; 54(1): 16–18.
2. **Zaikovska O.**, Kisis J., Pilmane M. Defensins and cytokins in nail unit affected by onychomycosis: a pilot study // Papers on Anthropology XXII, 2013; 225–233.
3. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Ķīsis J. Nagu patomorfoloģiskās pārmaiņas onihomikozes gadījumā // RSU Zinātniskie raksti 2013, 2014; 274.–281.
4. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Kisis J. Morphopathological aspects of healthy nails and nails affected by onychomycosis // Mycoses, 2014; 57(9): 531–536.

Onihomikozes praktisko rekomendāciju izstrāde (1)

Onihomikozes praktiskās rekomendācijas, piedalījies kā līdzautors. Pieņemtas Rīgas Stradiņa universitātes Infektoloģijas un dermatoloģijas katedras sēdē 2014. gada 11. februārī.

Tēzes par pētījuma tēmu Latvijā (7)

1. **Muraško O.**, Ķīsis J. Onihomikoze un D vitamīna daudzums organismā // Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2010, 18.–19. marts: 143.

2. **Muraško O.**, Ķīsis J. Folliculitis mycotica // Baltic journal of dermatology, 2011; (1): 27.
3. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Ķīsis J. Onihomikozes skarta naga imūnhistoķīmiskais izmeklējums // Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2013, 21.–22. marts: 179.
4. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Ķīsis J. Onihomikozes morfoloģiskās diagnostikas metodes // Latvijas ārstu kongress, 2013.
5. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Kīsis J. The presence of antimicrobial peptides in onychomycosis affected nails // Baltic Morphology VII Scientific conference, November 7–9, 2013; 54.
6. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Ķīsis J., Nazarovs J. Iekaisuma un audu remodelācijas procesi onihomikozes skartos nagos // Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2014, 10.–11. aprīlis: 205.
7. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Ķīsis J. *Onihomikozes skartu nagu histoloģisks novērtējums un apasiņošanas un inervācijas īpatnības*. Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2015, 26.–27. marts: 213.

Tēzes par pētījuma tēmu ārzemēs (4)

1. **Murashko O.**, Kīsis J., Kroica J. Causative agents of onychomycosis in Latvia // 6th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium, 2009: 48.
2. **Murasko O.**, Pilmane M., Kīsis J. The morphology of nails affected by onychomycosis and antimicrobial peptides // The abstract book of Baltic Morphology VI, September 22–23, 2011: 33.
3. **Zaikovska O.**, Kīsis J., Pilmane M. Mycosis and psoriasis – similar and different // European Academy of Dermatology and Venereology 21st congress, 2012: 107.

4. **Zaikovska O.**, Pilmane M., Kisis J. Morphology and immunohistochemical examination of nails affected by onychomycosis // European Academy of Dermatology and Venereology 22st congress, 2013: 96.

Uzstāšanās par publikācijas tēmu Latvijā (7)

1. 2010. g. 17. marts – mutiska uzstāšanās ar darbu “*Onikomikozes ierosinātāji Latvijā*” Latvijas dermatovenerologu asociācijas sēdē.
2. 2010. g. 18.–19. marts – stenda referāts “*Onihomikoze un D vitamīna daudzums organismā*” Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konferencē.
3. 2013. g. 21.–22. marts – stenda referāts “*Onihomikozes skarta naga imūnhistohīmiskais izmeklējums*” Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konferencē.
4. 2013. g. 19.–21. septembris – stenda referāts “*Onihomikozes morfoloģiskas diagnostikas metodes*” Latvijas ārstu 7. kongresā.
5. 2013. g. 7.–9. novembris – stenda referāts “*The presence of antimicrobial peptides in onychomycosis affected nails*” Baltic Morphology VII Scientific conference.
6. 2014. g. 10.–11. aprīlis – stenda referāts “*Iekaisuma un audu remodelācijas procesi onihomikozes skartos nagos*” Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konferencē.
7. 2015. g. 26.–27. marts – stenda referāts “*Onihomikozes skartu nagu histoloģisks novērtējums un apasiņošanas un inervācijas īpatnības*” Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konferencē.

Uztāšanās par publikācijas tēmu ārzemēs (4)

1. 2009. g. 23.–26. aprīlis – mutiska uztāšanās ar darbu “*Causative agents of onychomycosis in Latvia*” 6th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium Bukarestē, Rumānijā.
2. 2011. g. 22.–23. septembris – mutiska uztāšanās ar darbu “*The morphology of nails affected by onychomycosis and antimicrobial peptides*” Baltic Morphology VI Tartu, Igaunijā.
3. 2012. g. 27.–30. septembris – mutiska uztāšanās ar darbu “*Mycosis and psoriasis – similar and different*” un *co-chair* simpozijā “Fungal skin and scalp infections” European Academy of Dermatology and Venereology 21. kongresā Prāgā, Čehijā.
4. 2013. g. 2.–6. oktobris – stenda referāts “*Morphology and immunohistochemical examination of nails affected by onychomycosis*” European Academy of Dermatology and Venereology 22. kongresā Stambulā, Turcijā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdullah L., Abbas O. Common nail changes and disorders in older people. Diagnosis and management // Canadian Family Physician, Feb 2011; (57): 2173–2181.
2. André J., Sass U., Richert B., Theunis A. Nail pathology // Clin Dermatol, Sep–Oct 2013; 31(5): 526–539.
3. Baran R. The nail in the elderly // Clin Dermatol, Jan–Feb 2011; 29(1): 54–60.
4. Barber K., Barber J. Onychomycosis: therapy directed by morphology and mycology // Skin Therapy Lett, Jan 2009; 14(1): 1–2.
5. Boveland S. D., Moore P. A., Mysore J., et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases-2 and -9, macrophage inflammatory protein-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2 in normal, purulonecrotic and fungal infected equine corneas // Vet Ophthalmol, Mar 2010; 13(2): 81–90.
6. Campos M. R., Russo M., Gomes E., Almeida S. R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum* // Microbes Infect, Feb 2006; 8(2): 372–379.
7. Chamorro C. I., Weber G., Grönberg A., et al. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes // J Invest dermatol, 2009; 129: 937–944.
8. Cohen J. L., Scher R. K., Pappert A. S. The nail and fungus infections // Elewski B. E., ed. Cutaneous fungal infections. New York: Igaku-Shoin, 1992; 106–123.
9. Christensen R. Analysis of variance. Design and Regression. Applied statistical methods. London, Chapman & Hall, 1996.
10. Day I. N., Thompson R. J. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein // Prog Neurobiol, Mar 2010; 90(3): 327–362.
11. Diamantis A., Magiorkinis E., Sakorafas G. H., Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times // Onkologie, Dec 2008; 31(12): 702–706.
12. Dorschner R., Lopez-Garcia B., et al. Innate immune defense of the nail unit by antimicrobial peptides // J Am Acad Dermatol, Mar 2004; 50(3): 343–348.
13. Faergemann J., Correia O., Nowicki R., Ro B. I. Genetic predisposition-understanding underlying mechanisms of onychomycosis // J Eur Acad Dermatol Venereol, Sep 2005; 19(1): 17–19.
14. Gabay C., Lamacchia C., Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases // Nat Rev Rheumatol, Apr 2010; 6(4): 232–241.
15. Gasparoto T. H., Gaziri L. C., Burger E., et al. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10 // FEMS Immunol Med Microbiol, Oct 1 2004; 42(2): 219–224.
16. Grover C., Nanda S., Reddy B., Chaturvedi K. U. Nail biopsy: assessment of indications and outcome // Dermatol Surg, Feb 2005; 31(2): 190–194.
17. Hamsa A. R., Sherif S. A., Rasha T. A., et al. Dealing with dysmorphic nail problems // Egyptian Dermatology Online Journal, June 2006; 2(1): 4.
18. Hay R. J. Fungal skin infections // Arch Dis Child, Sep 1992; 67(9): 1065–1067.
19. Heinrich P. C., Behrmann I., Haan S., et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation // Biochem J, Aug 15 2003; 374(Pt 1): 1–20.

20. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics // *Am J Clin Pathol*, Jun 1981; 75(6): 816–821.
21. Itoh K., Suzuki K., Bise K., et al. Apoptosis in the basal ganglia of the developing human nervous system // *Acta Neuropathol*, Feb 2001; 101(2): 92–100.
22. Järvi H., Naaber P., Kaur S., et al. Toenail onychomycosis in Estonia // *Mycoses*, Feb 2004; 47(1–2): 57–61.
23. Jiang Y., Wang Y., Wang B., et al. Antifungal activity of recombinant mouse beta-defensin 3 // *Lett Appl Microbiol*, May 2010; 50(5): 468–473.
24. Jensen J. M., Pfeiffer S., Akaki T., et al. Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis // *J Invest Dermatol*, Jul 2007; 127(7): 1720–1727.
25. Karimzadegan-Nia M., Mir-Amin-Mohammadi A., Bouzari N., Firooz A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis // *Australas J Dermatol*, Feb 2007; 48(1): 18–21.
26. Karkkainen M. J., Petrova T. V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis // *Oncogene*, Nov 20 2000; 19(49): 5598–5605.
27. Kawai M., Yamazaki M., Tsuboi R., et al. Human beta-defensin-2, an antimicrobial peptide, is elevated in scales collected from tinea pedis patients // *Int J Dermatol*, Nov 2006; 45(11): 1389–1390.
28. Kerr J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept // *Toxicology*, Dec 27 2002; 181–182.
29. Kurokawa C. S., Araujo J. P. Jr., Soares A. M., et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis* // *Microbiol Immunol*, 2007; 51(4): 421–428.
30. Lai Y., Gallo R. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense // *Clin Immunol*, Apr 2010; 135(1): 1–11.
31. Lillie R. D., Pizzolato P., Donaldson P. T. Nuclear stains with soluble metachrome metal mordant dye lakes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues // *Histochemistry*, Oct 7 1976; 49(1): 23–35.
32. Lone R., Bashir D., Ahmad S., et al. A study on clinico-mycological profile, etiological agents and diagnosis of onychomycosis at a government medical college hospital in kashmir // *J Clin Diagn Res*, Sep 2013; 7(9): 1983–1985.
33. Martin B. Nail histopathology // *Actas Dermosifiliogr*, Sep 2013; 104(7): 564–578.
34. Marangon A. V., Svidzinski T. I., Salci T. P., et al. Metabolic extract of *Fusarium oxysporum* induces histopathologic alterations and apoptosis in the skin of Wistar rats // *Int J Dermatol*, Jul 2009; 48(7): 697–703.
35. McCawley L. J., Matrisian L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! // *Curr Opin Cell Biol*, Oct 2001; 13(5): 534–540.
36. McManus J. F. Periodic acid routine applied to kidney // *Amer J Pathol*, 1948; 24: 643.
37. Mitchell I. D., Brice A. J. Investigations into parametric analysis of data from in vivo micronucleus assays by comparison with non-parametric methods // *Mutat Res*, Jan–Feb 1986; 159(1–2): 139–146.

38. Mitchell B. M., Wu T. G., Chong E. M., et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in experimental corneal injury and fungal keratitis // *Cornea*, Jun 2007; 26(5): 589–593.
39. Moreno-Coutiño G., Toussaint-Caire S., Arenas R. Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis // *Mycoses*, Mar 1 2010; 53(2): 144–147.
40. Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P., et al. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity // *Biomed Pharmacother*, 1998; 52(6): 252–258.
41. Neely J. G., Hartman J. M., Forsen J. W. Jr., Wallace M. S. Tutorials in clinical research: VII. Understanding comparative statistics (contrast) – part B: application of T-test, Mann-Whitney U, and chi-square // *Laryngoscope*, Oct 2003; 113(10): 1719–1725.
42. Nishikaku A. S., Ribeiro L. C., Molina R. F., et al. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection // *Int J Exp Pathol*, Oct 2009; 90(5): 527–537.
43. Ouyang W., Rutz S., Crellin N. K., et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease // *Annu Rev Immunol*, 2011; 29: 71–109.
44. Pärnänen P., Meurman J. H., Sorsa T. The effects of *Candida* proteinases on human proMMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 // *Mycoses*, Jul 2011; 54(4): 325–330.
45. Pilmane M., Shine J., Iismaa T. P. Distribution of galanin immunoreactivity in the bronchi of humans with tuberculosis // *Ann N Y Acad Sci*, Dec 21 1998; 863: 445–449.
46. Pilmane M., Engelis A., Mozgis D. Neuropeptides in colon of children with Hirschprung disease // *International Journal of Surgery in Childhood*, 1999; 7(4): 223–227.
47. Pires C. A., Cruz N. F., Lobato A. M., et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis // *An Bras Dermatol*, Mar–Apr 2014; 89(2): 259–264.
48. Ramsdale M. Programmed cell death in pathogenic fungi // *Biochim Biophys Acta*, Jul 2008; 1783(7): 1369–1380.
49. Rodrigues E. G., Dobroff A. S., Taborda C. P., Travassos L. R. Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides // *An Acad Bras Cienc*, Sep 2009; 81(3): 503–520.
50. Sariahmetoglu M., Crawford B. D., Leon H., et al. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation // *FASEB J*, Aug 2007; 21(10): 2486–2495.
51. Seebacher C., Brasch J., Abeck D., et al. Onychomycosis // *Mycoses*, Jul 2007; 50(4): 321–327.
52. Singh G., Haneef N. S., Uday A. Nail changes and disorders among the elderly // *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, Nov–Dec 2005; 71(6): 386–392.
53. Stewart C. L., Rubin A. I. Update: nail unit dermatopathology // *Dermatol Ther*, Nov–Dec 2012; 25(6): 551–568.
54. Sumikawa M., Egawa T., Honda I., et al. Effects of foot care intervention including nail drilling combined with topical antifungal application in diabetic patients with onychomycosis // *J Dermatol*, Jul 2007; 34(7): 456–464.

55. Szepletowski J. C., Reich A., Pacan P., et al. Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an international onychomycosis-specific questionnaire // *J Eur Acad Dermatol Venereol*, Apr 2007; 21(4): 491–496.
56. Tobin G., Luts A., Sundler F., Ekström J. Peptidergic innervation of the major salivary glands of the ferret // *Peptides*, Jul–Aug 1990; 11(4): 863–867.
57. Villar C. C., Chukwuedum Aniemeke J., Zhao X. R., Huynh-Ba G. Induction of apoptosis in oral epithelial cells by *Candida albicans* // *Mol Oral Microbiol*, Dec 2012; 27(6): 436–448.
58. Weber A., Wasiliew P., Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway // *Sci Signal*, Jan 19 2010; 3(105).
59. Wu H., Downs D., Ghosh K., et al. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism // *FASEB J*, Jun 2013; 27(6): 2132–2144.
60. Wüthrich M., LeBert V., Galles K., et al. Interleukin 1 enhances vaccine-induced antifungal T-helper 17 cells and resistance against *Blastomyces dermatitidis* infection // *J Infect Dis*, Oct 1 2013; 208(7): 1175–1182.
61. Yuan X., Wilhelmus K. R. Corneal neovascularization during experimental fungal keratitis // *Mol Vis*, Sep 29 2009; 15: 1988–1996.
62. Zahur M., Afroz A., Rashid U., Khaliq S. Dermatomycoses: Challenges and Human Immune Responses // *Curr Protein Pept Sci*, May 12 2014.
63. Zdanov A., Schalk-Hihi C., Gustchina A., et al. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma // *Structure*, Jun 15 1995; 3(6): 591–601.
64. Zhong W., Yin H., Xie L. Expression and potential role of major inflammatory cytokines in experimental keratomycosis // *Mol Vis*, Jul 4 2009; 15: 1303–1311.
65. Zipfel P. F., Skerka C. Complement, *Candida*, and cytokines: the role of C5a in host response to fungi // *Eur J Immunol*, Apr 2012; 42(4): 822–825.

Vācu valodā

1. Nenoff P., Paasch U., Handrick W. Infections of finger and toe nails due to fungi and bacteria // *Hautarzt*, Apr 2014; 65(4): 337–348.

Latviešu valodā

1. Krastiņš O. Statistika un ekonometrija. Mācību līdzeklis augstskolām. Rīga, KR centrālā statistikas pārvalde, 1990.

Interneta vietne

Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin – a review. JPCS (1), April–June 2011
www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol1/JPCS_1_05.pdf
[skatīts 3.04.2014.]

PATEICĪBAS

Visdziļākā pateicība manai darba vadītājai profesorei Mārai Pilmanei par lielo darbu, kas tika ieguldīts šī darba tapšanā. Sirsnīgs paldies par zinātniskās domāšanas pamatu ielikšanu, padomiem un atbalstu.

Ļoti pateicos profesoram Jānim Ķīsim, manam otram darba vadītājam, par morālo atbalstu, par palīdzību materiāla savākšanas procesā, kā arī par palīdzību onihomikozes tēmas izvēlē jau pirms vairākiem gadiem.

Liels paldies AAI laborantei Natālijai Morozai par smalko darbu, pagatavojot preparātus no nagu materiāla.

Sirsnīgi pateicos visam AAI kolektīvam par atbalstu un palīdzību.

Vislielākais paldies maniem vecākiem, kas no bērnības atbalstīja vēlmi mācīties un neapstāties pie sasniegtā. Protams, silti vārdi ir sakāmi manam vīram par izturību un daudzām, viņa izdarītām lietām, kas palīdzēja man paveikt šo darbu.

Pielikums. Histoloģijas datu pārskats

P.	Naga plātnīte				Naga gultne				Derma		
	Parakeratoze	Hiperkeratoze	Ieslēgumi	PAS	Granuloze	Akantoze	Vakuolārs boj.	Pericel. tūska	Kolagēnās šķ.	Vaskularizācija	Fibrociņu daudz.
1	2	nav	3	+	normo-	nav	nav	2	normo-	2	70
2	2	ir	3	+	hiper-	nav	2	nav	hiper-	nav	120
3	nav	nav	2	+	normo-	nav	2	2	atrof-	3	100
4	2	ir	3	+	hiper-	nav	nav	nav	hiper-	nav	75
5	3	nav	3	+	hiper-	nav	nav	3	normo-	2	85
6	3	nav	nav	+	hipo-	2	2	2	hiper-	2	60
7	2	nav	nav	+	hiper-	nav	nav	2	hiper-	3	110
8	3	ir	2	+	normo-	nav	nav	2	normo-	3	110
9	2	nav	2	+	hiper-	3	3	3	atrof-	2	60
10	2	ir	nav	—	hiper-	nav	nav	2	normo-	2	70
11	2	nav	nav	+	normo-	3	3	3	atrof-	2	50
12	3	ir	3	+	normo-	nav	nav	nav	normo-	2	80
13	3	nav	nav	—	hiper-	3	3	3	normo-	nav	60
14	2	nav	2	+	normo-	nav	nav	nav	atrof-	3	40
15	2	ir	nav	—	hiper-	nav	nav	3	normo-	3	70
16	2	ir	nav	+	hiper-	nav	2	nav	hiper-	2	50
17	3	ir	3	+	normo-	nav	2	3	normo-	2	70
18	3	ir	2	+	normo-	nav	2	3	atrof-	2	50
19	2	ir	nav	—	hipo-	nav	nav	3	hiper-	3	110
20	2	ir	3	+	hiper-	nav	2	nav	normo-	2	60
21	3	ir	2	+	normo-	nav	nav	3	hiper-	2	80
22	3	nav	2	+	normo-	2	nav	nav	normo-	3	65
23	2	ir	2	+	hiper-	nav	nav	2	atrof-	3	30
24	2	ir	2	+	hipo-	nav	3	2	normo-	2	30
25	2	nav	nav	—	hiper-	3	2	2	normo-	2	80
26	3	nav	2	+	normo-	2	2	nav	hiper-	2	40
27	2	ir	3	+	hiper-	nav	2	3	hiper-	3	80
28	2	ir	3	+	hiper-	nav	2	3	hiper-	2	40
29	2	ir	2	+	normo-	nav	2	3	hiper-	3	120
30	2	ir	3	+	hipo-	4	2	2	hiper-	2	67
1K	nav	nav	nav	—	normo-	nav	2	nav	normo-	nav	50
2K	nav	nav	nav	—	normo-	nav	nav	nav	normo-	nav	45
3K	nav	nav	nav	—	normo-	nav	2	2	normo-	nav	50
4K	nav	nav	nav	—	hipo-	nav	nav	nav	normo-	nav	40
5K	nav	nav	nav	—	normo-	nav	2	nav	normo-	nav	35

Saisinājumi un apzīmējumi: P. – pacienta numurs, boj. – bojājums, pericel. – pericelulāra, šķ. – šķiedras, daudz. – daudzums, 2 – sāpērēklains bojājums, 3 – lielpērēklains bojājums, 4 – totāls bojājums