

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
Katedra i Klinika Pulmonologii, Alergologii
i Onkologii Pulmonologicznej**



lek. med. Agata Nowicka

**Stopień zaawansowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc
a aktywność procesu apoptozy w układzie oddechowym**

Rozprawa doktorska

Promotor:

prof. dr hab. n. med. Halina Batura-Gabryel

Poznań 2012

SPIS TREŚCI

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	5
1. WSTĘP	7
1.1 Definicja POChP	7
1.2 Epidemiologia.....	7
1.3 Rozpoznanie POChP.....	8
1.4 Ocena stopnia klinicznego zaawansowania POChP.....	10
1.5 Patogeneza POChP.....	17
1.5.1 Zmiany patologiczne w POChP- przebudowa dróg oddechowych.....	17
1.5.2 Proces zapalny w drogach oddechowych.....	18
1.5.3 Zaburzenie równowagi między proteinazami i antyproteinazami.....	18
1.5.4 Stres oksydacyjny.....	19
1.6 Apoptoza- znaczenie procesu oraz szlaki regulacyjne.....	20
2. CEL PRACY.....	24
3. MATERIAŁ	25
4. METODY	26
4.1. Badanie ankietowe	26
4.2. Spirometria.....	26
4.3. Bodypletyzmoграфия.....	27
4.4. Pomiar pojemności dyfuzyjnej płuc dla tlenu węgla.....	27
4.5. Gazometria krwi tętniczej.....	27
4.6. Skala BODE	28
4.7. Bronchofiberoskopia.....	29
4.8. Immunofenotypowa ocena składu komórkowego płuc oskrzelowych.....	30
4.9. Ocena procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP.....	31

4.9.1	Określenie odsetka komórek apoptotycznych w popłuczynach oskrzelowych w oparciu o wiązanie aneksyny V.....	31
4.9.2	Pomiar stężenia sFas ligand w popłuczynach oskrzelowych.....	32
4.10	Analiza statystyczna.....	33
5.	WYNIKI.....	36
5.1	Charakterystyka grupy badanej.....	36
5.2	Immunofenotypowa ocena składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych.....	39
5.3	Ocena apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP.....	41
5.3.1	Apoptoza komórek popłuczyn oskrzelowych chorych na POChP oceniana w oparciu o wiązanie aneksyny V.....	41
5.3.1.A	Ocena apoptozy komórek popłuczyn oskrzelowych chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD w oparciu o wiązanie aneksyny V.....	42
5.3.1.C	Ocena apoptozy komórek popłuczyn oskrzelowych chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo w oparciu o wiązanie aneksyny V.....	43
5.3.1.D	Porównania odsetka komórek apoptotycznych w popłuczynach oskrzelowych, ocenianych w oparciu o wiązanie aneksyny V, z innymi badanymi parametrami w grupach chorych na POChP.....	44
5.3.1.E	Korelacje między odsetkiem komórek apoptotycznych w popłuczynach oskrzelowych, ocenianym w oparciu o wiązanie aneksyny V, a wykładnikami stopnia zaawansowania choroby i zaburzeń czynnościowych płuc.....	45
5.3.2	Ocena stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP	45
5.3.2.A	Ocena stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych Chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD	46
5.3.2.B	Ocena stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo.....	47
5.3.2.C	Porównania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych z innymi badanymi parametrami	

w grupach chorych na POChP.....	48
5.3.2.D Korelacje między stężeniem sFasL w płucach oskrzelowych chorych na POChP a wykładnikami stopnia zaawansowania choroby i zaburzeń czynnościowych płuc.....	49
5.4 Próba odpowiedzi na pytanie czy apoptoza jest związana ze stopniem zaawansowania klinicznego POChP poprzez poszukiwanie parametrów świadczących o zaawansowaniu POChP (analiza skupień przeprowadzona metodą aglomeracji oraz metodą grupowania k-średnich).....	49
6. DYSKUSJA.....	55
7. WNIOSKI.....	73
8. STRESZCZENIE.....	74
9. SUMMARY.....	77
10. PIŚMIENNICTWO.....	79
11. ANEKS.....	92
12. SPIS TABEL I RYCIN.....	115

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

\bar{x} - średnia arytmetyczna

6MWT (ang. *6-minute walk test*) - test sześciominutowego chodu

ACD (ang. *anaemia of chronic disease*) – niedokrwistość chorób przewlekłych

Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor 1*) – czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne

BAL (ang. *bronchoalveolar lavage*) - płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe

BALF (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*) – płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego

BMI (ang. *body mass index*)- wskaźnik masy ciała

BOOP (ang. *bronchiolitis obliterans organizing pneumonia*) – zarostowe zapalenie oskrzelików z organizującym się zapaleniem płuc

CRP (ang. *C-reactive protein*) – białko C-reaktywne

DD (ang. *death domain*) - domena śmierci

DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) - kompleks sygnalizacyjny inicjujący śmierć

DLCO (ang. *diffuse lung capacity for carbon monoxide*) - pojemność dyfuzyjna płuc dla tlenku węgla

DR (ang. *death receptor*) – receptor śmierci

FADD (ang. *Fas-associated death domain*) - domena śmierci towarzysząca Fas

FEV1 (ang. *forced expiratory volume in 1 sec*) - natężona objętość wydechowa Pierwszosekundowa

FFM (ang. *fat free mass*) - beztłuszczowa masa ciała

FITC - izotiocyjanian fluoresceiny

FVC (ang. *forced vital capacity*) - natężona pojemność życiowa

GOLD (ang. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) - Światowa Inicjatywa dla Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc

HP (ang. *hypersensitivity pneumonia*) – zapalenie płuc z nadwrażliwości

HRP (ang. *horseradish peroxidase*) - peroksydaza chrzanowa

IC/TLC (ang. *inspiratory capacity/total lung capacity ratio*) – stosunek pojemności wdechowej do całkowitej pojemności płuc

IPF (ang. *idiopathic pulmonary fibrosis*) – idiopatyczne włóknienie płuc

Max – maksimum

Me - mediana

Min - minimum

MMP-7 (ang. *matrix metalloproteinase-7*) – metaloproteinaza macierzy 7

MMRC (ang. *modified Medical Research Council questionnaire*) - zmodyfikowany
kwestionariusz *Medical Research Council*

N – liczność

paCO₂ - ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej

paO₂ - ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej

PI - jodek propidyny

POChP - przewlekła obturacyjna choroba płuc

PS (ang. *phosphatidylserine*) - fosfatydyloseryna

PSB (ang. *phosphate buffered saline*) - bufor fosforanowy

Q₁ - kwartył dolny

Q₃ - kwartył górny

RV (ang. *residual volume*) – objętość zapasowa

rż- rok życia

SaO₂ - saturacja krwi tętniczej tlenem

SD – odchylenie standardowe

SE - błąd standardowy

sFasL (ang. *soluble Fas ligand*)- rozpuszczalny Fas ligand

TLC (ang. *total lung capacity*) – całkowita pojemność płuc

TNF (ang. *tumor necrosis factor*) - czynnik martwicy guza

TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor*) - receptor czynnika martwicy guza

TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) - ligand indukujący apoptozę
związany z TNF

V - współczynnik zmienności

vs - versus

WHO (ang. *World Health Organization*)- Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

1.1 Definicja POChP

Zgodnie z wytycznymi Światowej Strategii Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc jest to choroba poddająca się prewencji i leczeniu, charakteryzująca się trwałym ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Ograniczenie to jest zwykle postępujące i wiąże się z przewlekłą odpowiedzią zapalną dróg oddechowych i płuc na szkodliwe cząsteczki lub gazy. Zaostrzenia i choroby towarzyszące mogą przyczyniać się do ciężkości stanu klinicznego poszczególnych chorych (47).

Przewlekłą obturacyjną chorobę płuc możemy podejrzewać u pacjenta, który skarży się na kaszel, odkrztuszanie plwociny lub duszność i/lub u którego występuje narażenie na czynniki ryzyka choroby w wywiadzie. Wśród czynników ryzyka na szczególną uwagę zasługuje palenie tytoniu, ponadto narażenie na pyły i substancje chemiczne w miejscu pracy oraz zanieczyszczenia wewnątrz pomieszczeń. Czynnikiem ryzyka zależnym od gospodarza jest niedobór alfa-1-antytrypsyny (47, 158).

1.2 Epidemiologia

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) należy obecnie do wiodących przyczyn chorobowości i śmiertelności na świecie (47). Badanie *Global Burden of Disease* prowadzone pod auspicjami WHO i Banku Światowego, szacuje występowanie POChP na 9,34 przypadków na 1000 mężczyzn i 7,33 na 1000 kobiet (152). Wg danych WHO w 2004 roku na świecie ponad 63 mln ludzi chorowało na zaawansowaną POChP, definiowaną jako przewlekłe ograniczenie przepływu powietrza w drogach oddechowych, z FEV1 poniżej 1 litra, któremu towarzyszyły objawy kliniczne choroby (153). W metaanalizie badań przeprowadzonych w 28 różnych krajach, częstość występowania POChP potwierdzonej badaniem spirometrycznym w populacji > 40 rż szacowana jest na 8,9% (54). W Stanach Zjednoczonych częstość występowania POChP szacowana jest na 6,0% populacji \geq 25rż (88). Przyjmuje się jednak, że dane te są zaniżone. Spowodowane jest to faktem, iż rozpoznanie stawiane jest zazwyczaj dopiero wtedy gdy choroba staje się jawna klinicznie i umiarkowanie zaawansowana. Wykazano, że choroba ta występuje częściej u palaczy tytoniu niż u

osób niepalących, częściej po 40 rż w porównaniu z młodszą populacją, częściej u mężczyzn niż u kobiet (54).

Śmiertelność różni się między populacjami, oceniana jest na 4,4/100 tys. osób w Japonii do 130/100 tys. osób w Chinach (27). Wg Światowej Organizacji Zdrowia do 2020 roku POChP stanie się trzecią co do częstości przyczyną zgonu na świecie (95, 151). Inni autorzy w nowszych badaniach szacują, że POChP stanie się czwartą co do częstości przyczyną śmiertelności na świecie do 2030 roku (90).

W Polsce nie przeprowadzono badania epidemiologicznego obejmującego reprezentatywną próbę całej populacji, dostępne są jedynie badania cząstkowe (158). W badaniach przeprowadzonych w Zabrzu cechy POChP stwierdzono u ok. 10% badanych powyżej 40 rż (158, 97). Podobne wyniki uzyskano w Warszawie (109). Znacznie wyższą częstość występowania POChP stwierdzono w badaniu BOLD w województwie małopolskim. Oszacowana częstość występowania POChP w populacji osób po 40rż wyniosła 22,1%. Oszacowana częstość występowania POChP w stadium III i IV wyniosła 1,9%. Choroba występowała częściej u mężczyzn niż u kobiet (100). Badając częstość występowania POChP w praktyce lekarza podstawowej opieki zdrowotnej, chorobę rozpoznano u 8,1% badanych powyżej 40 rż, z czego 61,3% chorych miało łagodną postać choroby, 35,5% postać umiarkowaną, a 3,2% postać ciężką (126). W innym badaniu w praktyce lekarza rodzinnego POChP rozpoznano u 9,3% pacjentów >40rż. W tej grupie 30,6% chorych odpowiadało rozpoznaniu POChP w stadium I, 51,4% w stadium II, 15,3% w stadium III, natomiast 2,7% w stadium IV. Należy zauważyć, że tylko 18,6% pacjentów miało wcześniej rozpoznaną POChP (67). W badaniu KOMPAS oceniono grupę chorych objętych ambulatoryjną opieką specjalistyczną, co nie stanowi reprezentatywnej grupy dla całej populacji. Wśród pacjentów specjalistycznych poradni pulmonologicznych, alergologicznych i pediatrycznych w Polsce, u 24,5% rozpoznano POChP. 17% z nich odpowiadało rozpoznaniu POChP w stadium I, 47% w stadium II, 26% w stadium III, 6% w stadium IV (92).

1.3 Rozpoznanie POChP

Do rozpoznania POChP konieczne jest przeprowadzenie wywiadu i badania przedmiotowego oraz wykonanie spirometrii po inhalacji leku rozkurczającego oskrzela. Wywiad powinien obejmować pytania o objawy oraz narażenie na czynniki

ryzyka POChP. Badanie radiologiczne klatki piersiowej może być prawidłowe lub ujawnić cechy charakterystyczne dla POChP, pozwala także na wykluczenie innych schorzeń, mogących być przyczyną stwierdzanych objawów klinicznych (47, 158). Autorzy wytycznych GOLD z 2011 roku zwracają szczególną uwagę na ocenę nasilenia duszności u pacjenta z POChP. W tym celu posłużyć się można zmodyfikowanym kwestionariuszem *Medical Research Council* (mMRC), który przedstawiono w Tabeli 1. Badanie spirometryczne jest niezbędne do rozpoznania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc i pozwala określić zaawansowanie zmian patologicznych. Spirometria wykonana po inhalacji krótkodziałającego leku rozkurczającego oskrzela pozwala na rozpoznanie obturacji dróg oddechowych, definiowanej jako obniżenie stosunku FEV1/FVC poniżej 0,70. Badanie to służy również do klasyfikacji ciężkości POChP na podstawie wartości FEV1 po zastosowaniu leku rozkurczającego oskrzela (Tabela 2) (47).

Tabela 1. Zmodyfikowany kwestionariusz *Medical Research Council* dla oceny nasilenia duszności (47)

Postaw krzyżyk w rubryce, która pasuje do Ciebie (tylko w jednej)	
mMRC stopień 0. Odczuwam brak powietrza tylko przy dużym wysiłku fizycznym	
mMRC stopień 1. Brakuje mi powietrza, gdy szybko idę po płaskim terenie albo gdy pokonuję niewielkie wzniesienie	
mMRC stopień 2. Z powodu braku tchu chodzę wolniej niż inni ludzie w moim wieku, albo muszę się zatrzymywać dla złapania oddechu, gdy idę swoim tempem po płaskim terenie	
mMRC stopień 3. Idąc po płaskim terenie, co ok. 100 metrów albo co kilka minut zatrzymuję się, żeby złapać oddech.	
mMRC stopień 4. Odczuwam zbyt dużą duszność, aby wychodzić z domu, albo brakuje mi powietrza, gdy się ubieram lub rozbieram	

Tabela 2. Spirometryczna klasyfikacja ciężkości POChP oparta na wartościach FEV1 po zastosowaniu leku rozkurczającego oskrzela (47)

Stadium 1: Lekka	FEV1/FVC<0,70 FEV1 ≥ 80% wartości należnej
Stadium 2: Umiarkowana	FEV1/FVC<0,70 50%≤ FEV1<80% wartości należnej
Stadium 3: Ciężka	FEV1/FVC<0,70 30%≤ FEV1<50% wartości należnej
Stadium 4: bardzo ciężka	FEV1/FVC<0,70 FEV1<30% wartości należnej

Obturacja oskrzeli jest podstawowym mechanizmem warunkującym obecność duszności i przekładającym się na jakość życia chorego na POChP. FEV1 uważany był zatem za podstawowy wskaźnik prognostyczny świadczący o zaawansowaniu choroby (48). Anthonisen i wsp. przez trzy lata obserwowali grupę prawie 1000 chorych na POChP. Wyjściowo określono ciężkość objawów, czynność płuc, tolerancję wysiłku i jakość życia, badania czynnościowe układu oddechowego były następnie powtarzane podczas obserwacji. Autorzy badania stwierdzili, że wyjściowa wartość FEV1 jest, obok wieku pacjenta, najbardziej trafnym czynnikiem prognostycznym śmierci w POChP. Średnia utrata FEV1 podczas trzyletniej obserwacji w całej grupie chorych wynosiła 44 ml/rok (4). Większa obturacja oskrzeli jest związana z wzrastającą częstością zaostrzeń POChP i ryzykiem śmierci (47).

1.4 Ocena stopnia klinicznego zaawansowania POChP

Od wielu lat zwracano uwagę na fakt, że spirometryczny pomiar FEV1 nie jest optymalnym parametrem odzwierciedlającym rzeczywisty stan zdrowia chorego na POChP. Włoscy badacze stwierdzili, że dopiero przekroczenie granicy FEV1<50% wn. wiąże się dramatycznym pogorszeniem stanu zdrowia. Wyższe wartości FEV1 w żaden sposób nie odzwierciedlają różnic w stanie zdrowia pacjentów z POChP. Badania te zwracają szczególną uwagę na rolę chorób współistniejących z POChP. Uwzględnienie chorób towarzyszących pozwala na dużo dokładniejszą ocenę stanu zdrowia chorego na POChP (5).

Problem z oceną stopnia zaawansowania POChP wyłącznie na podstawie pomiaru FEV1 potwierdzają również autorzy najnowszej aktualizacji zaleceń GOLD. Stwierdzili oni, że istnieje bardzo słaba korelacja między FEV1, objawami i pogorszeniem jakości życia związanej ze zdrowiem pacjenta (ang. *health-related quality of life*). Udowadniają oni, że w każdym stadium zaawansowania POChP pacjent może mieć zarówno dobry jak i bardzo słaby stan zdrowia. Autorzy zaleceń GOLD podkreślają konieczność dokładnej oceny objawów zgłaszanych przez pacjenta, oceny ryzyka zaostrzeń choroby, a także oceny i leczenia chorób towarzyszących (47).

Przewlekła obturacyjna choroba płuc uznawana jest obecnie za proces toczący się nie tylko lokalnie w tkance płucnej, lecz także za chorobę ogólnoustrojową. Zmiany pozapłucne i choroby towarzyszące mają znamienny wpływ na przeżycie chorych oraz przebieg naturalny choroby. W przebiegu POChP zmiany płucne, pozapłucne i choroby towarzyszące oddziałują na siebie wzajemnie (14).

Obecnie brane są pod uwagę dwa poglądy na wzajemne oddziaływanie zmian płucnych, pozapłucnych i chorób towarzyszących w przebiegu POChP. Pierwsza teoria głosi, że zmiany zapalne i procesy naprawcze toczące się pierwotnie w płucach obejmują następnie inne narządy. Wg drugiego poglądu zmiany płucne w przebiegu POChP są jedną z wielu manifestacji „systemowego” stanu zapalnego, z zajęciem wielu narządów (12, 14).

Wykazano, że w płucach palaczy tytoniu toczy się proces zapalny, natomiast u chorych na POChP zapalenie w tkance płucnej ma znacznie większe nasilenie, wzrasta ono gwałtownie wraz ze wzrostem zaawansowania choroby. Towarzyszy mu także zapalenie o charakterze układowym oraz proces zapalny w sercu, naczyniach krwionośnych i mięśniach szkieletowych (27). Ten ogólnoustrojowy proces zapalny ma swoje konsekwencje kliniczne.

Spośród zmian pozapłucnych w przebiegu POChP najczęściej występują zaburzenia stanu odżywienia i osłabienie mięśni szkieletowych (15). Zaburzenia stanu odżywienia u chorych na POChP powodują zmniejszenie tolerancji wysiłku i pogorszenie jakości życia. Wykazano, że zły stan odżywienia jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym i negatywnie wpływa na długość przeżycia chorych z POChP (15, 23).

U pacjentów z POChP, zwłaszcza z ciężką postacią choroby, często stwierdza się wyniszczenie. Związane jest ono z utratą beztłuszczowej masy ciała (ang. *Fat Free Mass* - FFM), głównie z zanikiem mięśni szkieletowych (46). Zanik mięśni

szkieletowych związany jest z utratą siły mięśniowej, co w znaczący sposób wpływa na wydolność wysiłkową pacjenta z POChP, niezależnie od ciężkości choroby (12). Wybiórcza utrata beztłuszczowej masy ciała wpływa niekorzystnie na funkcję mięśni oddechowych oraz obwodowych, wydolność wysiłkową oraz ogólny stan zdrowia. Wykazano także, że spadek wagi negatywnie wpływa na rokowanie chorych na POChP. (27). Uznaje się, że w odpowiedzi na stymulację przez kwasinę lub zakażenie oraz podczas nieadekwatnego dowozu kalorii, dochodzi do utraty białek komórkowych. Celem tego procesu jest dostarczenie niezbędnych aminokwasów do syntezy białek i procesów metabolicznych. Źródłem tych białek są głównie mięśnie, a także skóra, podczas gdy ważne dla życia narządy tracą niewiele białek, a mózg pozostaje nienaruszony (154). Zanik mięśni szkieletowych u chorych na POChP, dotyczący głównie kończyn dolnych, wykazano w wielu pracach. Utrata masy mięśni szkieletowych może być spowodowany zarówno ich zwiększoną apoptozą, zanikiem spowodowanym bezruchem wywołanym dusznością jak i stosowanym leczeniem (np. steroidoterapią systemową) (46).

U chorych na POChP powszechna jest osteoporoza, depresja oraz niedokrwistość chorób przewlekłych (46). Mechanizm powstawania osteoporozy w tej grupie chorych nie został do końca wyjaśniony. Może ona być związana z zaawansowanym wiekiem, niedożywieniem, niskim BMI, siedzącym trybem życia, paleniem tytoniu, sterydoterapią czy układowym procesem zapalnym (2, 12). Złamania kompresyjne kręgow, częste u pacjentów z POChP, mogą powodować zwiększenie kifozy piersiowej, a w konsekwencji wpływać na zaburzenia czynnościowe płuc (12).

Wysoka częstość występowania depresji u pacjentów z POChP może być wynikiem fizjologicznej reakcji organizmu na postępującą chorobę. Ze względu na zaawansowanie choroby, pacjenci z POChP są często izolowani i nie mogą uczestniczyć w wielu wydarzeniach towarzyskich (12). Jednakże istnieją hipotezy sugerujące związek depresji z systemowym zapaleniem, z którym mamy do czynienia w POChP. W kilku eksperymentalnych modelach wykazano rolę TNF-alfa i innych cytokin i cząsteczek (np. tlenku azotu) w patogenezie depresji (2).

POChP tradycyjnie kojarzona jest z czerwienicą. Jednak w tej grupie chorych istnieje także zwiększone ryzyko wystąpienia niedokrwistości chorób przewlekłych (ACD, ang. *anaemia of chronic disease*). Częstość występowania ACD u pacjentów z ciężką i bardzo ciężką postacią choroby szacowana jest na 15-30%, podczas gdy czerwienica jest względnie rzadka (6%) (2). Wykazano, że w grupie chorych na POChP

niski hematokryt jest silnie związany ze zwiększoną zachorowalnością, z większą liczbą i dłuższym czasem trwania hospitalizacji (24). Stężenie hemoglobiny jest silnie związane ze wzmożoną dusznością i z ograniczoną tolerancją wysiłku (12). Pacjenci z POChP z niskim poziomem hemoglobiny mają gorsze rokowanie. Wzrost poziomu hemoglobiny poprzez transfuzje krwi powoduje zmniejszenie wentylacji minutowej i pracy związanej z oddychaniem u chorych na POChP (127).

W POChP ryzyko chorób sercowo-naczyniowych jest zwiększone 2-do 3-krotnie. Wykazano, że zwiększone ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc koreluje ze zwiększonym stężeniem białka C-reaktywnego (CRP). (47, 128).

Stwierdzono, że pacjenci z ciężką i umiarkowaną obturacją dróg oddechowych mają zwiększoną liczbę leukocytów i płytek krwi oraz zwiększone stężenie fibrynogeny oraz CRP, w porównaniu z pacjentami bez obturacji. Umiarkowana i ciężka obturacja wiąże się wzrostem występowania zmian niedokrwiennych w elektrokardiogramie w tych grupach chorych (128). Częściowo związane jest to ze wspólnymi czynnikami ryzyka POChP i choroby wieńcowej, takimi jak palenie tytoniu czy wiek (2).

Ze względu na ogólnoustrojowy charakter procesu zapalnego u chorych na POChP zaczęto poszukiwać innych, poza FEV₁, wykładników stopnia klinicznego zaawansowania choroby oraz wskaźników prognostycznych, uwzględniających płucne i pozapłucne aspekty choroby (48).

Jednym z takich wykładników może być wskaźnik statycznej hiperinflacji płuc, określany w badaniu bodypletyzmograficznym jako stosunek pojemności wdechowej do całkowitej pojemności płuc (IC/TLC). Ciro Casanova i wsp. założyli, że IC/TLC może być niezależnym od FEV₁ predyktorem naturalnego przebiegu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Autorzy przez 5 lat (Me=34 miesiące) monitorowali grupę prawie 700 chorych na POChP. Wyniki ich prac dowodzą, że IC/TLC jest niezależnym czynnikiem prognostycznym śmiertelności u pacjentów z POChP. Poprzez analogię z frakcją wyrzutową lewej komory, która tak dobrze przewiduje przebieg niewydolności lewokomorowej serca, autorzy określili wskaźnik IC/TLC mianem „frakcji wdechowej”. Stwierdzili także, że IC/TLC może służyć za wykładnik ciężkości uszkodzenia płuc w przebiegu POChP. Uznali, że graniczna wartość IC/TLC 25%, jest łatwym do zapamiętania progiem pozwalającym oszacować ciężkość POChP. Pacjenci z IC/TLC≤25% żyją krócej niż chorzy z IC/TLC>25% (21). Użyteczność tego wskaźnika w ocenie przebiegu POChP potwierdzili także badacze brazylijscy.

Stwierdzili oni, że określenie wartości IC/TLC dostarcza istotnych informacji, pozwalających określić wydolność wysiłkową pacjentów z POChP. W przeprowadzonym przez nich badaniu chorzy z niższym wskaźnikiem IC/TLC osiągnęli także niższą maksymalną pojemność wysiłkową (ang. *maximal exercise capacity*), a wartością graniczną było IC/TLC 28% (3). Wskaźnik IC/TLC koreluje także z nasileniem duszności, zgłaszanej przez chorych na POChP podczas zwykłych czynności dnia codziennego (99).

Podjęmowane są także próby określenia wartości stosunku objętości zapasowej do całkowitej pojemności płuc (RV/TLC) w ocenie zaawansowania POChP. Mets i wsp. podjęli próbę określenia związku między upośledzeniem czynności płuc i ilościową tomografią komputerową u chorych na POChP. Stwierdzili, że wykładniki rozedmy płuc i pułapki powietrznej w tomografii komputerowej silnie korelują z upośledzeniem przepływu powietrza w drogach oddechowych, a jednym z ocenianych parametrów był RV/TLC (94). Inni badacze z kolei porównywali wartość duszności i wykładników obturacji dróg oddechowych jako predyktorów przeżycia w POChP. Jednym z badanych parametrów był RV/TLC. Badanie wykazało, że RV/TLC było silnym predyktorem śmiertelności, jednak badacze skupili się na innych ocenianych parametrach i nie wymienili RV/TLC jako ważnego wskaźnika prognostycznego u chorych na POChP (98).

Wykładnikiem znacznego zaawansowaniu klinicznego POChP jest obecność utrwalonej niewydolności oddechowej, definiowanej jako stan, w którym zaburzenia czynności jednego lub kilku elementów układu oddechowego upośledzają wymianę gazową w płucach, prowadząc do obniżenia ciśnienia parcjalnego tlenu (paO_2) i podwyższenia ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla ($paCO_2$) we krwi tętniczej (130). Szacuje się, że pacjentów z POChP, w przebiegu której doszło do hipoksemii, retencji dwutlenku węgla i rozwoju serca płucnego, umrze w ciągu trzech lat (129). W kilku badaniach wykazano, że paO_2 i $paCO_2$ wpływają na prognozę u pacjentów z POChP, a gwałtownie postępująca hypoksemia pozwala przewidywać śmierć pacjenta (42). Udowodniono, że stosowanie przewlekłego leczenia tlenem u chorych na POChP wydłuża przeżycie, a z grona wszystkich wskazań do przewlekłej tlenoterapii, POChP jest jedyną chorobą, w której takie badania przeprowadzono. Prace przeprowadzone w Warszawie i w Edynburgu wykazały, że z wielu wykładników zaawansowania POChP i serca płucnego, to paO_2 i FEV1 pozwalają przewidywać przeżycie chorego na POChP, a paO_2 i średnie ciśnienie w tętnicy płucnej korelują znacząco z przeżyciem (129).

Kolejne badanie, przeprowadzone przez autorów polskich u chorych na POChP leczonych przewlekle tlenem, udowodniło, że $paO_2 \leq 55 \text{ mmHg}$ jest wartością graniczną, a tlenoterapia u pacjentów z umiarkowaną hypoksemią (paO_2 56-60 mmHg) nie powoduje wydłużenia przeżycia (49).

Kolejnym parametrem mogącym świadczyć o ciężkości POChP, uwzględniającym ogólnoustrojowy charakter choroby, jest wskaźnik masy ciała (BMI). Chorzy na POChP, u których stwierdza się nadwagę lub otyłość, przeżywają dłużej niż chorzy z prawidłową masą ciała lub z niedowagą (150). *Schols i wsp.* zanalizowali grupę 400 chorych na POChP. Stwierdzili, że niski wskaźnik masy ciała (BMI), wiek i niskie paO_2 są znamionymi niezależnymi wskaźnikami zwiększonej śmiertelności w POChP. Zwiększoną śmiertelność wykazano u chorych z BMI poniżej 25 kg/m^2 , a zatem nie tylko u osób niedożywionych, ale również u chorych z prawidłową masą ciała. Negatywny wpływ niskiej wagi ciała na przeżycie chorych na POChP może być odwrócony poprzez odpowiednie leczenie żywieniowe, w którego następstwie dojdzie do wzrostu wagi (121). Podobnie *Landbo i wsp.* wykazali, że BMI jest niezależnym predyktorem śmiertelności u chorych na POChP, a związek ten jest najsilniejszy u pacjentów z ciężką POChP. W tej grupie chorych śmiertelność zmniejszała się wraz ze wzrostem BMI (82).

Parametrem pozwalającym ocenić stan kliniczny pacjentów z POChP, a zwłaszcza osób z najcięższymi postaciami choroby, u których FEV1 nie całkowicie odzwierciedla stan czynnościowy i stan zdrowia, jest dystans przebyty w teście 6-cio minutowego chodu (6MWT, ang. *6 minute walk test*). Udowodniono, że ten prosty test wysiłkowy w sposób wiarygodny i obiektywny pozwala ocenić wydolność wysiłkową pacjentów z POChP, bez względu na wiek czy wykształcenie chorego (107). Redelmeier i wsp. stwierdzili, że wydolność wysiłkowa chorego na POChP istotnie zmienia się gdy dystans w 6MWT zmniejsza lub zwiększa się o minimum 54m. Taka zmiana dystansu jest również zauważalna dla pacjenta, w jego subiektywnej ocenie własnej zdolności do podjęcia wysiłku (113). Badacze amerykańscy udowodnili, że u pacjentów z ciężką przewleklą obturacyjną chorobą płuc, dystans w teście 6-cio minutowego chodu jest parametrem pozwalającym lepiej przewidywać śmiertelność niż inne tradycyjne markery ciężkości choroby, a pomiar przebytego dystansu jest użyteczny we wszechstronnym monitorowniu pacjenta z ciężką POChP (107). Spruit i wsp. przez trzy lata obserwowali ponad 2100 pacjentów z POChP w stadium II-IV wg GOLD. Stwierdzili, że dystans w teście 6-cio minutowego chodu jest użytecznym

parametrem dla identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem śmierci lub hospitalizacji związanej z zaostrzeniem choroby. Granicznym dystansem dla zwiększonego ryzyka śmierci było 334m, a dla zwiększonego ryzyka hospitalizacji 357m (132). Badacze hiszpańscy w prospektywnym badaniu monitorowali ponad 1300 chorych na POChP. Badacze stwierdzili, że przebyty w 6MWT dystans mniejszy niż 350 m jest związany ze zwiększoną śmiertelnością i powinien być uważany za nieprawidłowy (30). Wnioski te zostały potwierdzone przez tych samych badaczy w grupie kobiet chorujących na POChP. Również w tej grupie granicznym dystansem pozwalającym prognozować śmiertelność było 350m (32).

Uwzględniając zarówno płucne jak i pozapłucne aspekty przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, Cote i Celli zaproponowali użycie dziesięciopunktowej skali BODE do oceny stanu klinicznego pacjenta. Skala ta pozwala na prognozowanie długości przeżycia i ryzyka śmierci chorych na POChP (22, 23). Analizie poddane są tu wykładniki choroby, mające największy wpływ na rokowanie, takie jak: indeks masy ciała (B, ang. *body mass index*), stopień obturacji dróg oddechowych (O, ang. *airflow obstruction*), duszność (D, ang. *dyspnoea*) oraz wydolność wysiłkowa (E, ang. *exercise capacity*). Poszczególne elementy skali BODE zostały przedstawione w tabeli 3. Ostateczną punktację w skali BODE uzyskuje się po zsumowaniu punktów uzyskanych za poszczególne elementy.. Minimalna ilość punktów (0) oznacza rokowanie najlepsze, a maksymalna ilość punktów (10)- rokowanie najgorsze. Najgorsze rokowanie mają pacjenci z liczbą 7-10 pkt. W tej grupie chorych 5 lat przeżywa ok. 20-25% badanych (14, 22, 23).

Tabela 3. Skala oceny stanu klinicznego BODE (23)

BODE	0 punktów	1 punkt	2 punkty	3 punkty
FEV1 (%N)	≥65	50-64	36-49	≤35
6 MWD (m)	>350	250-349	150-249	<149
MMRC	0-1	2	3	4
BMI	>21	≤21		

Od czasu jej wprowadzenia, skala BODE jest powszechnie używana w celu monitorowania przebiegu POChP, udowodniono także jej użyteczność dla oceny wyników różnych interwencji medycznych, do kwalifikacji chorych na POChP do przeszczepienia płuc, a także do prognozowania kolejnych hospitalizacji (48).

1.5 Patogeneza POChP

Ze względu na dużą częstość występowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, prowadzonych jest wiele badań mających na celu określenie czynników patogenetycznych tego schorzenia. Podejmowane są również próby określenia miejsca procesu apoptozy w etiopatogenezie POChP.

1.5.A Zmiany patologiczne w POChP- przebudowa dróg oddechowych

Dla POChP charakterystyczne jest objęcie przez proces zapalny zarówno dużych oskrzeli, oskrzelików, miąższu płucnego i naczyń płucnych. W centralnych drogach oddechowych dochodzi do przerostu gruczołów śluzowych, komórek kubkowych oraz mięśni gładkich. W obwodowych drogach oddechowych głównymi komórkami nacieku zapalnego są limfocyty T CD8+, makrofagi i neutrofile. Przerost komórek kubkowych i ich obecność w miejscach gdzie zwykle nie występują (oskrzeliki końcowe) prowadzi do upośledzenia mechanizmów oczyszczania śluzowo-rzęskowego. Dochodzi do przerostu mięśniówki gładkiej, a także do utraty części przyczepów przegród międzypęcherzykowych do oskrzelików. Zmiany te prowadzą do pogrubienia ścian oskrzeli i zwężenia ich światła. Za upośledzenie przepływu powietrza w drogach oddechowych odpowiedzialny jest również proces włóknienia. Zmiany zapalno-włókniste w przebiegu POChP nazywane są obliterative bronchiolitis. Dochodzi tu do powtarzających się cykli uszkodzenia i naprawy ściany dróg oddechowych, co jest przyczyną przebudowy ścian dróg oddechowych, powstawania tkanki bliznowatej, która trwale zwęża światło dróg oddechowych (46, 108).

Zmiany patologiczne charakterystyczne dla POChP związane są z przewlekłym procesem zapalnym oraz z opisanymi wyżej zmianami strukturalnymi, które są wynikiem powtarzających się epizodów uszkodzenia i naprawy. Proces zapalny w drogach oddechowych chorych na POChP jest modyfikacją odpowiedzi zapalnej dróg oddechowych na przewlekłe działanie czynników drażniących, takich jak dym

tytoniowy. Stres oksydacyjny i nadmiar proteinaz pogłębiają toczące się w płucach zapalenie (47).

1.5.B Proces zapalny w drogach oddechowych

Dla POChP charakterystyczny jest przewlekły się proces zapalny, dotyczący głównie drobnych oskrzeli. Stopień zapalenia wzrasta wraz ze wzrostem stopnia ciężkości POChP wg GOLD. Komórkami biorącymi udział w reakcji zapalnej są tu granulocyty obojętnochłonne, limfocyty T (CD8+), makrofagi oraz limfocyty B (61). POChP charakteryzuje się zwiększoną liczbą limfocytów CD8+ (cytotoksycznych) Tc1, obecnych jedynie u palaczy, u których rozwija się POChP (10, 47). Makrofagi są pobudzane przez dym tytoniowy oraz inne substancje drażniące do uwalniania substancji chemotaktycznych dla neutrofilii, takich jak chemokiny CXC (IL-8, GRO-alfa- przyciągająca neutrofile i monocyty) i mediatory lipidowe (LTB₄, który przyciąga neutrofile i limfocyty T). Czynniki chemotaktyczne dla neutrofilii powodują ich szybki transport z krążenia do światła oskrzeli. Neutrofile są zdolne do uwalniania wolnych rodników tlenowych, elastazy oraz cytokin, co ma kluczowe znaczenie w patogenezie POChP, wykazując wpływ na komórki kubkowe i gruczoły podśluzówkowe, powodując hipersekrecję śluzu, indukując rozedmę płuc poprzez niszczenie ścian pęcherzyków płucnych oraz rozwój procesu zapalnego (27). U chorych na POChP stwierdza się również zwiększone stężenie czynników nasilających proces zapalny, takich jak TNF-alfa, Il-6 czy Il-1beta. Czynniki te mogą również odpowiadać za niektóre zmiany ogólnoustrojowe w przebiegu POChP. TNF-alfa może aktywować transkrypcję czynnika jądrowego-κB (NF-κB), rozpoczynającego transkrypcję genu IL-8. Mediatorami stanu zapalnego indukującymi zmiany morfologiczne są czynniki wzrostu, np. TGF-beta, który może powodować włóknienie w małych drogach oddechowych (11).

1.5.C Zaburzenie równowagi między proteinazami i antyproteinazami

W POChP stwierdza się zwiększoną aktywność enzymów proteolitycznych, prowadzącą do destrukcji ścian pęcherzyków płucnych, a w konsekwencji do rozedmy płuc. Uważa się, że w destrukcji miększu płuc biorą udział różne proteazy. Głównym składnikiem aktywności elastolitycznej płuc, a także czynnikiem stymulującym wydzielanie śluzu jest elastaza neutrofilowa. Udowodniono, że enzym ten stanowi

główny mechanizm elastolityczny u pacjentów z niedoborem alfa-1-antytrypsyny, natomiast u pacjentów z POChP związaną z paleniem tytoniu większą rolę odgrywają inne mechanizmy. U tych pacjentów wykazano udział katepsyn oraz metaloproteinaz macierzy (MMP), głównie kolagenazy (MMP-1), gelatynazy B (MMP-9). U pacjentów z rozedmą płuc wykazano także zwiększoną aktywność MMP-2 i MMP-12 (11). Kolagenazy biorą udział w degradacji włókien kolagenu typu I i III (zlokalizowanego w zewnątrzkomórkowej macierzy śródmiąższu płuc) oraz kolagenu typu II (umiejscowionego w chrząstkach dróg oddechowych). Gelatynazy (metaloproteinazy) mają zdolność rozkładu kolagenu typu IV, głównego strukturalnego składnika błon podstawnych, są także zdolne do rozkładu elastyny (122). Limfocyty Tc (CD8+) również biorą udział w niszczeniu mięszu płuc poprzez uwalnianie proteolitycznych perforyn i granzymów (11). W POChP zwiększeniu aktywności enzymów proteolitycznych towarzyszy niedobór i zmniejszona aktywność antyproteaz, takich jak alfa-1-antytrypsyna (alfa-1-AT), alfa-1-antychymotrypsyna, inhibitor leukoproteazy wydzielniczej (SLPI), elafina, nystatyny oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz 1-4 (TIMP 1-4) (11). Uważa się, że zwiększonemu stężeniu elastazy neutrofilowej towarzyszy zahamowanie produkcji SLPI (133).

1.5.D Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny może być ważnym czynnikiem nasilającym odpowiedź zapalną w POChP w stabilnym okresie choroby, w czasie zaostrzeń ulega on znacznemu zwiększeniu. Wolne rodniki (pojedyncze atomy tlenu, rodniki ponadtlenkowe, nadtlenki wodoru, hydroperoksydy) dostają się do tkanki płucnej chorych na POChP wraz z dymem tytoniowym, są także uwalniane przez komórki zapalne (neutrofile i makrofagi). Ilość endogennych antyoksydantów może u chorych na POChP ulec zmniejszeniu. Wolne rodniki uczestniczą w patomechanizmie POChP poprzez zmniejszenie aktywności antyproteaz, aktywację czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) prowadzącą do wzmożonego uwalniania Il-8 oraz TNF- α , zwiększenie produkcji izoprostanów, zwiększenie sekrecji śluzu, skurcz oskrzeli oraz nasilenie powstawania wysięku (108).

1.6 Apoptoza- znaczenie procesu oraz szlaki regulacyjne

Badania prowadzone na modelach zwierzęcych, jak i ludzkich wskazują, że kolejnym mechanizmem, który może brać udział w patogenezie POChP, jest zaburzenie równowagi między apoptozą a proliferacją komórek w tkance płucnej. Prawidłowo przebiegająca apoptoza jest uważana za proces zapobiegający przewlekłemu zapaleniu, poprzez pozbycie się umierających komórek zanim uwolnią one swoją szkodliwą zawartość do otaczających tkanek (37). U chorych na POChP opisano natomiast zwiększenie apoptozy komórek śródbłonna tkanki płucnej, jak również zwiększoną liczbę komórek nabłonkowych, komórek śródmiąższowych oraz komórek zapalnych, które podlegały apoptozie (27, 69).

Apoptoza, nazywana także programowaną śmiercią komórki, jest fizjologiczną formą śmierci komórki umożliwiającą utrzymanie homeostazy ustroju. Umożliwia ona eliminację komórek nieprawidłowych, niefunkcjonalnych, uszkodzonych lub zainfekowanych (50). Proces ten odgrywa kluczową rolę w rozwoju/podziale prawidłowych tkanek (40). Spośród wszystkich 10^{14} komórek w organizmie człowieka, w ciągu jednego dnia aż 10^7 komórek ulega apoptozie (93). Zaburzenia regulacji apoptozy („za dużo lub za mało”) prowadzą natomiast do powstania wielu schorzeń (105). Nieprawidłowa aktywacja procesu apoptozy, prowadząca do nadmiernej utarty komórek, może powodować np. defekt układu odpornościowego w przebiegu AIDS czy choroby neurodegeneracyjne. Z drugiej strony, nieadekwatna apoptoza, prowadząca do nadmiernego przeżycia i akumulacji komórek, może być przyczyną chorób nowotworowych (białaczki, chłoniaki, guzy łe), przewlekłych chorób zapalnych czy schorzeń autoimmunologicznych (55).

Apoptoza odgrywa także znaczącą rolę w patogenezie wielu chorób płuc, a wpływanie na regulację tego procesu może mieć znaczenie w leczeniu tych schorzeń. Do chorób, w których rola procesu apoptozy została udowodniona, należą: sarkoidoza (31, 34, 77, 124, 135), idiopatyczne włóknienie płuc (73, 79, 111, 141), włóknienie płuc w przebiegu chorób tkanki łącznej (73, 79), rak płuca (18, 41, 63, 66, 125), przewlekłe eozynofilowe zapalenie płuc (116), krzemica płuc (20) czy astma oskrzelowa (144, 145, 146).

W komórce podlegającej apoptozie dochodzi do głębokich zmian jej architektury i utraty kontaktu komórki z macierzą (52), komórka ulega obkurczeniu, w błonie komórkowej pojawiają się uwypuklenia, dochodzi do kondensacji chromatyny, fragmentacji DNA na odcinki długości nukleosomów i przeniesienia fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej (102). Obecność fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej jest jednym z sygnałów umożliwiających rozpoznanie i usuwanie komórek apoptotycznych (38, 60). Do innych czynników pozwalających na rozpoznanie komórek apoptotycznych przez fagocyty należą m. in. składowe układu dopełniacza (143). Efektem końcowym dezintegracji komórki jest powstanie otoczonych błoną komórkową i zawierających organelle komórkowe ciałek apoptotycznych, które są fagocytowane przez makrofagi oraz komórki sąsiadujące, co pozwala uniknąć reakcji zapalnej (118).

Komórki podlegają apoptozie po odebraniu za pośrednictwem określonych struktur sygnału apoptozy. Do podstawowych szlaków indukcji apoptozy należą: droga receptorowa czyli zewnątrzpochodna (ang. *extrinsic*) i droga mitochondrialna czyli wewnątrzpochodna (ang. *intrinsic*) (52, 131). Oba szlaki łączą się w jeden wspólny proces (45) na etapie egzekutorowym, kiedy to po serii molekularnych i biochemicznych przemian dochodzi do aktywacji kaspaz, proteaz cysteinylowych, odpowiedzialnych za podział składników jądra i cytoplazmy komórki (52).

Droga receptorowa uzależniona jest od obecności receptorów powierzchniowych, zwanych receptorami śmierci (DR, ang. *death receptor*), które indukują programowaną śmierć komórki poprzez wiązanie się ze swoimi naturalnymi ligandami. Receptory te to białka przezbłonowe, charakteryzujące się podobieństwem strukturalnym i funkcjonalnym. W swych regionach zewnątrzkomórkowych zawierają domenę bogatą w cysteinę, natomiast regiony wewnątrzkomórkowe nazywane domenami śmierci (DD, ang. *death domain*), biorą udział w wiązaniu z ligandami, co jest niezbędne dla indukcji procesu apoptozy (29). Do receptorów śmierci zaliczamy Fas (CD95/APO-1), TNF-R1, receptory TRAIL- DR 1 i DR2. Apoptoza jest inicjowana poprzez ich wiązanie z takimi ligandami jak Fas/CD95 ligand, TNF- α , TRAIL (44). Ligandy te należą do rodziny cytokin i białek powierzchniowych, które wykazują 25-30-procentowe podobieństwo sekwencji aminokwasów (85). TNF- α jest silną cytokiną prozapalną o szerokim spektrum działania, ogrywa ważną rolę w procesach odpornościowych i zapalnych, w proliferacji, różnicowaniu i apoptozie komórek (16).

Inni członkowie rodziny TNF mają znacznie węższe spectrum działania, rola FasL i TRAIL ogranicza się do indukcji apoptozy (8).

Receptorowa droga inicjacji apoptozy zostanie omówiona na przykładzie układu Fas/Fas ligand.

Receptor Fas/CD 95/APO-1 to białko powierzchniowe zbudowane z 319 aminokwasów. Składa się z trzech domen zewnątrzkomórkowych oraz z wewnątrzkomórkowej domeny śmierci, niezbędnej dla przekazywania sygnału. Należy do nadrodziny receptora wzrostu nerwów- receptora czynnika martwicy guza (TNF) (białko błonowe typ I) (106). Wysoką ekspresję APO-1/Fas wykazują dojrzałe aktywowane limfocyty T (71, 74). Ekspresję Fas wykazuje także tkanka grasicy, serca, płuc, wątroby i jajników, nie wykazuje jej tkanka mózgu czy śledziony. Fas ligand (FasL) to białko błonowe typu II i należy do rodziny czynnika martwicy guza (TNF). Fas ligand indukuje apoptozę poprzez wiązanie ze swoim receptorem błonowym, Fas (136). Fas ligand wykazuje ekspresję przede wszystkim na aktywowanych limfocytach T i stanowi kluczowy element procesu eliminacji tych komórek podczas zmniejszania odpowiedzi immunologicznej (96, 115). Połączony z błoną komórkową ludzki Fas-ligand jest przekształcany do formy rozpuszczalnej (sFasL) poprzez działanie metaloproteiny (89). SFas ligand to glikoproteina (26-29 kDa) składająca się z zewnątrzkomórkowego regionu Fas-ligand (156). SFasL nie jest ekwiwalentem Fas ligandu związanego z błoną komórkową (124), ponieważ konwersja Fas ligand związanego z błoną komórkową w formę rozpuszczalną (sFasL) związana jest ze zmniejszeniem aktywności proapoptotycznej i utratą cytotoksyczności (120). Ludzki sFasL skutecznie indukuje apoptozę komórek wykazujących jego ekspresję (136). Wykazano, że u myszy sFasL jest aktywny i indukuje apoptozę w stężeniu <10ng/ml (89, 140). Stężenia sFasL wyższe niż 10ng/ml stwierdzano w surowicach pacjentów z białaczkami z dużych ziarnistych limfocytów oraz z chłoniakami z komórek NK (140).

Inhibitorem apoptozy jest sFas, przypominający budową Fas pozbawiony domeny przezbłonowej. SFas blokuje apoptozę poprzez zahamowanie wiązania Fas, Fas-L lub sFas-L przez błonę komórkową. Poziom sFas w surowicy wzrasta w toczniu rumieniowatym oraz białaczkach T- i B- komórkowych (156).

Inicjacja apoptozy przez receptor Fas rozpoczyna się poprzez związanie cząsteczki FasL, co doprowadza do powstania kompleksu DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) (70). Po stymulacji receptora Fas przez FasL, w ciągu kilku sekund dochodzi do rekrutacji białka adaptacyjnego FADD (ang. *Fas-associated death*

domain)/Mort1 oraz prokaspazy-8, nieaktywnej formy (zymogeu) kaspazy-8. Aktywacja kaspazy-8 odbywa się na drodze autoproteolizy (148). W komórkach bogatych w kaspazę-8 dochodzi do bezpośredniej aktywacji kaspazy-3, natomiast komórki ubogie w kaspazę-8 wymagają wzmocnienia sygnału poprzez mitochondria (119). Po aktywacji kaspazy-8 przesyłanie sygnału apoptozy zależne od Fas biegnie dwoma drogami: szlakiem proteolitycznym za pośrednictwem kaskady kaspaz oraz szlakiem mediatorów lipidowych (29).

Szlak mitochondrialny przesyłania sygnału apoptozy zależy od zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej. Szereg bodźców, takich jak czynniki chemiczne, promieniowanie ultrafioletowe, reaktywne cząsteczki tlenu czy azotu, może indukować apoptozę poprzez szlak mitochondrialny (51). W regulacji tego procesu biorą udział białka błonowe należące do rodziny Bcl-2 (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim), które doprowadzają do tworzenia kanałów jonowych w błonie mitochondrialnej (104) oraz do uwolnienia z mitochondrium do cytoplazmy cytochromu c, gdzie łączy się on z białkiem Apaf-1 (ang. *apoptotic promoting activating factor-1*) i prokaspazą-9, doprowadzając do aktywacji kaspazy-3 (51, 52, 76).

Oba szlaki aktywacji apoptozy- receptorowy i mitochondrialny- doprowadzają do aktywacji kaskady kaspaz.

Kaspazy to proteazy cysteinowe, odgrywające kluczową rolę w procesie apoptozy. Wspólną cechą tych enzymów jest proteoliza białkowych substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego (52, 131). Kaspazy podzielone zostały na kaspazy indukujące (kaspaza-8, -9, -12) oraz efektorowe (kaspaza-3, -6, -7). Enzymy te mają zdolność niszczenia białek enzymatycznych i efektorowych, co w końcowej fazie apoptozy doprowadza do całkowitej dezintegracji komórki (26, 131). Po uruchomieniu kaskady kaspaz proces śmierci komórki staje się nieodwracalny (25, 39).

Ze względu na pojawiające się w ostatnich latach doniesienia o roli apoptozy w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, podjęliśmy się nowatorskiej próby oceny procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na POCHP w zależności od klinicznego zaawansowania choroby. Rozwiązanie tego problemu ma znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne.

2. CEL PRACY

Cel główny:

Ocena wykładników procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby.

Cele szczegółowe:

1. Ocena odsetka komórek apoptotycznych i stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych jako wykładników procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD.
2. Ocena odsetka komórek apoptotycznych i stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych jako wykładników procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo.
3. Analiza związku między badanymi wykładnikami apoptozy a wybranymi parametrami określającymi stopień zaawansowania POChP i stan kliniczny chorych.

3. MATERIAŁ

Do badania typu *cross-sectional study* włączeni zostali chorzy na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc objęci opieką Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozpoznanie POChP u w/w pacjentów postawione zostało w oparciu o kryteria GOLD. Kryteria kliniczne to występowanie duszności, przewlekłego kaszlu lub odkrztuszania płwociny. Istotne dane z wywiadu to narażenie na czynniki ryzyka tej choroby, takie jak: dym tytoniowy, przemysłowe pyły i substancje chemiczne, dym z pieców kuchennych i grzewczych. Diagnoza POChP potwierdzona została za pomocą spirometrii, w której po inhalacji leku rozszerzającego oskrzela stwierdzono niecałkowicie odwracalne ograniczenie przepływu powietrza w drogach oddechowych ($FEV1/FVC < 0,7$). Do grupy badanej włączono pacjentów chorych na POChP w wieku od 40 do 80 lat, palaczy lub byłych palaczy, w stabilnym okresie choroby, a zatem bez rozpoznanego zaostrzenia. U wszystkich chorych obliczono liczbę paczkolet palenia papierosów jako iloczyn liczby paczek papierosów palonych dziennie i liczby lat palenia tytoniu. Zaostrzenie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc definiowane jest jako zdarzenie w naturalnym przebiegu choroby charakteryzujące się zmianą nasilenia przewlekłe występujących objawów- duszności, kaszlu lub odkrztuszania płwociny, która wykracza poza normalną zmienność z dnia na dzień, ma nagły początek i może uzasadniać zmianę leczenia farmakologicznego (47). Pytania o zmianę nasilenia w/w objawów zawarte zostały w wypełnianej przez pacjentów ankiecie. Ponieważ najczęstszą przyczynę zaostrzeń POChP stanowią infekcje dróg oddechowych, brak zaostrzenia choroby potwierdzano także badaniem stężenia białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi.

Z badania wyłączeni zostali chorzy:

- ze współistnieniem innych chorób płuc, takich jak rak płuca, astma oskrzelowa, choroby śródmiąższowe płuc, gruźlica płuc, zatorowość płucna;
- z przeciwwskazaniami do wykonania bronchofiberoskopii.

Chorzy włączeni zostali do badania po udzieleniu przez nich pisemnej zgody. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, uchwała nr 1374/05.

4. METODY

4.1 Badanie ankietowe

Część specjalnie przygotowanej dla celów badania ankiety zawierała pytania dotyczące badania podmiotowego. Obejmowała ona pytania o objawy typowe dla przewlekłej obturacyjnej choroby płuc ze strony układu oddechowego, takie jak duszność, kaszel, odkrztuszanie płwociny. Szczególną uwagę zwracano na zmiany nasilenia w/w objawów, co może świadczyć o zaostrzeniu choroby. Zadano także pytania o objawy mogące wynikać z obecności powikłań POChP lub chorób towarzyszących, tzn. o bóle głowy, obrzęki czy krwioplucie. Następnie pytano o narażenie na czynniki ryzyka POChP - czynne i/lub bierne narażenie na dym tytoniowy, zawód, narażenie na substancje drażniące, pyły, gazy w miejscu pracy, częstość infekcji dróg oddechowych w dzieciństwie. Kolejne pytania dotyczyły przebiegu choroby, momentu jej rozpoznania, częstości zaostrzeń i związanych z nimi hospitalizacji. Ostatnia grupa pytań dotyczyła przyjmowanych przez chorego leków, ze szczególnym uwzględnieniem glikokortykosteroidów wziewnych i systemowych.

4.2 Spirometria

Badania spirometryczne wykonane zostały za pomocą aparatu Master Screen Body/Diffusion firmy Jaeger.

Pod uwagę brane były następujące parametry:

- FEV1 [%] - natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
- FVC [%] - natężona pojemność życiowa
- FEV1/FVC [%] – stosunek natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej i natężonej pojemności życiowej

Parametry te podane zostały jako odsetek wartości należnych dla płci, wieku i wzrostu wg Europejskiej Wspólnoty Węgla i Stali (ECCS). Badania spirometryczne wykonane zostały 15-30 minut po inhalacji leku rozszerzającego oskrzela (400 ug salbutamolu). Spirometria służyła do potwierdzenia rozpoznania POChP poprzez obecność obturacji dróg oddechowych ($FEV1/FVC < 0,7$), oraz do określenia ciężkości choroby (stadium I- $FEV1 \geq 80\%$ wartości należnej, stadium II- $50\% \leq FEV1 < 80\%$,

stadium III $30\% \leq FEV1 < 50\%$, stadium IV $FEV1 < 30\%$ lub $FEV1 < 50\%$ przy współistnieniu niewydolności oddechowej). Kwalifikację chorych do projektu rozpoczęto w 2008 roku, dlatego przez cały okres badania posługiwano się kryteriami GOLD z 2007 roku.

4.3. Bodypletyzmografia

U większości pacjentów wykonano badanie mechaniki oddychania. W dalszej analizie brano pod uwagę następujące parametry:

- TLC [%] - całkowita pojemność płuc
- RV [%] - objętość zalegająca
- IC/TLC [%] - stosunek pojemności wdechowej do całkowitej pojemności płuc
- RV/TLC [%] - stosunek objętości zalegającej do całkowitej pojemności płuc

Dwa ostatnie parametry służą do oceny rozdęcia płuc (hiperinflacji). Do badania użyto bodypletyzmo grafu Master Screen Body/Diffusion firmy Jaeger.

4.10. Pomiar pojemności dyfuzyjnej płuc dla tlenu węgla

Pojemność dyfuzyjną płuc dla tlenu węgla (DLCO) oznaczono metodą pojedynczego oddechu. Metoda ta wymaga wstrzymania oddechu na szczycie wdechu na ok. 10 sekund. Część chorych na POChP, zwłaszcza ze znaczną dusznością w zaawansowanej chorobie, nie jest w stanie z tego powodu wykonać badania. Wartość DLCO oznaczana jest jako odsetek wartości należnej. Zaburzenia dyfuzji kwalifikowane są jako łagodne ($DLCO > 60\%$, ale mniejsze od dolnej granicy normy), umiarkowane ($DLCO 40-60\%$) lub ciężkie ($DLCO < 40\%$).

Zmniejszenie DLCO u chorych na POChP może świadczyć o rozedmie płuc. Do badania DLCO użyto bodypletyzmo grafu Master Screen Body/Diffusion firmy Jaeger.

4.11. Gazometria krwi tętniczej

W celu oznaczenia SaO_2 , paO_2 i $paCO_2$, krew pobrana została przez lekarza z tętnicy promieniowej, od pacjenta pozostającego w pozycji siedzącej, oddychającego powietrzem atmosferycznym. Oznaczenie wykonane zostało w ciągu 20 min. od chwili pobrania krwi.

Wykonanie badania gazometrii krwi tętniczej konieczne było do stwierdzenia obecności lub braku niewydolności oddechowej. Niewydolność oddechowa rozpoznawana była u pacjentów z hipoksemią ($paO_2 < 60 \text{ mmHg}$) oraz z hipoksemią i hiperkapnią ($paCO_2 > 45 \text{ mmHg}$). Stwierdzenie obecności lub braku niewydolności oddechowej konieczne było do zróżnicowania III i IV^o zaawansowania POChP wg kryteriów GOLD 2007.

4.12. Skala BODE

Dziesięciopunktowa skala BODE (Wstęp Tabela 3) pozwala na określenie stanu klinicznego pacjenta. Analizie poddane są tu wykładniki choroby mające największy wpływ na rokowanie:

B (ang. *body mass index*) - indeks masy ciała

O (ang. *airflow obstruction*) - stopień obturacji dróg oddechowych

D (ang. *dyspnoea*) - duszność

E (ang. *exercise capacity*) - wydolność wysiłkowa

BODE jest skalą sumaryczną, za każdy z parametrów można otrzymać od 0 do 3 punktów, jedynie za BMI 0 lub 1 punkt. W badanej grupie chorych na POChP analizie poddano zarówno poszczególne elementy BODE, jak i sumę uzyskanych punktów.

Wszyscy pacjenci z badanej grupy zostali zważeni i zmierzani na wadze lekarskiej. Na tej podstawie obliczono **wskaźnik masy ciała (BMI)** jako iloraz wagi [kg] i kwadratu wzrostu [m^2] pacjenta. BMI $< 20 \text{ kg/ m}^2$ oznacza niedowagę, BMI 20-25 kg/ m^2 kwalifikuje chorego do grupy osób o prawidłowej masie ciała, BMI $> 25 \text{ kg/ m}^2$ oznacza nadwagę, a BMI $> 30 \text{ kg/ m}^2$ – otyłość (112). W prowadzonym projekcie chorzy zostali podzieleni ze względu na BMI na dwie podgrupy: BMI $< 25 \text{ kg/ m}^2$ oraz BMI $\geq 25 \text{ kg/ m}^2$.

Stopień **obturacji dróg oddechowych** określono po wykonaniu badania spirometrycznego przy pomocy FEV1 [%].

Do oceny nasilenia **duszności** posłużyła skala MMRC (Wstęp Tabela 1).

Test sześciominutowego chodu (6MWT) u chorych na POChP służy do oceny **wydolności wysiłkowej** oraz jako wskaźnik pozwalający przewidywać chorobowość i śmiertelność. Porównanie dystansu przebytego w 6MWT przed i po zakończeniu

leczenia pozwala na ocenę jego skuteczności. Bezwzględny przeciwwskazaniem do wykonania testu jest zawał serca lub niestabilna dławica piersiowa w ciągu miesiąca poprzedzającego badanie. Do przeciwwskazań względnych należą czynność serca w spoczynku powyżej 120/minutę, ciśnienie skurczowe powyżej 180mmHg lub ciśnienie rozkurczowe powyżej 100mmHg.

Test 6-cio minutowego chodu wykonywany był zgodnie z zaleceniami ATS na korytarzu, na prostym odcinku o długości 30m. Mierzono dystans (w metrach) jaki w ciągu sześciu minut przebył pacjent chodząc własnym tempem. Przed testem oraz po jego zakończeniu mierzono tętno, ciśnienie tętnicze oraz saturację hemoglobiny tlenem. Saturacja oceniana była przy użyciu pulsoksymetru OXYPLETH 520A. Pacjent w każdym momencie mógł przerwać wykonywanie badania. Wskazaniami do natychmiastowego zakończenia 6MWT był ból w klatce piersiowej, silna duszność, kurcze mięśni nóg, wzmożona potliwość, nagłe zblednięcie lub zasinienie (9).

Po wykonaniu badań umożliwiających ocenę wszystkich elementów wchodzących w skład skali BODE, sumowano punkty otrzymane za poszczególne parametry, uzyskując ostateczną punktację. Pojedynczy pomiar punktacji w skali BODE u chorych na POChP ma znaczenie zarówno w ocenie ciężkości choroby, jak i znaczenie prognostyczne. Minimalna ilość punktów (0) oznacza rokowanie najlepsze, a maksymalna ilość punktów (10) - rokowanie najgorsze. Wyróżniono cztery przedziały punktacji, charakteryzujące się różnym rokowaniem (0-2, 3-4, 5-6, 7-10 punktów). Najgorsze rokowanie mają pacjenci z liczbą 7-10 pkt. W tej grupie chorych 5 lat przeżywa ok. 20-25% badanych (14, 22, 23).

4.13. Bronchofiberoskopia

Proces apoptozy badany był w popłuczynach oskrzelowych pobranych podczas bronchofiberoskopii z obwodowych partii drzewa oskrzelowego. Do badań użyto bronchofiberoskopów firmy Pentax oraz Olympus. Zabieg ten u wszystkich pacjentów wykonywany był rutynowo, jako element badań kontrolnych lub w celu pobrania materiału do badań bakteriologicznych. Część uzyskanego materiału wykorzystana została w celu realizacji prezentowanego projektu.

Przeciwwskazaniem do wykonania bronchofiberoskopii jest ciężka niewydolność oddechowa, ciężka niewydolność serca, ciężkie zaburzenia rytmu serca, zwłaszcza komorowe, zawał serca w ciągu dwóch tygodni poprzedzających badanie lub

niestabilna dławica piersiowa. Chorzy na POChP ze współwystępowaniem w/w stanów nie byli kwalifikowani do prezentowanego projektu.

Popłuczyny zostały natychmiast odwirowane w temperaturze pokojowej z prędkością 1500 obrotów/minutę przez 5 minut w celu oddzielenia frakcji komórkowej od nadsączu. Nadsącz został zamrożony w temperaturze -70°C , natomiast zawiesina komórkowa poddana dalszym badaniom bezpośrednio po pobraniu.

4.14. Immunofenotypowa ocena składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych

W celu oceny składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych chorych na POChP określono immunofenotyp komórek, co pozwoliło wyodrębnić z zawiesiny komórki nienabłonkowe, granulocyty, limfocyty i makrofagi. Wykorzystane w tym celu przeciwciała monoklonalne przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oceny komórek w popłuczynach oskrzelowych

Przeciwciało	Fluorochrom	Klon	Izotyp	Producent
CD45/CD14 (BD LeucoGATE™)	PE, FITC	MφP9, 2D1	Ms IgG _{2b} , κ, Ms	Becton Dickinson
CD4/CD8/CD3	PerCP, PE, FITC	SK7, SK1, SK3	Ms IgG ₁ , κ, Ms IgG ₁ , κ, Ms IgG ₁ , κ	Becton Dickinson
CD11b/Mac-1	APC	D12	Ms IgG _{2a} , κ	Becton Dickinson
CD45	APC-Cy™ ₇	2D1	Ms IgG ₁ , κ	Becton Dickinson

Procedura immunofenotypowania była zgodna z zaleceniami producenta (Becton Dickinson). Osad komórkowy, uzyskany po odwirowaniu popłuczyn oskrzelowych i zlanii nadsącza, został zawieszony w 2,5 ml buforu fosforanowego (PBS). Następnie do trzech probówek przeniesiono po 100µl uzyskanej zawiesiny. Do pierwszej probówki dodano 20µl reagentu LeucoGATE oraz CD11b, druga stanowiła próbę kontrolną (kontrola izotypowa), do trzeciej dodano po 20µl przeciwciał CD4/CD8/CD3, CD11b oraz CD45. Zawiesinę ostrożnie zamieszano, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej (20-25°C) przez 15 minut bez dostępu światła. Po inkubacji dodano 2 ml buforu lizującego (FACS Lysing Solution; Becton Dickinson), ostrożnie zmieszano i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Uzyskana zawiesina została dwukrotnie przepłukana buforem PBS, po każdym płukaniu odwirowana przy prędkości 1500 obrotów/minutę w czasie 5 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane w ten sposób komórki były gotowe do dalszej analizy za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto (Becton Dickinson) przy użyciu oprogramowania FASCDiva (Becton Dickinson).

4.15. Ocena procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP

W celu oceny apoptozy w drogach oddechowych pacjentów z POChP określono odsetek komórek podlegających apoptozie w oparciu o wiązanie aneksyny V. W popłuczynach oskrzelowych zmierzono także stężenie sFas ligand, jako jednego z elementów przesyłania sygnału apoptozy szlakiem zewnątrzpochodnym Fas/Fas ligand.

4.10.1 Określenie odsetka komórek apoptotycznych w popłuczynach oskrzelowych w oparciu o wiązanie aneksyny V

Odsetek komórek aktywnie podlegających apoptozie określony został za pomocą aneksyny V barwionej izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I- BD Pharmingen). Metoda ta opiera się na utracie asymetrii budowy błony komórkowej we wczesnej fazie apoptozy. W komórkach apoptotycznych fosfatydyloseryna (PS) przemieszcza się z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej, a zatem jest eksponowana na środowisko zewnętrzne. Aneksyna V jest białkiem zależnym od Ca^{2+} wiążącym fosfolipidy. Białko to ma silne powinowactwo do

fosfátydyloseryny. Używany w tej metodzie jodek propidyny (PI) jest standardowo używanym w cytometrii przepływowej wykładnikiem żywotności komórki. Żywe komórki z nienaruszoną błoną komórkową nie łączą się z PI, natomiast błony komórek martwych i uszkodzonych są przepuszczalne dla PI. Komórki barwiące się aneksyną V-FITC, a nie barwiące się jodkiem propidyny, to komórki podlegające apoptozie. Komórki barwiące się zarówno aneksyną V-FITC, jak i PI, są albo w późnej fazie apoptozy, albo podlegają martwicy, albo są to komórki martwe. Komórki nie barwiące się ani aneksyną V-FITC ani PI są żywe i nie podlegają apoptozie.

Zgodnie z zaleceniami producenta osad komórkowy został dwukrotnie przemyty 2,5ml zimnego buforu fosforanowego (PSB). Do czterech 5ml probówek przeniesiono po 100ul uzyskanego roztworu (ok. 1×10^5 komórek). Pierwsza probówka stanowiła kontrolę ujemną, do drugiej dodano 5ul aneksyny V, do trzeciej 5ul jodku propidyny, natomiast do czwartej probówki po 5ul aneksyny V i jodku propidyny. Po zamieszaniu wszystkie probówki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Następnie do wszystkich probówek dodano 400ul buforu wiążącego aneksynę V. Uzyskany materiał został w ciągu 60 minut poddany analizie za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto (Becton Dickinson) przy użyciu oprogramowania FASCDiva (Becton Dickinson).

4.9.2 Pomiar stężenia sFas ligand w popłuczynach oskrzelowych

Kolejnym etapem prezentowanego projektu był pomiar stężenia sFas ligand w popłuczynach oskrzelowych metodą ELISA przy użyciu Human sFas Ligand ELISA Kit (BioVendor). Supernatant z BAL-u, zamrożony w temperaturze -70° C, został rozmrożony tylko raz, bezpośrednio przed badaniem. Procedura badania zgodna była z protokołem producenta.

Wszystkie reagenty zostały przed użyciem dokładnie zamieszane. Każda próbka nadsącza z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego oceniana była w duplikacie. Studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi przeciw ludzkiemu sFas Ligand zostały dwukrotnie przemyte buforem płuczącym dostarczonym przez producenta. Przygotowano dwa rzędy standardowych rozcieńczeń sFas Ligand, w zakresie od 10 do 0,16ng/ml. 50ul nadsącza z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego dodano do wyznaczonych dołków. SFas Ligand obecny w badanych próbkach został związany z przeciwciałami anty-sFas Ligand, opłaszczającymi dołki.

Do dołków dodano 50 μ l koniugatu biotyny, próbki poddano dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, a następnie płukano cztery razy. Koniugat biotyny został związany z sFas Ligand połączonym z przeciwciałem monoklonalnym anti-sFas Ligand. Niezwiązany koniugat biotyny został usunięty podczas czterokrotnego płukania. Do wszystkich dołków dodano 100 μ l streptawidyny-HRP, inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, a następnie płukano. Streptawidyna-HRP przyłączyła się do wcześniej utworzonych połączeń. Aby uzyskać reakcję barwną, dodano 100 μ l roztworu substratu TMB (3,3',5,5'-czterometylobenzydyna), reagującego z HRP, inkubowano 10min w temperaturze pokojowej. Barwa utworzonego produktu zależała od stężenia sFas Ligand w badanej próbce. Reakcja enzymatyczna została zahamowana po dodaniu 100 μ l roztworu hamującego. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda=450\text{nm}$ wykorzystując czytnik Multiskan Bichromatic (Labsystem). Utworzono standardową krzywą poprzez umieszczenie średniej absorbancji dla każdego stężenia standardowego na osi rzędnych oraz stężenia sFas Ligand na osi odciętych. Stężenie sFas Ligand w BAL-u zostało wyznaczone poprzez odnalezienie średniej wartości absorbancji dla danej próbki na osi rzędnych, przeprowadzenie poziomej linii do krzywej standardowej. Od miejsca przecięcia przeprowadzono linię pionową do osi odciętych, gdzie odczytano wartość stężenia sFas Ligand w badanej próbce.

4.11 Analiza statystyczna

Dane uzyskane w badaniach dodatkowych opracowano w czterech podgrupach według stopni zaawansowania choroby wg GOLD, wydolności oddechowej, wieku, płci, BMI, IC/TLC, dystansu w teście 6-cio min. chodu, punktacji w skali BODE. W analizie statystycznej zebranego materiału badawczego zastosowano następujące metody statystyczne.

Do prezentacji wyników w przypadku zmiennych ilościowych wykorzystano metody statystyki opisowej takie jak: licznosc (N), średnia arytmetyczna (\bar{x}), odchylenie standardowe (SD), minimum (Min), maksimum (Max), rozstęp, kwartył dolny (Q_1), mediana (Me), kwartył górny (Q_3), współczynnik zmienności (V), błąd standardowy (SE). Z kolei w odniesieniu do zmiennych jakościowych zastosowano liczebność i procent (%).

Dla wszystkich parametrów sprawdzono zgodność ich rozkładu z rozkładem normalnym. Ocenę zgodności przeprowadzono testem Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji sprawdzono testem Levene'a.

Analizę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi w dwóch podgrupach (wydolność oddechowa, płeć, wiek, BMI, IC/TLC, dystans w teście 6-cio min. chodu) dla zmiennych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach sprawdzono testem t-Studenta. Natomiast analizę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi w dwóch podgrupach (wydolność oddechowa, płeć, wiek, BMI, IC/TLC, dystans w teście 6-cio min. chodu) dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego lub niejednorodnych wariancjach sprawdzono testem nieparametrycznym Manna-Whitneya.

Analizę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi w trzech podgrupach (stopień zaawansowania POChP I+II, III i IV wg GOLD) dla zmiennych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach sprawdzono analizą wariancji (ANOVA). W przypadku istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test HSD Tukeya. Analizę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi w trzech podgrupach (stopień zaawansowania POChP I+II, III i IV wg GOLD) dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego lub niejednorodnych wariancjach sprawdzono testem nieparametrycznym ANOVA rang Kruskala-Wallisa. W przypadku istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test post-hoc dla porównań wielokrotnych.

W celu określenia związku między wykładnikami apoptozy a wynikami badań dodatkowych zastosowano nieparametryczny współczynnik korelacji Spearmana.

W celu określenia istotności różnic pomiędzy porównywanymi grupami w odniesieniu do zmiennych jakościowych wykorzystano tabele wieloznaczne i test χ^2 .

W celu ustalenia wzajemnych zależności poszczególnych zmiennych świadczących o zaawansowaniu choroby (stopień wg GOLD, punktacja w skali BODE, RV/TLC, RV, FEV1, dystans w teście 6-cio minutowego chodu, IC/TLC, DLCO, SaO₂, odsetek komórek apoptotycznych) zastosowano analizę skupień z wykorzystaniem metody aglomeracji i metody k-średnich. Metoda aglomeracji polega na tworzeniu skupień, począwszy od połączenia dwóch najbardziej podobnych obiektów, a następnie na kolejnym dołączaniu obiektów lub łączeniu skupień ze względu na ich podobieństwo, aż do uzyskania skupienia mocnego, które integruje wszystkie skupienia niższych poziomów. W celu określenia odległości między skupieniami wykorzystano metodę

aglomeracji Warda wraz z wykorzystaniem miary odległości euklidesowej. W procedurach hierarchicznych istnieje możliwość graficznego przedstawienia wyników w postaci dendrogramu (drzewka połączeń), które ilustruje kolejne połączenia skupień coraz to wyższego rzędu. Uzyskana hierarchia pozwala na określenie wzajemnego położenia skupień i obiektów w nich zawartych. Otrzymane wyniki analizy skupień przedstawiono za pomocą dendrogramu. W analizie skupień metodą aglomeracji przeprowadzonej w tej samej grupie zmiennych wyodrębniono dwie najdłuższe odległości wiązań, co pomogło we wskazaniu ilości skupień podczas przeprowadzania grupowania metodą k-średnich.

Weryfikacje hipotez statystycznych przeprowadzone były dla poziomu istotności $\alpha=0,05$. W analizie statystycznej zgromadzonego materiału wykorzystano program Statistica 9.0 PL i MS Excel 2003.

5. WYNIKI

3.1 Charakterystyka grupy badanej

Do badania włączono 57 chorych na POChP (39 mężczyzn i 18 kobiet), pozostających pod opieką Katedry i Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Na podstawie kryteriów włączenia do badania kwalifikowano chorych w wieku od 40 do 80 rż. Średni wiek w całej grupie badanej wynosił 65,19 lat. Zgodnie z przyjętymi kryteriami wszyscy chorzy zostali włączeni do badania w stabilnym okresie choroby. Potwierdzają to dane uzyskane dzięki przeprowadzonej ankiecie, w której żaden z pacjentów nie podawał objawów zaostrzenia POChP. Również prawidłowe stężenia CRP uzyskane u wszystkich chorych świadczą o stabilnym okresie choroby. Średnie stężenie CRP w grupie badanej (N=57) wynosiło 3,51mg/l (Min=0,5mg/l, Max=9,34mg/l), przy normie laboratoryjnej 0-9 mg/l. Zgodnie z kryteriami włączenia do badania zakwalifikowano chorych na POChP palących papierosy oraz byłych palaczy. Dla wszystkich chorych obliczono liczbę paczkolet (liczba lat palenia x liczba paczek papierosów/dziennie). Średnia liczba paczkolet w całej badanej grupie wyniosła 38 (Me=40). Poniżej, w tabeli 4, przedstawiono parametry charakteryzujące badaną grupę chorych na POChP. (Aneks Tabela 1)

Grupa badana została podzielona na trzy podgrupy ze względu na stopień zaawansowania choroby według GOLD na podstawie badania spirometrycznego: POChP I+II^o (n=22), POChP III^o (n=19), POChP IV^o (n=16). Wartości badanych parametrów charakteryzujących w/w podgrupy przedstawiono w tabeli 5. (Aneks Tabela 2, 3, 4)

Na podstawie wyników gazometrii krwi tętniczej wyodrębniono także grupę chorych **wydolnych oddechowo**, z ciśnieniem parcjalnym tlenu we krwi tętniczej ≥ 60 mmHg (n=37) oraz grupę chorych **niewydolnych oddechowo**, z hipoksemią (ciśnieniem parcjalnym tlenu we krwi tętniczej poniżej 60mmHg) oraz z hipoksemią i hiperkapnią (ciśnieniem parcjalnym dwutlenku węgla we krwi tętniczej powyżej 45mmHg) (n=20). Poniżej, w tabeli 6, przedstawiono parametry charakteryzujące podgrupy chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo. (Aneks Tabela 5, 6)

Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy badanej oraz podgrup I+II, III, IV^o wg GOLD

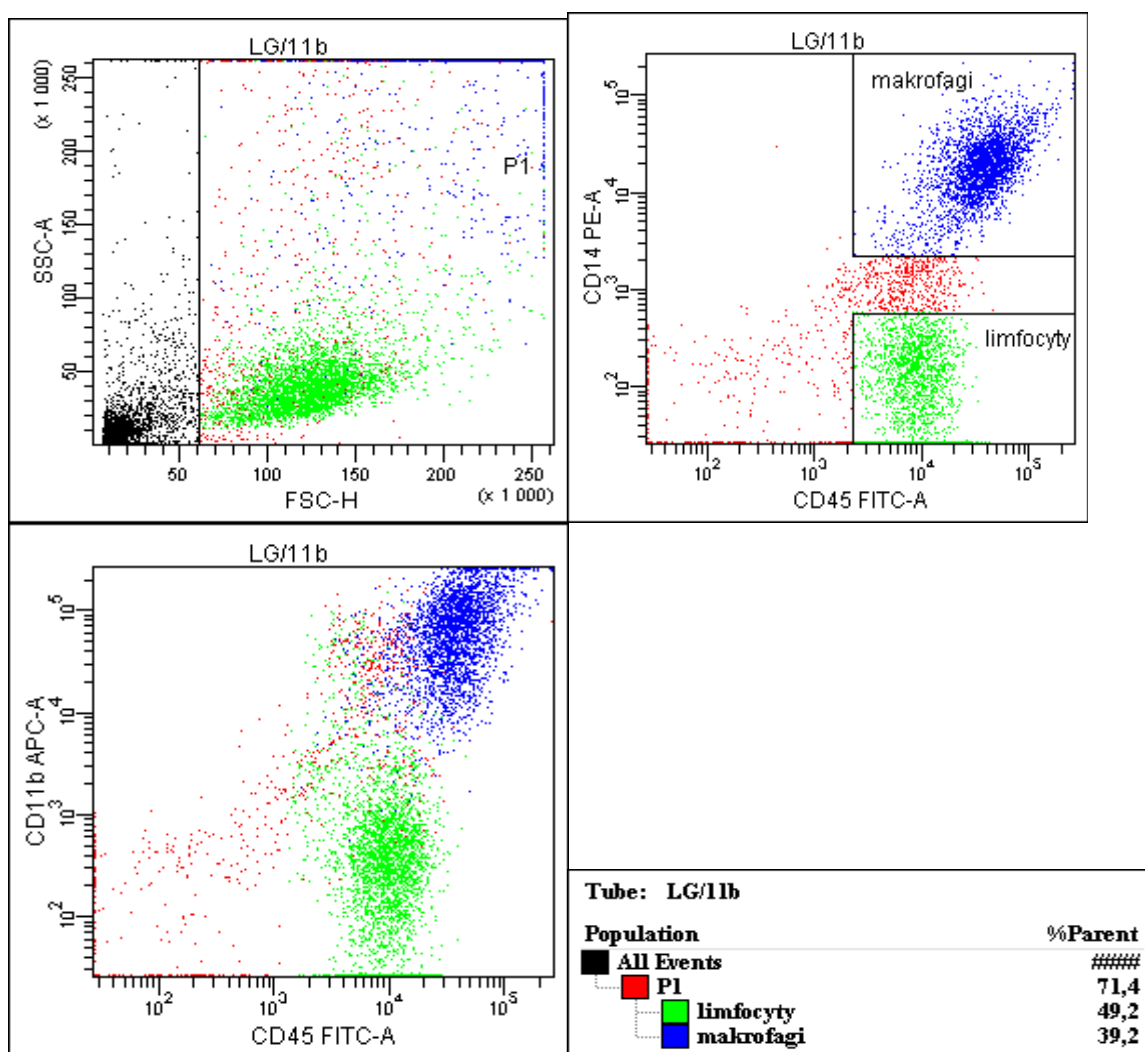
	ogółem	POChP I+II ^o wg GOLD	POChP III ^o wg GOLD	POChP IV ^o wg GOLD	wartość p (dla I+II, III i IV ^o wg GOLD)
	$\bar{x} \pm SE$ (Min ; Max)				
wiek [lata]	65,19±1,06 (42 ; 79)	63,55±2,0 (42 ; 76)	66,42±1,76 (56 ; 79)	66,00±1,59 (58 ; 77)	ns
FEV1 [%]	47,69±2,33 (15 ; 98)	64,23±4,00 (28 ; 98)	41,59±1,14 (31,9 ; 49,7)	31,14±2,29 (15,3 ; 48,9)	≤0,001
RV [%]	196,41±8,66 (98 ; 362,9)	162,98±10,95 (97,8 ; 276)	201,01±11,39 (150 ; 301)	250,52±16,64 (158 ; 362,9)	≤0,001
TLC [%]	118,22±2,82 (80 ; 176,7)	113,15±3,95 (80,4 ; 144,7)	118,06±5,12 (88 ; 176,7)	127,68±5,42 (97 ; 154,9)	≤0,001
IC/TLC [%]	30,81±1,27 (10,1 ; 49,8)	38,06±1,75 (25,6 ; 49,8)	28,16±1,65 (10,1 ; 37,2)	24,45±1,62 (16 ; 34,5)	≤0,001
RV/TLC [%]	63,25±1,32 (42,15 ; 79,22)	55,93±1,92 (42,15 ; 70,48)	65,97±1,66 (45,22 ; 75,64)	70,17±1,51 (62,98 ; 79,22)	≤0,001
DLCO [%]	49,54±2,86 (16 ; 85,3)	63,35±2,58 (42,1 ; 85,3)	41,34±4,43 (16,1 ; 77,5)	34,96±5,09 (21,2 ; 62,3)	≤0,001
paO2 [mmHg]	63,33±1,04 (51 ; 88,6)	66,34±1,15 (56,3 ; 75,4)	64,19±1,35 (52,7 ; 76,6)	58,17±2,55 (51,88,6)	≤0,001
paCO2 [mmHg]	41,52±0,78 (27,5 ; 55,5)	39,65±0,72 (34,3 ; 46,3)	39,58±0,38 (27,5 ; 48,9)	46,37±1,57 (34,9 ; 55,5)	≤0,001
SaO2 [%]	93,61±0,41 (85 ; 99,5)	95,22±0,49 (91,1 ; 99,5)	94,12±1,33 (90,1 ; 96,6)	90,78±0,84 (85,4 ; 98,3)	≤0,001
dystans w teście 6-min. chodu [m]	343,43±17,96 (60 ; 570)	432,73±16,82 (300 ; 570)	305,88±29,56 (60 ; 510)	232,92±28,64 (60 ; 375)	≤0,001
BMI [kg/m ²]	26,8±0,77 (16,5 ; 44,1)	26,23±1,07 (19,1 ; 37,6)	26,34±1,08 (19,9 ; 39,6)	28,14±1,99 (16,5 ; 44,1)	ns
MMRC [0-4]	2±0,126 (0 ; 4)	1±0,146 (0 ; 2)	2±0,137 (1 ; 3)	3±0,143 (2 ; 4)	≤0,001
BODE [punkty 1-10]	3±0,36 (0 ; 9)	1±0,32 (0 ; 5)	5±0,38 (2 ; 8)	6±0,39 (3 ; 9)	≤0,001
liczba paczkołat	38±2,03 (10 ; 80)	37±2,86 (10 ; 65)	37±4,17 (10 ; 80)	41±3,67 (10 ; 60)	ns

Tabela 6. Ogólna charakterystyka grup chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo

	Wydolni oddechowo (N=37)	Niewydolni oddechowo (N=20)	wartość p
	$\bar{x} \pm SE$ (Min ; Max)		
wiek [lata]	64,24±1,36 (42 ; 79)	66,95±1,67 (57 ; 79)	ns
FEV1 [%]	53,79±2,83 (15,3 ; 98)	35,79±2,45 (21,3 ; 63,5)	≤0,001
RV [%]	182,48±9,86 (97,8 ; 301)	226,15±14,82 (154,7 ; 362,9)	0,028
TLC [%]	115,44±3,47 (80,4 ; 176,7)	124,15±4,59 (97 ; 154,9)	ns
IC/TLC [%]	34,07±1,5 (18,8 ; 49,8)	25,19±1,56 (10,1 ; 36,5)	≤0,001
RV/TLC [%]	60,18±1,7 (42,15 ; 76,89)	68,86±1,27 (60,94 ; 79,22)	≤0,001
DLCO [%]	55,27±3,1 (16,1 ; 85,3)	37,26±4,68 (17,7 ; 77,5)	0,003
SaO2 [%]	94,95±0,31 (91,1 ; 99,5)	91,12±0,73 (85,4 ; 92,8)	≤0,001
paO2 [mmHg]	67,29±0,77 (60 ; 88,6)	56,01±1,79 (51 ; 59,8)	≤0,001
paCO2 [mmHg]	39,95±0,77 (27,5 ; 53,2)	45,52±1,33 (34,2 ; 55,5)	≤0,001
dystans w teście 6-min. chodu [m]	377±20,9 (60 ; 570)	263±25,5 (120 ; 465)	0,002
BMI [kg/m²]	26,0±0,74 (16,5 ; 37,6)	28,29±1,71 (19,4 ; 44,1)	ns
MMRC [0-4]	2±0,135 (0 ; 3)	3±0,124 (2 ; 4)	≤0,001
BODE [punkty 1-10]	3±0,4 (0 ; 9)	6±0,37 (2 ; 8)	≤0,001
liczba paczkołat	37±2 (10 ; 65)	41±4,37 (10 ; 80)	ns

3.2 Immunofenotypowa ocena składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych

Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych określony został metodą cytometrii przepływowej. Immunofenotyp komórek popłuczyn oskrzelowych oceniono za pomocą przeciwciał anti-CD45/CD14, anti-CD45, anti-CD11b oraz anti-CD4/CD8/CD3. (Rycina 1)



Rycina 1. Immunofenotypowa ocena składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych w oparciu o ekspresję CD45, CD14 i CD11b

Określono procentowy udział komórek nienabłonkowych wśród wszystkich komórek zawartych w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP. Wśród nich wyodrębniono odsetek granulocytów, limfocytów i makrofagów.

Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych ogółu chorych oraz w grupach chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD przedstawiono w tabeli 7, w grupach chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo w tabeli 8.

Tabela 7. Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych u chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD

	ogółem (N=56)	POChP I+II ^o wg GOLD (N=22)	POChP III ^o wg GOLD (N=19)	POChP IV ^o wg GOLD (N=15)	wartość P dla I+II, III, IV ^o wg GOLD
	$\bar{x} \pm SE$ (Min ; Max)				
komórki nienabłonkowe [%]	64,26±2,43 (21; 91)	67,32±3,4 (28; 90)	58,76±4,98 (21; 91)	66,73±4,09 (43; 87)	ns
granulocyty [%]	48,34±3,28 (0; 95)	40,05±5,11 (0; 81)	46,11±5,97 (10; 95)	63,33±4,29 (32; 84)	0,0146
limfocyty [%]	3,63±0,57 (0; 21)	4,82±0,66 (1; 21)	3,38±0,64 (0; 11)	2,2±0,83 (0; 12)	ns
makrofagi [%]	16,81±2,66 (0; 88)	23,32±5,43 (0; 88)	15,8±4,12 (0; 69)	8,53±1,4 (1; 21)	ns

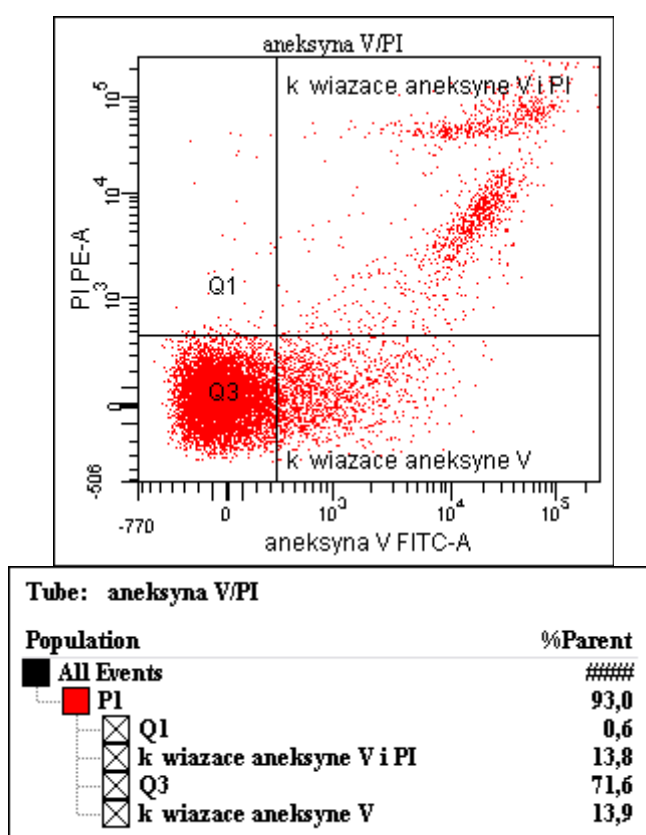
Tabela 8. Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo

	Wydolni oddechowo (N=37)	Niewydolni oddechowo (N=19)	wartość P
	$\bar{x} \pm SE$ (Min ; Max)		
komórki nienabłonkowe [%]	62,92±3,12 (21; 91)	66,87±3,84 (32; 87)	ns
granulocyty [%]	45,41±4,16 (0; 95)	54,05±5,16 (10; 77)	ns
limfocyty [%]	4,04±0,78 (0; 21)	2,83±0,66 (0; 12)	ns
makrofagi [%]	18,09±3,65 (0; 88)	14,32±3,36 (1; 69)	ns

3.3 Ocena apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP

3.3.1 Apoptoza komórek płuczyn oskrzelowych chorych na POChP oceniana w oparciu o wiązanie aneksyny V

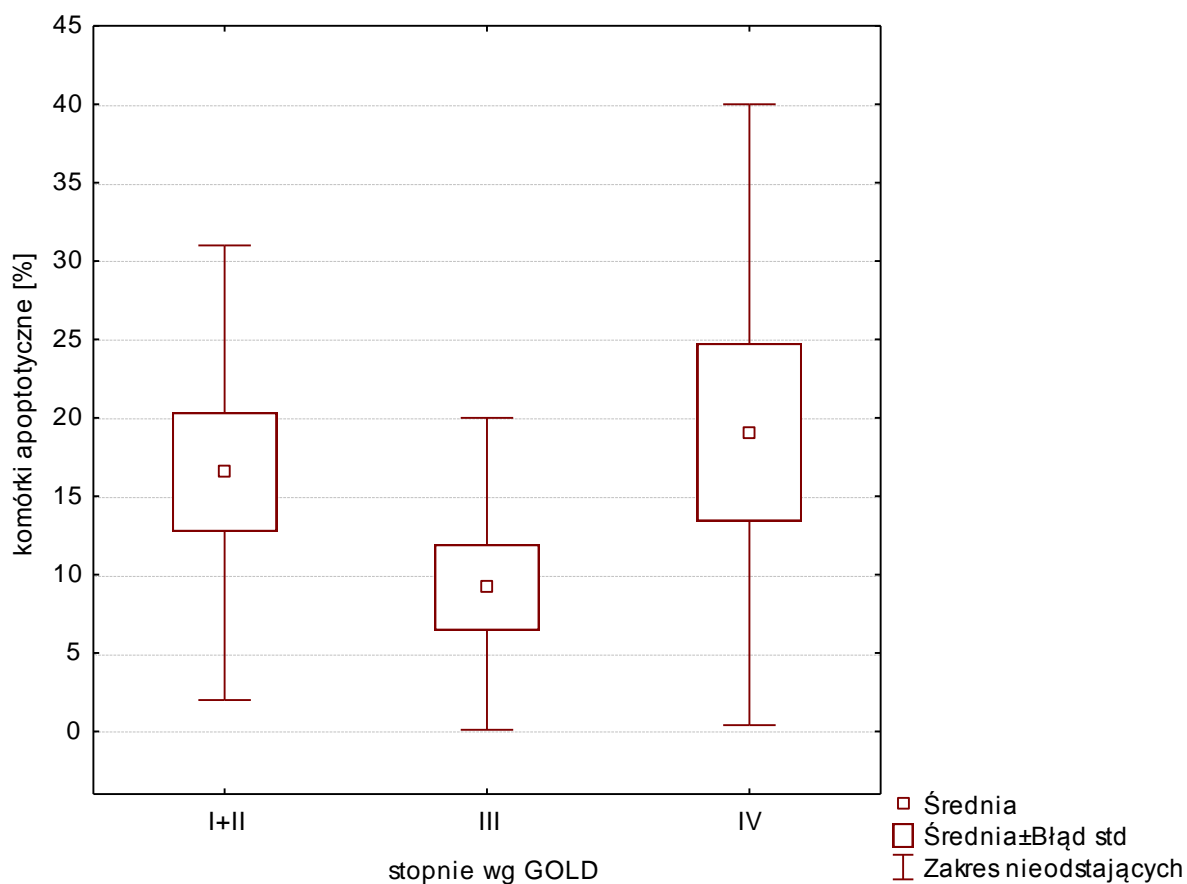
Do oceny apoptozy komórek w dolnych drogach oddechowych chorych na POChP wykorzystano zestaw umożliwiający ocenę wiązania aneksyny V na powierzchni błony komórkowej. (Rycina 2)



Rycina 2. Ocena apoptozy komórek płuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych w oparciu o wiązanie aneksyny V

Wykazano, że w całej grupie badanej (n=56) średnio 14,73% komórek wykazuje wykładniki apoptozy (Me=6) . (Aneks Tabela 1)

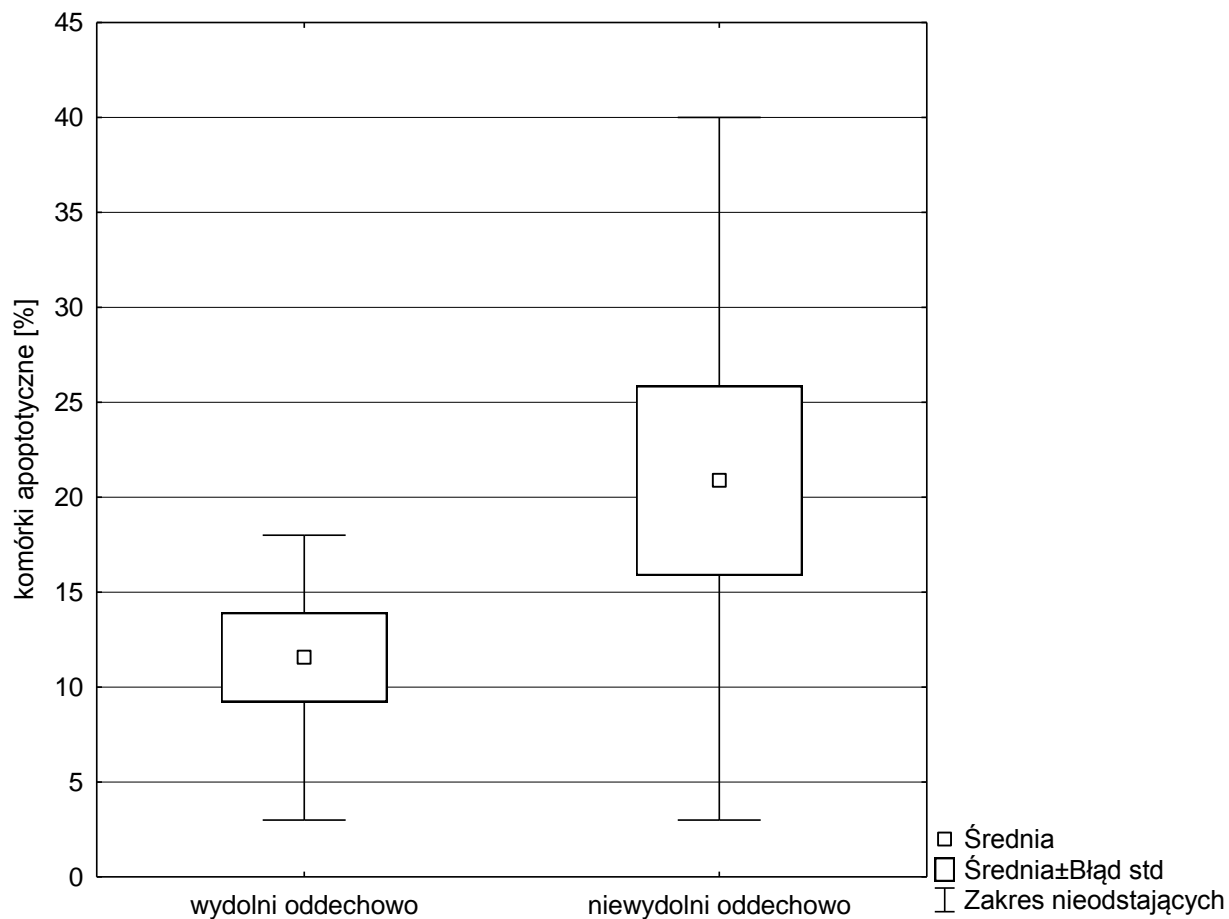
3.3.1.a Ocena apoptozy komórek płuczyn oskrzelowych chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD w oparciu o wiązanie aneksyny V



Rycina 3. Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP w stopniu I+II, II i IV wg GOLD (p=ns)

Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP wynosił odpowiednio w stopniu I+II wg GOLD 16,55% (Me=6,5), w stopniu III 9,18% (Me=6), w stopniu IV 19,08 (Me=13) (Rycina 3, Aneks Tabela 2, 3, 4). Średnie te wykazują zróżnicowanie w badanych grupach, jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej ($p=0,5806$). (Aneks Tabela 18).

3.3.1.b Ocena apoptozy komórek płuczek oskrzelowych chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo w oparciu o wiązanie aneksyny V



Rycina 4. Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo.

Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP bez niewydolności oddechowej wynosił 11,57% (Me=5,0), natomiast w grupie chorych na POChP niewydolnych oddechowo 20,87% (Me=13,0). W badanych grupach średnie te wykazują różnicowanie istotne statystycznie ($p=0,0438$). (Rycina 4, Aneks Tabela 5, 6)

3.3.1.c Porównania odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych, ocenianych w oparciu o wiązanie aneksyny V, z innymi badanymi parametrami w grupach chorych na POChP:

- **pleć:** średni odsetek komórek apoptotycznych w dolnych drogach oddechowych w grupie mężczyzn chorych na POChP wynosił 12,81% (Me=5,77), a w grupie kobiet 18,77% (Me=12,5). W badanych grupach średnie te nie wykazują zróżnicowania istotnego statystycznie ($p=0,2578$) (Aneks Tabela 7, 21).

- **wiek:** badając różnice pomiędzy grupami wiekowymi (40-65 rż oraz 65-80 rż) u chorych na POChP nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych ($p=0,5941$). W grupie chorych młodszych (40-65 rż) średnio 16,26% (Me=7) komórek podlegało apoptozie, natomiast wśród chorych starszych (65-80 rż) średnio 12,53% (Me=6) komórek podlegało apoptozie. (Aneks Tabela 7, 21)

- **BMI:** badając różnice pomiędzy grupami pacjentów z $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ (chorzy z niedowagą i prawidłową masą ciała) oraz z $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ (nadwaga i otyłość) nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych ($p=0,2195$). W grupie chorych z nadwagą i otyłością średnio 12,99% (Me=5,5) komórek podlegało apoptozie, natomiast w grupie chorych z prawidłową masą ciała i niedowagą średni odsetek komórek apoptotycznych wynosił 16,88% (Me=8) (Aneks Tabela 7, 21).

- **wskaźnik hiperinflacji:** badając różnice pomiędzy grupami pacjentów z $IC/TLC \leq 25$ oraz z $IC/TLC > 25$ nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych ($p=0,5848$). W grupie chorych z $IC/TLC \leq 25$ średnio 12,96% (Me=4,5) komórek podlegało apoptozie, a w grupie z $IC/TLC > 25$ średnio 15,86% (Me=6). (Aneks Tabela 7, 21)

- **dystans w teście 6-cio minutowego chodu:** badając różnice pomiędzy grupami pacjentów z dystansem w 6MWT $< 350 \text{ m}$ oraz z dystansem w 6MWT $\geq 350 \text{ m}$ nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych ($p=0,9379$). W grupie chorych z 6MWT $< 350 \text{ m}$ wynosił on 14,94% (Me=6), a z 6MWT $\geq 350 \text{ m}$ 15,55% (Me=8). (Aneks Tabela 8, 21)

- **punktacja w skali BODE:** badając różnice pomiędzy grupami pacjentów z punktacją w skali BODE 0-2, BODE 3-4, BODE 5-6 i BODE 7-10 nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla odsetka komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych

($p=0,5417$). Wynosił on odpowiednio 18,39% (Me=11,5), 11,73% (Me=6), 11,63% (Me=3,8), 15,82% (Me=5,5). (Aneks Tabela 8, 24)

3.3.1.d Korelacje między odsetkiem komórek apoptotycznych w popłuczynach oskrzelowych, ocenianym w oparciu o wiązanie aneksyny V, a wykładnikami stopnia zaawansowania choroby i zaburzeń czynnościowych płuc

W analizowanej grupie chorych na POChP wykazano dodatnią istotną statystycznie korelację odsetka komórek apoptotycznych, ocenionego w oparciu o wiązanie aneksyny V, z ciśnieniem parcjalnym dwutlenku węgla we krwi tętniczej ($r_s=0,27$, $p=0,0400$). (Aneks Tabela 22)

Nie wykazano korelacji odsetka komórek apoptotycznych, ocenionego w oparciu o wiązanie aneksyny V:

- z wykładnikami zaawansowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc takimi jak: **FEV1** [%] ($r_s=0,02$, $p=0,8970$), **RV** [%] ($r_s=-0,19$, $p=0,1891$), **TLC** [%] ($r_s=-0,03$, $p=0,8190$), **IC/TLC** [%] ($r_s=-0,02$, $p=0,9164$), **RV/TLC** [%] ($r_s=-0,03$, $p=0,8426$);

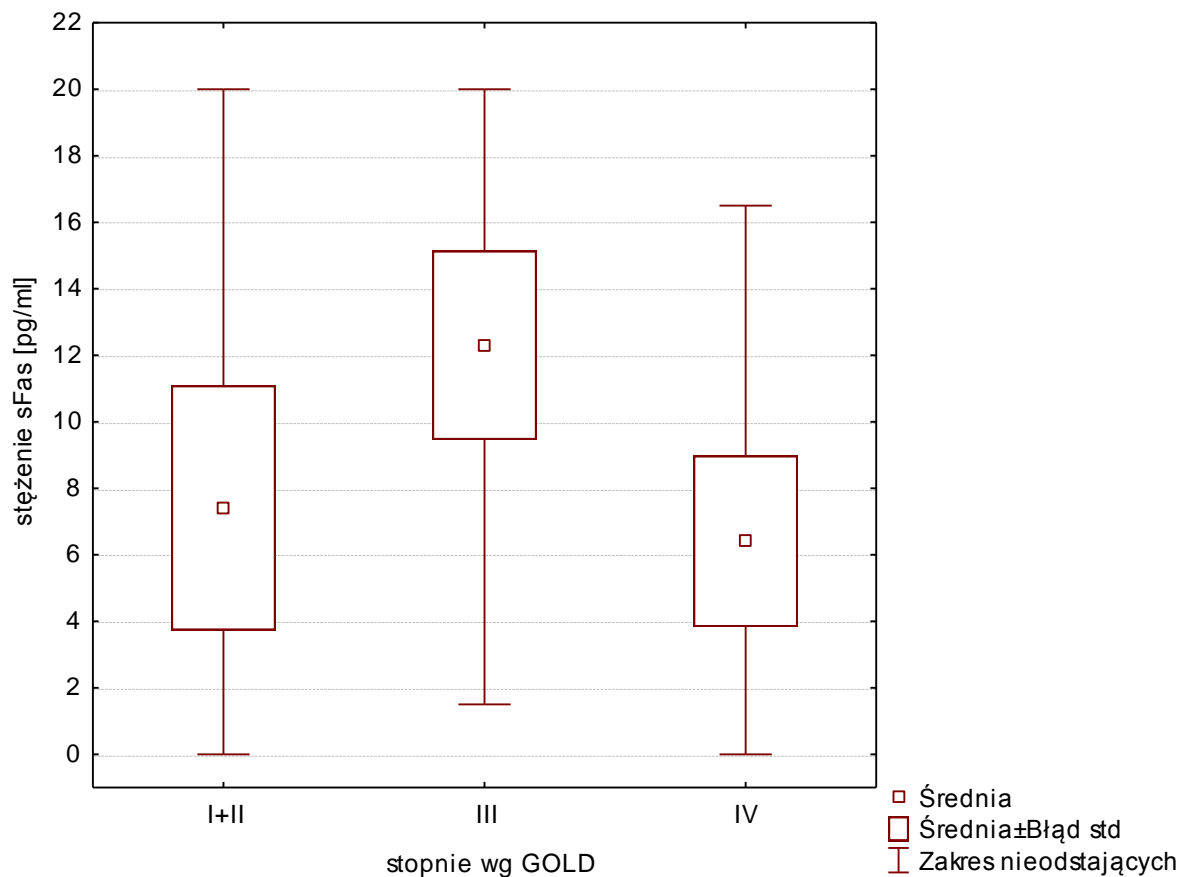
- z parametrami czynności płuc takimi jak **DLCO** [%] ($r_s=0,02$, $p=0,8765$), **SaO2** [%] ($r_s=0,12$, $p=0,3933$), **paO2** [mmHg] ($r_s=-0,07$, $p=0,6184$), **dystans w teście 6-cio minutowego chodu** [m] ($r_s=0,03$, $p=0,8093$),

- z innymi parametrami, takimi jak stopień w skali **MMRC** ($r_s=-0,30$, $p=0,8125$), **BMI** [kg/m^2] ($r_s=-0,2$, $p=0,1312$), punktacja w skali **BODE** ($r_s=-0,06$, $p=0,7037$), **liczba paczkołat** ($r_s=0,05$, $p=0,1312$) czy **wiek** ($r_s=-0,04$, $p=0,7924$). (Aneks Tabela 22)

3.3.2 Ocena stężenia sFasL [pg/ml] w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP w oparciu o

W analizowanej grupie chorych na POChP określono stężenie sFasL w popłuczynach oskrzelowych. W całej grupie badanej ($n=43$) uzyskano średnie stężenie sFasL 8,86pg/ml (Me=1,5pg/ml). (Aneks Tabela 1)

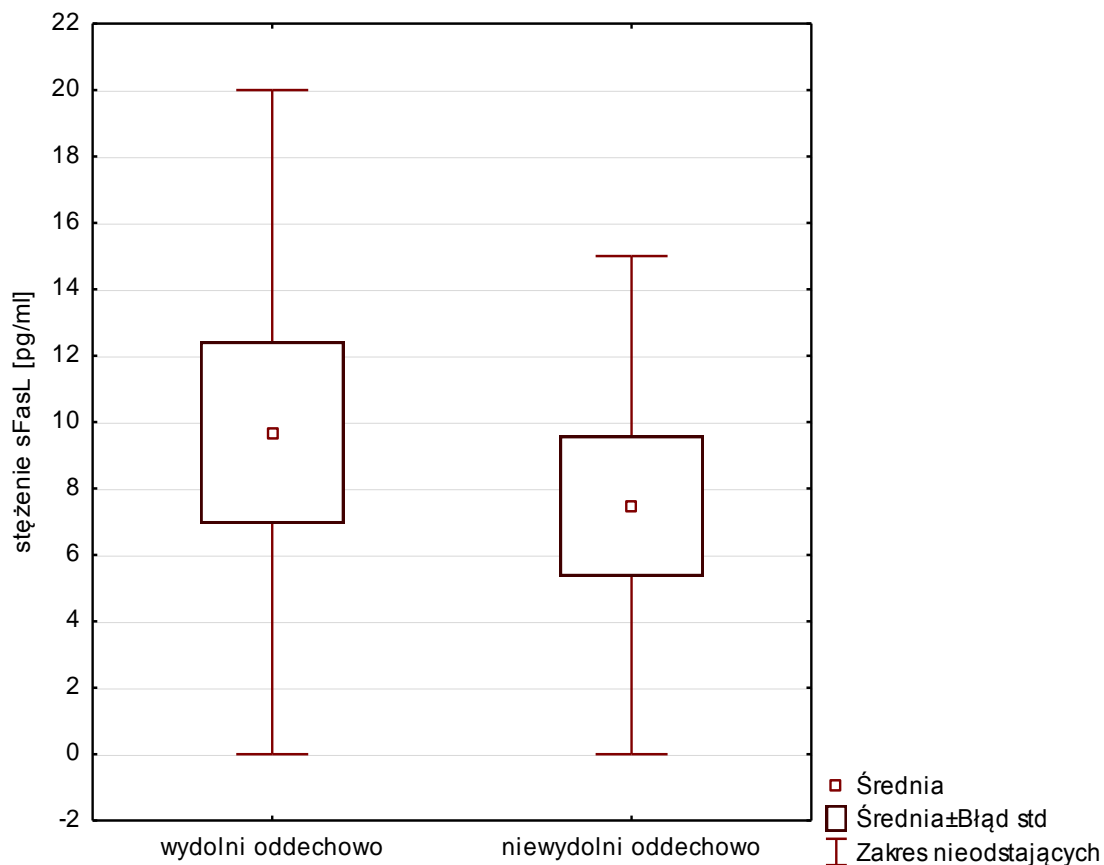
3.3.2.a Ocena stężenia sFasL [pg/ml] w płucach oskrzelowych chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD



Rycina 5. Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP w stopniu I+II, II i IV wg GOLD (p=0,0647).

Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP wynosiło odpowiednio w stopniu I+II wg GOLD 7,41 pg/ml, (Me=0), w stopniu III 12,3 pg/ml (Me 15), w stopniu IV 6,41 pg/ml (Me=1,5). (Rycina 5, Aneks Tabela 2, 3, 4). W badanych grupach widoczna jest tendencja do zróżnicowania istotnego statystycznie, jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej (p=0,0647). (Aneks Tabela 18)

3.3.2.b Ocena stężenia sFasL [pg/ml] w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo



Rycina 6. Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo (p=ns)

Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP wydolnych oddechowo wynosiło 9,69pg/ml (Me=0), natomiast w grupie chorych na POChP niewydolnych oddechowo 7,47pg/ml (Me=2,25). (Rycina 6, Aneks Tabela 5, 6) W badanych grupach średnie te wykazują zróżnicowanie jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej ($p=0,7822$) (Aneks Tabela 20)

3.3.2.c Porównania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych z innymi badanymi parametrami w grupach chorych na POChP:

- **pleć:** wartości średnie stężenia sFasL wynosiły 8,11 pg/ml (Me=0,76) u mężczyzn i 10,27 pg/ml (Me=7,5) u kobiet. Nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania badanego parametru w grupach mężczyzn i kobiet ($p=0,7695$). (Aneks Tabela 7, 21)

- **wiek:** badając różnicę pomiędzy grupami wiekowymi (40-65rż oraz 65-80rż) u chorych na POChP nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania dla stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych ($p=0,9703$) W grupie chorych młodszych średnie stężenie sFasL wynosiło 17,21pg/ml (Me=13), natomiast u chorych starszych 15,56pg/ml (Me=15) (Aneks Tabela 7, 21)

- **BMI:** nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych pomiędzy grupami pacjentów z $BMI \leq 25 \text{kg/m}^2$ (chorzy z niedowagą i prawidłową masą ciała) oraz z $BMI > 25 \text{kg/m}^2$ (nadwaga i otyłość) ($p=0,4053$). W grupie z $BMI \leq 25 \text{kg/m}^2$ średnie stężenie sFasL wynosiło 20,14pg/ml (Me=16,5), natomiast w grupie chorych z $BMI > 25 \text{kg/m}^2$ 15pg/ml (Me=15), (Aneks Tabela 7, 21)

- **wskaznik hiperinflacji IC/TLC:** nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych między chorymi z $IC/TLC \leq 25\%$ oraz z $IC/TLC > 25\%$ ($p=0,6982$). W grupie z $IC/TLC \leq 25$ średnie stężenie sFasL wynosiło 11,70pg/ml (Me=11), natomiast w grupie chorych z $IC/TLC > 25\%$ 16,5pg/ml (Me=15), (Aneks Tabela 7, 21)

- **dystans w teście 6-cio minutowego chodu:** nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych między chorymi z dystansem w $6MWT < 350\text{m}$ oraz z dystansem w $6MWT \geq 350\text{m}$ ($p=0,7562$). W grupie z dystansem w $6MWT < 350\text{m}$ średnie stężenie sFasL wynosiło 7,88pg/ml (Me=2,25), natomiast w grupie chorych z dystansem w $6MWT \geq 350\text{m}$ 10,68pg/ml (Me=0), (Aneks Tabela 8, 21)

- **punktacja w skali BODE:** nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych między chorymi z punktacją w skali BODE 0-2, BODE 3-4, BODE 5-6 i BODE 7-10 ($p=0,2361$). W przedziale 0-2 punkty średnie stężenie sFasL wynosiło 9,40pg/ml (Me=0), 3-4 punkty: 10,90pg/ml (Me=6,25), 5-6 punktów: 6,81pg/ml (Me=2,25), 7-10 punktów: 7,65pg/ml (Me=4,5). (Aneks Tabela 8, 24)

3.3.2.d Korelacje między stężeniem sFasL w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP a wykładnikami stopnia zaawansowania choroby i zaburzeń czynnościowych płuc

- Wykładniki zaawansowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc takie jak: **FEV1** [%] ($r_s = -0,04$, $p = 0,8020$), **RV** [%] ($r_s = 0,05$, $p = 0,7912$), **TLC** [%] ($r_s = 0,09$, $p = 0,5999$), **IC/TLC** [%] ($r_s = -0,22$, $p = 0,1943$), **RV/TLC** [%] ($r_s = 0,19$, $p = 0,2626$);

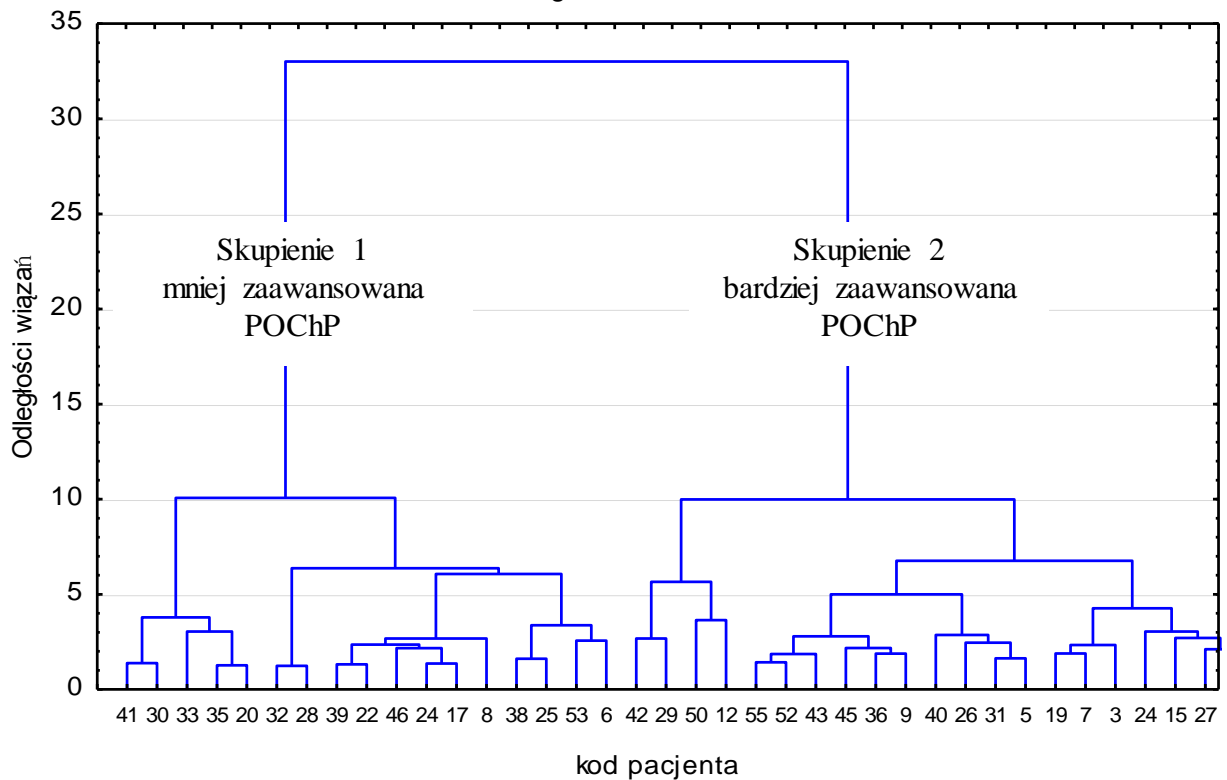
- parametry czynności płuc takie jak: **SaO2** [%] ($r_s = 0,11$, $p = 0,4944$), **paO2** [mmHg] ($r_s = 0,12$, $p = 0,4481$), **paCO2** [%] ($r_s = -0,04$, $p = 0,7978$), **DLCO** [%] ($r_s = -0,22$, $p = 0,2067$), dystans w teście 6-cio minutowego chodu [m] ($r_s = -0,03$, $p = 0,8545$),

- inne parametry, takie jak: stopień w skali **MMRC** ($r_s = -0,12$, $p = 0,4350$), **BMI** [kg/m^2] ($r_s = -0,05$, $p = 0,7480$) i punktacja w skali **BODE** ($r_s = 0,13$, $p = 0,4346$) oraz wiek ($r_s = -0,13$, $p = 0,4071$), również nie korelowały ze stężeniem sFasL [pg/ml] w popłuczynach oskrzelowych. (Aneks Tabela 23)

3.3.3 Próba odpowiedzi na pytanie czy apoptoza jest związana ze stopniem zaawansowania klinicznego POChP poprzez poszukiwanie parametrów świadczących o zaawansowaniu choroby (analiza skupień przeprowadzona metodą aglomeracji oraz metodą grupowania k-średnich)

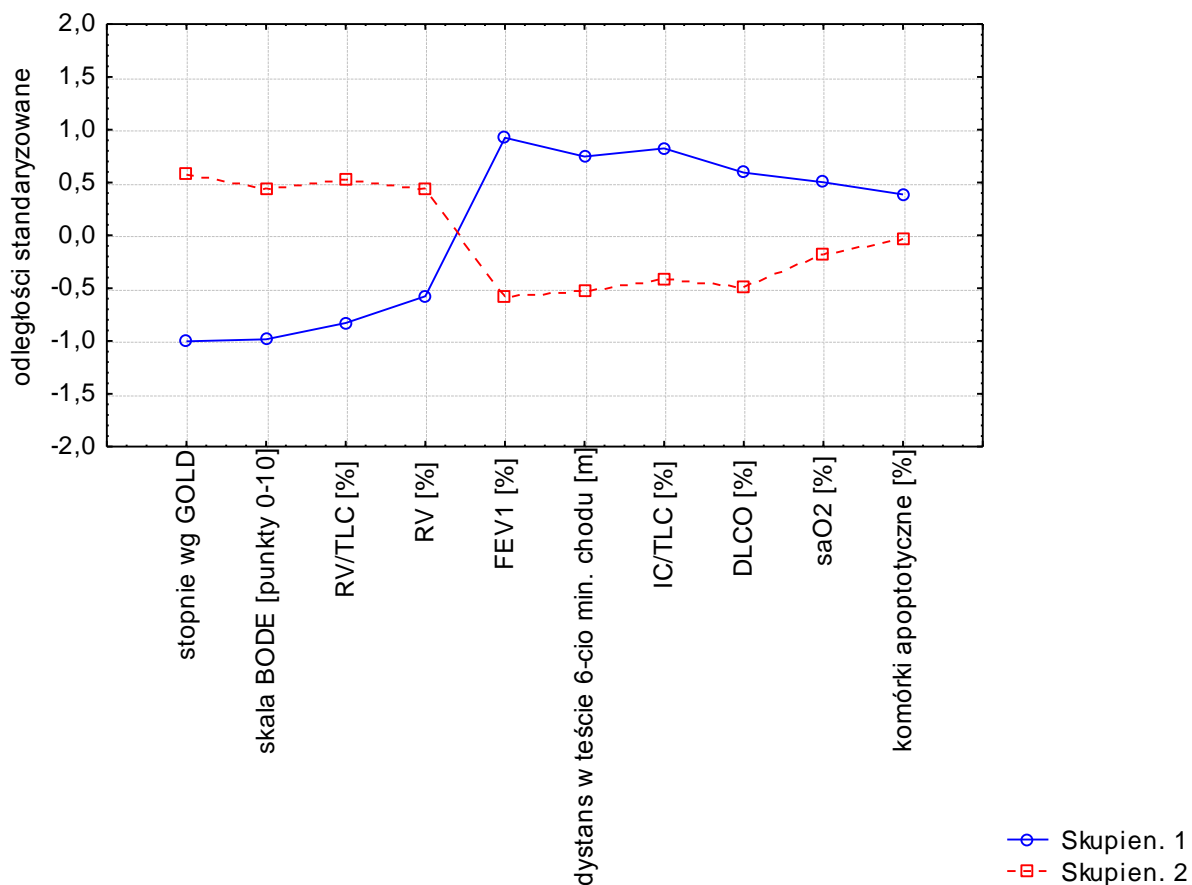
Analiza sformułowanych wcześniej założeń teoretycznych wymagała określenia parametrów świadczących o zaawansowaniu klinicznym POChP. W tym celu zastosowano model statystyczny, który umożliwił określenie zmiennych tworzących hipotetyczne grupy (skupienia) osób z mniej i bardziej zaawansowaną chorobą oraz pokazał rodzaj występujących zależności pomiędzy tymi zmiennymi. Przyjęto, że zmiennymi świadczącymi o zaawansowaniu choroby są: stopień wg GOLD, punktacja w skali BODE, RV/TLC, RV, FEV1, dystans w teście 6-cio minutowego chodu, IC/TLC, DLCO, SaO2, odsetek komórek apoptotycznych. Otrzymane wyniki analizy skupień przedstawiono za pomocą dendrogramu, obrazującego uzyskane skupienia chorych z mniej zaawansowaną POChP (skupienie 1) oraz z bardziej zaawansowaną POChP (skupienie 2) (Rycina 7).

Diagram drzewa
 Metoda Warda
 Odległ. euklidesowa



Rycina 7. Dendrogram przedstawiający powiązania pomiędzy zmiennymi tworzącymi skupienia chorych z mniej zaawansowaną POChP (skupienie 1) oraz z bardziej zaawansowaną POChP (skupienie 2)

Kolejnym krokiem analizy skupień, który został zastosowany, było przeprowadzenie grupowania metodą k-średnich.



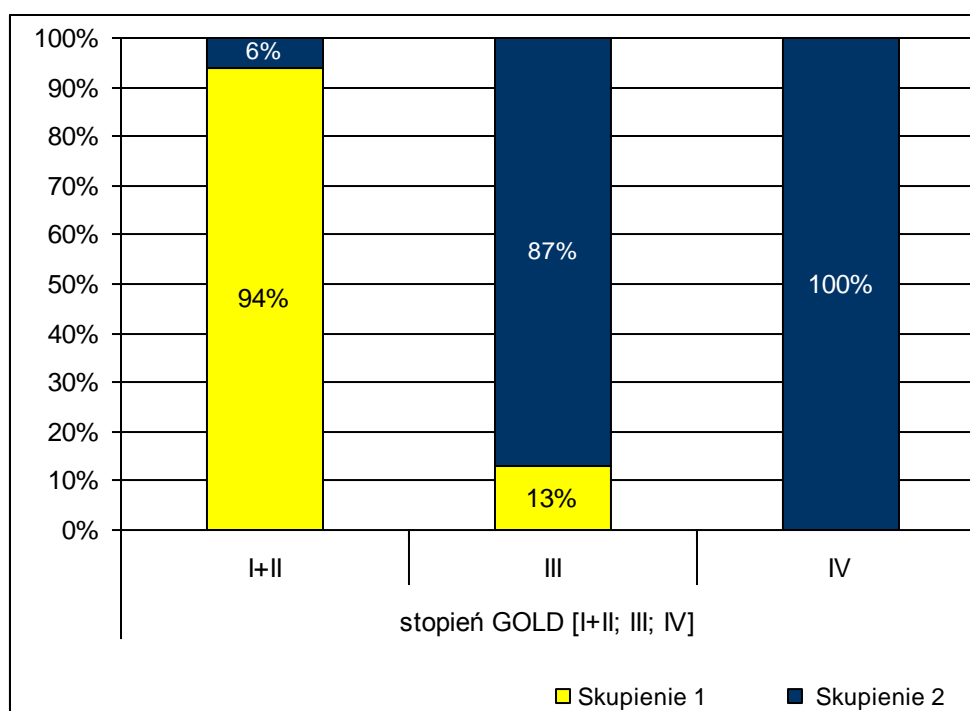
Rycina 8. Przedstawienie wartości średnich analizowanych parametrów w skupieniach chorych z mniej zaawansowaną POChP (skupienie 1) oraz z bardziej zaawansowaną POChP (skupienie 2)

Decyzja podjęta odnośnie ilości skupień okazała się być trafna, gdyż otrzymane skupienia różniły się układem wymienionych zmiennych. Przedstawiony powyżej wykres średnich obrazuje zróżnicowanie zmiennych w obrębie każdego skupienia (Rycina 8). W celu sprawdzenia na ile dobrze dana zmienna różnicuje uzyskane skupienia przeprowadzono analizę wariancji, której wyniki przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki analizy wariancji przeprowadzonej w obszarze zmiennych świadczących o zaawansowaniu choroby u chorych na POChP

	Skupienie 1- mniej zaawansowana POChP n=17	Skupienie 2 – bardziej zaawansowana POChP n=22	F	wartość p
	$\bar{x} \pm SD$ (Q ₁ ; Me; Q ₃)			
skala BODE [punkty 0-10]	1 ± 1,237 (0; 1; 2)	5 ± 1,816 (4; 5; 6)	63,01	<0,001
RV/TLC [%]	55,65±7,955 (50,37; 56,48; 60,94)	68,08±5,024 (64,74; 67,86; 70,04)	34,43	<0,001
RV [%]	162,22 ± 32,222 (142,1; 161,3; 184,3)	222,86 ± 56,783 (178,2; 204,2; 269,1)	15,33	<0,001
FEV1 [%]	63,84 ± 13,933 (55,8; 66,2; 69,2)	36,63 ± 9,195 (29,2; 36,85; 44,5)	52,33	<0,001
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	439,12 ± 58,316 (420; 420; 465)	266,14 ± 112,698 (180; 255; 315)	32,40	<0,001
IC/TLC [%]	38,11±7,446 (32,7; 35,8; 44)	27,17±6,578 (24,7; 27,5; 31,4)	23,12	<0,001
DLCO [%]	60,81 ± 10,432 (54,9; 61,9; 65,4)	40,21 ± 18,374 (26,6; 38,3; 49,2)	16,88	<0,001
saO2 [%]	95,14 ± 2,18 (93,9; 95,2; 96,2)	93,29 ± 2,780 (91; 94; 95,4)	6,96	0,0122
komórki apoptotyczne [%]	21,53 ± 19,609 (1; 17; 40)	14,33 ± 18,318 (3,85; 8; 16)	1,39	0,2451
Stopnie zaawansowania wg GOLD w ujęciu procentowym				
I+II	94% (N=5)	6% (N=1)	80,42	<0,001
III	13% (N=2)	87% (N=13)		
IV	0% (N=0)	100% (N=8)		

Uzyskane wyniki wskazują, że wyróżnione zmienne różnicują otrzymane skupienia pacjentów z POChP. W skupieniu 1 znaleźli się bowiem chorzy z mniej zaawansowaną chorobą, charakteryzujący się niskim stopniem zaawansowania wg GOLD, niską punktacją w skali BODE (1 punkt), niskim RV/TLC (55,65%) oraz RV (162,22%), natomiast wysokimi wartościami dla parametrów FEV1 (63,84%), dystans w teście 6-cio minutowego chodu (439,12m), IC/TLC (38,11%), DLCO (60,81%), saO2 (95,14%), odsetek komórek apoptotycznych (21,53%). W skupieniu 2 znalazły się osoby z bardziej zaawansowaną POChP, charakteryzujące się wysokim stopniem zaawansowania choroby wg GOLD, wysoką punktacją w skali BODE (5 punktów), wysokim RV/TLC (68,08%) oraz RV (222,86%), natomiast niskimi wartościami dla parametrów FEV1 (36,63%), dystans w teście 6-cio minutowego chodu (266,14m), IC/TLC (27,17%), DLCO (40,21%), saO2 (93,29%), odsetek komórek apoptotycznych (14,33%). (Tabela 5)



Rycina 9. Rozkład procentowy stopni w skali GOLD w skupieniach

Na rycinie 9 przedstawiono rozkład procentowy stopni w skali GOLD w skupieniach. Aż 94% chorych z I i II stopniem POChP wg GOLD znalazło się w skupieniu 1 (mniej zaawansowana POChP), a tylko 6% w skupieniu 2 (bardziej zaawansowana POChP). Wszyscy pacjenci z IV stopniem zaawansowania POChP znaleźli się w skupieniu 2.

Dzięki utworzeniu za pomocą analizy skupień dwóch grup pacjentów uzyskano istotne zróżnicowanie pomiędzy powstałymi grupami parametrów takich jak FEV1 ($p < 0,001$), DLCO ($p < 0,001$), saO2 ($p = 0,0022$), dystans w teście 6-cio min. chodu ($p < 0,001$), RV ($p < 0,001$), stopień wg GOLD ($p < 0,001$), punktacja w skali BODE ($p < 0,001$), IC/TLC ($p < 0,001$), RV/TLC ($p < 0,001$). Parametr odsetek komórek apoptotycznych wykazał zróżnicowanie pomiędzy grupami, jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej ($p = 0,245$).

6. DYSKUSJA

Przewlekła obturacyjna choroba płuc jest jednym z najczęstszych problemów klinicznych z jakimi w codziennej praktyce spotyka się lekarz pulmonolog. W Polsce szacuje się, że około 10% dorosłej populacji choruje na POChP (97, 109). Potwierdzają to dane międzynarodowe. Metaanaliza wielu badań epidemiologicznych obejmujących kilkadziesiąt krajów z różnych rejonów świata wykazała, że POChP można rozpoznać u około 9-10% populacji powyżej 40 rż (54). Wg Światowej Organizacji Zdrowia do 2020 roku POChP stanie się trzecią co do częstości przyczyną zgonu na świecie (95, 151). Inni autorzy w nowszych badaniach szacują, że POChP stanie się czwartą co do częstości przyczyną śmiertelności na świecie do 2030 roku (90). Duże rozpowszechnienie choroby, jej postępujący charakter, doprowadzający często do wieloletniego inwalidztwa oddechowego oraz znaczące koszty społeczne i ekonomiczne spowodowały, że to właśnie tym problemem postanowiliśmy zająć się w prezentowanej pracy.

Badaniem objęto 57 chorych na POChP (39 mężczyzn i 18 kobiet), w wieku 40-80 rż, palaczy lub byłych palaczy, w stabilnym okresie choroby. Chorzy byli pacjentami Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz przyklinicznej Poradni Pulmonologicznej. Pacjenci zgłaszali się do Kliniki w celu wykonania badań kontrolnych, część z nich w celu kwalifikacji do domowego leczenia tlenem. U żadnego z pacjentów powodem wizyty nie było zaostrzenie POChP. Wśród zakwalifikowanych do badania pacjentów największą grupę stanowili chorzy w II i III stadium zaawansowania choroby wg GOLD - po 19 chorych (33,3%) w każdym ze stadiów, następnie IV stadium POChP (16 pacjentów, 28,2%). Tylko 3 chorych (5,3%) miało rozpoznaną POChP w stadium I. Niewielka liczba pacjentów z I^o POChP mogła wynikać ze specyfiki jednostki, w której prowadzono badanie. Zarówno oddział szpitalny, jak i poradnia, przy Klinice Pulmonologii Uniwersytetu Medycznego, to jednostki wysokospecjalistyczne trzeciego stopnia referencji. Trafiają tu zazwyczaj chorzy z zaawansowanymi chorobami, z trudnymi problemami klinicznymi, przekazywani z jednostek o niższym stopniu referencji. Drugim powodem niewielkiej liczby pacjentów z łagodną POChP mogło być jej niedorozpoznanie. Pacjenci rzadko udają się do lekarza z mało zaawansowaną chorobą, gdy jej jedynym objawem jest kaszel, którego przyczynę wiążą najczęściej z paleniem tytoniu. Po pomoc lekarską chorzy zwracają się dopiero gdy ich choroba ma stadium umiarkowane i staje się jawna klinicznie. Potwierdzają to badania przeprowadzone wśród pacjentów poradni

podstawowej opieki zdrowotnej. Siatkowska i wsp. wykonywali badanie spirometryczne u ponad 1000 dorosłych pacjentów poradni lekarza rodzinnego. Przed badaniem tylko u 10 z nich rozpoznawano POChP, co stanowiło 1% badanej populacji. Analiza objawów klinicznych oraz badanie spirometryczne pozwoliło na rozpoznanie POChP u 62 chorych (6,04% badanej populacji). Większość z nowo rozpoznanych chorych miało POChP w stadium I (126). Również inni autorzy potwierdzają, że największe niedorozpoznanie dotyczy chorych z mało zaawansowaną chorobą (75).

Ze względu na niewielką liczość grupy chorych z I^o POChP, w dalszych badaniach nie wyodrębniano jej jako osobnej podgrupy, lecz analizowano łącznie z chorymi z II^o POChP. Cała badana grupa została podzielona na trzy podgrupy ze względu na stopień zaawansowania choroby: I+II, III i IV^o POChP. Badane podgrupy różniły się istotnie statystycznie pod względem parametrów ocenianych w spirometrii, bodypletyzmoigrafii, gazometrii krwi tętniczej czy skali BODE (z wyjątkiem BMI). Podgrupy nie wykazywały natomiast zróżnicowania pod względem wieku i liczby paczkołat palenia tytoniu, a zatem te parametry nie wpływały na wyniki dalszych analiz (Tabela 5).

Od kilku lat podnoszone są głosy, że FEV1 nie jest dobrym wykładnikiem zaawansowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, a podział choroby na cztery stadia wg GOLD nie odzwierciedla rzeczywistego stanu klinicznego pacjentów. Przeprowadzono wiele badań udowadniających, że POChP jest chorobą dotyczącą zarówno płuc jak i mającą wiele manifestacji pozapłucnych (154). Istnieje zatem potrzeba wyodrębnienia parametrów pozwalających na ocenę zaawansowania klinicznego choroby, które uwzględniałyby zarówno jej aspekty płucne jak i pozapłucne.

W prezentowanej pracy przyjęto, że kolejnym, poza stadium wg GOLD, parametrem świadczącym o stopniu zaawansowania klinicznego POChP, jest niewydolność oddechowa. Grupy pacjentów wydolnych i niewydolnych oddechowo różniły się istotnie statystycznie pod względem parametrów ocenianych w spirometrii, bodypletyzmoigrafii, gazometrii krwi tętniczej czy skali BODE (z wyjątkiem TLC i BMI). Podgrupy nie różniły się natomiast pod względem wieku i liczby paczkołat palenia tytoniu, a zatem te parametry nie wpływały na wyniki dalszych analiz (Tabela 6).

Z wcześniej przeprowadzonych badań wiadomo, że chorzy na POChP z przewlekłą niewydolnością oddechową żyją krócej, a zastosowanie leczenia w postaci przewlekłej domowej tlenoterapii znacząco wydłuża przeżycie, wpływa na poprawę parametrów hemodynamicznych, poprawia pamięć i zdolność koncentracji, zmniejsza częstość zaostrzeń choroby i związanych z nimi hospitalizacji (19, 42, 91, 101, 129).

Kolejne analizowane parametry świadczące o zaawansowaniu klinicznym POChP to wykładniki rozdęcia płuc takie jak RV/TLC i IC/TLC. Przyjęcie RV/TLC jako wykładnika ciężkości choroby wynika z prac przeprowadzonych przez Nishimurę i wsp, którzy wykazali, że RV /TLC jest silnym predyktorem śmiertelności (98). Natomiast Casanova i wsp. stwierdzili, że IC/TLC może służyć za wykładnik ciężkości uszkodzenia płuc w przebiegu POChP. Wskaźnik ten nazwali „frakcją wdechową”. Uznali, że graniczna wartość IC/TLC 25%, jest łatwym do zapamiętania progiem pozwalającym oszacować ciężkość POChP. Pacjenci z $IC/TLC \leq 25\%$ żyją krócej niż chorzy z $IC/TLC > 25\%$ (21). W prezentowanym projekcie również przyjęto próg 25% jako wartość graniczną IC/TLC dla grup o mniejszym i większym zaawansowaniu choroby.

Następnym wykładnikiem ciężkości POChP mogłoby być BMI. Parametr ten uwzględnia ogólnoustrojowy charakter choroby. Przyjęto, że chorzy na POChP z $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ mają mniej zaawansowaną chorobę w porównaniu z chorymi z $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$. Przyjęcie takiego parametru i zastosowany podział na podgrupy wynika z wcześniej przeprowadzonych badań Wilsona i wsp. oraz Scholsa i wsp. (121, 150).

Ograniczona wydolność wysiłkowa chorych na POChP może wynikać z zaawansowania klinicznego choroby. Prostim badaniem pozwalającym ocenić wydolność wysiłkową jest test 6-cio minutowego chodu. Przyjmuje się, że dystans mniejszy niż 350m jest związany ze zwiększoną śmiertelnością i powinien być uważany za nieprawidłowy (30, 32, 107). W niniejszej analizie przyjęto wartość graniczną 350m przebytych w 6MWT jako próg dla mniejszego i większego zaawansowania POChP.

Oba wyżej wymienione parametry, jak również obturacja oceniana za pomocą spirometrycznego pomiaru FEV1 i nasilenie duszności oceniane według kwestionariusza MMRC, stanowią elementy skali BODE. Udowodniono, że skala ta ma istotne znaczenie w ocenie stanu klinicznego i prognozowaniu dalszego przebiegu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Wyodrębniono cztery zakresy punktacji (0-2, 3-4, 5-6, 7-10), gdzie pierwszy z nich charakteryzuje się najlepszym rokowaniem, natomiast ostatni zakres ma rokowanie najgorsze. Tylko 20-25% chorych, którzy uzyskali w skali BODE od 7 do 10 punktów, przeżyje 5 lat (14, 22, 23).

Założono, że materiałem służącym do oceny apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP będą popłuczyny oskrzelowe, pobrane w trakcie bronchofiberoskopii. Bronchofiberoskopia jest zabiegiem inwazyjnym, zatem do prezentowanego projektu nigdy nie kwalifikowano chorych nie mających wskazań do tej procedury. Zawsze byli to pacjenci, u których bronchofiberoskopia była zlecona przez lekarza prowadzącego w celu pełnej oceny

przebiegu choroby, pobrania materiału do badań bakteriologicznych i cytologicznych czy wykluczenia innych przyczyn zgłaszanych przez chorego objawów. Z badania wykluczono również pacjentów mających przeciwwskazania do bronchofiberoskopii. Z powodu inwazyjnego charakteru, bronchofiberoskopii nie wykonywano także u osób zdrowych, które potencjalnie mogłyby stworzyć grupę kontrolną, a całe badanie przeprowadzono jako *cross-sectional study*.

Podczas bronchofiberoskopii pobrano popłuczyny oskrzelowe, a ich skład komórkowy określono metodą cytometrii przepływownej. Wykorzystane tutaj przeciwciała anti-CD4/CD8/CD3 umożliwiają wykrywanie dojrzałych ludzkich limfocytów T (CD3⁺), limfocytów T pomocniczych/indukujących (CD3⁺/CD4⁺) oraz limfocytów T supresorowych/cytotoksycznych. Przeciwciała anti-CD11b rozpoznają antygen obecny na około 30% limfocytów, przede wszystkim na komórkach NK oraz limfocytach T, a także na dojrzałych neutrofilach i monocytach. Anti-CD45 rozpoznaje antygen obecny na wszystkich ludzkich leukocytach, w tym limfocytach, monocytach, neutrofilach, eozynofilach i bazofilach. Natomiast przeciwciało anti-CD45/CD14 (LeucoGATE) umożliwia utworzenie optymalnej bramki dla limfocytów podczas immunofenotypowania. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono średnio 64,26% komórek nienabłonkowych w popłuczynach oskrzelowych (48,34% granulocytów, 3,63% limfocytów oraz 16,81% makrofagów).

U palaczy w materiale z dróg oddechowych można spodziewać się zwiększonego odsetka makrofagów i granulocytów, a zmniejszenia odsetka limfocytów. Hodge i wsp. wykazali, że z pośród chorych na POChP, tylko pacjenci w stadium umiarkowanym i ciężkim mieli zwiększoną liczbę granulocytów w BAL w porównaniu z grupą zdrowych ochotników. Liczba makrofagów i limfocytów w BAL chorych na POChP i osób zdrowych nie różniła się istotnie statystycznie (58).

Apoptoza w POChP

Zgodnie z definicją, POChP jest chorobą której można zapobiegać i którą można leczyć (47). Zapobieganie polega głównie na unikaniu narażenia na czynniki ryzyka choroby, przede wszystkim na nie paleniu tytoniu. Natomiast leczenie POChP nie daje dotychczas zadowalających efektów. Stosowane obecnie metody leczenia farmakologicznego pozwalają bowiem głównie na zwolnienie tempa progresji choroby, ponieważ ograniczenie przepływu powietrza w drogach oddechowych chorych na POChP jest trwałe. Istnieje zatem potrzeba

poszukiwania nowych metod leczenia tej choroby. Poszukiwania nowych leków wymagają jednak najpierw dokładnego poznania mechanizmów doprowadzających do rozwoju choroby.

Z przeprowadzonych dotychczas badań nad patogenezą POChP wiemy, że u podstaw choroby leżą trzy główne mechanizmy: przewlekły proces zapalny toczący się w drogach oddechowych, zaburzenie równowagi między mechanizmami proteolitycznymi i antyproteolitycznymi, co prowadzi do dostrukturyzacji zdrowej tkanki płucnej, oraz stres oksydacyjny. Ostatnio wzrasta ilość danych świadczących o roli czwartego ważnego mechanizmu w patogenezie POChP. Mechanizmem tym jest apoptoza (33). Dysponujemy ograniczoną liczbą badań wykazujących rolę procesu apoptozy w rozwoju POChP u ludzi. Prace eksperymentalne na modelach zwierzęcych pozwalają lepiej poznać związek między paleniem tytoniu, apoptozą i rozwojem POChP (33). Opierając się na danych z piśmiennictwa, podjęcie tematu apoptozy u chorych na POChP wydaje się być zasadne.

Segura-Valdez i wsp. wykazali wzmożoną apoptozę w tkance płucnej pacjentów z POChP. Apoptoza dotyczy głównie komórek śródbłonka naczyń włosowatych i arterioli płuc, czasami również komórek nabłonka pęcherzyków, komórek śródmiąższowych oraz komórek zapalnych (neutrofilii i limfocytów). Udowodnili oni, że apoptoza, przynajmniej częściowo, odpowiedzialna jest za zanik włósniczek i pęcherzyków płucnych w trakcie rozwoju rozedmy płuc (122). *Imai i wsp.* opisali wzrost ilości komórek apoptotycznych (komórek nabłonka pęcherzyków płucnych, komórek śródbłonka oraz komórek mezenchymalnych) w rozedmowej tkance płucnej. Stwierdzili także wzrost aktywowanych podjednostek kaspazy-3 (pełniące znaczącą rolę w kaskadzie kaspaz, prowadzącej ostatecznie do apoptozy). Wykazali także ekspresję pro-apoptotycznych białek *Bax* i *Bad* u pacjentów z rozedmą płuc, podczas gdy w grupie kontrolnej nie wykazano takiej ekspresji. Białko anty-apoptotyczne *Bcl-2* nie zostało znalezione ani w rozedmowej ani w prawidłowej tkance płucnej (65). Do podobnych wniosków doszli *Yokohori i wsp.* Stwierdzili oni wzrost zarówno apoptozy jak i proliferacji komórek ścian pęcherzyków płucnych u pacjentów z rozedmą w porównaniu z palaczami nie chorującymi na POChP oraz osobami niepalącymi (157). *Hodge i wsp.* opisali nasilenie apoptozy komórek nabłonka pęcherzyków płucnych oraz limfocytów T w popłuczynach oskrzelowych i popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) u pacjentów z POChP w porównaniu z grupą kontrolną osób niepalących. Wzrost apoptozy u pacjentów z POChP utrzymywał się nawet po zaprzestaniu palenia tytoniu (57).

Majo i wsp. stwierdzili, że apoptoza może być jednym z mechanizmów destrukcji płuc prowadzącym do powstania rozedmy, szczególnie u palaczy (87). Potwierdzili to S. Hodge i wsp. stwierdzając, że mechanizmy humoralne i zależne od komórek CD4+ mogą prowadzić

do apoptozy komórek przegród międzypęcherzykowych i rozwoju rozedmy (56). R. M. Senior podsumowując konferencję *Mechanisms of COPD* stwierdził, że apoptoza ścian mikronaczyń płucnych może poprzedzać rozwój rozedmy i może być związana z utratą przesyłania sygnału przez jeden z receptorów VEGF na komórkach endotelium. Zadaje także pytanie, czy obecność limfocytów w rozedmowej tkance płucnej równocześnie z ekspresją Fas w nabłonku oskrzelików i pęcherzyków płucnych może świadczyć o działaniu systemu Fas-Fas-ligand, którego wynikiem jest wzmożona apoptoza strukturalnych komórek płuc. (123). Rolę VEGF oraz jego receptora KDR (ang. *kinase insert domain-containing receptor*) w rozedmowej tkance płucnej badali *Kasahara i wsp.* Wykazali oni zwiększenie ilości apoptotycznych komórek nabłonkowych i śródbłonkowych przegród międzypęcherzykowych w tkance płucnej chorych z rozedmą w porównaniu z osobami niepalącymi, palaczami tytoniu i pacjentami z pierwotnym nadciśnieniem płucnym. Udowodnili, że zmniejszenie ekspresji lub aktywności VEGF lub KDR w płucach poprzedza rozwój rozedmy spowodowanej apoptozą (69). Hipotezę tę potwierdzają badania przeprowadzone przez *Kanazawa i wsp.* Wykazali oni, że poziom VEGF w indukowanej płwocinie pacjentów z POChP zmniejsza się wraz ze wzrostem ciężkości choroby (68). W innej pracy wykazano, że pomimo ważnej roli VEGF w przekazywaniu sygnału między strukturami pęcherzyków płucnych, polimorfizm 936 C/T genu VEGF (związany z niskim poziomem VEGF w surowicy) nie wiąże się z rozwojem POChP (117).

Przewlekła obturacyjna choroba płuc uznawana jest obecnie za proces dotyczący nie tylko tkanki płucnej, ale chorobę wieloczynnikową, mającą swe manifestacje układowe. Istnieją doniesienia o zmianach dotyczących procesu apoptozy w krążeniu systemowym oraz w mięśniach szkieletowych u chorych na POChP (33).

Biorąc pod uwagę, że limfocyty T przemieszczają się pomiędzy drogami oddechowymi a krążeniem obwodowym, *Hodge i wsp.* założyli, że u chorych na POChP, krążące limfocyty T mogą podlegać wzmożonej apoptozie. Przeanalizowali oni limfocyty T stymulowane fitohemaglutyniną (PHA) z krwi obwodowej chorych na POChP i grupy kontrolnej. Apoptoza badana była za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem aneksyny V oraz 7-aminoaktynomycyny D. Ponieważ w indukcję procesu apoptozy komórek T zaangażowanych jest wiele szlaków, m. in. TGF-beta/TGF-beta R, TNF-alfa/TNF-alfa R1, Fas/Fas ligand, również te mediatory oznaczane były w surowicy krwi w badanych grupach. Obserwowano znaczący wzrost apoptozy (PHA)-stymulowanych limfocytów T u chorych na POChP. Wykazano, że wzmożona śmierć komórek T może być związana ze wzrostem stężenia mediatorów apoptozy, takich jak TGF-beta, TNF-alfa oraz Fas, we krwi obwodowej

pacjentów z POChP (59). Natomiast *Takabatake i wsp.* wykazali istotny statystycznie wzrost poziomu TNF-alfa i rozpuszczalnych receptorów TNF (sTNF-Rs) w krążeniu chorych na POChP. Nie wykazali oni wzrostu poziomu sFas-ligand w surowicy krwi i sFas w osoczu osób chorych na POChP w porównaniu z osobami zdrowymi. Uważają zatem, że apoptoza indukowana przez system Fas-Fas-ligand nie jest niezależnym czynnikiem patogenetycznym POChP (138).

Oslabienie siły mięśni obwodowych, obserwowane w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, może być związane ze zmniejszeniem liczby włókien mięśniowych, jako skutek aktywacji szlaków apoptozy. Wykazano, że apoptoza mięśni szkieletowych jest wzmożona u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc z niskim wskaźnikiem masy ciała w porównaniu z pacjentami z POChP z prawidłowym BMI oraz ze zdrowymi ochotnikami. Wzrost apoptozy mięśni szkieletowych wiąże się ze spadkiem wydolności wysiłkowej (1). Inni autorzy wykazali, że układ Fas-FasL nie odgrywa znaczącej roli jako czynnik wywołujący apoptozę prowadzącą do utraty mięśni szkieletowych i tkanki tłuszczowej u wyniszczonych pacjentów z POChP (137).

Interpretując dane uzyskane z badań nad zwierzęcymi modelami POChP, trzeba pamiętać, że modele te nie zawsze są reprezentatywne dla zmian zachodzących w tkance płucnej ludzi chorych na POChP. W wielu zwierzęcych modelach POChP obserwowano rozwój rozedmy płuc pomimo braku czynników zapalnych (33). W tych badaniach rozedma wywoływana była bezpośrednim działaniem na komórki pęcherzyków płucnych (7), lub poprzez inaktywację VEGFR (69) albo VEGF (142).

Kasahara i wsp., prowadząc badania na szczurach, wykazali, że zablokowanie receptora VEGF indukowało apoptozę komórek pęcherzykowych i prowadziło do powiększenia przestrzeni powietrznych. Ponad to leczenie za pomocą inhibitora kaspaz przeciwdziało apoptozie komórek przegrodowych i rozwojowi rozedmy wywołanej zablokowaniem receptora VEGF (69). Inni badacze wykazali, że zależna od katepsyny S apoptoza komórek nabłonka jest wydarzeniem krytycznym w patogenezie rozedmy indukowanej przez interferon gamma (INF-gamma) (159). Na tym samym modelu wykazano także, że INF-gamma jest potencjalnym aktywatorem zarówno zewnątrzpochodnego (zależnego od receptorów śmierci), jak i wewnątrzpochodnego (mitochondrialnego), szlaku apoptozy. Aktywacja ta jest, przynajmniej częściowo, zależna od CCR5 (86). *Aoshiba i wsp.* wykazali na modelu mysim, że dotchawicze podanie aktywnej kaspazy-3 powoduje apoptozę nabłonka, wzrost aktywności elastolitycznej w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych oraz rozwój zmian rozedmowych (7).

Demedts i wsp. przeanalizowali większość z w/w badań i przedstawili interakcje, jakie zachodzą między procesem apoptozy a innymi mechanizmami patogenetycznymi w POChP. Biorąca udział w procesie zapalnym elastaza neutrofilowa rozszczepia receptor fosfatydyloseryny na makrofagach. Uniemożliwia to interakcje między makrofagiem a komórką podlegającą apoptozie. Efektem jest upośledzone oczyszczanie z komórek apoptotycznych i przetrwałe zapalenie (147). Natomiast cytotoksyczne limfocyty T CD8+ powodują apoptozę komórek nabłonka pęcherzyków płucnych poprzez wydzielanie perforyn i granzymu-B (13, 84). Nadmiar enzymów proteolitycznych w drogach oddechowych chorych na POChP również wpływa na toczący się tam proces apoptozy. Degradacja błony podstawnej poprzez metaloproteinazy macierzy prowadzi do przerwania sygnałów przeżycia i indukuje apoptozę komórek nabłonka (43). Bezpośredni wpływ na apoptozę ma proteoliza sygnałów indukujących śmierć. Wykazano bowiem, że MMP-7 indukuje Fas-ligand produkowany przez komórki nabłonka, a przez to wpływa na apoptozę (110). Natomiast stres oksydacyjny może prowadzić do zmniejszenia poziomu VEGF, czego rezultatem jest apoptoza komórek nabłonka pęcherzyków płucnych (33, 68).

Większość przeprowadzonych dotychczas badań nad rolą procesu apoptozy w patogenezie POChP skupia się na apoptozie komórek strukturalnych tkanki płucnej, co może być jednym z mechanizmów rozwoju rozedmy płuc. Interesującym wydaje się być także problem apoptozy komórek biorących udział w procesie zapalnym w drogach oddechowych chorych na POChP. Tym właśnie problemem postanowiliśmy się zająć w prezentowanej pracy. Podczas realizacji pracy podjęliśmy się nowatorskiej próby oceny apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby. Aktywność procesu apoptozy badana była w oparciu o wiązanie aneksyny V. Oznaczono także stężenie sFas ligand w popłuczynach oskrzelowych.

Pierwszą metodą oceniono odsetek komórek aktywnie podlegających apoptozie u 56 chorych na POChP. Średni odsetek komórek podlegających apoptozie w badanej grupie wyniósł $14,73 \pm 17,57$ %. Dotychczas nie przeprowadzono badań u chorych na POChP, w których apoptoza komórek płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego byłaby oceniana przy użyciu aneksyny V. Badania z użyciem tej metody przeprowadzono w innych chorobach układu oddechowego. Laflamme i wsp. oceniali w oparciu o wiązanie aneksyny V odsetek limfocytów z BALF podlegających apoptozie u chorych na zapalenie płuc z nadwrażliwości w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. U osób zdrowych średni odsetek apoptotycznych limfocytów wynosił $56,5 \pm 5,5$, i był wyższy niż u pacjentów z HP, gdzie wynosił $37,4 \pm 3,4\%$ (81). Autorzy szwedzcy natomiast oceniali przy pomocy aneksyny V

apoptozę limfocytów w BALF u chorych na sarkoidozę. Założyli, że usuwanie aktywowanych limfocytów drogą apoptozy jest warunkiem eliminacji procesu zapalnego w sarkoidozie. Wykazali oni, że zarówno u pacjentów z sarkoidozą, jak i w zdrowej grupie kontrolnej, w drogach oddechowych odsetek limfocytów podlegających apoptozie jest niski ($7,2\pm 3,14\%$ vs $8,1\pm 2,5\%$). Dopiero po stymulacji przeciwciałami anti-Fas odsetek ten wzrósł znacząco u zdrowej populacji ($45,4\pm 11,1\%$), ale nie u chorych na sarkoidozę ($8,5\pm 1,9\%$). Stwierdzili, że limfocyty chorych na sarkoidozę są odporne na apoptozę, co sprzyja akumulacji tych komórek zapalnych w drogach oddechowych (135).

Stężenie sFas ligand oznaczono u 43 pacjentów, uzyskując średnie stężenie $8,86\pm 12,33$ pg/ml. Dotychczas nie przeprowadzono badań, w których oznaczano by stężenie sFas ligand w BAL chorych na POChP. Z badań przeprowadzonych w innych chorobach układu oddechowego wynika, że stężenia sFasL w BALF były niskie i wahały się od $4,7\pm 6,0$ pg/ml w grupie kontrolnej, poprzez $32,9\pm 42,5$ pg/ml u chorych z zarostowym zapaleniem oskrzelików, do $40,1\pm 69,1$ pg/ml u pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc. Granicą wykrywalności w zastosowanej tu metodzie ELISA było 5 pg/ml (78). Badacze tureccy porównywali natomiast stężenie sFasL w BALF pacjentów z rakiem płuca oraz w grupie kontrolnej. W ich badaniu średnie stężenie sFasL u chorych z rakiem płuca wynosiło $51,6\pm 39,2$ pg/ml i nie różniło się istotnie statystycznie ($p>0,05$) od stężenia w grupie kontrolnej ($41,2\pm 27,4$ pg/ml) (36). W opublikowanym w 2011 roku polskim badaniu oznaczano stężenie sFasL w różnych chorobach płuc prowadzących do śródmiąższowego włóknienia płuc. Tu również notowano bardzo niskie stężenia sFas ligand w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, od $0,21\pm 0,51$ pg/ml w grupie kontrolnej, poprzez $2,04\pm 2,28$ pg/ml u chorych na IPF, do $13,0\pm 7,6$ pg/ml u chorych z HP. Z całej grupy badanej wyodrębniono pacjentów palących papierosy. Badanie wykazało, że palenie powoduje istotne statystycznie obniżenie stężenia sFasL u chorych na IPF, w porównaniu z chorymi niepalącymi ($p=0,012$). Wśród chorych palących u większości pacjentów notowano stężenia zerowe (poniżej progu wykrywalności) (72). W naszym badaniu wszyscy pacjenci byli palaczami lub byłymi palaczami, co może tłumaczyć dlaczego aż u 20 chorych odnotowano zerowe stężenie sFasL.

U chorych na POChP stężenie sFas ligand oznaczane było dotychczas nie w BALF, ale w surowicy krwi. Badaniami takimi zajmowali się *Takabatake i wsp.* W opublikowanym w 2000 roku badaniu, do pomiaru stężenia sFasL w surowicy wykorzystali oni metodę ELISA, której granicą wykrywalności było 0,1ng/ml. U większości osób biorących udział w badaniu, zarówno wśród chorych na POChP, jak i osób zdrowych w grupie kontrolnej,

stężenie sFasL było niewykrywalne. Porównali zatem wyniki 5 chorych na POChP i 2 osób zdrowych, u których otrzymali stężenia powyżej progu wykrywalności. W tym badaniu nie stwierdzili istotnych statystycznie różnic stężenia sFasL między chorymi na POChP a grupą kontrolną (138). Kontynuując swoje badania, w 2005 roku ci sami autorzy opublikowali pracę, w której do badania stężenia sFasL użyli wysoce czulej metody ELISA o granicy wykrywalności 5pg/ml. Tym razem stwierdzili, że u chorych na POChP surowicze stężenie sFasL jest istotnie niższe niż w kontrolnej grupie zdrowych ochotników (46 ± 29 pg/ml vs 55 ± 28 pg/ml) (137). Pozostaje jednak pytanie, czy stężenie sFasL u chorych na POChP jest niskie, ponieważ mało komórek podlega apoptozie, czy dlatego, że sFas ligand został zużyty, łącząc się ze swoim receptorem podczas indukcji procesu apoptozy.

Wcześniejsze prace udowodniły wpływ palenia papierosów na proces apoptozy (56, 87). W pracy własnej oceniono odsetek komórek podlegających apoptozie oraz stężenie sFasL w grupach chorych palących papierosy (N=43) oraz byłych palaczy (N=14). W badanych podgrupach nie wykazano istotnych statystycznie różnic pod względem wymienionych parametrów ($p=ns$ dla obu parametrów). A zatem fakt bycia aktywnym palaczem lub byłym palaczem nie powinien wpływać na dalsze analizy procesu apoptozy w badanej grupie.

Z wcześniej przeprowadzonych badań wiadomo także, że leczenie przy pomocy glikokortykosteroidów może wpływać na nasilenie apoptozy w organizmie. Z jednej strony glikokortykosteroidy hamują indukowaną przez $INF-\gamma$ i Fas apoptozę komórek nabłonkowych płuc (149), z drugiej strony mogą indukować apoptozę komórek T w ścianie oskrzeli (103). W grupie badanych przez nas chorych 51 pacjentów przyjmowało glikokortykosteroidy, natomiast 6 chorych nie otrzymywało takiego leczenia. Podgupy te nie różniły się istotnie statystycznie pod względem odsetka komórek podlegających apoptozie oraz stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych.

Apoptoza a stopień zaawansowania klinicznego POChP

U chorych na POChP nie przeprowadzono dotychczas badań, w których porównywano by proces apoptozy w drogach oddechowych u pacjentów z mniej i bardziej zaawansowaną chorobą. Istnieją jednak przesłanki teoretyczne wynikające z badań przeprowadzonych w ostatnich latach, że proces apoptozy może zmieniać swoją aktywność w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby. Wcześniejsze prace, w których badano apoptozę w POChP w zależności od ciężkości choroby, oceniały wykładniki apoptozy

w surowicy krwi, na co wpływ może mieć zarówno apoptoza komórek tkanki płucnej, komórek zapalnych jak i pozapłucne aspekty choroby, np. apoptoza komórek mięśniowych. W opublikowanym w 1998 roku badaniu, *Yasuda i wsp.* porównywali surowicze stężenia sFas i sFas ligand u osób zdrowych, chorych na inne niż POChP choroby układu oddechowego leczonych tlenem oraz u chorych na POChP o różnym stopniu zaawansowania choroby. Ich definicja stadium zaawansowania choroby była jednak inna niż powszechnie stosowane klasyfikacje. Jako POChP łagodne/umiarkowane traktowani byli chorzy nie stosujący przewlekle tlenoterapii, natomiast POChP ciężkie to pacjenci leczeni tlenem. Mimo, że chorzy mieli wykonaną spirometrię, nie oceniono FEV1. W cytowanym badaniu stężenie sFas ligand w surowicy nie wykazywało różnic pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na POChP, niezależnie od zaawansowania choroby. Natomiast surowicze stężenie sFas, inhibitora procesu apoptozy, było istotnie wyższe u pacjentów z ciężką POChP. Autorzy konkludują, że zwiększone surowicze stężenie sFas może wywoływać hamujący efekt na apoptozę limfocytów T naciekających płuca pacjentów z POChP, a podwyższenie sFas w surowicy może odgrywać rolę w patofizjologii progresji POChP (156). W opublikowanym dwa lata później badaniu *Takabatake i wsp.* nie potwierdzili tego spostrzeżenia (138). W innym badaniu *Hacker i wsp.* wykazali zwiększone surowicze stężenia końcowych produktów apoptozy: rozszczepianej przez kaspazy cytokeratyny-18 (ang. *caspase-cleaved cytokeratin-18*) oraz fragmentów DNA związanych z histonami (ang. *histone-associated DNA-fragments*) u chorych na POChP. Stwierdzili, że wyniki ich badań wskazują na układowe wydzielanie białek specyficznych dla apoptozy jako markerów zwiększonego obrotu komórkowego towarzyszącego progresji POChP (53).

W naszym badaniu apoptoza oceniana była u pacjentów z różnymi wykładnikami zaawansowania POChP, począwszy od najbardziej standardowych, jak stopień zaawansowania choroby wg GOLD mierzony przy pomocy FEV1, poprzez inne parametry czynnościowe (IC/TLC, RV/TLC, niewydolność oddechowa), aż do stosowanej od kilku lat skali BODE wraz z jej poszczególnymi elementami. Apoptoza oceniana była także w zależności od wieku i płci pacjentów.

Apoptoza a stadium zaawansowania POChP wg GOLD

Biorąc pod uwagę kryteria GOLD, chorych na POChP podzieliliśmy na następujące podgrupy: I+II^o zaawansowania (POChP łagodna i umiarkowana), III^o (POChP ciężka) oraz IV^o (POChP bardzo ciężka). W oparciu o wiązanie aneksyny V wykazaliśmy, że średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP wynosił odpowiednio w stopniu I+II wg GOLD 16,55%, w stopniu III 9,18%, w stopniu IV 19,08% (Rycina 4, Aneks Tabela 2, 3, 4). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między badanymi trzema podgrupami. Analizując jednak wyniki badania między stopniami I+II oraz III, stwierdziliśmy, że podgrupy te różnią się pod względem odsetka komórek podlegających aktywnie apoptozie. W III stadium zaawansowania POChP w drogach oddechowych apoptozie ulega mniej komórek niż w stadium I i II. Wydaje się zatem, że w bardziej zaawansowanej chorobie w stadium III, większa liczba komórek bierze udział w toczącym się tu procesie zapalnym. W porównaniu z mniej zaawansowaną chorobą, to właśnie w stadium III POChP, gdy FEV1 spada poniżej 50% wartości należnej, choroba staje się jawna klinicznie, pacjenci zaczynają uskarżać się na narastającą duszność, a proces zapalny ulega nasileniu. Potwierdzać to może praca Hackera i wsp., którzy wykazali, że w I i II stadium POChP pacjenci są chronieni przed procesem zapalnym poprzez zwiększone wydzielanie rozpuszczalnego ST2, białka o działaniu przeciwzapalnym. Stężenie rozpuszczalnego ST2 w surowicy ulegało znacznemu obniżeniu począwszy od III stadium zaawansowania POChP. Autorzy uznali, że rozpuszczalny ST2 ma znaczącą rolę w przeciwdziałaniu procesowi zapalnemu we wczesnych stadiach POChP (53).

Apoptoza a niewydolność oddechowa

Badając apoptozę komórek z płuczyn oskrzelowych chorych na POChP w oparciu o wiązanie aneksyny V, wykazano istotne statystycznie zróżnicowanie odsetka komórek apoptotycznych pomiędzy chorymi wydolnymi i niewydolnymi oddechowo. Średni odsetek komórek podlegających apoptozie u chorych z niewydolnością oddechową był znamienne wyższy ($20,87 \pm 18,92\%$) w porównaniu z chorymi bez niewydolności oddechowej ($11,57 \pm 18,92\%$) (Rycina 4, Aneks Tabela 5, 6). Do odmiennych wniosków doszli *Yasuda i wsp.* W cytowanej wcześniej pracy wykazali oni zwiększone stężenie czynników hamujących apoptozę u chorych na POChP, którzy stosowali przewlekłe leczenie tlenem. Wg tych badaczy u chorych na POChP niewydolnych oddechowo apoptozie powinno zatem podlegać

mniej komórek. Kryteria rozpoznania niewydolności oddechowej i wskazania do przewlekłego leczenia tlenem nie pokrywają się, zatem odmienne wyniki uzyskane w prezentowanym projekcie i badaniu Yasudy mogą wynikać z innego charakteru badanych podgrup. W naszym badaniu ocenialiśmy chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo, Yasuda brał pod uwagę stosowanie tlenoterapii, więc wśród chorych z łagodną/umiarkowaną POChP mogli być również pacjenci z niewydolnością oddechową, którzy nie wymagali jeszcze tlenoterapii (156).

W badaniu własnym licznosc grupy pacjentów niewydolnych oddechowo wynosiła 20, z czego 70% (N=14) stanowili chorzy z bardzo ciężką POChP, 25% (N=5) chorzy z POChP w stadium ciężkim, natomiast tylko u jednego pacjenta (5%) rozpoznano POChP w stadium umiarkowanym. Grupa chorych z niewydolnością oddechową jest zatem grupą chorych z mocno zaawansowaną chorobą wg kryterów GOLD. Przyjmując niewydolność oddechową za wykładnik zaawansowania klinicznego POChP, można stwierdzić, że proces apoptozy ulega nasileniu wraz ze wzrostem zaawansowania choroby. Zakładając, że u chorych na POChP niewydolnych oddechowo apoptoza ulega nasileniu, interesujące wydaje się też odwrócenie problemu i odpowiedź na pytanie: czy badając wykładniki apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP, można przewidywać rozwój niewydolności oddechowej? Wymaga to dalszych badań większej grupy pacjentów oraz powtarzania badań na przestrzeni czasu.

Apoptoza a płeć

Do badania włączono 39 mężczyzn i 18 kobiet chorych na POChP. Analizując proces apoptozy w zależności od płci, nie wykazano istotnych różnic grupach mężczyzn i kobiet, niezależnie od zastosowanej metody. Ani odsetek komórek apoptotycznych, ani stężenie sFasL nie różniły się między płciami. (Aneks Tabela 7)

Apoptoza a wiek

Zgodnie z kryteriami kwalifikacji do badania włączono chorych na POChP w wieku 40-80 lat. Dolna granica wieku związana jest z niezwykle rzadkim rozpoznaniem POChP u osób młodszych. Badania epidemiologiczne dotyczące POChP prowadzone są zazwyczaj u chorych po 40 rż. Górna granica wieku związana jest z brakiem możliwości prawidłowego wykonania, a następnie interpretacji badań czynnościowych układu oddechowego. Obecnie

brak jest zakresu wartości należnych parametrów ocenianych w spirometrii czy bodypletyzmoграфии dla osób powyżej 80 rż.

W badaniu wzięło udział 34 pacjentów w wieku 40-65 lat i 23 pacjentów w wieku 65-80 lat. Analizując wyniki badania procesu apoptozy w grupach wiekowych, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic odsetka komórek apoptotycznych ani stężenia sFasL między chorymi młodszymi a starszymi. Do innych wniosków doszli *Ichikura i wsp.*, którzy wykazali istotną ujemną korelację między wiekiem a stężeniem sFasL w surowicy krwi. Nie badali oni jednak chorych na POChP, lecz osoby zdrowe, a stężenie sFas oznaczali w surowicy (64).

Apoptoza a BMI

Według powszechnie przyjętych zasad, prawidłowy wskaźnik masy ciała mieści się w zakresie od 20 do 25 kg/m². BMI mniejsze od 25 kg/m² oznacza niedobór masy ciała, BMI > 25 kg/m² to nadwaga, a powyżej 30 kg/m² – otyłość (112). W prowadzonym projekcie chorzy zostali podzieleni ze względu na BMI na dwie podgrupy: BMI < 25 kg/m² oraz BMI ≥ 25 kg/m². Podział ten znajduje odzwierciedlenie w piśmiennictwie, udowodniono, że u chorych na POChP wartość BMI 25 kg/m² stanowi próg między chorymi o gorszym i lepszym rokowaniu. Chorzy z większą masą ciała i z wyższym BMI żyją dłużej niż chorzy wyniszczeni z niskim BMI (121, 150). Badając chorych na POChP, w grupach zależnych od wskaźnika masy ciała, nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania pod względem odsetka komórek apoptotycznych oraz stężenia sFasL w drogach oddechowych. (Aneks Tabela 7) Oceniany na tej podstawie proces apoptozy nie różni się u chorych na POChP z mniejszą i większą masą ciała. BMI jest jednak wykładnikiem ogólnoustrojowych zmian jakie zachodzą w POChP, a niskie wartości BMI wynikają z zaniku mięśni i tkanki tłuszczowej u kachektycznych chorych na POChP. W badaniu własnym oceniano apoptozę toczącą się lokalnie w drogach oddechowych, zatem możemy nie odnajdować tu wykładników apoptozy toczącej się pozapłucnie. Badaniem procesu apoptozy toczącej się ogólnoustrojowo u chorych na POChP w zależności od masy ciała, zajmowali się *Takabatake i wsp.* Stwierdzili oni, że stężenie sFasL w surowicy krwi kachektycznych pacjentów z POChP (BMI < 20 kg/m²) było istotnie wyższe w porównaniu z chorymi z relatywnie wyższym BMI (BMI ≥ 20 kg/m²) (51 ± 33 pg/ml vs 36 ± 15 pg/ml). Natomiast surowicze stężenie sFasL u wszystkich chorych na POChP było istotnie niższe niż w kontrolnej grupie osób zdrowych. Równocześnie badali oni surowicze stężenie sFas, inhibitora apoptozy, u chorych na POChP i osób zdrowych. Stężenia sFas nie różniły się istotnie w badanych grupach. Ostatecznie, analizując całościowo wyniki

swojego badania, Takabatake i wsp. stwierdzili, że układ Fas/Fas Ligand nie odgrywa znaczącej roli jako potencjalny czynnik wyzwalający apoptozę prowadzącą do zaniku tkanki mięśniowej i tłuszczowej u wyniszczonych chorych na POChP. Stwierdzili także, że być może układ Fas/Fas Ligand jest istotny w wyzwalaniu apoptozy u chorych tracących masę ciała, a nie w grupie o masie ciała niskiej, ale stabilnej (137)

Apoptoza a rozdęcie płuc

Analizując proces apoptozy w zależności od wykładników rozdęcia płuc, przyjęto zaproponowany przez Casanova i wsp. próg 25% jako wartość graniczną IC/TLC dla grup o mniejszym i większym zaawansowaniu choroby. Autorzy ci stwierdzili, że IC/TLC może służyć za wykładnik ciężkości uszkodzenia płuc w przebiegu POChP, a pacjenci z $IC/TLC \leq 25\%$ żyją krócej niż chorzy z $IC/TLC > 25\%$ (21). W badaniu własnym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla odsetka komórek podlegających apoptozie i stężenia sFas ligand w drogach oddechowych chorych na POChP w zależności od hiperinflacji płuc. (Aneks Tabela 7)

Apoptoza a wydolność wysiłkowa

Dystans przebyty w teście 6-ciominutowego marszu może służyć jako prosty wykładnik wydolności wysiłkowej chorego na POChP. Pinto-Plata i wsp. udowodnili, że dystans mniejszy niż 350m jest związany ze zwiększoną śmiertelnością i powinien być uważany za nieprawidłowy (107). Również w niniejszej analizie przyjęto wartość graniczną 350m przebytych w 6MWT jako próg dla mniejszego i większego zaawansowania POChP. Badając proces apoptozy w grupach chorych z lepszą ($6MWD > 350m$) i gorszą ($6MWD < 350m$) wydolnością wysiłkową, nie wykazano istotnego statystycznie zróżnicowania odsetka komórek podlegających apoptozie i stężenia sFasL w popłuczynach oskrzelowych chorych na POChP. (Aneks Tabela 7)

Apoptoza a skala BODE

Zaproponowana przez Cote i Celli skala BODE uwzględnia ogólnoustrojowy charakter POChP, ocenia bowiem nie tylko problemy płucne (FEV1 jako miernik obturacji oskrzeli, duszność oceniana kwestionariuszem MMRC), ale bierze pod uwagę zmiany

pozapłucne (BMI oraz dystans przebyty w teście 6-cio minutowego chodu). BODE jest skalą sumaryczną, a każdy kolejny z czterech przedziałów punktowych charakteryzuje coraz gorszy stan kliniczny pacjenta i coraz większe zaawansowanie choroby. Zgodnie z propozycją Cote i Celli, również w badaniu własnym uwzględniono podział pacjentów z POChP na cztery podgrupy, w zależności od liczby punktów uzyskanych w skali BODE: 0-2, 3-4, 5-6, 7-10 punktów (22, 23). W niniejszym badaniu grupy pacjentów z POChP z różną punktacją w skali BODE nie różnią się istotnie pod względem odsetka komórek apoptotycznych i stężenia sFas ligand w drogach oddechowych. (Aneks Tabela 7)

Korelacje między wykładnikami apoptozy a parametrami określającymi stopień zaawansowania klinicznego POChP

Kolejnym etapem prezentowanego projektu była próba określenia korelacji między wykładnikami apoptozy a parametrami oceniającymi stopień zaawansowania klinicznego POChP.

W badaniu własnym wykazano dodatnią istotną statystycznie korelację odsetka komórek podlegających apoptozie, ocenianego w oparciu o wiązanie aneksyny V, z ciśnieniem parcjalnym dwutlenku węgla we krwi tętniczej ($r_s=0,27$, $p=0,0400$).

Wynik naszego badania nie potwierdza wcześniejszych pomiarów *Takabatake i wsp.*, którzy nie stwierdzili korelacji między $paCO_2$ a apoptozą, ocenianą za pomocą stężenia sFas ligand w surowicy krwi (138).

Wynik badania własnego może natomiast potwierdzać wcześniejsze spostrzeżenia *Douglasa i wsp.* Autorzy ci na modelu mysim wykazali wzmożoną apoptozę komórek nerwowych wywołaną przez przerywaną hypoksję i hyperkapnię (35). Podobnie *Lin i wsp.* wykazali wpływ hyperkapni na wzmożoną apoptozę leukocytów krwi obwodowej pacjentów z zespołem obturacyjnego bezdechu sennego (83). Natomiast do odwrotnych wniosków doszli badacze kanadyjscy. Stwierdzili oni, że hyperkapnia, stosowana w celach terapeutycznych u pacjentów z ARDS, zmniejsza apoptozę wynikającą z zespołu niedokrwienie-reperfuzja (80). Również autorzy chińscy doszli do wniosku, że hyperkapnia, poprzez zwiększenie stosunku Bcl-2/Bax, hamuje apoptozę komórek mięśni gładkich tętnicy płucnej, czego końcowym efektem jest rozwój nadciśnienia płucnego (155). Z prac tych wynika, że wpływ hyperkapni na apoptozę pozostaje niewyjaśniony i wymaga dalszych badań. Również u chorych na POChP warto było by przeprowadzić ocenę apoptozy u chorych z całkowitą niewydolnością oddechową, czyli ze współistnieniem hypoksemii z hyperkapnią. Chorzy ci (tzw. *blue bloater*

– siny obrzęknięty) charakteryzują się przewagą przewlekłego zapalenia oskrzeli z hypowentylacją pęcherzykową, obecnością sinicy i otyłości. W odróżnieniu od nich, pacjenci z POChP o fenotypie *pink puffer* (różowy sapacz) mają silny napęd oddechowy, skutkujący hypoksemią bez współistniejącej hyperkapni. W tej grupie pacjentów w obrazie klinicznym przeważa rozedma płuc, a chorzy są zazwyczaj wyniszczeni. Być może wykonanie badania w grupach chorych o fenotypach *blue bloater* i *pink puffer* (z i bez hyperkapni) pozwoliło by na wyciągnięcie dalszych wniosków o roli apoptozy w patogenezie POChP.

Przeprowadzając dalsze analizy w badaniu własnym nie wykazano korelacji między odsetkiem komórek apoptotycznych i stężeniem sFasL a takimi parametrami, świadczącymi o klinicznym zaawansowaniu POChP, jak: FEV1, RV, TLC, IC/TLC, RV/TLC, DLCO, SaO2, paO2, dystans w teście 6-cio minutowego chodu, stopień w skali MMRC, BMI, punktacja w skali BODE czy liczba paczkołat (Aneks Tabela 22, 23). Wyniki te są częściowo zbieżne z wnioskami *Takabatake i wsp.*, którzy nie stwierdzili korelacji między stężeniem sFas Ligand w surowicy krwi chorych na POChP i takimi wykładnikami ciężkości choroby jak FEV1, VC, FEV1/VC, paO2 czy paCO2 (138).

Poszukiwanie parametrów świadczących o zaawansowaniu POChP

W końcowym etapie prezentowanego projektu, podjęliśmy próbę odpowiedzi na pytanie, czy apoptoza jest związana ze stopniem zaawansowania klinicznego POChP, poprzez poszukiwanie parametrów świadczących o zaawansowaniu choroby. W tym celu posłużyliśmy się analizą skupień przeprowadzoną metodą aglomeracji oraz metodą grupowania k-średnich. W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskano dwa skupienia chorych, z mniej i bardziej zaawansowaną POChP. Skupienia te różniły się istotnie pod względem takich parametrów jak: FEV1, DLCO, saO2, dystans w teście 6-cio min. chodu, RV, stopień wg GOLD, punktacja w skali BODE, IC/TLC, RV/TLC. Uznano, że w/w parametry w największym stopniu świadczą o ciężkości POChP i w największym stopniu różnicują pacjentów z mniej i bardziej zaawansowaną chorobą. Parametr odsetek komórek apoptotycznych wpisywał się w przeprowadzoną analizę skupień (Rycina 8), jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej ($p=0,245$) (Tabela 9). Być może przeprowadzenie podobnej analizy z uwzględnieniem większej grupy pacjentów pozwoliło by na pełniejsze wyjaśnienie czy wykładniki apoptozy mogą świadczyć o klinicznym zaawansowaniu POChP.

Podsumowanie

Rola procesu apoptozy jako czynnika patogenetycznego POChP nie została do końca poznana. Wzbudza ona nadal wiele kontrowersji. Dotychczas przeprowadzone badania koncentrują się głównie na apoptozie strukturalnych komórek tkanki płucnej. Interesującym, a do tej pory słabo poznanym problemem jest apoptoza komórek zapalnych w tkance płucnej. Konieczne są dalsze badania, które wyjaśniłyby mechanizm procesu śmierci komórki w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. Wyjaśnienie tych problemów mogłoby w przyszłości pomóc w poszukiwaniu nowych leków, które skutecznie hamowałyby proces progresji zmian w układzie oddechowym chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc.

7. WNIOSKI

1. Apoptoza w drogach oddechowych chorych na POChP, oceniana w oparciu o odsetek komórek apoptotycznych i stężenie sFasL w popłuczynach oskrzelowych, nie różni się w I+II, III i IV stadium choroby wg GOLD.
2. Proces apoptozy komórek w drogach oddechowych chorych na POChP ulega nasileniu u pacjentów z niewydolnością oddechową.
3. Odsetek komórek podlegających apoptozie w drogach oddechowych chorych na POChP koreluje z ciężkością niewydolności oddechowej, której miarą jest ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej.
4. Ocena wykładników apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP, jako parametrów świadczących o klinicznym zaawansowaniu choroby, wymaga przeprowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem większej grupy pacjentów.

8. STRZESZCZENIE

Przewlekła obturacyjna choroba płuc charakteryzuje się trwałym ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Wg kryteriów GOLD chorobę dzielimy na cztery stopnie ciężkości, której miarą jest FEV1 po inhalacji leku rozkurczającego oskrzela. Ostatnio jednak coraz więcej danych przemawia za tym, że FEV1 nie jest optymalnym parametrem określającym stan kliniczny chorych, w wielu badaniach zaproponowano inne wykładniki oceny ciężkości choroby i wskaźniki prognostyczne. POChP jest schorzeniem, w którego patogenezie bierze udział przewlekłe zapalenie neutrofilowe, zaburzenie równowagi między proteinazami i antyproteinazami oraz stres oksydacyjny. Coraz więcej doniesień sugeruje, że czwartym mechanizmem patogenetycznym POChP jest apoptoza. *Celem pracy* była ocena procesu apoptozy w drogach oddechowych chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby. *Materiał i metody:* do badania włączono 57 chorych na POChP (39 mężczyzn i 18 kobiet), u których rozpoznano zgodnie z kryteriami GOLD, w wieku 40-80 lat, palaczy lub byłych palaczy, w stabilnym okresie choroby. Kryterium wyłączenia stanowiło rozpoznanie innej niż POChP choroby układu oddechowego oraz obecność przeciwwskazań do wykonania bronchofiberoskopii. Badani rekrutowani byli spośród pacjentów Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej UM w Poznaniu oraz przyklinicznej Poradni Pulmonologicznej. Z ogółu grupy badanej wyodrębniono podgrupy chorych w I+II, III i IV stadium zaawansowania wg GOLD, podgrupy chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo oraz podgrupy uzależnione od wartości takich parametrów jak: wiek, płeć, BMI, IC/TLC, dystans w teście 6-cio minutowego chodu, punktacja w skali BODE. U wszystkich analizowanych pacjentów przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe, wykonano spirometrię, bodypletyzmografię, DLCO, gazometrię krwi tętniczej, test 6-cio minutowego chodu, obliczono punktację według skali oceny stanu klinicznego BODE oraz liczbę paczkołat palenia tytoniu. Podczas rutynowo wykonywanej bronchofiberoskopii pobrano popłuczyny oskrzelowe, które poddano dalszym badaniom. Ich skład komórkowy został określony immunofenotypowo. Nasilenie procesu apoptozy w drogach oddechowych oceniono za pomocą pomiaru odsetka komórek podlegających apoptozie, w oparciu o wiązanie aneksyny V barwionej izotiocyjanianem fluoresceiny (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I- BD Pharmingen). W popłuczynach oceniono także stężenie rozpuszczonego ligandu Fas, białka stanowiącego element szlaku Fas/Fas ligand indukującego apoptozę

(Human sFas Ligand ELISA Kit - BioVendor). *Wyniki:* podgrupy chorych z I+II, III i IV stadium zaawansowania wg GOLD nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku, liczby paczkołat palenia papierosów oraz BMI, natomiast różniły się istotnie statystycznie pod względem parametrów ocenianych w badaniach czynnościowych układu oddechowego oraz w skali BODE (poza BMI). Podobne wyniki uzyskano między podgrupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechemo. Średni odsetek komórek nienabłonkowych w płucach oskrzelowych ogółu chorych wynosił 64,26%. Spośród w/w komórek, w całej grupie badanej średnio 14,73% komórek podlegało apoptozie ocenianej w oparciu o wiązanie aneksyny V. Porównując odsetek komórek podlegających apoptozie w grupach chorych w I+II, III i IV^o POChP, nie uzyskano istotnych statystycznie różnic. Uzyskano natomiast istotne statystycznie zróżnicowanie odsetka komórek podlegających apoptozie między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechemo ($p=0,0438$). Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic odsetka komórek apoptotycznych między następującymi podgrupami pacjentów: kobiety vs mężczyźni, wiek 40-65 rż vs 65-80rż, $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ vs $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$, $IC/TLC \leq 25\%$ vs $IC/TLC > 25\%$, $6MWD < 350\text{m}$ vs $6MWD \geq 350\text{m}$, BODE 0-2, 3-4, 5-6, 7-10 punktów. Wykazano dodatnią istotną statystycznie korelację między odsetkiem komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych a ciśnieniem parcjalnym dwutlenku węgla we krwi tętniczej ($p=0,04$). Nie wykazano korelacji między odsetkiem komórek apoptotycznych w płucach oskrzelowych a FEV1 (%), RV (%), TLC (%), IC/TLC (%), RV/TLC (%), DLCO (%), SaO2 (%), paO2 (mmHg), 6MWD (m), stopniem MMRC, BMI (kg/m^2), punktacją w skali BODE, liczbą paczkołat palenia czy wiekiem chorych. Mierząc stężenie sFas ligand w płucach oskrzelowych, w całej grupie badanej uzyskano średnie stężenie 8,86pg/ml. Porównując stężenie sFasL w grupach chorych w I+II, III i IV^o POChP, nie uzyskano istotnych statystycznie różnic. Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic stężenia sFasL między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechemo. Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic stężenia sFasL między następującymi podgrupami pacjentów: kobiety vs mężczyźni, wiek 40-65 rż vs 65-80rż, $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ vs $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$, $IC/TLC \leq 25\%$ vs $IC/TLC > 25\%$, $6MWD < 350\text{m}$ vs $6MWD \geq 350\text{m}$, BODE 0-2, 3-4, 5-6, 7-10 punktów. Nie wykazano korelacji między stężeniem sFasL w płucach oskrzelowych a FEV1 (%), RV (%), TLC (%), IC/TLC (%), RV/TLC (%), DLCO (%), SaO2 (%), paO2 (mmHg), paCO2 (mmHg), 6MWD (m), stopniem MMRC, BMI (kg/m^2), punktacją w skali BODE, liczbą paczkołat palenia czy wiekiem chorych. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy apoptoza jest związana ze stopniem zaawansowania klinicznego POChP poprzez poszukiwanie grupy parametrów świadczących o zaawansowaniu choroby. Uznano, że

parametrami najlepiej różnicującymi grupy chorych z mniej i bardziej zaawansowaną POChP są: FEV1, DLCO, saO₂, dystans w teście 6-cio min. chodu, RV, stopień wg GOLD, punktacja w skali BODE, IC/TLC, RV/TLC. Parametr odsetek komórek apoptotycznych wykazał zróżnicowanie pomiędzy grupami, jednak nie na zakładanym poziomie istotności statystycznej ($p=0,245$). *Wnioski:* 1. Apoptoza w drogach oddechowych chorych na POChP, oceniana w oparciu o odsetek komórek apoptotycznych i stężenie sFasL w płucach oskrzelowych, nie różni się w I+II, III i IV stadium wg GOLD. 2. Proces apoptozy komórek w drogach oddechowych chorych na POChP ulega nasileniu u pacjentów z niewydolnością oddechową. 3. Odsetek komórek podlegających apoptozie w drogach oddechowych chorych na POChP koreluje z ciężkością niewydolności oddechowej, której miarą jest ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej. 4. Ocena wykładników apoptozy w drogach oddechowych chorych na POChP, jako parametrów świadczących o klinicznym zaawansowaniu choroby, wymaga przeprowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem większej grupy pacjentów.

9. SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease is characterized by persistent airflow limitation. According to GOLD criteria, we can classify four stages of severity of airflow limitation, based on post-bronchodilator FEV₁. Recent data suggest that FEV₁ is not an optimal parameter that characterizes the patients' clinical status. Many different parameters that assess disease severity and prognostic factors have been proposed. There are three main mechanisms involved in the pathogenesis of COPD: chronic lung inflammation, protease-antiprotease imbalance and oxidative stress. Recent data suggest that apoptosis is a fourth mechanism in the pathogenesis of this disorder. *The aim of the study:* was the assessment of apoptosis in the airways of patients with COPD, according to the disease severity. *Material and methods:* 57 patients (38 males and 19 females), diagnosed with COPD according to GOLD criteria, aged 40 to 80 years, current or former smokers, with stable disease, were enrolled into the study. Patients with other lung diseases or with contraindications to fiberoptic bronchoscopy, were not enrolled. Subjects were recruited among hospital and ambulatory patients of the Department of Pulmonology, Allergology and Lung Oncology, Poznan University of Medical Sciences. All subjects were divided into subgroups of patients with GOLD stage I+II, III and IV, subgroups with or without respiratory failure, and subgroups based on such parameters like: age, gender, BMI, IC/TLC ratio, 6-minute walking distance, BODE index. In all analyzed subjects medical history, physical examination, spirometry, whole body plethysmography, arterial blood gas analysis, 6-minute walk test, BODE index and the measurement of cigarette smoking packyears were performed. During the routine fiberoptic bronchoscopy, the bronchial washings were collected. We differentiated the bronchial washings cells using immunophenotyping. Apoptosis in the airways was assessed by the measurement of the percentage of apoptotic cells in bronchial washings (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I- BD Pharmingen). The bronchial washings concentration of soluble Fas ligand, a component of Fas/Fas ligand apoptosis induction pathway, was also measured (Human sFas Ligand ELISA Kit – BioVendor). *Results:* there were no statistically significant differences of age, cigarette smoking packyears and BMI among I+II, III and IV COPD stages subgroups. On the contrary, function tests and BODE index parameters were different among these subgroups. Similar results were obtained between the patients with or without respiratory insufficiency. In the whole analyzed group, the average percentage of non-epithelial cells in bronchial washings was 64,26%. Among these cells, the average percentage

of apoptotic cells was 14,73%. Comparing COPD stage I+II, III and IV subgroups, no significant differences of the percentage of apoptotic cells were disclosed. Patients diagnosed with respiratory failure showed significantly increased percentage of apoptotic cells, comparing with the subgroup without respiratory failure ($p=0,0438$). There were no statistically significant differences of the apoptotic cells percentage between the subgroups of: females vs males, aged 40-65 years vs 65-80 years, $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ vs $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$, $IC/TLC \leq 25\%$ vs $IC/TLC > 25\%$, $6MWD < 350\text{m}$ vs $6MWD \geq 350\text{m}$, BODE index 0-2, 3-4, 5-6, 7-10 points. The positive significant correlation of the percentage of apoptotic cells in bronchial washings and $paCO_2$ was revealed ($p=0,04$). In the analyzed group there was no correlation of the percentage of apoptotic cells and FEV1 (%), RV (%), TLC (%), IC/TLC (%), RV/TLC (%), DLCO (%), SaO2 (%), paO_2 (mmHg), 6MWD (m), MMRC, BMI (kg/m^2), BODE index, cigarette smoking packyears or patients age. The average concentration of sFasL in the whole analyzed group was 8,86pg/ml. Comparing COPD stage I+II, III and IV subgroups, no significant differences of the concentration of sFasL were disclosed. The concentration of sFasL was not significantly different between the subgroups of: respiratory sufficient vs respiratory insufficient patients, females vs males, aged 40-65 years vs 65-80 years, $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ vs $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$, $IC/TLC \leq 25\%$ vs $IC/TLC > 25\%$, $6MWD < 350\text{m}$ vs $6MWD \geq 350\text{m}$, BODE index 0-2, 3-4, 5-6, 7-10 points. In the analyzed subjects there was no correlation of the percentage of apoptotic cells and FEV1 (%), RV (%), TLC (%), IC/TLC (%), RV/TLC (%), DLCO (%), SaO2 (%), paO_2 (mmHg), $paCO_2$ (mmHg), 6MWD (m), MMRC, BMI (kg/m^2), BODE index, cigarette smoking packyears or patients age. We tried to answer if apoptosis is one of the parameters characterizing COPD severity. Using a statistical model, we formed a group of parameters differentiating patients with less or more severe disease: FEV1, DLCO, SaO2, 6-minute walk distance, RV, GOLD stage, BODE index, IC/TLC, RV/TLC. The percentage of apoptotic cells in bronchial washings was different in these two groups of patients, but the difference was not significant ($p=0,245$). *Conclusions:* : 1. There are no differences of apoptotic cells in the COPD stage I+II, III and IV patients airways. 2. In COPD, the apoptosis in the airways is increased in the patients with respiratory insufficiency. 3. The percentage of apoptotic cells in COPD patients airways correlates with the severity of respiratory failure, measured by $paCO_2$. 4. Apoptosis as a parameter of COPD severity need to be assessed in future trials with higher number of patients.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Agusti A.G., Sauleda J., Miralles C et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(4):485-489
2. Agusti A.G.N., Noguera A., Sauleda J. et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347-360
3. Albuquerque A.L.P., Nery L.E., Villaca D.S. et al. Inspiratory fraction and exercise impairment in COPD patients GOLD stages II-III. *Eur Respir J* 2006;28:939-944
4. Anthonisen N.R., Wright E.C., Hodgkin J.E. Prognosis In chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(1): 14-20
5. Antonelli-Incalzi R., Imperiale C., Bellia V. et al. Do GOLD stages of COPD severity really correspond to differences in health status? *Eur Respir J* 2003;22:444-449
6. Aoshiba K., Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 596-601
7. Aoshiba K., Yokohori N., Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(5):555-562
8. Ashkenazi A., Dixit V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:255-260
9. ATS Statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:111-117
10. Barnes P.J., Shapiro S.D., Pauwels R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-88
11. Barnes P.J. Mechanisms of COPD: Differences from asthma. *Chest* 2000; 177(2): 10S-14S
12. Barnes P.J., Celli B.R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 1165-1185
13. Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-409
14. Batura-Gabryel H. POChP jako choroba systemowa. *Terapia* 2010; 9: 4-8
15. Batura-Gabryel H., Kuźnar-Kamińska B. Nowe spojrzenie na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP)- problem chorób współistniejących. *Przewodnik Lekarza* 2007; 3:98-101

16. Baud V., Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TERNDS in Cell Biology* 2001; 11(9):372-377
17. Bednarek M., Maciejewski J., Wozniak M., Kuca P., Zieliński J. Prevalence, severity and underdiagnosis of COPD in the primary care setting. *Thorax* 2008; 63(5): 402-407
18. Boldrini L., Faviana P., Pistolesi F. et al. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene and its relationship with p53 in non small cell lung cancer. *Oncogene* 2001;20(45):6632-6637
19. Borak J et al. Psychological status of COPD patients on long term oxygen therapy. *Eur Respir J* 1991;4:59-62
20. Borges V.M., Falcao H., Leite-Junior J.H. et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med* 2001;194(2):155-164
21. Casanova C., Cote C., de Torres J.P. et al. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:591-597
22. Celli B.R., Cote C.G., Marin J.M. et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1005-1012
23. Celli B.R., MacNee W., ERS/ATS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23(6):242
24. Chambellan A., Chailleux E., Similowski T. and the ANTADIR observatory group. Prognostic value of the hematocrit in patients with severe COPD receiving long-term oxygen therapy. *Chest* 2005; 128: 1201-1208
25. Cheng E., Kirsch D.G., Clem R. et al. Conversion of Bcl-2 to Bax-like death receptor by caspases. *Science* 1997;278:1966-1968
26. Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G.K. Caspases- an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008;151(1):10-27
27. Chung K.F., Adcock I.M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31:1334-1356
28. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990;3:937-974
29. Condo I., Testi R. Intracellular mediators of programmed cell death initiated at the cell surface receptor Fas. *Transpl Int* 2000; 13: S3-S6

30. Cote C.G., Casanova C., Marin J.M. et al. Validation and comparison of reference equations for the 6-min walk distance test. *Eur Respir J* 2008; 3:571-578
31. Dai H., Guzman J., Costabel U. Increased expression of apoptosis signalling receptors by alveolar macrophages in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;13(6):1451-1454
32. de Torres J.P., Casanova C., Cote C.G. et al. Six-minute walking distance in women with COPD. *COPD* 2011 ;8(4) :300-305
33. Demedts I.K., Demoor T., Bracke K.R. et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research* 2006; 7:53
34. Domagała-Kulawik J., Droszcz P., Kraszewska I. Chazan R. Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2000; 4: 185-188
35. Douglas R.M., Ryu J., Kanaan A. et al. Neuronal death during combined intermittent hypoxia/hypercapnia is due to mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298(6):C1594-C1602
36. Erdogan B., Uzaslan E., Budak F. et al. The evaluation of soluble Fas and soluble Fas ligand levels of bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer. *Tuberk Toraks* 2005;53(2):127-131
37. Fadeel B., Xue D., Kagan V. Programmed cell clearance: Molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2010; 396: 7-10
38. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 1992; 148: 2207-2216
39. Fal A., Nowak A.A., Nowak M.T., Małolepszy J. Programowana śmierć komórki i jej rola w patogenezie procesów chorobowych. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2003, CIX, 1 (1): 71-78
40. Fellstrom B., Zezina L. Apoptosis: Friend or Foe? *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 2414-2416
41. Fokkema E., Vries E.G., Groen H.J. et al. Expression of apoptosis-related proteins and morphological changes in a rat tumor model of human small cell lung cancer prior to and after treatment with radiotherapy, carboplatin, or combined treatment. *Virchows Arch* 2003;442(4):349-355

42. France A.J., Prescott R.J., Biernacki W et al. Does right ventricular function predict survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax* 1988;43:621-626
43. Frisch S.M., Screaton R.A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:555-562
44. Galuzzi L., Vitale I., Abrams J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19:107-120
45. Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55:178-194
46. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (updated 2008) <http://www.goldcopd.org>
47. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (updated 2011) <http://www.goldcopd.org>
48. Górecka D. Wskaźniki prognostyczne w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. *Przewodnik Lekarza* 2006;2:67-70
49. Górecka D., Gorzelak K., Śliwiński P. et al. Effect of long term oxygen therapy on survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease with moderate hypoxaemia. *Thorax* 1997;52:674-679
50. Granville D.J., Carthy C.M., Hunt D.W. et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998;78:893-913
51. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312
52. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sciences* 2001; 69: 2957-2964
53. Hacker S., Lambers C., Pollreis A., Hoetzenecker K., Lichtenauer M., Mangold A. et al. Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD. *J Clin Lab Anal* 2009; 23:372-379
54. Halbert R.J., Natoli J.L., Gano A. et al. Global Burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28: 523-32
55. Haslett C., Savill J. Why is apoptosis important to clinicians? *BMJ* 2001;322:1499-1500

56. Hodge S., Hodge G., Scicchitano R. et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunology and Cell Biology* 2003; 81:289-296
57. Hodge S., Hodge G., Holmes M., Reynolds P.N. Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J* 2005; 25: 447-454
58. Hodge S.J., Hodge G.L., Holmes M. et al. Flow cytometric characterization of cell populations in bronchoalveolar lavage and bronchial brushings from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004; 61B: 27-34
59. Hodge S.J., Hodge G.L., Reynolds P.N., Scicchitano R., Holmes M. Increased production of TGF- β and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L492-L499
60. Hoffmann P.R., Decathelineau A.M., Ogden C.A. et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001;155:649-659
61. Hogg J.C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709-721
62. Hogg J.C., Chu F., Utokaparch S. et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2645-2653
63. Honma Y., Ishii Y., Yamamoto-Yamaguchi Y. et al. Cotylenin A, a differentiation-inducing agent, and INF- α cooperatively induce apoptosis and have an antitumor effect on human non-small cell lung carcinoma cells in nude mice. *Cancer Research* 2003;63:3659-3666
64. Ichikura T., Majima T., Uchida T. et al. Plasma soluble Fas ligand concentration: decrease in elderly men and increase in patients with gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2001;8:311-314
65. Imai K., Mercer B.A., Schulman L.L. et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25: 250-258
66. Janmaat M.L., Kruyt F.A.E., Rodriguez J.A. et al. Response to Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clinical Cancer Research* 2003;9:2316-2326)

67. Jassem E., Górecka D., Krakowiak P., Kozielski J., Słomiński M., Krajnik M., Fal A.M. Zintegrowana opieka medyczna u chorych na zaawansowaną przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. *Pneumonol Alergol Pol* 2010; 78, 2: 126-132
68. Kanazawa H., Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest* 2005;128(5):3191-9197
69. Kasahara Y., Tuder R.M., Taraseviciene-Stewart L. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106: 1311-1319
70. Kischkel F.C. Hellbardt S., Behrmann I. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14(22):5579-5588
71. Klas C., Debatin K-M., Joker R., Kramer P.H. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630
72. Kopiński G., Balicka-Ślusarczyk B., Dyczek A. et al. Enhanced expression of Fas Ligand (FasL) in the lower airways of patients with fibrotic interstitial lung diseases (ILDs). *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2011;49(4):636-645
73. Koyama S., Sato E., Haniuda M. et al. Decreased level of Vascular Endothelial Growth Factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:382-385
74. Krammer P.H., Behrmann I., Daniel P., Dhein J., Debatin K-M. Regulation of apoptosis in the immune system. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6: 279-289
75. Krawczyk K., Skucha W. Częstość występowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc wśród przewlekle palących tytoń mieszkańców Krakowa i Proszowic. *Przegl Lek* 2000;57:617-618
76. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nature Med* 2000;6:513-519
77. Kunitake R., Kuwano K., Miyazaki H. et al. Apoptosis in the course of granulomatous inflammation in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;13(6):1329-37
78. Kuwano K., Kawasaki M., Maeyama T. et al. Soluble form of Fas and Fas ligand in BAL fluid from patients with pulmonary fibrosis and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Chest* 2000;118:451-458
79. Kuwano K., Miyazaki H., Hagimoto N. et al. The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(1):53-60

80. Laffey J.G., Tanaka M., Engelberts D. et al. Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2287-2294
81. Laflamme C., Israel-Assayag E., Cormier Y. Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2003;21:225-231
82. Landbo C., Prescott E., Lange P et al. Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 1856-1861
83. Lin L., Li T.P. Alteration of telomere length of the peripheral white blood cells in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011;31(3):457-460
84. Liu A.N., Mohammed A.Z., Rice W.R. et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor- α : relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:849-858
85. Locksley R.M. et al. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501
86. Ma B., Kang M.J., Lee C.G. et al. Role of CCR5 in INF- γ -induced and cigarette smoke-induced emphysema. *J Clin Invest* 2005;115:3460-3472
87. Majo J., Ghezzi H., Cosio M.G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17: 946-953
88. Mannino Chronic Obstructive Pulmonary Disease: definition and epidemiology. *Respiratory Care* 2003; 48(12): 1185-1193
89. Mariani S.M., Matiba B., Sparna T., Krammer P.H. Expression of biologically active mouse and human cd95/apo-1/fas ligand in the baculovirus system. *J Immunol Methods* 1996;193:63-70
90. Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442
91. Medical Research Council Working Party: Long-term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet* 1981;1:681-685
92. Mejza F., Nizankowska-Mogilnicka E., Kurzawa R., Górski P., Wirkijowski B., Jaeschke R. Outpatients specialist care of chronic obstructive pulmonary disease patients in Poland- results of the KOMPAS study. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009; 77: 507-516

93. Melino G., Knight R.A., Green D.R. Publications in cell death: the golden age. *Cell Death and Differentiation* 2001; 19: 107-120
94. Mets O.M., Murphy K., Zanen P. et al. The relationship between lung function impairment and quantitative computed tomography in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Radiol* 2012;22:120-128
95. Murray C.J., Lopez A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498-504
96. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365
97. Niepsuj G., Kozielski J., Niepsuj K. i wsp. Przewlekła obturacyjna choroba płuc wśród mieszkańców Zabrze. *Wiad. Lek.* 2002;55 (supl. 1):354-359
98. Nishimura K., Izumi T., Tsukino M. et al. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 2002;121:1434-1440
99. Nishimura K., Yasui M., Nishimura T., Oga T. Airflow limitation od static hyperinflation: which is more closely related to dyspnea with activities of daily living in patients with COPD? *Respiratory Research* 2011;12:135-141
100. Nizankowska-Mogilnicka E., Mejza F., Buist A.S., Vollmer W.M., Skucha W., Harat R., Pająk A., Gąsowski J., Frey J., Nastalek P., Twardowska M., Janicka J., Szczeklik A. Częstość występowania POChP i rozpowszechnienie palenia tytoniu w Małopolsce- wyniki badania BOLD w Polsce. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007; 117(9): 402-410
101. Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group: Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. A clinical trial. *Ann Intern Med* 1980;93:391-398
102. O'Reilly L.A., Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res* 1999; 48: 5-21
103. O'Sullivan S., Cormican L., Burke C.M., Poulter L.W. Fluticasone induces T cell apoptosis in the bronchial wall of mild to moderate asthmatics. *Thorax* 2004;59:657-661
104. Pahlavani M.A., Vargas D.A. Aging but not dietary restriction alters the activation-induced apoptosis in rat T cells. *FEBS Letters* 2001;491:114-118
105. Peter M.E., Heufelder A.E., Hengartner M.O. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:12736-12737

106. Peter M.E., Krammer P.H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology* 1998; 10: 545-551
107. Pinto-Plata V.M., Cote C., Cabral H. et al. The 6-min walk distance: change over time and value as predictor of survival in severe COPD. *Eur Respir J* 2004; 23:28-33
108. Plusa T., Jahnz-Różyk K. Astma oskrzelowa i przewlekła obturacyjna choroba płuc. MEDPRESS, Warszawa 2001, str. 99-100, 123-125
109. Pływaczewski R., Bednarek M., Jonczak L. i wsp. Prevalence of COPD in Warsaw population. *Pneumonol Alergol Pol* 2003; 71(7-8):329-335
110. Powell W.C., Fingleton B., Wilson C.L. et al. The metalloproteinase matrylisin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 1999;9:1441-1447
111. Ramos C., Montano M., Garcia-Alvarez J. et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lung differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:591-598
112. Raport of WHO Consultation on Obesity Preventing and Managing the Global Epidemic Division of noncommunicable Diseases, World Health Organization, 1998)
113. Redelmeier D.A., Bayumi A.M., Goldstein R.S. et al. Interpreting small differences in functional status: The six minute walk test in chronic lung diseases patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1278-1282
114. Ren Y., Savill J. Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death and Differentiation* 1998;5:563-568
115. Russel J.H., Rush B., Weaver C. et al. Mature T cells of the autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90:4409-4413
116. Saita N., Yamanaka T., Kohrogi H. et al. Apoptotic response of eosinophils in chronic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J* 2001;17(2):190-194
117. Sakao S., Tatsumi K., Hashimoto T. et al. Vascular endothelial growth factor and the risk of smoking-related COPD. *Chest* 2003; 124: 323-327
118. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-788
119. Schmitz I., Walczak H., Krammer P.H., Peter M.E. Differences between CD95 type I and type II cells detected with CD95 ligand. *Cell Death and Differentiation* 1996; 6, 821-822

120. Schneider P., Holler N., Bodmer J-L. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998;187(6):1205-1213
121. Schols A.M., Slangen J., Volovics L et al. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1791-1797
122. Segura-Valdez L., Pardo A., Gaxiola M. Et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-694
123. Senior R.M. Mechanisms of COPD. Conference Summary. *Chest* 2000;117:320S-323S
124. Shikuwa Ch., Kadota J., Mukae H. High concentration of soluble Fas ligand in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 2002;69(3):242-246
125. Shin M.S., Kim H.S., Lee S.H. et al. Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2002;21(26):4129-4136
126. Siatkowska H., Kozielski J., Ziora D. Chorzy na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc w praktyce lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2010; 78, 2: 112-120
127. Similowski T., Agusti A., MacNee W. et al. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 390-396
128. Sin D.D., Man S.F.P. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of Cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation.* 2003; 107: 1514-1519
129. Skwarski K., MacNee W., Wraith P.K. et al. Predictors of survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with long-term oxygen therapy. *Chest* 1991;100:1522-1527
130. Śliwiński P. Niewydolność oddychania. W: Choroby układu oddechowego. Rowińska-Zakrzewska E., Kuś J. (red), PZWL, Warszawa 2004
131. Smolewski P., Grzybowska O. Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych- dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Hematologia Polonica* 2002; 33: 393-401

132. Spruit M.A., Polkey M.I., Celli B. et al. Predicting outcomes from 6-minute walk distance in chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Med Dir Assoc.* 2012;13(3):291-297
133. Stockley R.A. New approaches to the management of COPD. *Chest* 2000; 94: 1215-1220
134. Stratelis G., Jakobsson P., Molstad S. et al. Early detection of COPD in primary care : screening by invitation of smokers aged 40 to 55 years. *Br J Gen Pract* 2004;54:201-206
135. Stridth A., Planck A., Gigliotti D., Eklund A., Grunewald J. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. *Thorax* 2002; 57: 897-901
136. Suda T., Hashimoto H., Tanaka M. et al. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997;186(12):2045-2050
137. Takabatake N., Arao T., Sata M. et al. Circulating levels of soluble Fas ligand in cachexic patients with COPD are higher than those in non-cachexic patients with COPD. *Internal Medicine* 2005; 44: 1137-1143
138. Takabatake N., Nakamura H., Inoue S et al. Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2000; 94: 1215-1220
139. Tanaka M., Suda T., Takahashi T. et al. Expression of the functional form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *Eur Mol Biol Organ J* 1995;14:1129-1135
140. Tanaka M.T., Suda T., Haze K. et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med.* 1996;2:317-322
141. Tanaka T., Yoshimi M., Maeyama T. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2002;20(2):359-368
142. Tang K., Rossiter H.B., Wagner P.D. Breen E.C. Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *J Appl Physiol* 2004;97:1559-1566
143. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V. et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192(3):359-366
144. Trautmann A., Schmid-Grendelmeier P., Kruger K. et al. T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(2):329-337

145. Tsuyuki S., Bertrand C., Erard F et al. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 1995;96(6):2924-2931
146. Turlej R.K., Fievez L., Sandersen C.F et al. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax* 2001;56:696-702
147. Vandivier R.W., Fadok V.A., Hoffmann P.R. et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* 2002;109:661-670
148. Walczak H., Krammer P.H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental Cell Research* 2000; 256:58-66
149. Wen L-P., Madani K., Fahrni J.A. et al. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by INF- γ and Fas. *Am J Physiol* 1997;273:L921-L929)
150. Wilson D.O., Rogers R.M., Sanders M.H. et al. Nutritional intervention in malnourished patients with emphysema. *Am Rev Resp Dis* 1986;134:672-677
151. World Health Report. Geneva: World Health Organization: <http://www.who.int/whr/2000/en/statistics.htm>
152. World Bank/WHO Global Burden of Disease Study: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease
153. World Health Organization. The global burden of disease:2004 update. Geneva, World Health Organization 2008. <http://www.wgo.int/evidence/bod>
154. Wouters E.F.M., Creutzberg E.C., Schols A. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121: 127S-130S
155. Xu Y., Wang Y.Y., Jia X.G. et al. The relationship between endogenous hydrogen sulfide system and pulmonary hypertension induced by hypoxic hypercapnia. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2011;27(3):300-304
156. Yasuda N., Gotoh K., Minatoguchi S. et al. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med* 1998; 92: 993-999
157. Yokohori N., Aoshiba K., Nagai A., et al. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004; 125: 626-632
158. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc rozpoznawania i leczenia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP). *Pneumonologia i Alergologia Polska* 2010; 78(5):1-45

159. Zheng T., Kang M.J., Crothers K. et al. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in INF-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 2005;174:3460-3472

11. ANEKS

Tabela 1. Statystyki opisowe badanych parametrów dla ogółu chorych

Ogół badanych	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	57	65,19	64	42	79	60	72	37	8,039	12	1,065
liczba paczkołat	57	38,25	40	10	80	30	50	70	15,338	40	2,032
FEV1 [%]	56	47,69	44,65	15,3	98	35	63,25	82,7	17,483	37	2,336
FVC [%]	56	64,08	64,1	27,9	115,4	51,6	73,85	87,5	17,135	27	2,290
FEV1/FVC [%]	56	57,62	59,5	33,9	74,8	50,42	67,545	40,9	10,853	19	1,450
RV [%]	47	196,41	189,3	97,8	362,9	154,9	245	265,1	59,358	30	8,658
TLC [%]	47	118,22	115,7	80,4	176,7	102,3	131,9	96,3	19,307	16	2,816
IC/TLC [%]	49	30,81	30,8	10,1	49,8	25,2	35,8	39,7	8,861	29	1,266
RV/TLC [%]	48	63,25	64,925	42,15	79,22	59,505	69,86	37,07	9,166	14	1,323
DLCO [%]	44	49,54	50,7	16,1	85,3	35,75	62,65	69,2	18,957	38	2,858
paO ₂ [mmHg]	57	63,33	63,1	51	88,6	58,5	68,2	37,6	7,839	12	1,038
paCO ₂ [mmHg]	57	41,52	41,1	27,5	55,5	37,2	44,4	28	5,914	14	0,783
saO ₂ [%]	57	93,61	94	85,4	99,5	91,4	95,6	14,1	3,056	3	0,405
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	51	343,43	360	60	570	240	430	510	128,263	37	17,960
BMI [kg/m ²]	57	26,80	26,7	16,5	44,1	22,6	29,4	27,6	5,852	22	0,775
stopień MMRC [0-4]	57	2,09	2	0	4	1	3	4	0,950	46	0,126
skala BODE [punkty 0-10]	51	3,43	3	0	9	1	5	9	2,579	75	0,361
komórki nienabłonkowe [%]	56	64,26	66,5	21	91	51,5	79	70	18,202	28	2,432
granulocyty [%]	56	48,34	47	0	95	28	70,5	95	24,535	51	3,279
limfocyty [%]	56	3,63	2	0	21	1	5	21	4,241	117	0,567
makrofagi [%]	56	16,81	8,5	0	88	5	20,5	88	19,924	119	2,662
komórki apoptotyczne [%]	56	14,73	6	0	72	3	19	72	17,574	119	2,348
stężenie sFasL [pg/ml]	43	8,86	1,5	0	51	0	15	51	12,335	139	1,881
CRP [mg/l]	53	3,51	3,1	0,5	9,34	1,77	5,69	8,84	4,468	105	0,614

Tabela 2. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w I+II stopniu wg GOLD

I+II stopień wg GOLD	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	22	63,55	62,5	42	76	57	72	34	9,410	15	2,006
liczba paczkołat	22	37,50	35	10	65	30	50	55	13,430	36	2,863
FEV1 [%]	22	64,23	65,75	28	98	55,3	69,8	70	14,521	23	3,096
FVC [%]	22	76,16	73,85	47,5	115,4	68,5	84,2	67,9	14,115	19	3,009
FEV1/FVC [%]	22	64,34	67,945	45,4	69,4	62,26	68,9	24	6,964	11	1,485
RV [%]	20	162,98	158,75	97,8	276	123,65	201,4	178,2	48,983	30	10,953
TLC [%]	20	113,15	110,4	80,4	144,7	100,3	127,65	64,3	17,670	16	3,951
IC/TLC [%]	18	38,06	36,85	25,6	49,8	32,7	44	24,2	7,412	19	1,747
RV/TLC [%]	18	55,93	56,035	42,15	70,48	50,37	61,5	28,33	8,144	15	1,920
DLCO [%]	19	63,35	62,6	42,1	85,3	55,2	71,3	43,2	11,228	18	2,576
paO ₂ [mmHg]	22	66,34	66,25	56,3	75,4	62,4	70,7	19,1	5,408	8	1,153
paCO ₂ [mmHg]	22	39,65	40,25	34,3	46,3	37,2	41,6	12	3,370	8	0,719
saO ₂ [%]	22	95,22	95,2	91,1	99,5	93,9	96,4	8,4	2,302	2	0,491
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	22	432,73	425	300	570	390	480	270	78,872	18	16,816
BMI [kg/m ²]	22	26,23	25,95	19,1	37,6	22,7	28,7	18,5	5,006	19	1,067
stopień MMRC [0-4]	22	1,23	1	0	2	1	2	2	0,685	56	0,146
skala BODE [punkty 0-10]	22	1,23	1	0	5	0	2	5	1,510	123	0,322
komórki nienabłonkowe [%]	22	67,32	68	28	90	58	79	62	15,965	24	3,404
granulocyty [%]	22	40,05	43,50	0	81	17	61	81	23,968	60	5,110
limfocyty [%]	22	4,82	3	1	21	1	5	20	5,517	115	1,176
makrofagi [%]	22	23,32	13	0	88	3	35	88	25,490	109	5,435
komórki apoptotyczne [%]	22	16,55	6,5	0	51	1	34	51	17,856	108	3,807
stężenie sFasL [pg/ml]	17	7,41	0	0	51	0	7,5	51	15,179	205	3,682
CRP [mg/l]	21	3,31	3,1	0,74	8,36	1,58	4,09	7,62	2,065	62	0,451

Tabela 3. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w III stopniu wg GOLD

III stopień wg GOLD	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	19	66,42	65	56	79	59	74	23	7,662	12	1,758
liczba paczkołat	19	36,58	40	10	80	25	50	70	18,185	50	4,172
FEV1 [%]	19	41,59	42,6	31,9	49,7	37,7	44,7	17,8	4,958	12	1,137
FVC [%]	19	63,71	64,4	41,7	87,9	54,2	69	46,2	12,563	20	2,882
FEV1/FVC [%]	19	55,04	56,23	36,3	66,4	51,02	63,1	30,1	9,020	16	2,069
RV [%]	16	201,01	186,25	150	301	171,25	229,85	151	45,558	23	11,390
TLC [%]	16	118,06	113,3	88	176,7	106,3	128,8	88,7	20,790	18	5,198
IC/TLC [%]	18	28,16	27,65	10,1	37,2	25,2	33,1	27,1	6,988	25	1,647
RV/TLC [%]	18	65,97	66,055	45,22	75,64	61,66	70,04	30,42	7,063	11	1,665
DLCO [%]	16	41,34	38,95	16,1	77,5	28,4	51,4	61,4	17,710	43	4,427
paO ₂ [mmHg]	19	64,19	64,4	52,7	76,6	59,8	66,7	23,9	5,904	9	1,354
paCO ₂ [mmHg]	19	39,58	40,3	27,5	48,9	35,7	44,4	21,4	5,792	15	1,329
saO ₂ [%]	19	94,12	94,4	90,1	96,6	92,8	95,4	6,5	1,667	2	0,382
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	17	305,88	300	60	510	240	420	450	121,889	40	29,562
BMI [kg/m ²]	19	26,34	26,6	19,9	39,6	22,6	29,4	19,7	4,699	18	1,078
stopień MMRC [0-4]	19	2,37	2	1	3	2	3	2	0,597	25	0,137
skala BODE [punkty 0-10]	17	4,29	4	2	8	3	5	6	1,490	35	0,361
komórki nienabłonkowe [%]	19	58,76	58	21	91	42	78	70	21,710	37	4,981
granulocyty [%]	19	46,11	43	10	95	26	71	85	26,030	56	5,972
limfocyty [%]	19	3,38	3	0	11	1	5	11	2,795	83	0,641
makrofagi [%]	19	15,80	7,2	0	69	4	21	69	17,947	114	4,117
komórki apoptotyczne [%]	19	9,18	6	0,1	53	3	10	52,9	11,974	130	2,747
stężenie sFasL [pg/ml]	15	12,30	15	0	35,5	0,018	16,5	35,5	11,003	89	2,841
CRP [mg/l]	17	3,75	3,1	0,5	9,34	1,77	4,33	8,84	2,870	76	0,696

Tabela 4. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w IV stopniu wg GOLD

IV stopień wg GOLD	N	x	Me	Min	Max	Q₁	Q₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	16	66,00	64,5	58	77	61	72,5	19	6,346	10	1,586
liczba paczkołat	16	41,25	40	10	60	30	55	50	14,663	36	3,666
FEV1 [%]	15	31,14	29,5	15,3	48,9	26,2	35,6	33,6	8,883	29	2,294
FVC [%]	15	46,85	49,7	27,9	62,8	39,1	53,5	34,9	10,190	22	2,631
FEV1/FVC [%]	15	51,03	48,4	33,9	74,8	39,1	58,6	40,9	12,606	25	3,255
RV [%]	11	250,52	269,1	158,2	362,9	203,1	274	204,7	55,191	22	16,641
TLC [%]	11	127,68	127	97	154,9	111,9	142	57,9	17,976	14	5,420
IC/TLC [%]	13	24,45	23	16	34,5	19,9	30,3	18,5	5,829	24	1,617
RV/TLC [%]	12	70,17	69,86	62,98	79,22	65,38	74,21	16,24	5,246	7	1,514
DLCO [%]	9	34,96	28,2	21,2	62,3	21,4	44	41,1	15,259	44	5,086
paO ₂ [mmHg]	16	58,17	53,9	51	88,6	52,5	58,95	37,6	10,196	18	2,549
paCO ₂ [mmHg]	16	46,37	45,25	34,9	55,5	42,5	52,7	20,6	6,285	14	1,571
saO ₂ [%]	16	90,78	89,55	85,4	98,3	88,9	92,5	12,9	3,378	4	0,844
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	12	232,92	232,5	60	375	160	307,5	315	99,212	43	28,640
BMI [kg/m ²]	16	28,14	27,1	16,5	44,1	22,05	32,4	27,6	7,975	28	1,994
stopień MMRC [0-4]	16	2,94	3	2	4	3	3	2	0,574	20	0,143
skala BODE [punkty 0-10]	12	6,25	6,5	3	9	5	7,5	6	1,765	28	0,509
komórki nienabłonkowe [%]	15	66,73	73	43	87	52	80	44	15,841	24	4,090
granulocyty [%]	15	63,33	70	32	84	49	77	52	16,625	26	4,292
limfocyty [%]	15	2,20	1	0	12	0	2	12	3,234	147	0,835
makrofagi [%]	15	8,53	8	1	21	6	13	20	5,423	64	1,400
komórki apoptotyczne [%]	15	19,08	13	0,4	72	3	30	71,6	21,989	115	5,677
stężenie sFasL [pg/ml]	11	6,41	1,5	0	23,5	0	15	23,5	8,543	133	2,576
CRP [mg/l]	15	6,18	2,87	0,79	28	2	8,1	27,21	7,281	118	1,880

Tabela 5. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP wydolnych oddechowo

wydolni oddechowo	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	37	64,24	63	42	79	60	71	37	8,264	13	1,359
liczba paczkołat	37	36,89	35	10	65	30	45	55	12,602	34	2,072
FEV1 [%]	37	53,79	51,3	15,3	98	41,4	66,3	82,7	17,232	32	2,833
FVC [%]	37	69,54	68,9	31,7	115,4	62,6	80,1	83,7	15,869	23	2,609
FEV1/FVC [%]	37	59,83	63,2	36,3	69,4	55,1	68,3	33,1	10,033	17	1,649
RV [%]	32	182,48	175,15	97,8	301	146,05	209,2	203,2	55,785	31	9,861
TLC [%]	32	115,44	113,95	80,4	176,7	101,65	127,65	96,3	19,629	17	3,470
IC/TLC [%]	31	34,07	35	18,8	49,8	27,5	39,5	31	8,414	25	1,511
RV/TLC [%]	31	60,18	61,5	42,15	76,89	51,67	66,71	34,74	9,452	16	1,698
DLCO [%]	30	55,27	58,15	16,1	85,3	43,2	65,4	69,2	16,986	31	3,101
paO ₂ [mmHg]	37	67,29	66,2	60	88,6	63,1	69,6	28,6	5,915	9	0,972
paCO ₂ [mmHg]	37	39,35	40,2	27,5	53,2	36,8	41,6	25,7	4,692	12	0,771
saO ₂ [%]	37	94,95	95,2	91,1	98,7	93,9	96,1	7,6	1,900	2	0,312
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	36	376,81	420	60	570	315	450	510	125,329	33	20,888
BMI [kg/m ²]	37	26,00	26,7	16,5	37,6	23	28,4	21,1	4,513	17	0,742
stopień MMRC [0-4]	37	1,65	2	0	3	1	2	3	0,824	50	0,135
skala BODE [punkty 0-10]	36	2,53	3	0	9	0	4	9	2,324	92	0,387
komórki nienabłonkowe [%]	37	62,92	64	21	91	51	78	70	18,983	30	3,121
granulocyty [%]	37	45,41	44	0	95	26	65	95	25,308	56	4,161
limfocyty [%]	37	4,04	2	0	21	1	5	21	4,773	118	0,785
makrofagi [%]	37	18,09	8	0	88	3	25	88	22,226	123	3,654
komórki apoptotyczne [%]	37	11,57	5	0	51	1	17	51	14,315	124	2,353
stężenie sFasL [pg/ml]	27	9,69	0	0	51	0	16,5	51	14,235	147	2,740
CRP [mg/l]	33	3,62	3,18	0,5	9,05	1,88	4,29	8,55	2,297	63	0,400

Tabela 6. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP niewydolnych oddechowo

niewydolni oddechowo	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
wiek [lata]	20	66,95	65	57	79	59,5	74	22	7,487	11	1,674
liczba paczkołat	20	40,75	42,5	10	80	30	55	70	19,553	48	4,372
FEV1 [%]	19	35,79	33,1	21,3	63,5	27,9	44,6	42,2	10,676	30	2,449
FVC [%]	19	53,46	53,5	27,9	94,4	41,7	62,8	66,5	14,598	27	3,349
FEV1/FVC [%]	19	53,30	53,77	33,9	74,8	47,7	60,4	40,9	11,351	21	2,604
RV [%]	15	226,15	204,2	154,7	362,9	178,9	272	208,2	57,403	25	14,821
TLC [%]	15	124,15	127	97	154,9	108,6	142	57,9	17,789	14	4,593
IC/TLC [%]	18	25,19	26,05	10,1	36,5	20,1	30,3	26,4	6,623	26	1,561
RV/TLC [%]	17	68,86	67,86	60,94	79,22	65,28	72,72	18,28	5,248	8	1,273
DLCO [%]	14	37,26	34,9	17,7	77,5	21,4	44	59,8	17,521	47	4,683
paO ₂ [mmHg]	20	56,01	53,95	51	74,3	52,85	58,85	23,3	5,268	9	1,178
paCO ₂ [mmHg]	20	45,52	45	34,2	55,5	42,95	49,75	21,3	5,954	13	1,331
saO ₂ [%]	20	91,12	90,15	85,4	99,5	89,2	93,4	14,1	3,260	4	0,729
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	15	263,33	255	120	465	165	315	345	98,736	37	25,494
BMI [kg/m ²]	20	28,29	26,1	19,4	44,1	22,05	32,4	24,7	7,664	27	1,714
stopień MMRC [0-4]	20	2,90	3	2	4	3	3	2	0,553	19	0,124
skala BODE [punkty 0-10]	15	5,60	6	2	8	4	7	6	1,765	32	0,456
komórki nienabłonkowe [%]	19	66,87	72	32	87	52	80	55	16,755	25	3,844
granulocyty [%]	19	54,05	63	10	77	32	72	67	22,501	42	5,162
limfocyty [%]	19	2,83	2	0	12	1	4	12	2,892	102	0,663
makrofagi [%]	19	14,32	12	1	69	7	19	68	14,663	102	3,364
komórki apoptotyczne [%]	19	20,87	13	3	72	3,8	40	69	21,760	104	4,992
stężenie sFasL [pg/ml]	16	7,47	2,25	0	23,5	0	15	23,5	8,457	113	2,114
CRP [mg/l]	20	5,32	2,535	0,5	28	1,45	7,18	27,5	6,623	124	1,481

Tabela 7. Statystyki opisowe dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach

	N	x	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Rozstęp	SD	V	SE
Płeć: mężczyźni											
komórki apoptotyczne [%]	38	12,81	5,75	0	59	3	15,8	59	16,035	125	2,601
stężenie sFasL [pg/ml]	28	8,11	0,759	0	38,5	0	15	38,5	11,652	144	2,202
Płeć: kobiety											
komórki apoptotyczne [%]	18	18,77	12,5	1	72	3,8	31	71	20,351	108	4,797
stężenie sFasL [pg/ml]	15	10,27	7,5	0	51	0	16,5	51	13,834	135	3,572
Wiek: 40-65rż											
komórki apoptotyczne [%]	33	16,26	7	0	72	3	23	72	18,096	111	3,150
stężenie sFasL [pg/ml]	14	17,21	13	1,5	51	7,5	23,5	49,5	15,121	88	4,041
Wiek: 65-80rż											
komórki apoptotyczne [%]	23	12,53	6	0,1	59	3	13	58,9	16,948	135	3,534
stężenie sFasL [pg/ml]	9	15,56	15	0,018	29,5	15	16,5	29,482	7,646	49	2,549
IC/TLC>25											
komórki apoptotyczne [%]	37	15,68	6	0	72	3	23	72	18,448	118	3,033
stężenie sFasL [pg/ml]	15	16,50	15	1,5	38,5	9	20	37	10,448	63	2,698
IC/TLC≤25											
komórki apoptotyczne [%]	12	12,96	4,5	0,1	59	3	14	58,9	18,171	140	5,246
stężenie sFasL [pg/ml]	5	11,70	11	0,018	29,5	3	15	29,482	11,623	99	5,198
BMI>25											
komórki apoptotyczne [%]	31	12,99	5,5	0	53	1	17	53	15,915	123	2,858
stężenie sFasL [pg/ml]	16	15,00	15	0,018	38,5	8,25	18,25	38,482	10,769	72	2,692
BMI≤25											
komórki apoptotyczne [%]	25	16,88	8	1	72	3	20	71	19,556	115	3,911
stężenie sFasL [pg/ml]	7	20,14	16,5	1,5	51	7,5	29,5	49,5	16,262	80	6,147

Tabela 8. Statystyki opisowe dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach

	N	x	Me	Min	Max	Q₁	Q₃	Rozstęp	SD	V	SE
dystans 6MWT<350											
komórki apoptotyczne [%]	23	14,94	6	0	72	3	18	72	19,304	129	4,025
stężenie sFasL [pg/ml]	16	7,88	2	0	24	0	16	24	8,909	113	2,227
dystans 6MWT≥350											
komórki apoptotyczne [%]	27	15,66	8	0,4	53	1	31	52,6	16,984	108	3,269
stężenie sFasL [pg/ml]	22	10,68	0	0	51	0	16,5	51	15,266	143	3,255
BODE 0-2											
komórki apoptotyczne [%]	18	18,39	11,5	1	51	1	38	50	18,286	99	4,310
stężenie sFasL [pg/ml]	15	9,40	0	0	51	0	15	51	15,857	169	4,094
BODE 3-4											
komórki apoptotyczne [%]	15	11,73	6	0,4	53	3	16	52,6	13,943	119	3,600
stężenie sFasL [pg/ml]	10	10,90	6,25	0	35,5	0	16,5	35,5	13,316	122	4,211
BODE 5-6											
komórki apoptotyczne [%]	11	11,63	3,8	0	72	1	15	72	21,022	181	6,338
stężenie sFasL [pg/ml]	8	6,81	2,25	0	20	0,009	15	20	8,364	123	2,957
BODE 7-10											
komórki apoptotyczne [%]	12	15,82	5,5	3	59	3	24	56	18,255	115	5,270
stężenie sFasL [pg/ml]	10	7,65	4,5	0	23,5	0	16,5	23,5	8,762	115	2,771

Tabela 9. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów dla ogółu badanych

Ogół badanych	N	W	p
wiek [lata]	57	0,96	0,0672
liczba paczkiolat	57	0,96	0,0949
FEV1 [%]	56	0,96	0,0864
RV [%]	47	0,97	0,1855
TLC [%]	47	0,97	0,1942
IC/TLC [%]	49	0,99	0,8134
RV/TLC [%]	48	0,96	0,0653
DLCO [%]	44	0,97	0,2228
paO2 [mmHg]	57	0,96	0,0861
paCO2 [mmHg]	57	0,98	0,4405
saO2 [%]	57	0,97	0,1839
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	51	0,97	0,2302
BMI [kg/m ²]	57	0,93	0,0022
stopień MMRC [0-4]	57	0,89	0,0001
skala BODE [punkty 0-10]	51	0,94	0,0089
komórki nienablonkowe [%]	56	0,95	0,0293
granulocyty [%]	56	0,96	0,0835
limfocyty [%]	56	0,72	0,0000
makrofagi [%]	56	0,73	0,0000
komórki apoptotyczne [%]	56	0,78	0,0000
stężenie sFasL [pg/ml]	43	0,75	0,0000

Tabela 10. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów w grupach GOLD

Parametry	stopnie wg GOLD=I+II			stopnie wg GOLD=III			stopnie wg GOLD=IV		
	N	W	p	N	W	p	N	W	p
wiek [lata]	22	0,95	0,2976	19	0,93	0,1663	16	0,90	0,0918
FEV1 [%]	22	0,96	0,5276	19	0,96	0,4791	15	0,96	0,6202
RV [%]	20	0,95	0,4280	16	0,89	0,0522	11	0,94	0,5485
FEV1/FVC [%]	22	0,73	0,0000	19	0,91	0,0725	15	0,94	0,4354
TLC [%]	20	0,96	0,5565	16	0,89	0,0485	11	0,93	0,3960
DLCO [%]	19	0,98	0,9312	16	0,96	0,5835	9	0,85	0,0706
RV/TLC [%]	18	0,98	0,8853	18	0,90	0,0480	12	0,95	0,6402
IC/TLC [%]	18	0,96	0,6100	18	0,93	0,2306	13	0,94	0,4487
BMI [kg/m ²]	22	0,92	0,0764	19	0,92	0,1319	16	0,93	0,2789
saO ₂ [%]	22	0,98	0,8253	19	0,96	0,6289	16	0,89	0,0535
paO ₂ [mmHg]	22	0,96	0,5042	19	0,94	0,3091	16	0,69	0,0001
paCO ₂ [mmHg]	22	0,96	0,4694	19	0,97	0,7991	16	0,94	0,2930
skala BODE [punkty 0-10]	22	0,80	0,0006	17	0,92	0,1547	12	0,97	0,8929
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	22	0,94	0,2403	17	0,97	0,8588	12	0,96	0,7838
liczba paczkołat	22	0,97	0,7592	19	0,94	0,2667	16	0,91	0,0970
stopień MMRC [0-4]	22	0,79	0,0004	19	0,75	0,0002	16	0,75	0,0006
komórki apoptotyczne [%]	22	0,82	0,0009	19	0,64	0,0000	15	0,79	0,0026
stężenie sFasL [pg/ml]	17	0,57	0,0000	15	0,89	0,0765	11	0,77	0,0046
komórki nienabłonkowe [%]	22	0,96	0,5447	19	0,95	0,4007	15	0,89	0,0647
granulocyty [%]	22	0,96	0,4913	19	0,93	0,2090	15	0,85	0,0197
limfocyty [%]	22	0,67	0,0000	19	0,92	0,1096	15	0,66	0,0001
makrofagi [%]	22	0,81	0,0007	19	0,76	0,0003	15	0,94	0,4005

Tabela 11. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów w grupach chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo

Parametry	niewydolni oddechowo			wydolni oddechowo		
	N	W	p	N	W	p
wiek [lata]	20	0,90	0,0429	37	0,97	0,4130
FEV1 [%]	19	0,92	0,1277	37	0,97	0,4928
FEV1/FVC [%]	19	0,97	0,8307	37	0,84	0,0001
RV [%]	15	0,92	0,2157	32	0,96	0,2494
TLC [%]	15	0,94	0,3288	32	0,95	0,1423
DLCO [%]	14	0,90	0,1015	30	0,97	0,6477
RV/TLC [%]	17	0,97	0,8212	31	0,97	0,4431
IC/TLC [%]	18	0,98	0,9653	31	0,98	0,6780
BMI [kg/m ²]	20	0,90	0,0350	37	0,96	0,1463
saO ₂ [%]	20	0,93	0,1574	37	0,98	0,7928
paO ₂ [mmHg]	20	0,76	0,0002	37	0,89	0,0013
paCO ₂ [mmHg]	20	0,96	0,5175	37	0,97	0,2990
skala BODE [punkty 0-10]	15	0,94	0,4297	36	0,89	0,0015
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	15	0,95	0,6005	36	0,93	0,0271
liczba paczkołat	20	0,94	0,2573	37	0,97	0,3511
stopień MMRC [0-4]	20	0,73	0,0001	37	0,87	0,0004
komórki apoptotyczne [%]	19	0,81	0,0015	37	0,77	0,0000
stężenie sFasL [pg/ml]	16	0,81	0,0042	27	0,74	0,0000
komórki nienabłonkowe [%]	19	0,92	0,1388	37	0,96	0,2087
granulocyty [%]	19	0,97	0,0175	37	0,97	0,3468
limfocyty [%]	19	0,79	0,0009	37	0,72	0,0000
makrofagi [%]	19	0,65	0,0000	37	0,75	0,0000

Tabela 12. Test normalności Shapiro-Wilka dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach

Płeć	mężczyzna			kobieta		
	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	38	0,75	0,0000	18	0,84	0,0054
stężenie sFasL [pg/ml]	28	0,74	0,0000	15	0,75	0,0001

Wiek	40-65 rż.			65-80 rż.		
	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	33	0,82	0,0001	23	0,69	0,0000
stężenie sFasL [pg/ml]	26	0,72	0,0000	17	0,78	0,0011

BMI	BMI>25			BMI≤25		
	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	31	0,78	0,0000	25	0,78	0,0001
stężenie sFasL [pg/ml]	26	0,81	0,0002	17	0,67	0,0001

IC/TLC	IC/TLC>25			IC/TLC≤25		
	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	37	0,80	0,0000	12	0,70	0,0009
stężenie sFasL [pg/ml]	30	0,76	0,0000	7	0,81	0,0561

dystans 6MWT	dystans 6MWT<300			dystans 6MWT≥300		
	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	23	0,73	0,0000	27	0,82	0,0004
stężenie sFasL [pg/ml]	16	0,78	0,0014	22	0,75	0,0001

BODE	BODE 0-2			BODE 3-4			BODE 5-6			BODE 7-10		
	N	W	p	N	W	p	N	W	p	N	W	p
komórki apoptotyczne [%]	18	0,84	0,0055	15	0,74	0,0007	11	0,59	0,0000	12	0,76	0,0034
stężenie sFasL [pg/ml]	15	0,67	0,0001	10	0,81	0,0191	8	0,78	0,0178	10	0,84	0,0397

Tabela 13. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) między grupami GOLD

	F	p
wiek [lata]	1,15	0,3234
FEV1 [%]	3,91	0,0262
FVC [%]	0,47	0,6305
RV [%]	0,13	0,8783
TLC [%]	0,01	0,9940
DLCO [%]	1,80	0,1778
saO2 [%]	3,12	0,0523
paO2 [mmHg]	1,71	0,1913
paCO2 [mmHg]	4,68	0,0134
liczba paczkołat	0,67	0,5162
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	2,56	0,0878
skala BODE [punkty 0-10]	0,30	0,7449
stopień MMRC [0-4]	1,77	0,1803
komórki nienablonkowe [%]	2,28	0,1125
granulocyty [%]	12,00	0,0001
limfocyty [%]	2,72	0,0750
makrofagi [%]	7,20	0,0017
komórki apoptotyczne [%]	4,60	0,0144
stężenie sFasL [pg/ml]	3,51	0,0494
RV/TLC [%]	1,31	0,2810
BMI [kg/m ²]	2,78	0,0710
IC/TLC [%]	0,44	0,6462

Tabela 14. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) między grupami wydolni/niewydolni oddechowo

	F	p
wiek [lata]	0,03	0,8691
FEV1 [%]	5,73	0,0202
FEV1/FVC [%]	0,08	0,7797
FVC [%]	0,26	0,6121
RV [%]	0,03	0,8601
TLC [%]	0,02	0,8897
DLCO [%]	0,04	0,8481
saO2 [%]	6,67	0,0125
paO2 [mmHg]	0,57	0,4545
paCO2 [mmHg]	1,46	0,2314
liczba paczkołat	5,58	0,0218
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	0,62	0,4347
skala BODE [punkty 0-10]	1,57	0,2165
stopień MMRC [0-4]	7,59	0,0079
komórki nienabłonkowe [%]	0,22	0,6407
granulocyty [%]	0,99	0,3238
limfocyty [%]	2,69	0,1068
makrofagi [%]	4,36	0,0415
komórki apoptotyczne [%]	5,51	0,0227
stężenie sFasL [pg/ml]	3,21	0,0877
RV/TLC [%]	5,47	0,0238
BMI [kg/m ²]	8,76	0,0045
IC/TLC [%]	1,19	0,2806

Tabela 15. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] między wybranymi grupami

	F	wartość p
pleć		
komórki apoptotyczne [%]	1,37	0,2470
stężenie sFasL [pg/ml]	0,06	0,8097
wiek		
komórki apoptotyczne [%]	0,40	0,5283
stężenie sFasL [pg/ml]	4,62	0,0434
IC/TLC		
komórki apoptotyczne [%]	0,70	0,4062
stężenie sFasL [pg/ml]	1,06	0,3147
BMI		
komórki apoptotyczne [%]	0,30	0,5847
stężenie sFasL [pg/ml]	0,09	0,7667
dystans 6MWT		
komórki apoptotyczne [%]	0,02	0,8926
stężenie sFasL [pg/ml]	2,73	0,1074
BODE (0-2, 3-4, 5-6, 7-10)		
komórki apoptotyczne [%]	0,65	0,5868
stężenie sFasL [pg/ml]	1,03	0,3901

Tabela 16. Analiza wariancji ANOVA i test post-hoc HSD Tukeya między stopniami wg GOLD (I+II, III, IV) dla parametrów spełniających warunek normalności i jednorodności wariancji

Parametry	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	test F	wartość p
wiek [lata]	98,79	2	49,40	3520,09	54	65,19	0,76	0,4736
IC/TLC [%]	1597,00	2	798,50	2171,84	46	47,21	16,91	0,0000
IC/TLC [%] post-hoc; test HSD Tukeya								
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=15)			wartość p					
I+II vs III			0,0004					
I+II vs IV			0,0001					
III vs IV			0,3631					
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	test F	wartość p
BMI [kg/m ²]	39,71	2	19,85	1877,71	54	34,77	0,57	0,5684
liczba paczkołat	209,43	2	104,71	12965,13	54	240,10	0,44	0,6488
komórki nienabłonkowe [%]	871,61	2	435,80	17349,89	53	327,36	1,33	0,2728

Tabela 17. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa i test post-hoc dla porównań wielokrotnych między stopniami wg GOLD (I+II,III, IV) dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji

FEV1 [%] $H_{2,56} = 36,17$ $p = 0,0000$				
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>				
Stopnie	wg	GOLD	test z	wartość p
I+II (n=22), III (n=19), IV (n=15)				
I+II vs III			3,7979	0,0004
I+II vs IV			5,8479	0,0000
III vs IV			2,2255	0,0781
RV [%] $H_{2,47} = 13,93$ $p = 0,0009$				
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>				
Stopnie	wg	GOLD	test z	wartość p
I+II (n=20), III (n=16), IV (n=11)				
I+II vs III			1,8048	0,2133
I+II vs IV			3,7145	0,0006
III vs IV			2,0144	0,1319
TLC [%] $H_{2,47} = 4,45$ $p = 0,1080$				
RV/TLC [%] $H_{2,47} = 20,21$ $p = 0,0000$				
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>				
Stopnie	wg	GOLD	test z	wartość p
I+II (n=20), III (n=16), IV (n=11)				
I+II vs III			3,1905	0,0043
I+II vs IV			4,2592	0,0001
III vs IV			1,4055	0,4796
DLCO [%] $H_{2,44} = 18,92$ $p = 0,0001$				
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>				
Stopnie	wg	GOLD	test z	wartość p
I+II (n=19), III (n=16), IV (n=9)				
I+II vs III			3,57	0,0011
I+II vs IV			3,67	0,0007
III vs IV			0,65	1,0000
dystans w teście 6-cio min. chodu [m] $H_{2,51} = 21,59$ $p = 0,0000$				
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>				
Stopnie	wg	GOLD	test z	wartość p
I+II (n=22), III (n=17), IV (n=12)				
I+II vs III			3,09	0,0060
I+II vs IV			4,39	0,0000
III vs IV			1,53	0,3780

Tabela 18. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa i test post-hoc dla porównań wielokrotnych między stopniami wg GOLD (I+II,III, IV) dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji

paO2 [mmHg] $H_{2,57} = 15,06$ $p = 0,0005$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=16)	test z	Wartość p
I+II vs III	1,01	0,9442
I+II vs IV	3,81	0,0004
III vs IV	2,76	0,0175
paCO2 [mmHg] $H_{2,57} = 13,19$ $p = 0,0014$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=16)	test z	wartość p
I+II vs III	0,26	1,0000
I+II vs IV	3,36	0,0023
III vs IV	3,02	0,0076
saO2 [%] $H_{2,57} = 16,49$ $p = 0,0003$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=16)	test z	wartość p
I+II vs III	1,25	0,6330
I+II vs IV	4,02	0,0002
III vs IV	2,74	0,0187
skala BODE [punkty 0-10] $H_{2,56} = 32,52$ $p = 0,0000$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=15)	test z	wartość p
I+II vs III	3,94	0,0002
I+II vs IV	5,86	0,0000
III vs IV	2,04	0,1250
stopień MMRC [0-4] $H_{2,57} = 33,85$ $p = 0,0000$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=16)	test z	wartość p
I+II vs III	3,67	0,0007
I+II vs IV	5,33	0,0000
III vs IV	1,78	0,2265
granulocyty [%] $H_{2,56} = 8,45$ $p = 0,0146$		
<i>post-hoc; test dla porównań wielokrotnych</i>		
Stopnie wg GOLD I+II (n=22), III (n=19), IV (n=16)	test z	wartość p
I+II vs III	0,73	1,0000
I+II vs IV	2,85	0,0131
III vs IV	2,10	0,1065
limfocyty [%] $H_{2,56} = 5,86$ $p = 0,0534$		
makrofagi [%] $H_{2,56} = 2,81$ $p = 0,2456$		
komórki apoptotyczne [%] $H_{2,56} = 1,09$ $p = 0,5806$		
stężenie sFasL [pg/ml] $H_{2,43} = 5,47$ $p = 0,0647$		

Tabela 19. Test t-studenta istotności różnic między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo dla parametrów spełniających warunek normalności i jednorodności wariancji

	Test t-Studenta	df	p	N niewydolni oddechowo	N wydolni oddechowo
komórki nienabłonkowe [%]	0,77	54	0,4471	19	37
FVC [%]	-3,69	54	0,0005	19	37
RV [%]	2,48	45	0,0170	15	32
TLC [%]	1,46	45	0,1518	15	32
DLCO [%]	-3,24	42	0,0023	14	30
paCO ₂ [mmHg]	4,30	55	0,0001	20	37
IC/TLC [%]	-3,84	47	0,0004	18	31

Tabela 20. Test U Manna-Whitneya istotności różnic między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji

Parametry	Sum.rang niewydolni oddechowo	Sum.rang wydolni oddechowo	Test Z	wartość p	N niewydolni oddechowo	N wydolni oddechowo
wiek [lata]	643	1010	1,05	0,2960	20	37
FEV1 [%]	311,5	1284,5	-3,97	0,0001	19	37
FEV1/FVC [%]	409,0	1187,0	-2,28	0,0224	19	37
saO ₂ [%]	322	1331	-4,31	0,0000	20	37
paO ₂ [mmHg]	242	1411	-5,64	0,0000	20	37
skala BODE [punkty 0-10]	581	745	3,94	0,0001	15	36
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	242	1084	-3,05	0,0023	15	36
liczba paczkołat	640,5	1012,5	1,00	0,3157	20	37
stopień MMRC [0-4]	861	792	4,69	0,0000	20	37
komórki apoptotyczne [%]	658,5	937,5	2,02	0,0438	19	37
stężenie sFasL [pg/ml]	363,5	582,5	0,28	0,7822	16	27
BMI [kg/m ²]	625	1028	0,74	0,4568	20	37
RV/TLC [%]	564,5	611,5	3,18	0,0015	17	31
granulocyty [%]	611,5	984,5	1,2	0,2291	19	37
limfocyty [%]	495	1101	-0,80	0,4260	19	37
makrofagi [%]	560,5	1035,5	0,32	0,7489	19	37

Tabela 21. Test U Manna-Whitneya istotności różnic między wybranymi grupami dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml]

	Sum.rang	Sum.rang	Z	wartość p	N ₁	N ₂
pleć						
	mężczyzna	kobieta			mężczyzna	kobieta
komórki apoptotyczne [%]	1018	578	-1,13	0,2578	38	18
stężenie sFasL [pg/ml]	604	342	-0,29	0,7695	28	15
wiek						
	40-65 rż.	65-80 rż.	Z	p	40-65 rż.	65-80 rż.
komórki apoptotyczne [%]	973	623	0,53	0,5941	33	23
stężenie sFasL [pg/ml]	570	376	-0,04	0,9703	26	17
IC/TLC						
	>25	≤25	Z	p	>25	≥25
komórki apoptotyczne [%]	949	276	0,55	0,5848	37	12
stężenie sFasL [pg/ml]	559,5	143,5	-0,39	0,6982	30	7
BMI						
	>25	≤25	Z	p	>25	≤25
komórki apoptotyczne [%]	808,5	787,5	-1,23	0,2195	31	25
stężenie sFasL [pg/ml]	606	340	0,83	0,4053	26	17
dystans 6MWT						
	dystans 6MWT<350	dystans 6MWT≥350	Z	p	dystans 6MWT<350	dystans 6MWT≥350
komórki apoptotyczne [%]	582	693	-0,08	0,9379	23	27
stężenie sFasL [pg/ml]	323	418	0,31	0,7562	16	22

Tabela 22. Korelacja odsetka komórek apoptotycznych z wybranymi badanymi parametrami u ogółu chorych

komórki apoptotyczne [%]	N	R Spearman	t(N-2)	wartość p
wiek [lata]	56	-0,04	-0,26	0,7924
FEV1 [%]	55	0,02	0,13	0,8970
RV [%]	47	-0,19	-1,33	0,1891
TLC [%]	47	-0,03	-0,23	0,8190
DLCO [%]	44	0,02	0,16	0,8765
saO2 [%]	56	0,12	0,86	0,3933
paO2 [mmHg]	56	-0,07	-0,50	0,6184
paCO2 [mmHg]	56	0,27	2,10	0,0407
skala BODE [punkty 0-10]	50	-0,06	-0,38	0,7037
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	50	0,03	0,24	0,8093
liczba paczkołat	56	0,05	0,34	0,7341
stopień MMRC [0-4]	56	0,03	0,24	0,8125
IC/TLC [%]	49	-0,02	-0,11	0,9164
BMI [kg/m ²]	56	-0,20	-1,53	0,1312
RV/TLC [%]	48	-0,03	-0,20	0,8426

Tabela 23. Korelacja stężenia sFasL [pg/ml] z wybranymi badanymi parametrami u ogółu chorych

stężenie sFasL [pg/ml]	N	R Spearman	t(N-2)	wartość p
wiek [lata]	43	-0,13	-0,84	0,4071
FEV1 [%]	42	-0,04	-0,25	0,8020
RV [%]	36	0,05	0,27	0,7912
TLC [%]	36	0,09	0,53	0,5999
DLCO [%]	36	-0,22	-1,29	0,2067
saO2 [%]	43	0,11	0,69	0,4944
paO2 [mmHg]	43	0,12	0,77	0,4481
paCO2 [mmHg]	43	-0,04	-0,26	0,7978
skala BODE [punkty 0-10]	38	0,13	0,79	0,4346
dystans w teście 6-cio min. chodu [m]	38	-0,03	-0,18	0,8545
liczba paczolat	43	-0,26	-1,75	0,0868
stopień MMRC [0-4]	43	0,12	0,79	0,4350
IC/TLC [%]	37	-0,22	-1,32	0,1943
BMI [kg/m ²]	43	-0,05	-0,32	0,7480
RV/TLC [%]	37	0,19	1,14	0,2626

Tabela 24. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa między zakresami punktów w skali BODE (0-2, 3-4, 5-6, 7-10) dla parametrów odsetek komórek apoptotycznych i stężenie sFasL [pg/ml]

komórki apoptotyczne [%] $H_{3,56} = 2,15$ $p = 0,5417$
stężenie sFasL [pg/ml] $H_{3,43} = 4,25$ $p = 0,2361$

12. SPIS TABEL I RYCIN

Tabela 1. Zmodyfikowany kwestionariusz <i>Medical Research Council</i> dla oceny nasilenia duszności.....	9
Tabela 2. Spirometryczna klasyfikacja ciężkości POChP oparta na wartościach FEV1 po zastosowaniu leku rozkurczającego oskrzela.....	10
Tabela 3. Skala oceny stanu klinicznego BODE.....	16
Tabela 4. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oceny komórek w popłuczynach oskrzelowych.....	30
Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy badanej oraz podgrup I+II, III, IV ^o wg GOLD.....	37
Tabela 6. Ogólna charakterystyka grup chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo.....	38
Tabela 7. Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych u chorych na POChP w stopniu I+II, III i IV wg GOLD.....	40
Tabela 8. Skład komórkowy popłuczyn oskrzelowych u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo.....	40
Tabela 9. Wyniki analizy wariancji przeprowadzonej w obszarze zmiennych świadczących o zaawansowaniu choroby u chorych na POChP.....	52
Rycina 1. Immuno-fenotypowa ocena składu komórkowego popłuczyn oskrzelowych w oparciu o ekspresję CD45, CD14 i CD11b.....	39
Rycina 2. Ocena apoptozy komórek popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych w oparciu o wiązanie aneksyny V.....	41
Rycina 3. Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP w stopniu I+II, II i IV wg GOLD (p=ns).....	42
Rycina 4. Średni odsetek komórek apoptotycznych u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo.....	43
Rycina 5. Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP w stopniu I+II, II i IV wg GOLD (p=0,0647).....	46
Rycina 6. Średnie stężenie sFasL [pg/ml] u chorych na POChP wydolnych i niewydolnych oddechowo (p=ns).....	47

Rycina 7. Dendrogram przedstawiający powiązania pomiędzy zmiennymi tworzącymi skupienia chorych z mniej zaawansowaną POChP (skupienie 1) oraz z bardziej zaawansowaną POChP (skupienie 2).....	50
Rycina 8. Przedstawienie wartości średnich analizowanych parametrów w skupieniach chorych z mniej zaawansowaną POChP (skupienie 1) oraz z bardziej zaawansowaną POChP (skupienie 2).....	51
Rycina 9. Rozkład procentowy stopni w skali GOLD w skupieniach.....	53

ANEKS

Tabela 1. Statystyki opisowe badanych parametrów dla ogółu chorych.....	93
Tabela 2. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w I-II stopniu wg GOLD.....	94
Tabela 3. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w III stopniu wg GOLD.....	95
Tabela 4. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP w IV stopniu wg GOLD.....	96
Tabela 5. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP wydolnych oddechowo.....	97
Tabela 6. Statystyki opisowe badanych parametrów dla chorych na POChP niewydolnych oddechowo.....	98
Tabela 7. Statystyki opisowe dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach.....	99
Tabela 8. Statystyki opisowe dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach.....	100
Tabela 9. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów dla ogółu badanych.....	101
Tabela 10. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów w grupach GOLD.....	102
Tabela 11. Test normalności Shapiro-Wilka badanych parametrów w grupach chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo.....	103
Tabela 12. Test normalności Shapiro-Wilka dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] w wybranych grupach.....	104
Tabela 13. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) między grupami GOLD.....	105

Tabela 14. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) między grupami wydolni/niewydolni oddechowo.....	106
Tabela 15. Jednorodność wariancji (Test Levene'a) dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml] między wybranymi grupami...	107
Tabela 16. Analiza wariancji ANOVA i test post-hoc HSD Tukeya między stopniami wg GOLD (I+II, III, IV) dla parametrów spełniających warunek normalności i jednorodności wariancji.....	108
Tabela 17. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa i test post-hoc dla porównań wielokrotnych między stopniami wg GOLD (I+II,III, IV) dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji.....	109
Tabela 18. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa i test post-hoc dla porównań wielokrotnych między stopniami wg GOLD (I+II,III, IV) dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji.....	110
Tabela 19. Test t-studenta istotności różnic między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo dla parametrów spełniających warunek normalności i jednorodności wariancji.....	111
Tabela 20. Test U Manna-Whitneya istotności różnic między grupami chorych wydolnych i niewydolnych oddechowo dla parametrów nie spełniających warunku normalności lub jednorodności wariancji.....	111
Tabela 21. Test U Manna-Whitneya istotności różnic między wybranymi grupami dla parametrów komórki apoptotyczne [%] i stężenie sFasL [pg/ml].....	112
Tabela 22. Korelacja odsetka komórek apoptotycznych z wybranymi badanymi parametrami u ogółu chorych.....	113
Tabela 23. Korelacja stężenia sFasL [pg/ml] z wybranymi badanymi parametrami u ogółu chorych.....	114
Tabela 24. Analiza wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa między zakresami punktów w skali BODE (0-2, 3-4, 5-6, 7-10) dla parametrów odsetek komórek apoptotycznych i stężenie sFasL.....	114

