Razina eritropoetina, angiogenetskih faktora i upalnih citokina u sermu prije i nakon korekcije teške hipoksemije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća

Pavliša, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

2006

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:705192

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Pavliša

Razina eritropoetina, angiogenetskih faktora i upalnih citokina u serumu prije i nakon korekcije teške hipoksemije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti, Zagreb, Rockefellerova 3. i Odjelu za kliničku kemiju, KBC Rebro, Zagreb, Kišpatićeva 12.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Branimir Jakšić

ZAHVALA:
Iskreno zahvaljujem voditelju rada prof.dr.sc. Branimiru Jakšiću na savjetima, uputama i svesrdnoj podršci u svim fazama izrade rada.

Zahvaljujem dr. Veljku Vrbaniću, ravnatelju Specijalne bolnice za plućne bolesti, na podršci pri izradi rada.

Zahvaljujem obitelji na strpljivosti i razumijevanju.

POPIS KRATICA

A – adenozin

a-FGF – kiseli faktor rasta fibroblasta (engl. acidic fibroblast growth factor)

AKB - anemija kronične bolesti

AKT - anti-apoptotska kinaza

ALT – alanin–aminotransferaza

AST – aspartat – aminotransferaza

bcl-2 – onkogen bcl-2

bcl-XL – onkogen bcl - XL

b-FGF - bazični faktor rasta fibroblasta (engl. basic fibroblast growth factor)

Bil – bilirubin

C - citidin

Ca^{2+} - ion kalcija

CAD - C-terminalna aktivacijska domena

CD – sustav klasifikacije leukocitnih diferencijacijskih antigena (engl. Cluster of defferentiation)

CO_2 **-** ugljični dioksid

CPAP - ventilacije s pozitivnim tlakom

CV - koeficijent varijabilnosti

DAG - diacilglicerol

DLO_2 - dugotrajno liječenje kisikom

DNA – dezoksiribonukleinska kiselina

E – eritrociti

EGF – faktor rasta epidermisa (engl. epidermal growth factor)

eNOS – endotelna sintaza dušićnog oksida (engl. endothelial nitric oxide synthase)

EPO - eritropoetin

EPO-R – eritropoetinski receptor

ET-1 – endotelin 1

FEV_1 – forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi

FIH - faktor inhibicije hipoksijom induciranog faktora 1

FRC – funkcionalni rezidualni kapacitet

FVC – forsirani vitalni kapacitet

G - gvanozin

g/L – gram po litri

G-CSF – granulocitni faktor rasta (engl. granulocyte colony-stimulating factor)

GGT – gamaglutamil – transpeptidaza

GS - geometrijska sredina

Hb – hemoglobin

Hct – hematokrit

HIF-1 - hipoksijom inducirani faktor-1

HIF-α - hipoksijom inducirani faktor - alfa

HIF-β - hipoksijom inducirani faktor - beta

HGF – hepatocitni faktor rasta (eng. hepatocyte growth factor)

HRE - element odgovora na hipoksiju

ICAM-1 – unutarstanična adhezijska molekula -1 (eng. intercellular adhesion molecule-1)

IGF-I – inzulinu sličan faktor rasta (engl. insulin like growth factor)

IL-1β – interleukin – 1 beta

IL-6 – interleukin 6

IL-8 – interleukin – 8

INF-γ - interferona-γ

IP3 - inozitol trifosfat

IRES - unutarnje ribosomsko ulazno mjesto (engl.internal ribosome entry site)

JAK2 - Janus kinaza

kDa - kilodalton

KDR - transmembranski tirozin kinazni receptor

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

L – leukociti

MAKS – maksimalna vrijednost

MAPK- MAP kinaza

MCH – srednja količina hemoglobina u eritrocitu

MCP-1 – monocitni kemotaktični protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)

MCV – srednji volumen eritrocita

MED - medijan

MIN – minimalna vrijednost

ml - mililitar

mmHg - milimetri stupca žive

mmol - milimol

MMP - matriks metaloproteinaza

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

NF-κB – jezgrin faktor kapa B (engl. nuclear factor kapa B)

NK stanice – stanice prirodne ubojice (engl. natural killer cells)

NO – dušićni oksid

NRP-1 - nekinazni VEGF receptor

O_2 - kisik

ODD - razgradna domena ovisna o kisiku (engl. oxygen-dependent degradation domain)

$PaCO_2$ – parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi

PaO_2 - parcijalni arterijski tlak kisika u arterijskoj krvi

PAS – para-amino-salicilna kiselina

PCK - fosfoenolpiruvatkarbokinaza

PDGF - faktor rasta porijeklom iz trombocita (engl. platelet-derived growth factor)

PGE_2 – prostaglandin E_2

PGF - faktor rasta placente (engl. placenta growth factor)

PGI_2 – prostaglandin I_2

PHD - prolil-hidroksilaza

PI3K – fosfatidilinozitol – 3 - kinaza

PLCγ – fosfolipaza C γ

Pro - prolil

Sat – saturacija hemoglobina kisikom

SD - standardna devijacija

SE – sedimentacija eritrocita u prvom satu

SG - standardna greška

STAT – prenosilac signala i aktivator transkripcije (engl. signal transducer and activator of transcription)

TACE - TNF-α-konvertirajući enzim

TGFα – transformirajući faktor rasta α (engl. transforming growth factor α)

TGFβ - transformirajući faktor rasta β (engl. transforming growth factor β)

TNF-α – faktor nekroze tumora - alfa

Tr – trombociti

TT – tjelesna težina

U – uridin

U/L – jedinice na litru

VEGF - faktor rasta endotela krvnih žila (engl. vascular endothelial growth factor)

VHL - von Hippel-Lindau tumor supresorni protein

VPF - faktor permeabilnosti krvnih žila (engl. vascular permeability factor)

X – aritmetička sredina

χ^2 - Hi – kvadrat test

µmol – mikromol

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Eritropoeza
Slika 1.2. Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja EPO za EPO-R
Slika 1.3. Regulacija HIF
Slika 1.4: Višestruki učinak aktivacije HIF-1 molekule hipoksijom
Slika 1.5. Fiziološka aktivacija eritropoeze u hipoksiji
Slika 1.6. Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja VEGF-a za receptor
Slika 1.7. Regulacija ekspresije VEGF-a hipoksijom
Slika 1.8. Lokalni i sistemski učinci citokina
Slika 2.1.a. Model za istraživanje odnosa između hipoksije, faktora rasta i citokina
Slika 2.1.b. Model za istraživanje odnosa između faktora rasta i citokina nakon korekcije hipoksije

POPIS GRAFOVA

Graf 4.1. Histogram raspodjele EPO i njegove logaritamske transformacije
Graf 4.2. Histogram raspodjele VEGF i njegove logaritamske transformacije
Graf 4.3. Histogram raspodjele b FGF i njegove logaritamske transformacije
Graf 4.4. Povezanost log EPO 1 s odabranim varijablama
Graf 4.5. Povezanost log VEGF 1 s odabranim varijablama
Graf 4.6. Povezanost log b FGF 1 s log IL-1β 1
Graf 4.7. Povezanost log IL-1β 1 s odabranim varijablama
Graf 4.8. Povezanost log IL-6 1 s odabranim varijablama
Graf 4.9. Dinamika dišnih plinova i značajnost promjena
Graf 4.10. Dinamika eritrocita i hemoglobina i značajnost promjena
Graf 4.11. Dinamika trombocita i značajnost promjene
Graf 4.12. Dinamika EPO nakon početka liječenja i značajnost promjene
Graf 4.13. Dinamika EPO nakon korekcije hipoksemije prema grupama
Graf 4.14. Promjena VEGF i b FGF nakon početka liječenja i analiza značajnosti
Graf 4.15. Promjena IL-1β, IL-6 i TNF-α nakon početka liječenja i analiza značajnosti
Graf 4.16. Povazanost log EPO 2 s Hb 2
Graf 4.17. Povezanost log VEGF 2 s odabranim varijabama

Graf 4.18. Povezanost log b FGF 2 s log IL-1β 2
Graf 4.19. Povezanost log IL-1β 2 s log IL-6 2
Graf 4.20. Povezanost log IL-6 2 s log L 2

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Proangiogeni faktori (za objašnjenje vidi tekst)
Tablica 3.1. Raspored učinjenih laboratorijskih analiza
Tablica 4.1. Kliničke i demografske karakteristike ispitivane populacije i usporedba između muškaraca i žena
Tablica 4.2. Lijekovi korišteni prije prijema u bolnicu i započeta pri prijemu u bolnicu
Tablica 4.3. Respiracijske, hematološke i biokemijske karakteristike ispitivane populacije i usoredba između muškaraca i žena
Tablica 4.4. Opis faktora rasta
Tablica 4.5. Opis citokina
Tablica 4.6. Matrica korelacija svih istraživanih kontinuiranih varijabli
Tablica 4.7. Povezanost spola s parametrima crvene krvne slike, ispitivanim faktorima rasta i citokinima
Tablica 4.8. Povezanost podskupina varijable EPO s ostalim varijablama
Tablica 4.9. Povezanosti podskupina varijable VEGF s ostalim varijablama
Tablica 4.10. Stepwisse regresija s log EPO kao zavisnom varijablom
Tablica 4.11. Stepwisse regresija s log VEGF kao zavisnom varijablom
Tablica 4.12. Stepwisse regresija s log b-FGF kao zavisnom varijablom
Tablica 4.13. Stepwisse regresija s log IL-1β kao zavisnom varijablom
Tablica 4.14. Stepwisse regresija s log IL-6 kao zavisnom varijablom
Tablica 4.15. Stepwisse regresija s log TNF-α kao zavisnom varijablom
Tablica 4.16. Faktorska analiza
Tablica 4.17. Dinamika EPO
Tablica 4.18. Opis parametara VEGF i bFGF nakon početka liječenja
Tablica 4.19. Opis citokini nakon početka liječenja
Tablica 4.20. Povezanost DLO_2 s ostalim varijablama

SADRŽAJ

1. UVOD I POLAZIŠTA…….. 1
1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest……...….1
1.1.1. Definicija…….....…….1
1.1.2. Epidemiologija kronične opstruktivne plućne bolesti…….....1
1.1.3. Patogeneza kronične opstruktivne plućne bolesti……...….3
1.1.4. Patologija kronične opstruktivne plućne bolesti……..…5
1.1.5. Patofiziologija kronične opstruktivne plućne bolesti……...6
1.1.6. Poremećaj izmjene dišnih plinova……...7
1.1.7. Liječenje bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti…….....….8
1.1.7.1. Kontrolirana terapija kisikom u akutnom pogoršanju KOPB-a…….....…8
1.1.7.2. Dugotrajno liječenje kisikom……..….9
1.2. Eritropoeza…….....10
1.2.1. Eritropoetin……....10
1.2.2. Regulacija produkcije eritropoetina hipoksijom……....12
1.2.3. Fiziološki odnos eritropoeze i hipoksije…….....…13
1.2.4. Eritropoeza i respiracijska insuficijencija…….....……..16
1.2.5. Eritropoetin u KOPB pacijenata…….....18
1.3. Angiogeneza…….....19
1.3.1. Faktor rasta endotela krvnih žila…….....20
1.3.1.1. Regulacija ekspresije faktora rasta endotela krvnih žila hipoksijom….....24
1.3.1.2. Odnos faktora rasta endotela krvnih žila, kronične opstruktivne bolesti pluća i respiracijske insuficijencije…….....25
1.3.2. Bazični faktor rasta fibroblasta…….....25
1.3.2.1. Regulacija ekspresije bazičnog faktora rasta fibroblasta hipoksijom…….....27
1.3.2.2. Bazični faktor rasta fibroblasta u kliničkim modelima karakteriziranim hipoksijom…….....…27
1.4. Citokini…….....28
1.4.1. Interleukin-1β…….....….28

1.4.2. Interleukin-6…….....29
1.4.3. Faktor nekroze tumora-α…….....30
1.4.4. Citokini i hipoksija…….....…32
1.4.5. Citokini u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti……....33
1.4.6. Utjecaj citokina na eritropoezu…….....…34
1.4.7. Odnos citokina i eritropoetina……....35
1.4.8. Odnos citokina i faktora rasta krvnih žila…….....36
1.4.8.1. Odnos citokina i faktora rasta endotela krvnih žila……....36
1.4.8.2. Odnos citokina i bazičnog faktora rasta fibroblasta……...37
1.5. Hipoteza…….....37
1.6 Ciljevi.....38
2. HIPOTEZA …….....39
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE……...41
3.1. Ispitanici……...…….41
3.2. Plan rada…….....41
3.3. Laboratorijski testovi…….43
3.3.1. Analiza dišnih plinova, acidobaznog statusa…….....43
3.3.2. Analiza parametara krvne slike i biokemijskih parametara…….....43
3.3.3. Određivanje koncentracije eritropoetina u krvnom serumu……...44
3.3.4.Određivanje koncentracije VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α u krvnom serumu.44
3.3.5. Određivanje parametara plućne funkcije……...45
3.4. Etička načela…….....45
3.5. Statističke metode……..46
3.5.1. Opis varijabli……...……..46
3.5.2. Analiza povezanosti (univarijatna-bivarijatna)……..48
3.5.3. Neparametrijski testovi……..49
3.5.4. Multivarijatne metode……....50
4. REZULTATI……..……51
4.1. Kliničke i demografske karakteristike……...……51

INICIJALNI NALAZI.....54

4.2. Opis inicijalnih nalaza……54
4.2.1.Respiracijske, hematološke i biokemijske karakteristike……...54
4.2.2. Eritropoetin i angiogeni faktori rasta…….58
4.2.3. Citokini……..63
4.3. Analiza povezanosti inicijalnih nalaza (univarijatna-bivarijatna)…….…64
4.3.1. Matrica korelacija svih istraživanih kontinuiranih varijabli…… 64
4.3.2. Analiza korelacija faktora rasta i citokina s ostalim kontinuiranim varijablama...68
4.3.2.1. Analiza povezanosti log EPO 1 s drugim varijablama…….68
4.3.2.2. Analiza povezanosti log VEGF 1 s drugim varijablama……70
4.3.2.3. Analiza korelacija log bFGF 1 s drugim varijablama.....……...73
4.3.2.4. Analiza korelacija log IL-1β 1 s drugim varijablama…….....……...73
4.3.2.5. Analiza korelacija log IL-6 1 s drugim varijablama…… 75
4.3.2.6. Analiza povezanosti log TNF-α 1 s ostalim varijablama…….....78
4.3.3. Neparametrijski testovi……..78
4.3.3.1. Analiza povezanosti spola s parametrima crvene krvne slike, ispitivanim faktorima rasta i citokinima……...78
4.3.3.2. Analiza povezanosti ispitivanih faktora rasta i citokina s lijekovima korištenim prije prijema u bolnicu…….....78
4.3.3.3. Analiza povezanosti podskupina varijable EPO s ostalim varijablama….....79
4.3.3.4. Analiza povezanosti podskupina varijable VEGF s ostalim varijablama……..79
4.4. Multivarijatne analize…….....80
4.4.1. Stepwisse regresija……80
4.4.1.1. Stepwisse regresija s log EPO kao zavisnom varijablom……..80
4.4.1.2. Stepwisse regresija s log VEGF kao zavisnom varijablom……...81
4.4.1.3. Stepwisse regresija s log b-FGF kao zavisnom varijablom……...81
4.4.1.4. Stepwisse regresija s log IL-1β kao zavisnom varijablom……82
4.4.1.5. Stepwisse regresija s log IL-6 kao zavisnom varijablom……...82

4.4.1.6. Stepwisse regresija s log TNF-α kao zavisnom varijablom…….....83
4.4.2. Faktorska analiza…….....83
NALAZI NAKON POČETKA LIJEČENJA…….86
4.5. Dinamika dišnih plinova, parametara krvne slike, rutinskih biokemijskih nalaza i EPO nakon početka liječenja…….....86
4.5.1. Dinamika dišnih plinova i značajnost promjena……86
4.5.2. Dinamika parametara krvne slike i značajnost promjena…….....89
4.5.3. Dinamika rutinskih biokemijskih parametara i značajnost promjena……91
4.5.4. Dinamika EPO nakon početka liječenja i značajnost promjena……92
4.5.4.1. Dinamika EPO nakon korekcije hipoksemije prema grupama……..…93
4.5.4.2. Analiza povezanosti grupe pacijenata s različitim odgovorom EPO na korekciju hipoksemije s ostalim kontinuiranim varijablama……94
4.6. Angiogeni faktori rasta i citokini nakon početka liječenja……95
4.6.1. Opis parametara VEGF i bFGF nakon početka liječenja……...95
4.6.2. Grafički prikaz promjene VEGF i b FGF i analiza značajnost promjena nakon početka liječenja.....96
4.6.3. Opis parametara IL-1β, IL-6 i TNF-α nakon početka liječenja….....…….98
4.6.4. Grafički prikaz promjene IL-1β, IL-6 i TNF-α i analiza značajnost promjena nakon početka liječenja…….....99
4.7. Analiza povezanosti nalaza izmjerenih u drugoj točci (univarijatna-bivarijatna)...101
4.7.1. Analiza povezanosti log EPO 2 s ostalim kontinuiranim varijablama…….....101
4.7.2. Analiza povezanosti log VEGF 2 s ostalim kontinuiranim varijablama…….....101
4.7.3. Analiza povezanosti log bFGF 2 s ostalim kontinuiranim varijablama……...104
4.7.4. Analiza povezanosti log IL-1β 2 s ostalim kontinuiranim varijablama……...105
4.7.5. Analiza povezanosti log IL-6 2 s ostalim kontinuiranim varijablama……106
4.7.6. Analiza povezanosti log-TNF-α 2 s ostalim kontinuiranim varijablama…….....107
4.8. Neparametrijski testovi…….....107
4.8.1. Analiza povezanosti ispitivanih faktora rasta i citokina s lijekovima korištenim

tijekom bolničkog liječenja…….....107
4.9. Dugotrajno liječenje kisikom……...107
5. RASPRAVA……109
6. ZAKLJUČCI……146
7. SAŽETAK……...153
8. ABSTRACT……157
9.LITERATURA…….....161
10.ŽIVOTOPIS……182

1. UVOD, CILJ I SVRHA RADA

1.1. KRONIČNA OPSTRUKTIVNA PLUĆNA BOLEST

1.1.1. Definicija

Kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (KOPB) definiramo kao kroničnu upalu dišnih puteva i plućnog parenhima koja dovodi do suženja dišnih puteva i ograničenja protoka zraka koje je najčešće progresivno i nije u potpunosti reverzibilno na terapiju.

KOPB je karakterizirana varijabilnim kliničkim tijekom. Uglavnom je progresivnog tijeka, osobito u osoba koje su kontinuirano izložene štetnim faktorima. Ukoliko izloženost štetnim faktorima prestane, čak i ako je prisutan značajna opstrukcija dišnih puteva, može doći do djelomičnog poboljšanja plućne funkcije i usporenja napretka bolesti. Nasuprot tome, bolest može progredirati nakon prekida izlaganju štetnim čimbenicima što je posljedica procesa slabljenja plućne funkcije koji normalno nastaje s godinama (1,2).

1.1.2. Epidemiologija kronične opstruktivne plućne bolesti

KOPB spada među vodeće uzroke morbiditeta i mortaliteta u svijetu. Prevalencija, morbiditet i mortalitet ove bolesti uglavnom je direktno vezan s prevalencijom pušenja, najvažnijeg faktora rizika za razvoj KOPB-a. Iako epidemiološke studije ukazuju da je ova bolest važan javnozdravstveni problem, smatra se da su podaci o prevalenciji i morbiditetu značajno podcijenjeni zbog toga što se bolest uglavnom ne dijagnosticira dok ne postane klinički očita. Podaci o mortalitetu su također podcijenjeni jer se KOPB u izvješćima o smrti rijetko navodi kao glavni uzrok smrti, već se najčešće navodi kao dodatni faktor ili se uopće ne navodi (2).

Dostupne procjene o prevalenciji napravljene su na tri načina. One se mogu temeljiti na određivanju broja ljudi u populaciji koji imaju 1) respiratorne simptome ili 2) opstrukciju protoku zraka ili 3) na temelju udjela populacije kojima je dijagnosticiran kronični bronhitis odnosno emfizem. Svaki od ovih pristupa dovodi do različitih procjena. Procjene koje se temelje na prijavljivanju respiratornih simptoma (kroničnog kašlja, produkcije sputuma, kratkoće daha) obuhvaćaju ljude koji imaju rizik za razvoj KOPB-a kao i one s opstrukcijom dišnih puteva. Ovakve procjene rezultiraju maksimalnom

procjenom prevalencije. Velika anketa provedena između 1988. i 1994. u Sjedinjenim Američkim Državama temeljila se na odgovaranju na pitanja o respiratornim simptomima. Prevalencija respiratornih simptoma značajno je varirala ovisno o pušačkom statusu. Kronični je kašalj prijavilo oko 24 % muškaraca bijele rase s navikom pušenja, 4,7 % muškaraca koji su prestali pušiti i 4 % muškaraca koji nikad nisu pušili. Kronični kašlj prijavilo je 20,6 % žena bijele rase s navikom pušenja, 6,5 % žena koje su prestale pušiti i 5 % koje nikad nisu pušile. Prevalencija produkcije sputuma bila je slična prevalenciji kroničnog kašlja. U osoba bijele rase bila je nešto veća prevalencija respiratornih simptoma nego u osoba crne rase.

Respiratorni simptomi kao što su kašalj ili produkcija sputuma mogu biti prisutni mnogo prije razvoja bronhalne opstrukcije. Zbog toga, podaci koji se temelje na prisutnosti bronhalne opstrukcije daju točniji uvid u prevalenciju KOPB-a koja je klinički značajan. U navedenoj studiji prevalencija opstrukcije dišnih puteva bila je niža od prevalencije respiratornih simptoma. I ovom je studijom potvrđeno da je status pušenja najvažniji faktor koji određuje prevalenciju KOPB-a. Među muškarcima bijele rase koji su pušili, opstrukcija dišnih puteva bila je prisutna u 14,2 %. Opstrukcija dišnih puteva nađena je u 6,8 % muškaraca bijele rase koji su prestali pušiti, te u 3,3 % onih koji nikada nisu pušili. Opstrukcija dišnih puteva bila je prisutna u 13,6 % žena bijele rase s navikom pušenja, u 6,8 % žena koje su prestale pušiti i 3,1 % žena koje nikad nisu pušile. Opstrukcija dišnih puteva bila je nešto češća u osoba bijele rase u odnosu na osobe crne rase (3).

Procjene koje se temelje na osnovu postavljene dijagnoze KOPB-a daju nam informacije o prevalenciji klinički značajne bolesti. Podaci prikupljani na ovaj način zbunjujujući su jer se često astma i KOPB ne odvajaju, a također se često kronični bronhitis i emfizem prijavljuju zasebno. Studija koja je provedena u Velikoj Britaniji obuhvaćala je bazu podataka 525 liječnika obiteljske medicine koji su skrbili o 3,4 miliona pacijenata (6,4 % ukupne populacije). Prema ovoj studiji, 1997. godine prevalencija KOPB-a bila je 1,7% u muškarca i 1,4 % u žena. Između 1990 i 1997. prevalencija je porasla za 25% u muškaraca i za čak 69% u žena (4).

Smrtnost od KOPB-a u svijetu sve više raste. Dijelom se to objašnjava nekonzistentnom upotrebom terminologije prije 1970-te godine. Tijekom 70-tih godina prošlog stoljeća termin KOPB sve više zamjenjuje termine kronični bronhitis i emfizem. Smrtnost od

KOPB je vrlo niska u osoba mlađih od 45 godina, no raste s dobi. Trenutno je KOPB četvrti uzrok smrti u Sjedinjenim Američkim Državama, a predviđa se da će do 2020. godine biti peti uzrok smrti u svijetu (1,2,5).

1.1.3. Patogeneza kronične opstruktivne plućne bolesti

KOPB je karakterizirana kroničnom upalom dišnih puteva, plućnog parenhima i plućnih krvnih žila. Intenzitet upale, stanične i molekularne karakteristike upale variraju kako bolest napreduje. S vremenom upala oštećuje pluća i vodi patološkim promjenama koje su karakteristične za KOPB. Uz upalu, dva su još procesa koja su važna u patogenezi KOPB. To su neravnoteža između proteinaza i antiproteinaza, te oksidativni stres.

KOPB je obilježen povećanom količinom **upalnih stanica** u različitim dijelovima pluća. Glavne upalne stanice su neutrofili, makrofazi i limfociti (osobito $CD8^+$). Studije su potvrdile povezanost između broja upalnih stanica u plućima i težine bolesti (6).

Povećani broj neutrofila nađen je sputumu i bronhoalveolarnom lavatu KOPB pacijenata. Također, akutno pogoršanje KOPB-a karakterizirano je dodatnim porastom neutrofila u bronhoalveolarnom lavatu. Neutrofili luče nekoliko proteinaza, uključujući neutrofilnu elastazu, neutrofilni katepsin i neutrofilnu proteinazu-3 koje mogu doprinijeti destrukciji parenhima i kroničnoj sekreciji sluzi.

Povećani broj makrofaga prisutan je u velikim i malim dišnim putevima KOPB bolesnika. Vjerojatno je da makrofazi oslobađanjem medijatora kao što su faktor nekroze tumora-α (TNF-α), interleukin-8 (IL-8) i leukotrien B4 (LTB4) potiču neutrofilnu upalu.

U plućima KOPB bolesnika postoji povećan broj citotoksičnih T-limfocita ($CD8^+$ T limfocita). Njihova uloga u patogenezi KOPB-a nije do kraja razjašnjena. Jedan je od načina na koji citotoksični T limfociti mogu doprinijeti razvoju KOPB-a je oslobađanjem perforina, granzima-B i TNF-α koji uzrokuju citolizu i apoptozu alveolarnih epitelnih stanica i na taj način mogu biti odgovorni za održavanje upale.

Eozinofili su povećanog broja u akutnom pogoršanju KOPB-a.

Epitelne stanice dišnih puteva i alveola vjerojatno su značajan izvor upalnih medijatora u KOPB-u. Izloženost epitelnih stanica nosa ili bronha zdravih ljudi dušičnom dioksidu ili ozonu i plinovima nastalim izgaranjem benzina dovode do značajnog oslobađanja proinflamatornih medijatora, uključujući citokine i adhezijske molekule. Adhezijska

molekula E-selektin, uključena u adheziju neutrofila pojačano je izražena u epitelnih stanica KOPB pacijenata.

Aktivirane upalne stanice u KOPB-a oslobađaju razne **medijatore upale**. Smatra se da su LTB4, IL-8 i TNF-α važni u patogenezi KOPB-a. Dim cigareta aktivira makrofage i epitelne stanice na lučenje TNF-α i može potaknuti makrofage da luče druge medijatore upale uključivo IL-8 i LTB4.

LTB4 je snažan kemotaktični faktor za neutrofile i nađen je u povišenoj koncentraciji u pacijenata s KOPB-om. Vjerojatno se oslobađa iz alveolarnih makrofaga koji ga pojačano luče. Sintetizirano je nekoliko snažnih antagonista LTB4 receptora, koji su trenutno u kliničkim studijama i očekuje se da će dalje pojasniti ulogu ovih medijatora u KOPB-u.

IL-8 je selektivni kemotaktični faktor za neutrofile i nalazi se u povećanoj koncentraciji u sputumu i bronhoalveolarnom lavatu KOPB bolesnika. Mogu ga lučiti makrofazi, neutrofili i epitelne stanice dišnih puteva. IL-8 ima primarnu ulogu aktivaciji neutrofila i eozinofila u dišnim putevima KOPB bolesnika i može služiti kao marker za evaluaciju težine upale dišnih puteva u ovoj bolesti.

TNF-α aktivira transkripcijski faktor NK-κB koji aktivira IL-8 gen u epitelnim stanicama i makrofazima. TNF-α je prisutan u velikim koncentracijama u iskašljaju KOPB bolesnika. Serumske koncentracije TNF-α i njegova produkcija u monocitima krvi povećana je u bolesnika koji gube na tjelesnoj težini što sugerira njegovu ulogu u razvoju kaheksije u teškom KOPB-u.

Također, **neravnoteža između proteinaza i antiproteinaza** može rezultirati razvojem plućne destrukcije. Ona nastaje radi genetskog nedostatka antiproteaza (α-1 antitripsina) ili povećanog stvaranja proteaza. Povećano stvaranje proteaza nastaje kao posljedica upale inducirane izlaganjem iritansima. Kao što je već rečeno, makrofazi, neutrofili i epitelne stanice dišnih puteva mogu lučiti različite proteinaze. One uključuju neutrofilnu elastazu, neutrofilni katepsin G, neutrofilnu proteinazu-3, katepsine iz makrofaga i matriks metaloproteinaze. Ove su proteinaze sposobne razgraditi sve tri vezivne komponente alveolarnog zida: elastin, kolagen i glikoprotein. Također, fragmenti elastina mogu podržavati upalu djelujući kao snažan kemotaktični faktor za makrofage i neutrofile.

Oksidativni stres nastaje izravnim djelovanjem reaktivnih tvari iz duhanskog dima i neizravno u sklopu upalne reakcije. Stvara se velika koncentracija slobodnih kisikovih radikala sa sposobnošću oksidacije lipida, proteina i DNA što dovodi do njihove disfunkcije. U KOPB-u su povišeni svi markeru oksidativnog stresa (1,2).

1.1.4. Patologija kronične opstruktivne plućne bolesti

Patološke promjene karakteristične za KOPB zahvaćaju centralne i periferne dišne puteve, plućni parenhim i plućnu vaskulaturu. Različite vrste oštećenja posljedica su kronične upale u plućima koja počinje inhalacijom štetnih čestica i plinova kao što su sastojci dima cigareta.

Centralnim dišnim putevima pripadaju traheja, bronhi i bronhioli veći od 2-4 mm u promjeru. U pacijenata s kroničnim bronhitisom upalni eksudat i stanice infiltriraju epitel centralnih dišnih puteva i pridružene žlijezde. Predominantne stanice u upalnom eksudatu su makrofazi i citotoksični T limfociti. Kronična upala centralnih dišnih puteva vezana je i uz metaplaziju vrčastih i skvamoznih stanica, oštećenje i gubitak cilija, povećanje submukoznih žlijezda, povećanje broja glatkih mišićnih vlakana i vezivnog tkiva dišnog zida, degeneraciju hrskavica dišnih puteva i povećanu sekreciju sluzi.

Periferni dišni putevi uključuju male bronhe i bonhiole promjera manjeg od 2 mm. Rano slabljenje plućne funkcije u KOPB-u korelira s upalnim promjenama u perifernim dišnim putevima koje su slične onima u centralnim dišnim putevima. Ove promjene uključuju eksudat tekućine i stanica u zid i lumen dišnih puteva, metaplaziju vrčastih i skvamoznih stanica, edem mukoze i povećanje sluzi u dišnim putevima radi metaplazije vrčastih stanica. Najkarakterističnija promjena u perifernim dišnim putevima je njihovo suženje. Upala koja započinje udisanjem cigaretnog dima ili drugih rizičnih faktora dovodi do opetovanih ciklusa ozljede i oporavka zida perifernih dišnih puteva. Procesi oporavka povećavaju količinu kolagena i dovode do stvaranja ožiljaka što dovodi do remodeliranja tkiva, suženja dišnih puteva i njihove fiksne opstrukcije. Ove strukturne promjene dišnih puteva najvažniji su uzrok porasta perifernog otpora u KOPB-u. Upalne promjene kao što je edem dišnih puteva i hipersekrecija sluzi također doprinose suženju dišnih puteva, ali fibroza malih dišnih puteva ima najveću ulogu. Fibroza perifernih dišnih puteva karakterizirana je akumulacijom fibroblasta i miofibroblasta i nakupljanjem ekstracelularnog vezivnog tkiva. Nekoliko tipova stanica uključujući fagocite i epitelne

stanice mogu stvarati medijatore koji potiču ovaj proces. Ovi medijatori nisu do kraja identificirani ali se čini da TGF-β, ET-1, inzulinu sličan faktor rasta-1, fibronektin i faktor rasta porijeklom iz trombocita imaju ulogu.

Plućni parenhim obuhvaća površinu pluća za izmjenu plinova (respiratorne bronhiole i alveole) i plućni kapilarni sistem. Najčešći tip parenhimalne destrukcije u KOPB pacijenata je centrilobularni oblik emfizema koji uključuje dilataciju i destrukciju respiratornih bronhiola. Panacinarni emfizem, koji se širi kroz cijeli acinus, karakteristična je lezija u pacijenata s nedostatkom α-1 antitripsina. Ona uključuje dilataciju i destrukciju alveolarnih duktusa, vrećica i respiratornih bronhiola, te češće zahvaća donje plućne režnjeve. Kako proces obično zahvaća sve acinuse sekundarnog lobula naziva se i panlobularni emfizem.

Zahvaćenost plućne vaskulature u KOPB-u počinje u ranim fazama razvoja bolesti. Disfunkcija endotela plućnih arterija najranija je promjena. Ona može biti uzrokovana direktnim djelovanjem cigaretnog dima ili indirektno upalnim medijatorima. Kako endotel ima važnu ulogu u regulaciji tonusa krvnih žila i staničnoj proliferaciji, vjerojatno je da disfunkcija endotela može započeti slijed događaja koji rezultiraju strukturalnim promjenama. Zadebljanje intime prva je strukturalna promjena, potom slijedi proliferacija glatkih mišića krvnih žila i infiltracija zida upalnim stanicama, predominantno makrofazima i CD8+ T limfocitima. Ove strukturalne promjene vode povećanju tlaka u plućnim krvnim žilama koji se ispočetka javlja u fizičkom naporu, potom i u mirovanju. Kako bolest napreduje emfizematozna destrukcija plućnih kapilara također pridonosi promjenama plućne vaskulature (2).

1.1.5. Patofiziologija kronične opstruktivne plućne bolesti

Patofiziološke promjene karakteristične za bolest uključuju hipersekreciju sluzi, cilijarnu disfunkciju, opstrukciju, plućnu hiperinflaciju, poremećaj izmjene plinova, plućnu hipertenziju i plućno srce. Promjene se obično zbivaju navedenim redom.

Hipersekecija sluzi uzrokovana je stimulacijom povećanog broja vrčastih stanica upalnim medijatorima kao što su leukotrieni, proteinaze i neuropeptidi. Cilijarne epitelne stanice podliježu skvamoznoj metaplaziji što vodi oštećenju mukocilijarnog mehanizma čišćenja. Ovo su najčešće prve promjene koje se zbivaju u KOPB-u.

Najvažnije obilježje KOPB-a je ekspiratorna opstrukcija protoku zraka. Opstrukcija je uglavnom ireverzibilna s malom reverzibilnom komponentom. Ireverzibilna komponenta opstrukcije dišnih puteva primarno je posljedica njihovog remodeliranja: fibroze i suženja malih dišnih puteva, što vodi fiksnoj opstrukciji i posljedičnom porastu plućnog otpora. Mjesta bronhoopstrukcije u KOPB-u su manji dišni putevi; bronhi i bronhioli promjera manjeg od 2 mm. Destrukcija parenhima ima manju ulogu u ireverzibilnoj komponenti, ali doprinosi ekspiratornoj opstrukciji protoka zraka i povećava otpor na nekoliko načina. Destrukcija alveola inhibira sposobnost malih dišnih puteva da ostanu rašireni. Alveolarna destrukcija je također vezana s gubitkom elasticiteta pluća što smanjuje intraalveolarni tlak tijekom izdisaja.

Kontrakcija glatkih mišića dišnih puteva, upala u dišnim putevima, intraluminalna akumulacija sluzi i eksudata plazme odgovorna je za reverzibilni dio opstrukcije dišnih puteva.

Ograničavanje protoka zraka dišnim putevima u ekspiraciji inicijalno se događa samo u tjelesnom naporu, ali kasnije i u mirovanju. Istovremeno, FRC se povećava zbog kombinacije smanjene elastičnosti pluća, preranog zatvaranja dišnih puteva i varijabilne dinamike koja je odraz obrasca disanja usvojenog zbog suprostavljanja oštećenoj plućnoj mehanici. Kako se razvija ograničenje protoka zraka, pražnjenje pluća je usporeno i interval između inspiracija ne dozvoljava potpunu ekspiraciju i relaksaciju volumena respiratornog sustava. To vodi dinamičkoj plućnoj hiperinflaciji. Povećanje FRC-a može oštetiti funkciju i koordinaciju respiratorne muskulature, iako se čini da je kontraktilnost dijafragme očuvana, ukoliko se uzima u obzir plućni volumen. Ove se promjene događaju s napredovanjem bolesti, ali gotovo uvijek prvo tijekom tjelesnog napora. Tada povećana metabolička stimulacija ventilacije zahtijeva veći rad ventilacijske pumpe za održavanje izmjene plinova (2).

1.1.6. Poremećaj izmjene dišnih plinova

U uznapredovalom KOPB-u, periferna opstrukcija dišnih puteva, destrukcija plućnog parenhima i abnormalnosti plućnih krvnih žila smanjuju kapacitet pluća za izmjenu dišnih plinova i dovode od hipoksemije, a s daljnjim napretkom bolesti i hiperkapnije. Korelacija između rutinskih testova plućne funkcije i vrijednosti dišnih plinova u arterijskoj krvi je slaba. Ipak značajna hipoksemija ili hiperkapnija rijetko nastupa

ukoliko je FEV_1 veći od 1 litre. Hipoksemija inicijalno nastaje tijekom fizičkog napora, a s napretkom bolesti nalazimo je i u mirovanju. Nesrazmjer ventilacijsko perfuzijskog omjera glavni je mehanizam razvoja hipoksemije u KOPB-u. U perifernim dišnim putevima, oštećenje zida dišnih puteva povezano je s ventilacijsko perfuzijskim nesrazmjerom. U plućnom parenhimu, destrukcija plućne površine emfizemom reducira difuzijski kapacitet i doprinosi oštećenju izmjene dišnih plinova. Visoki perfuzijsko ventilacijski omjer vjerojatno je odraz emfizematoznih područja s alveolarnom destrukcijom. Čini se da je težina plućnog emfizema direktno vezana uz ukupnu neučinkovitost pluća u izmjeni plinova. To se odražava dobrom korelacijom između difuzijskog kapaciteta ugljičnog monoksida po litri alveolarnog volumena i težine makroskopskog emfizema. Reducirana ventilacija radi gubitka elastičnih svojstava emfizematoznog pluća, zajedno s gubitkom kapilara i generaliziranom nehomogenosti ventilacije zbog mjestimičnih promjena vode do ventilacijsko perfuzijskog nesrazmjera što rezultira hipoksemijom. Kronična hiperkapnija obično je odraz disfunkcije inspiratornih mišića i alveolarne hipoventilacije.

Pogoršanje izmjene dišnih plinova pri akutnom pogoršanju KOPB-a uzrokovano je dodatnim pogoršanjem ventilacijsko/perfuzijskog omjera, te povećanom potrošnjom kisika zbog povećanog rada dišne muskulature (7,8).

1.1.7. Liječenje bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti

Razlikujemo liječenje bolesnika u stabilnoj fazi KOPB-a i u akutnom pogoršanju. U obje faze bolesti liječenje se sastoji od niza farmakoloških i nefarmakoloških mjera, no ovdje ćemo detaljnije opisati primjenu kisika, jer je ona važna za promptnu korekciju hipoksemije.

1.1.7.1. Kontrolirana terapija kisikom u akutnom pogoršanju KOPB-a

Liječenje kisikom temeljna je mjera liječenja akutnih pogoršanja KOPB-a koje zahtijevaju hospitalizaciju. Osnovne postavke liječenja kisikom su kontinuirano, kontrolirano i nisko dozirano. Cilj primjene kisika je korekcija hipoksemije na 50-60 mmHg, odnosno postizanje saturacije hemoglobina kisikom od 80-90 %. Kisik se primjenjuje putem nosnog katetera ili putem Venturi maske. Iako maska ima veliku prednost jer daje uvijek istu koncentraciju kisika bez obzira na ventilaciju, pacijenti ju

teže toleriraju i često skidaju. Redovita pojava primjene kisika u bolesnika s akutnim pogoršanjem kronične hipoksemije je dodatna retencija ugljičnog dioksida koja nastaje radi smanjenja hipoksičnog podražaja na centar za disanja, bronhodilatatornog učinka, pojave mikroatelektaza uz povećanje «shunta» i smanjenja sveukupnog odnosa ventilacije/perfuzije. Po započinjanju primjene kisika analizu dišnih plinova u arterijskoj krvi treba ponavljati svakih pola do sat vremena kako bi se na temelju dobivenih vrijednosti korigirao protok kisika i osigurala zadovoljavajuća oksigenacija bez značajnije retencije ugljičnog dioksida i acidoze (2,9).

1.1.7.2. Dugotrajno liječenje kisikom

Dugotrajno liječenje kisikom označava kućno liječenje dugotrajnim udisanjem kisika, a primjenjuje se u bolesnika s kroničnom respiracijskom insuficijencijom. Primarni cilj terapije kisikom je postizanje parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi od barem 60 mmHg u mirovanju ili saturacije hemoglobina kisikom od 90%. Na taj način osigurava se adekvatna doprema kisika tkivima i čuva vitalna funkcija organa. Pokazano je da dugotrajna primjena kisika produžava životni vijek bolesnika s kroničnom respiracijskom insuficijencijom (10). Ova terapija može imati koristan učinak na hemodinamiku, hematološke karakteristike, podnošenje svakodnevnih fizičkih napora, te mentalno stanje ovih bolesnika (2,9-11). Primjena ove terapijske mjere smanjuje potrebu za hospitalizacijom i skraćuje boravak u bolnici (9). Prospektivnom je studijom pokazano da je primarni hemodinamski efekt dugotrajne terapije kisikom prevencija progresije plućne hipertenzije (11). Sniženje plućne hipertenzije postiže se već 15 satnim udisanjem kisika, a značajno smanjenje smrtnosti 19 satnim udisanjem kisika (9).
Dugotrajno se liječenje kisikom općenito započinje u pacijenata s teškim KOPB-om ukoliko je parcijalni tlak kiska u arterijskoj krvi manji od 55 mmHg ili saturacija hemoglobina kisikom manja od 88 %, ili ukoliko je parcijalni tlak kiska u arterijskoj krvi između 55 i 60 mmHg, odnosno saturacija hemoglobina kisikom manja od 89 % uz znakove plućne hipertenzije, popuštanja plućnog srca ili policitemije (2,9).

Zaključno, teški stupanj KOPB-a često je vezan uz kroničnu respiracijsku insuficijenciju, a akutna su pogoršanja ove bolesti redovito praćena daljnjim pogoršanjem vrijednosti dišnih plinova i teškom hipoksijom (2,7,8). Regulacija eritropoeze i angiogeneze

hipoksijom predstavljaju važne fiziološke homeostatske mehanizme koji balansiraju metaboličke potrebe organizma i dopremu kisika organima putem krvnih žila. Povećanim stvaranjem eritrocita i poticanjem formiranja novih krvnih žila osigurava se fiziološki mehanizam povratne sprege kako bi se nedostatno oksigenirano tkivo opskrbilo kisikom. Dok je eritropoetin (EPO) osnovni fiziološki regulator produkcije eritrocita, dva su najjača i specifično pozitivna regulatora angiogeneze faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF) i osnovni faktor rasta fibroblasta (b-FGF) (12). Podaci o eritropoetskom odgovoru na hipoksemiju u KOPB bolesnika su kontradiktorni, a podaci o angiogenetskom odgovor na hipoksični stimulus oskudni. Prema tome, KOPB kompliciran respiracijskom insuficijencijom predstavlja zanimljiv klinički model za istraživanje međusobnog odnosa između hipoksije, eritropoetina i angiogenetskih faktora rasta.

1.2. ERITROPOEZA

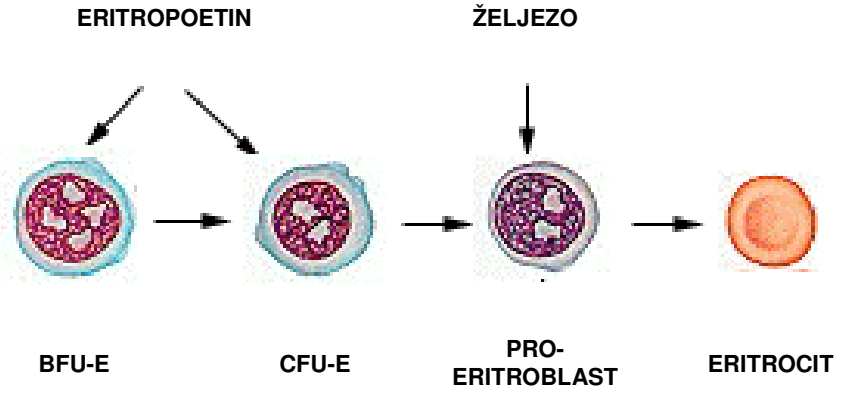
Eritropoeza je složeni proces nastanka eritrocita iz pluripotentne matične stanice. Eritrociti su visoko specijalizirane stanice čija je osnovna funkcija transport dišnih plinova. U fizološkim se uvjetima specifičnim mehanizmima regulacije održava precizna homeostaza između saturacije hemoglobina kisikom i produkcije eritrocita. Kako je ovaj proces od posebnog interesa ovog rada u daljnjem tekstu bit će pobliže opisan.

1.2.1. Eritropoetin

Eritropoetin je fiziološki regulator produkcije eritrocita. Po strukturi on je glikoproteinski hormon veličine 34 kDa. On regulira produkciju eritrocita stimulirajući proliferaciju i diferencijaciju eritrogenih progenitorskih stanica vežući se za specifične receptore na tim stanicama. Uz to, on sprječava njihovu apoptozu ekspresijom Bcl-XL i Bcl-2 i aktivacijom protein kinaza, uključujući kinazu-1 (13-15). EPO također potiče uskladištenje željeza u ove stanice povećanjem ekspresije transferinskih receptora (16). Eritroidne stanice na koje djeluje EPO su rane i kasne progenitorske stanice. Eritroidne jedinice koje formiraju nakupine (BFU-E) sadrže samo nekoliko receptora za EPO (EPO-R). Njihovom proliferacijom i zriobom nastaju eritroidne jedinice koje formiraju kolonije (CFU-E). Ove stanice imaju najveći broj receptora za EPO. Broj EPO receptora na površini eritroidnih prekursorskih stanica obično iznosi 500-2000 (17). Ove stanice

spadaju u zadnji amplifikacijski odjeljak eritroidne linije i sazrijevanjem se pretvaraju u proeritroblaste, a potom u eritroblaste i konačno eritrocite. Adekvatna produkcija eritrocita može se ostvariti samo uz prisustvo neophodnih elemenata među kojima je osobito važno željezo (Slika 1.1.). S obzirom da je glavna funkcija eritrocita transport kisika iz pluća u periferna tkiva, regulacija
produkcije EPO ima važnu ulogu u kontroli tkivne oksigenacije. Pri tome, EPO je jedini hematopoetski faktor rasta čija je produkcija regulirana tkivnim tlakom kisika.

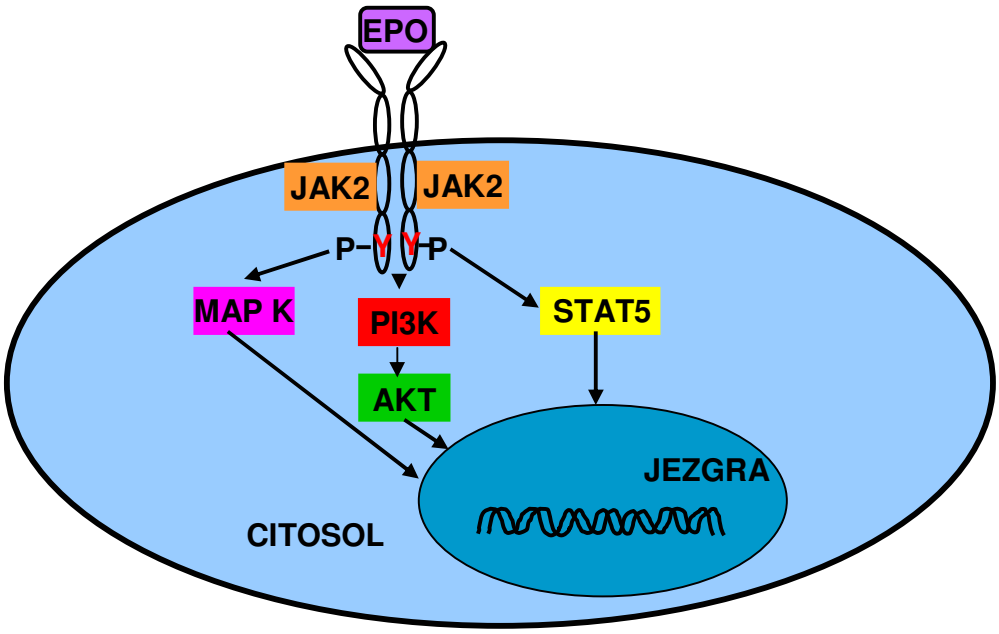
Slika 1.1. Eritropoeza (za objašnjenje vidi tekst)



-Kao što je prethodno izneseno, EPO i EPO receptor neophodni su za sazrijevanje eritrocita. Ukoliko nedostaje EPO ili EPO receptor, eritroidne progenitorske stanice podliježu apoptozi na razini CFU-E i eritroblasta. Isto tako je važna i JAK2. Ona je vezana za EPO recepor i aktivira se vezanjem EPO za specifični receptor. Mišji embriji bez gena za JAK2 umiru zbog nesazrijevanja eritrocita u fetalnoj jetri. Vezanjem EPO za receptor nastupa konformacijska promjena kojom se aktivira JAK2 koja je vezana za citoplazmatsku domenu EPO receptora. Aktivacijom JAK2 započinje unutarstanično prenošenje signala. JAK2 se fosforilira na aktivacijskoj petlji Y1007, Y1008. JAK2 također fosforilira i citoplazmatske Y rezidue EPO receptora. Kao posljedica dolazi do aktivacije citosolnih proteina, prenosioca signala i aktivatora transkripcije STAT, MAPK,

PI3K i AKT. Biološka posljedica ovih kaskadnih događaja je preživljavanje, proliferacija i diferencijacija eritroidnih progenitorskih stanica (Slika 1.2.) (18). Uz hematopoetske progenitorske stanice, EPO receptor je nađen i na endotelnim stanicama, mišićnim stanicama, stanicama srčanog mišića, te neuronima. Hipoksija dovodi do povećane ekspresije EPO receptora na neuronima, što dovodi do njihove povećane osjetljivosti na EPO. Vezanjem za specifični receptor, EPO štiti kardiomiocite od ishemične ozljede bez učinka na koncentraciju hemoglobina. Prema tome, možemo reći da EPO direktno štiti kardiomiocite od ishemije i infarkta srca. U endotelnih stanica, EPO može stimulirati endotelnu proliferaciju i kemotaksiju in vitro i stimulirati angiogenezu in vivo. Pretpostavlja se da EPO inducira neovaskularizaciju induciranu upalom ili ishemijom mobiliziranjem endotelnih progenitorskih stanica iz koštane srži (19).

Slika 1.2. Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja EPO za EPO-R (za objašnjenje vidi tekst)



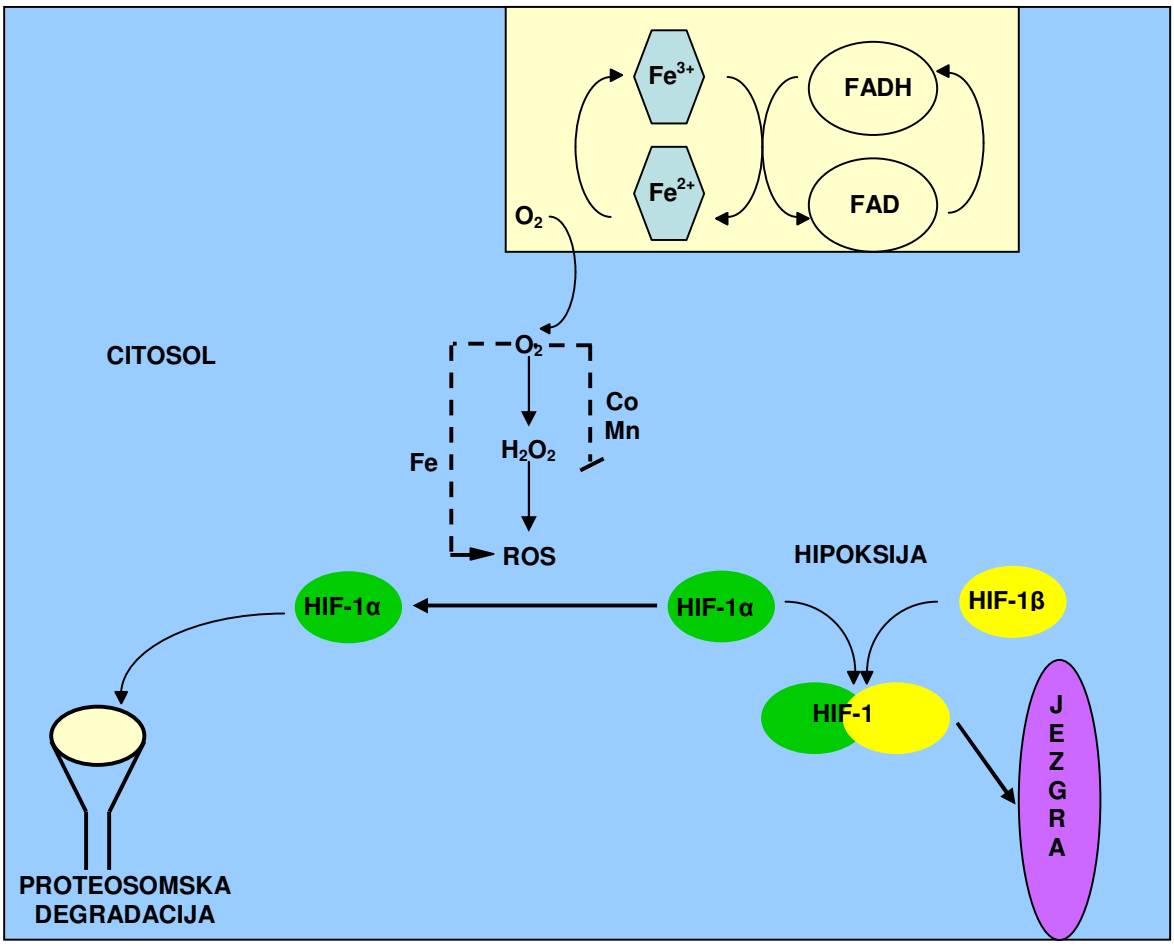
1.2.2. Regulacija produkcije eritropoetina hipoksijom

Regulacija produkcije EPO i osjet kisika predmet su intenzivnog istraživanja, što je dovelo do prepoznavanja složenog signalnog puta. EPO uglavnom sintetiziraju stanice smještene uz peritubularne kapilare bubrega, hepatociti pridonose ovoj proizvodnji oko

20 % (20). EPO gen lokaliziran je na sedmom kromosomu, sadrži pet eksona, četiri introna i funkcionalno važne 5' i 3' netranslantirane sekvence (21). Aktivacija transkripcije EPO gena posredovana je pomoću hipoksijom induciranog faktora-1 (HIF-1) (22,23). Ekspresija HIF-1 eksponencijalno raste kako pada koncentracija kisika u stanicama (24). Transkripcijski faktor HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od dva osnovna helix-petlja-helix PAS proteina; HIF-α (oko 120 kDa) i HIF-β (91-94 kDa β) podjedinice (25). HIF-α i HIF-β podjedinica imaju nekoliko izoformnih oblika koji su kodirani različitim genetskim lokusima. HIF-1β je konstitutivno izražen jezgrin protein, dok se HIF-α inducira hipoksijom (26). Postoje tri izoformna oblika HIF-α, pri čemu su HIF-1α i HIF-2α međusobno vrlo slična i oba sposobna djelovati s elementima odgovora na hipoksiju (HRE) i inducirati transkripciju (23). Eksperimenti upućuju da aktivacija HIF-1 uključuje redoks ovisnu stabilizaciju HIF-1α proteina (27). U hipoksičnim uvjetima HIF-1α translocira se u jezgru i heterodimerizira s β podjedinicom i formira HIF-1 kompleks (28). Tretiranje ekstrakata hipoksičnih stanica alkalnom fosfatazom kida DNA veze, što sugerira da bi fosforilacija mogla biti odgovorna za vezanje (29). U normooksičnim uvjetima dolazi do razgradnje HIF-1α podjedinice. Identificirane su dvije odvojene domene unutar HIF-1α podjedinice, koje su odgovorne za mehanizam kojim stanični kisik regulira HIF-1 aktivnost. Razgradna domena ovisna o kisiku (ODD) na humanom HIF-1α sadrži dva prolilna ostatka (Pro 402 i Pro 564) i posreduje interakciju s von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaznim kompleksom. Prolilni ostaci se hidroksiliraju specifičnim prolil-hidroksilazama (PHD1, PHD2, PHD3) i na taj način HIF-1α postaje cilj proteosmske destrukcije i degradira se ubikvitarnim proteosomskim putovima (28,29). Drugi mehanizam djeluje na C-terminalnu aktivacijsku domenu (CAD), hidroksilirajući asparaginski ostatak. Ovaj faktor inhibicije HIF-1 nazvan je FIH-1 (28). Prolil hidroksilaze i FIH-1 služe kao senzori za kisik u putevima odgovornim za hipoksiju (25). HIF hidroksilaze su Fe(II) ovisne dioksigenaze koje imaju veliku sposobnost vezanja kisika čime omogućuju da se HIF ne inaktivira u hipoksičnim uvjetima. Željezo je slabim vezama vezano za dihidroksilaze i može biti zamijenjen s drugim metalima, kao što je kobalt i mangan, i tada gubi katalitičku aktivnost. Na ovaj se način u eksperimentalnim uvjetima može postići pojačana eksprsija HIF-a, što indicira mogući put za terapeutsku manipulaciju eritropoeze i angiogeneze (31). Mehanizmi

«osjeta» kisika (eng. oxygen sensing) još nisu do kraja objašnjeni. Prema sadašnjim spoznajama čini se da hem protein, citokromu b sličan protein, služi kao senzor kisika u tkivima (32). Slika 1.3. prikazuje regulaciju HIF-1 ekspresije.

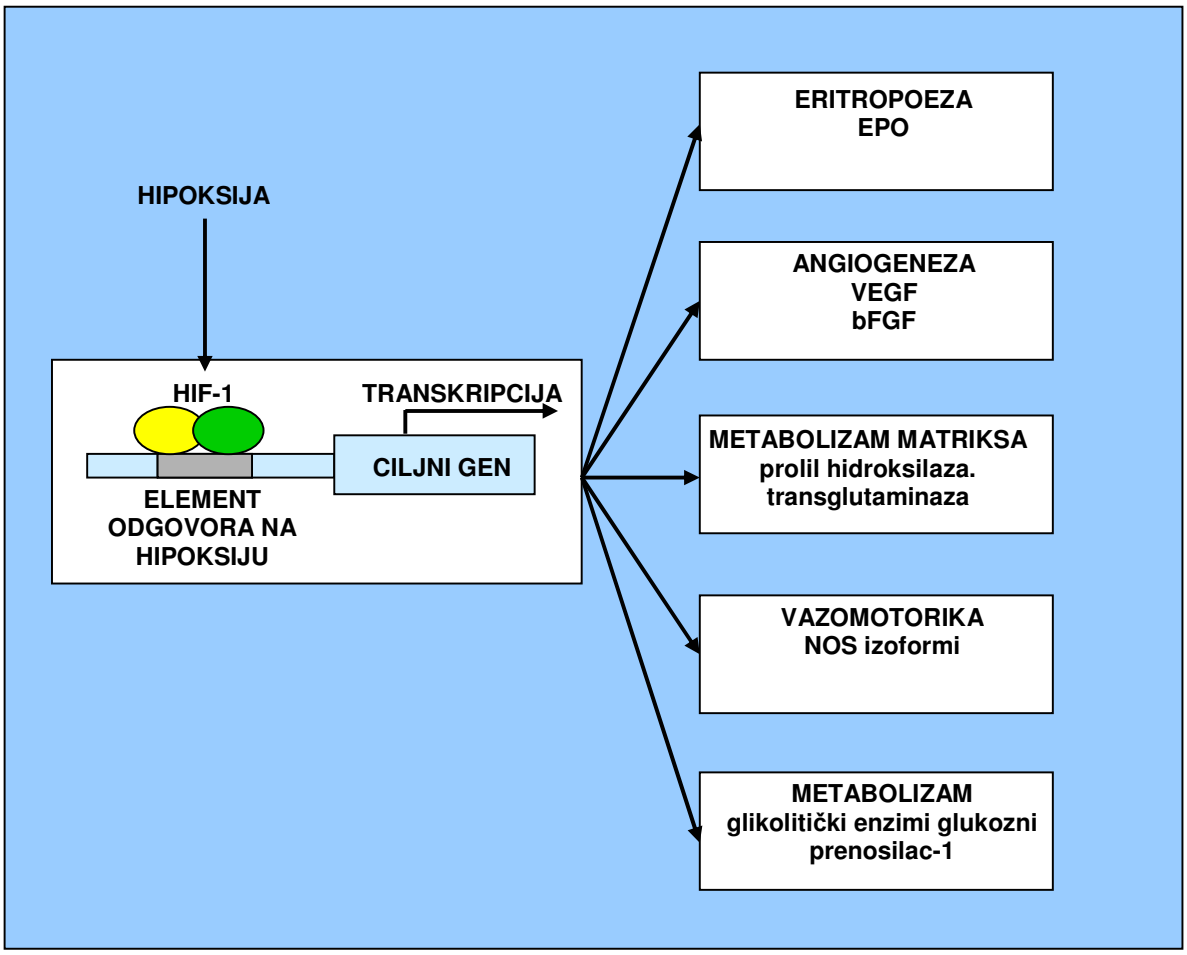
Slika 1.3. Regulacija HIF ekspresije (za objašnjenje vidi tekst)



Aktivni se heterodimerični HIF-1 veže za HRE na pojačivačkim mjestima, ne samo EPO gena, nego i mnogih drugih gena. On sudjeluje u inicijaciji transkripcije VEGF i bFGF gena u hipoksičnim uvjetima. Također, HIF-1 je uključen u aktivaciju brojnih gena koji su uključeni u različite stupnjeve angiogeneze kao što su geni važni za metabolizam matriksa i uključuju transglutaminaze, kolagen prolil hidroksilaze, zatim sintetazu

dušičnog oksida koja je važna za održavanje vaskularnog tonusa. HIF-1 sudjeluje i u regulaciji metaboličkih procesa aktivacijom transkripcije nekoliko glikolitičkih enzima i glukoznog-prenosioca-1 (28) (slika 1.4).

Slika 1.4. Višestruki učinak aktivacije HIF-1 molekule hipoksijom (za objašnjenje vidi tekst)

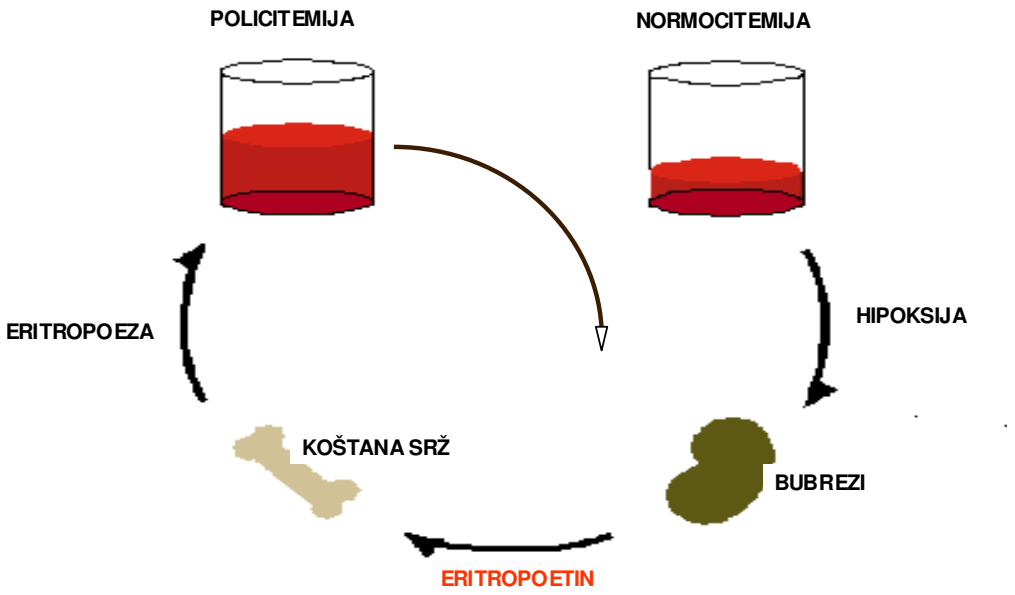


1.2.3. Fiziološki odnos eritropoeze i hipoksije

Hipoksija je osnovni stimulans produkcije EPO. Osnovna funkcija eritrocita je prijenos kisika tkivima. Pri tkivnoj hipoksiji koja može biti različitog uzroka (anemija, hipoksemija ili smanjen dotok krvi tkivima) dolazi do povećane produkcije EPO. EPO stimulira eritropoezu što dovodi do povećanja produkcije eritrocita, odnosno ukupne

mase eritrocita. Time se povećava kapacitet krvi za prijenos kisika, smanjuje hipoksični stimulans i osigurava negativna povratna sprega zaustavljanja EPO produkcije (33). Slika 1.5. shematski prikazuje ovaj fiziološki kompenzatorni mehanizam.

Slika 1.5. Fiziološka aktivacija eritropoeze u hipoksiji (za objašnjenje vidi tekst)



U zdravih je ljudi odnos između mase eritrocita i saturacije hemoglobina kisikom linearan (34). Pri anemiji, koncentracija serumskog EPO raste nakon što hemoglobin padne ispod 110 g/L. U kronično anemičnih ljudi postoji inverzni linearni odnos između razine serumskog EPO i koncentracije hemoglobina (34). U zdravih ljudi, izloženost velikim nadmorskim visinama i posljedičnoj hipoksemiji stimulira produkciju EPO (34,35). Eckardt i suradnici pokazali su da u zdravih ljudi nakon naglog izlaganja hipoksiji u hipobaričnoj komori EPO značajno raste iznad osnovnih vrijednosti. Oni su pokazali da EPO može značajno porasti nakon 84 minute izlaganja simuliranoj visini od 4000 metara, te da ono uzrokuje trostruko povećanje cirkulirajućeg hormona. Nakon prestanka izlaganja hipoksiji, koncentracija EPO još raste oko 1,5 sat. Tri sata nakon

prestanka izlaganja hipoksiji, koncentracija EPO počinje eksponencijalno padati, s prosječnim poluvremenom života od 5,2 sata (36).

1.2.4. Eritropoeza i respiracijska insuficijencija

Na temelju iznesenih spoznaja vezanih uz aktivaciju eritropoetinskog sustava u hipoksičnim uvjetima za očekivati je isti odgovor u pacijenata s respiracijskom insuficijencijom. Nasuprot tome, konfliktni su izvještaji o primjerenosti porasta mase eritrocita u pacijenata s KOPB-om kada se kompariraju s fiziološkim modelima. Neki istraživači izvještavaju da postoji korelacija između mase eritrocita i saturacije arterijske krvi kisikom u ovih pacijenata (37,38). Hume je u svom radu izvijestio da postoji inverzni odnos između postotka porasta mase eritrocita i logaritma arterijskog parcijalnog tlaka kisika u pacijenata s kroničnim bronhitisom i emfizemom. Također, mišljenja je da ta prilagodba u volumenu eritrocita slična prilagodbi stanovnika velikih nadmorskih visina na hipoksiju (38). No većina autora izvještava da je porast mase eritrocita neprimjeren s obzirom na stupanj hipoksemije (39,40). Udio policitemičnih bolesnika u studijama koje se bave istraživanjem kliničkih karakteristika KOPB bolesnika s respiracijskom insuficijencijom je vrlo varijabilan. U studiji Tsantesa i sur. samo 37% hipoksemičnih KOPB pacijenata bilo je policitemično i nije nađena korelacija između eritropoetinskog odgovora i stupnja hipoksemije (41). Studija Tassiopoulusa i sur. uključivala je teško hipoksemične pacijente sa srednjom vrijednosti parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi od 50,9 mmHg. U tom je istraživanju 58,6% pacijenata je imalo policitemiju (39). U NOTT studiji, na velikoj grupi hipoksemičnih ispitanika koji su zahtijevali dugotrajno liječenje kisikom srednja vrijednost hematokrita bila je tek blago iznad referentne vrijednosti, iznosila je 47,7% (42). Također, zamijećeno je da KOPB pacijenti s respiracijskom insuficijencijom koji još uvijek puše češće imaju sekundarnu policitemiju od onih koji ne, te da se ona teže korigira primjenom dugotrajne terapije kisikom (43). Primjenom teofilina dolazi do pada produkcije eritrocita, nevezano za produkciju EPO (44). U magistarskom radu pokazala sam da KOPB pacijenti s kroničnom respiracijskom insuficijencijom pokazuju neadekvatan eritropoetski odgovor na hipoksemiju. Manjina ispitanika razvila je policitemiju (36,5%), a srednja je vrijednost parametara crvene krvne slike bila unutar referentnih vrijednosti (45).

Podaci o eritropoetskom odgovoru pacijenata s respiracijskom insuficijencijom kao rezultatom drugih pulmoloških entiteta su oskudni. Postoje podaci da je hipoksemija vezana uz idiopatsku plućnu fibrozu također rijetko vezana uz policitemiju (46-49). Također u studiji Tassiopoulusa i sur. samo 11% pacijenata s idiopatskom plućnom fibrozom kompliciranom teškom hipoksemijom imalo je policitemiju (39).

Na različite se načine pokušava objasniti nedostatak eritropoetskog odgovora u pulmoloških pacijenata s respiracijskom insuficijencijom. Među potencijalnim uzrocima navodi se nedostatak željeza, hiperkapnijom inducirana supresija koštane srži, nedostatak folata i vitamina B_{12} (49,50). Uz to, navodi se i aktivacija drugih fizioloških mehanizama prilagodbe kao što su ventilacijske i cirkulacijske promjene kojima se poboljšava oksigenacija na način da se poveća frekvencija respiracija i minutni srčani volumen, kao i promjene u afinitetu vezanja kisika za molekulu hemoglobina primarno povećanjem razine 2,3-difosfoglicerata (51). Niti jedan od ovih mehanizama nije u potpunosti uspio objasniti ovaj fenomen. U posljednje se vrijeme sve više pažnje posvećuje istraživanju uloge eritropoetina i kronične upale u ovom fenomenu.

1.2.5. Eritropoetin u KOPB pacijenata

Izvještaji o aktivnosti EPO sustava u sklopu KOPB-a nisu uniformni, a rezultati mjerenja ovog parametra su jako varijabilni u ovoj skupini pacijenta. U studiji Tassiopoulusa i sur. srednja vrijednost EPO nađena je značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu koju su činili zdravi pojedinci (39). U studiji Guideta i sur. koja je uključivala teško hipoksemične pacijente s prosječnom vrijednosti parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi 47 mmHg, čak je u 85% ispitanika nađena povišena vrijednost EPO (52). Wedzicha i sur. izvještavaju da je srednja vrijednost serumskog EPO značajno viša u KOPB pacijenata u odnosu na zdravu populaciju, iako je u 31% ispitanika ovaj parametar bio unutar normalnih vrijednosti (53). Oba autora nalaze značajno više vrijednosti EPO u policitemičnoj skupini pacijenata, a Wedzicha i sur. pokazali su da u policitemične skupine pacijenata koncentracija EPO značajnije varira pri višekratnom uzimanju uzoraka (52,53). U studiji koju je proveo Graudal i sur. ne nalaze korelacije između vrijednosti serumskog EPO, hemoglobina i parametra plućne funkcije u KOPB pacijenata (54). U studiji Ström i sur. vrijednosti serumskog EPO nađene su unutar referentnih vrijednosti u 70% ispitanika s teškom respiracijskom insuficijencijom. Zamijećen je

dodatni pad ovog parametra već nakon 24 sata primjene kisika i korekcije hipoksemije (55). Pacijenti s KOPB-om koji zbog stupnja hipoksemije zahtijevaju trajnu terapiju kisikom sposobni na hipoksemiju reagirati povećanom produkcijom EPO. EPO značajno raste nakon 2 sata izlaganja hipoksiji (56). U magistarskom sam radu pokazala da je pri akutnom pogoršanju respiracijske insuficijencije u ovih pacijenata aktivacija eritropoetskog sustava neadekvatna. EPO je u većine ispitanika nađen unutar nisko normalnih vrijednosti, a iznad referentnog raspona samo u 15% ispitanika (45). U zdravih ljudi EPO se luči prema cirkadijalnom ritmu, pri čemu su najviše vrijednosti u popodnevnim satima. KOPB pacijenti s dnevnom hipoksemijom i pridruženom teškom noćnom desaturacijom imaju povišene i dnevne i noćne vrijednosti EPO i u njih se gubi fiziološki cirkadijalni ritam (57).

1.3. ANGIOGENEZA

Uz eritrocite, za prijenos dišnih plinova neophodne su i krvne žlile. Prema tome, angiogeneza također ima važnu ulogu u opskrbi tkiva kisikom. Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žila iz već postojećih. Na ovaj način odvija se neovaskularizacija u odraslih, ali se i vaskulariziraju neki organi u razvoju kao što je mozak, bubrezi i udovi. Nove se kapilare formiraju pupajući iz već postojećih i iz postkapilarnih venula. Proces pupanja sastoji se od slijedećih koraka: lokalna razgradnja bazalne membrane krvne žile, migracija endotelnih stanica, formiranje lumena, mitoza endotelnih stanica, spajanje obližnjih pupoljaka i stvaranje petlji. Ovaj proces razlikujemo od vaskulogeneze, koja se definira kao diferencijacija endotelnih stanica iz angioblasta. Fiziološka angiogeneza regulirana je ravnotežom među pozitivnim i negativnim angiogenim molekulama. Mehanizmi odgovorni za oslobađanje pozitivnih i negativnih angiogenih molekula nisu do kraja razjašnjeni, kao niti integracija njihovih signala unutar endotelne stanice. Na tablici 1. prikazani su najpoznatiji proangiogenim faktori.

U odraslih ljudi razlikujemo fiziološku i patološku angiogenezu. Nakon embrionalnog i postnatalnog razvoja, do tada vrlo brza proliferacija endotelnih stanica gotovo se potpuno gasi. Život endotelne stanice u odraslih ljudi iznosi nekoliko mjeseci do godina. Jedine situacije u kojoj fiziološki nastupa brza proliferacija endotelnih stanica su ženski reproduktivni ciklus, trudnoća i zarastanje rana. Različite patološka stanja uključuju neovaskularizaciju tkiva koja može ubrzavati progresiju bolesti (npr. u neoplastičnih

bolesti) ili biti medijator patogeneze (npr. u dijabetičkoj retinopatiji). Na mnogim ispitivanim modelima pokazano je da sistemska i lokalna hipoksija mogu snažno inducirati ekspresiju VEGF i bFGF kao najpotentnijih proangiogenih faktora (58).

Tablica 1.1. Proangiogeni faktori (za objašnjenje vidi tekst)

POLIPEPTIDNE MOLEKULE	NE-POLIPEPTIDNE MOLEKULE
faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF)	prostaglandini PGE_1, PGE_2
bazični - faktor rasta fibroblasta (bFGF)	nikotinamid
kiseli - faktor rasta fibroblasta (aFGF)	adenozin
angiogenin	1-butiril-glicerol
faktor rasta placente (PGF)	degradacijski produkti hijaluronske kiseline
interleukin - 8 (IL-8)	Cu^{2+} vezan za ceruloplazmin i heparin
faktor aktivacije trombocita (PAF)	gangliozidi GD_3, GM_1
faktor rasta endotelnih stanica porijeklom iz trombocita (PD-ECGF)	
granulocitni faktor rasta (G-CSF)	
hepatocitni faktor rasta (HGF)	
proliferin	
inzulinu sličan faktor rasta (IGF-I)	
faktor rasta epidermisa (EGF)	
transformirajući faktor rasta α (TGFα)	
transformirajući faktor rasta β (TGFβ)	
faktor rasta porijeklom iz trombocita (PDGF)	
faktor nekroze tumora α (TNF-α)	

1.3.1. Faktor rasta endotela krvnih žila

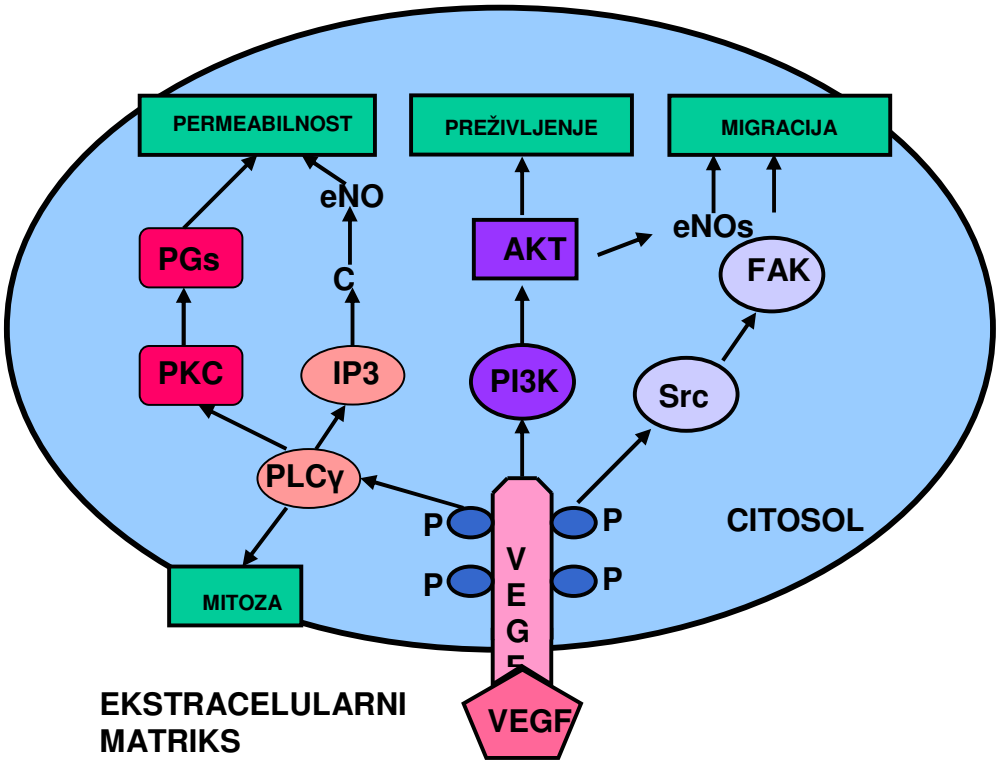
VEGF-A je član obitelji dimernih glikoproteina koji pripadaju velikoj obitelji faktora rasta koji nastaju iz trombocita. Ostali članovi ove obitelji su VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i faktor rasta placente (PGF). Ovi ostali članovi do sada su mnogo manje

istraživani, pa će se daljnji tekst odnositi na VEGF-A. VEGF je dimerični glikoprotein vezan disulfidnim vezama, mase od 34-45 kDa (59). Dva lanca koja čine VEGF organizirana su u antiparalelnom uzorku. Kristalne je strukture. Svaka molekula ima dva mjesta kojima se veže za receptor (60). VEGF gen je smješten na kratkom kraku šestog kromosoma. Područje koje kodira VEGF sastoji se od osam eksona, od kojih prvi kodira hidrofobnu vodeću sekvencu, tipičnu za secernirajuće proteine (59). Kao rezultat alternativnog povezivanja, postoje barem 4 izoformna oblika ovog citokina koji pokazuju različite fizičke mogućnosti. Zreli VEGF, prema tome, može sadržavati 121, 165, 189 ili 206 aminokiselinskih ostataka (VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206). VEGF 121 je solubilan, i ne veže se za heparin. Nasuprot tome, VEGF 165 i 189 vežu se za heparin velikim afinitetom. Unatoč ovim fizičkim razlikama, VEGF izoformni oblici imaju identične biološke učinke (61). VEGF posreduje svoju aktivnost pomoću dva transmembranska tirozin kinazna receptora visokog afiniteta. Oni se nazivaju FLT1 i KDR. Aminokiselinska sekvenca FLT1 i KDR podudara se u 44% i oni imaju vrlo slične fiziološke učinke. Oba se sastoje od hidrofobnog proteina kojeg čine sedam imunoglobulinu sličnih petlji u ekstracelularnom matriksu, jedna transmembranska domena i tirozin kinazna sekvenca unutar stanice (62). Osim na endotelnim stanicama krvnih žila, FLT1 i KDR izraženi su na tumorskim stanicama koje luče VEGF. Broj receptora po stanici varira u različitih tkiva in vivo. Različite kulture stanica sadrže oko 3000 kopija FLT1, te oko 40000 KDR. Miševi koji nemaju VEGF receptora ugibaju u embrionalnoj fazi razvoja (63). Nedavno je otkriven nekinazni receptor, nazvan neuropilin (NRP-1). Otkriveno je da on potencira vezanje VEGF-a za KDR. Vežući se za receptor, VEGF pokreće kaskadu događaja koji započinju autofosforilacijom oba tirozin kinazna receptora (59).

Vezanjem VEGF za specifični receptor dolazi do autofosforilacije multiplih tirozinskih rezidua na unutarstaničnoj domeni. VEGF ovisno preživljenje endotelnih stanica je djelomično posredovano putem aktivacije anti-apoptotske kinaze (AKT) pomoću PI3-kinaze (PI3K). Mehanizam aktivacije PI3K za sada još nije razjašnjen. AKT fosforilira i inhibira pro-apoptotski protein zvan Bad, što vodi inhibiciji kaspazne aktivnosti. AKT također uzrokuje Ca^{2+} neovisnu aktivaciju eNOS putem fosforilacije. Ovaj put je neophodan za staničnu migraciju. Glavni mitogeni signalni mehanizam za VEGF je preko

PLCγ puta. Također aktivacija PLCγ vodi hidrolizi fopsfatidilinozitol 4,5-bifosfata, stvaranju inozitol 1,4,5-trifosfata (IP3) i diacilglicerola i posljedičnoj mobilizaciji unutarstaničnog Ca^{2+}. Prenošenjem signala pomoću Ca^{2+} dolazi do eNOS aktivacije čime se stvara NO što rezultira povećanom međustaničnom permeabilnošću. Također PLC aktivacija rezultira aktivacijom PKC što vodi stvaranju COX-izvedenih prostaglandina uključujući PGI_2 i PGE_2 i rezultira vazodilatacijom i povećanom permeabilnošću (64,65). Na slici 1.6. shematski je prikazan signalni put VEGF receptora.

Slika 1.6. Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja VEGF-a za receptor (za objašnjenje vidi tekst)



VEGF ima presudnu ulogu u patološkoj i fiziološkoj angiogenezi i limfangiogenezi. Multifunkcionalni je protein koji pokazuje višestruke učinke na endotelne stanice krvnih žila koji dovode do neoangiogeneze. VEGF stimulira endotelne stanice na migraciju, diobu, formiranje cjevčica i štiti ih od apoptoze i starenja. Na molekularnoj razini, VEGF reprogramira gensku ekspresiju endotelnih stanica, što dovodi do povećane ekspresije

brojnih specifičnih proteina kao što su: prokoagulantni tkivni faktor, proteini koji su uključeni u fibrinolitičke puteve, matriks metaloproteaza, brojni mitogeni i brojni antiapoptotički faktori. Također, njegova druga značajna uloga je da povećava permeabilnost krvnih žila, te je poznat i kao faktor permeabilnosti krvnih žila (VPF). On promovira ekstravazaciju plazmatskog fibrinogena i vodi do odlaganja fibrina, što utječe na tumorski ekstracelularni matriks. Ovako modificirani ekstracelularni matriks, posljedično potiče migraciju makrofaga, fibroblasta i endotelnih stanica (59). Iako primarno djeluje na endotel krvnih žila, VEGF ima učinak i na druge stanice koje izražavaju VEGF receptor. VEGF stimulira monocito/makrofagnu kemotaksiju, te također ima učinak na limfocite, granulocitno-makrofagne progenitorske stanice, osteoblaste, epitelne stanice i neke tumorske stanice (66).

VEGF ima značajne uloge tijekom normalne angiogeneze; u upali, procesima koji su vezani uz zarastanje rana, razvoj embrija, reproduktivnom ciklusu i trudnoći (59). Također, povećanje ekspresije VEGF gena umiješano je u patogenezu raznih bolesti kao što su reumatoidni arthritis (67), dijabetička retinopatija (68), ali se u velikoj mjeri veže se i uz rast tumora, invaziju i metastaziranje (69). VEGF je od kritične važnosti u tumorskoj angiogenezi zbog svoje važne uloge u stimulaciji staničnog preživljavanja, mitogenezi, migraciji, diferencijaciji, kao i krvožilnoj propusnosti i mobilizaciji endotelnih progenitorskih stanica iz u perifernu cirkulaciju. Genetske alteracije i kaotični tumorski mikrookoliš karakteriziran hipoksijom, acidozom, prisutnošću slobodnih radikala i citokina jasno je vezan uz brojne abnormalnosti u ekspresiji i signalingu VEGF-a i njegovih receptora. Povišena je koncentracija serumskog VEGF-a nađena u u pacijenata s različitim tipovima karcinoma. Više vrijednosti ovog faktora rasta koreliraju s lošijom prognozom u nekih solidnih tumora, pa tako i karcinoma pluća ne-malih stanica (69-71). Također, povišena je razina VEGF-a nađena i u pleuralnim izljevima maligne etiologije, bilo da se radilo o primarnim karcinomima pluća ili sekundarnim metastazama (72).

Tumorski izražena VEGF molekula osobito je interesantna kao cilj antitumorske terapije. U posljednje je vrijeme pokazano inhibicija tumorske angiogeneze povećava učinak primjenjene kemoterapije i radioterapije. Različite su supstance sintetizirane s ciljem da blokiraju VEGF ili njegov receptorski signalni sistem u svrhu liječenja tumora. Među

njima najviše se napredovalo s bevacizumabom, humaniziranim monoklonalnim protutijelom usmjerenim na VEGF, te je ono pokazalo obečavajuće rezultate u kliničkim pokusima (73).

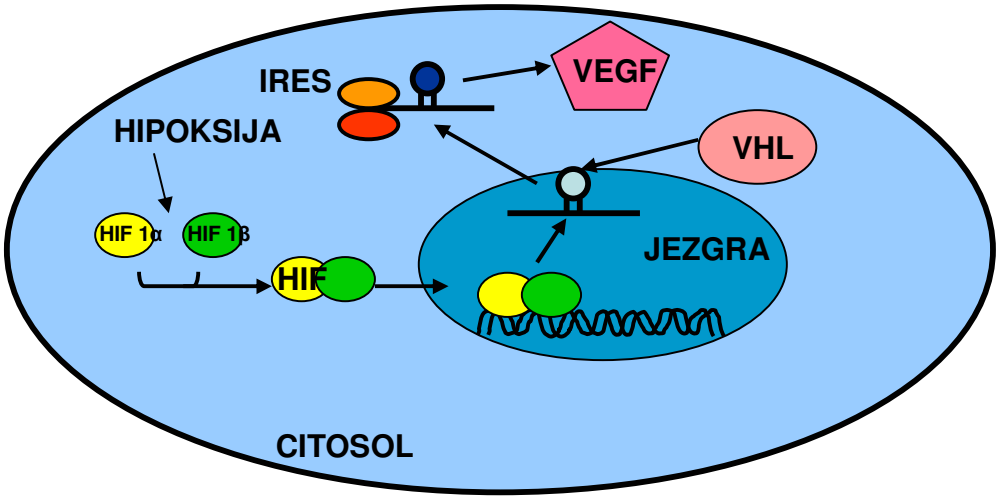
Nedavno je pokazano da su nakon infarkta miokarda HIF-1 i VEGF pojačano izraženi u tkivu miokarda (74). S obzirom na važnu ulogu ovog faktora rasta u neovaskularizaciji, sve je više studija koje pokušavaju naći načina za njegovu primjenu u liječenju ishemičnih bolesti. In vitro eksperimentima pokazano je da promjena ovog faktora rasta može potaknuti angiogenezu i poboljšati perfuziju ishemičnog miokarda, kao i pomoći u liječenju periferne vaskularne bolesti (75).

1.3.1.1. Regulacija ekspresije faktora rasta endotela krvnih žila hipoksijom

Hipoksija je snažan stimulus lučenja VEGF. Porast sekrecije biološki aktivnog VEGF-a djelomično je uzrokovan porastom transkripcije VEGF gena. Kada u hipoksičnim uvijetima dođe do dimerizacije HIF-1α i HIF-1β molekule, ovaj se kompleks veže za elemente odgovora na hipoksiju na 5'-kraju VEGF gena i aktivira njegovu transkripciju. Također, ekspresija VEGF-a značajno raste u hipoksičnim uvjetima zbog porasta stabilnosti VEGF mRNA. Uz to unutarnje ribosomsko ulazno mjesto (IRES) osigurava uspješan ulaz VEGF mRNA u ribosome. VHL (von Hippel-Lindau) tumor supresor protein regulira ekspresiju VEGF na posttranskripcijskoj razini (Slika 1.7.). Hipoksijom inducirana VEGF ekspresija, redovito je vezana s povećanom ekspresijo FLT1 i KDR (76).

Kako je indukcija HIF-1α neophodna za aktivaciju odgovora organizma na hipoksiju potaknuto je pitanje njegove uloge u u krajnjem ishodu ishemične ozljede i da li HIF manipulacija može to popraviti. Nekoliko je strategija uspješno korišteno u eksperimentalnoj aktivaciji HIF-a. Među najuzbudljivijim mogućnostima spominje se korištenje inhibitora HIF hidroksilaza. Inhibicijom HIF hidroksilaza pomoću analoga 2-oksoglutatarata stabilizira se HIF i aktivira transkripcijski odgovor (31).

Slika 1.7. Regulacija ekspresije VEGF-a hipoksijom (za objašnjenje vidi tekst)



1.3.1.2. Odnos faktora rasta endotela krvnih žila, kronične opstruktivne bolesti pluća i respiracijske insuficijencije

In vivo ispitivanja ukazuju da hipoksija u respiratorno insuficijentnih pacijenata može inducirati sintezu VEGF-a. Naime, u pacijenata s sindromom apneje u snu i teškom hipoksijom nađena je povišena razina VEGF-a (77,78). Novija istraživanja upućuju da bi VEGF mogao imati ulogu u patogenezi emfizema i kroničnog bronhitisa, te da bi mogao biti odgovoran za različite patofiziološke manifestacije ovih entiteta. Apoptoza stanica alveolarnih septa doprinosi razvoju emfizema. Pokazano je da je apoptoza koja nastaje u stanicama vaskularnog endotela i alveolarnim epitelnim stanicama, vezana uz reduciranu ekspresiju VEGF-a u plućima (79,80). S druge strane u pacijenata s kroničnim bronhitisom nađene su povišene vrijednosti ovog proteina u sputumu, te autori sugeriraju da povišene vrijednosti VEGF-a povećavaju bronhalnu i žilnu permeabilnost, čime omogućavaju proteinima plazme izlazak u ekstravaskularni prostor, vodeći k edemu i remodeliranju dišnih puteva (81).

1.3.2. Bazični faktor rasta fibroblasta

Faktori rasta fibroblasta čine obitelj koja se sastoji od barem sedam strukturno sličnih polipeptida. Termin faktor rasta fibroblasta prvi je upotrijebio Gospodarowicz 1972.,

opisivajući kationske polipeptide nađene u hipofizi i mozgu. Nakon toga, u mazgu je nađen anionski polipeptid, za koji se pokazalo da je snažan mitogen stanica endotela. Ova su dva faktora danas poznata pod nazivima bazični i kiseli FGF i ujedno su najbolje istraženi članovi obitelji faktra rasta fibroblasta.

Bazični FGF je jednolančani, neglikozilirani kationski polipeptid s molekularnom masom od oko 18 kDa. Njegova važna karakteristika je da ima sposobnost snažnog vezanja za heparin. Zbog toga se još i naziva heparin vežući faktor rasta-2 (82). Polipeptidnu molekulu bFGF-a čini 154 aminokiselina. Prve 23 aminokiseline ove molekule nisu neophodne za njenu biološku aktivnost. Naime, pokazano je da b-FGF molekuli izoliranoj iz nadbubrežne žlijezde, bubrega i žutog tijela nedostaju ove aminokiseline, a ipak je aktivna (83). Nekoliko izvora upućuje da postoji raznolikost većih oblika bFGF-a, s molekularnom masom do 24 kDa. Ona nastaje kao rezultat amino-terminalne ekstenzije proteina stvorenog tako što je translacija započela na CUG, a ne AUG početnim mjestima (84-87). Rezultati sugeriraju da prisustvo ovih amino-terminalnih ekstenzija rezultira lokalizacijom bFGF-a u staničnoj jezgri, a ne u citoplazmi (86,87).

Molekula b-FGF pokazuje visoku strukturalnu podudarnost među vrstama. Tako se ljudska i goveđa molekula b-FGF međusobno razlikuju samo u dvije amino-kiseline (88). Gen koji kodira bFGF nalazi se na četvrtom kromosomu. On se sastoji od tri eksona koji su međusobno razdvojeni pomoću dva velika introna (82).

Receptori velikog afiniteta za b-FGF nađeni su na površini više vrsta stanica, kao što su endotelne stanice, stanice glatkih mišića, fibroblasti, glioma stanice, hondrociti, hepatociti i epitelne stanice (89). Uglavnom se radi o jednolančanim polipeptidima molekularne mase od 110-165 kDa. Pokazano je da su ovi polipeptidi glikozilirani i da je N-vezana karbohidratna rezidua neophodna za njegovu funkciju (90). Signalni putevi pokrenuti vezanjem b-FGF molekule za njegov receptor nisu još u potpunosti razjašnjeni. Vežući se za receptor, b-FGF molekula inducira formiranje DAG i IP3, koji pak nastaju hidrolizom fosfatidilinozitol-4, 5-bifosfata. Za ove se molekule smatra da kao sekundarni glasnici aktiviraju protein kinazu C i mobiliziraju ione Ca^{2+}, te na taj način posreduju mitogenezu (91).

B-FGF je multipotentni faktor koji stimulira staničnu proliferaciju, migraciju, diferencijaciju, a osim toga je kemotaktični faktor za brojne stanice (92). Brojna in vivo

opažanja sugeriraju da FGF ima ulogu u modulaciji fizioloških procesa kao što su angiogeneza, zaraštanje rana i oporavak tkiva, embrionalni razvoj i diferencijacija, neuralna funkcija i neuralna degeneracija.

In vitro je pokazano da b-FGF posreduje u niz procesa neophodnih za angiogenezu. On je kemotaktičan i mitogen za endotelne stanice, stimulira endotelne stanice na proizvodnju kolaginaze i plazminogen aktivatora, te proteaza sposobnih za razgradnju bazalne membrane i inducira endotelne stanice da migriraju u kolageni matriks i formiraju cjevčice (82). Pokazano je da b-FGF ima važnu ulogu u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi. Primjer fiziološke angiogeneze je onaj vezan za reprodukciju. B-FGF je nađen u visokim koncentracijama u placenti, uterusu i žutom tijelu. Njegova sposobnost da stimulira angiogenezu i formiranje granulacijskog tkiva sugerira njegovu važnu ulogu u zarastanju rana. Za b-FGF je pokazano da stimulira proliferaciju stanica mezodermalnog i neuroektodermnog porijekla, uključujući fibroblaste, endotelijalne stanice, astrocite, oligodendrocite, neuroblaste, keratinocite, osteoblaste, glatke mišićne stanice, i melanocite (84,85). B-FGF inducira neuralnu diferencijaciju, preživljavanje i regeneraciju (85) i spašava neurone in vitro i in vivo od lezijom inducirane smrti. B-FGF stimulira ne mitogene funkcije glija stanica, kao što je migracija, i nađen je u područjima hipokampusa, moždanog debla, perifernih glia stanica, i izokorteksa (85).

I on, kao i VEGF, nađen je u povišenoj koncentraciju u ishemičnom miokardu. In vitro eksperimentima pokazano je da b-FGF može potaknuti angiogenezu i poboljšati perfuziju ishemičnog miokarda, kao i pomoći u liječenju periferne vaskularne bolesti (93,94).

1.3.2.1. Regulacija ekspresije bazičnog faktora rasta fibroblasta hipoksijom

Kao što je već prethodno izneseno, HIF-1 je ključni transkripcijski faktor koji regulira stanični odgovor na hipoksiju, uključujući i angiogenezu. Hipoksični stimulus dovodi do brzog porasta razine HIF-1α, kao posljedica redoks stabilizacije. HIF-1α se heterodimezira sa HIF-1β proteinom, kompleks ulazi u jezgru i veže za DNA u području HRE b-FGF gena. Na ovaj način dovodi do aktivacije transkripcije b-FGF gena (95).

1.3.2.2. Bazični faktor rasta fibroblasta u kliničkim modelima karakteriziranim hipoksijom

Niz je radova koji potvrđuju snažnu ekspresiju ovog faktora rasta u hipoksičnim uvjetima, čime se omogućava angiogeneza. Radovi upućuju da b-FGF ima važnu ulogu u vaskularizaciji miokarda za vrijeme hipoksije i ishemije. Naime, makrofazi kao odgovor na hipoksiju, uz VEGF, produciraju b-FGF, te je on nađen značajno povišen u serumu pacijenata s koronarnom bolesti srca, kao i u aterosklerotskim lezijama (75,96). U pacijenata sa solidnim tumorom i pridruženom anemijom nađena je značajna korelacija između sistemske hipoksije i serumskog b-FGF-a. U ovih je pacijenata serumska razina b-FGF-a značajno negativno korelirala s razinom hemoglobina (97). B-FGF ima važnu ulogu i u rastu brojnih tumora i njihovoj angiogenezi (69). Povišene su serumske koncentracije bFGF-a nađene u pacijenata s različitim tipovima karcinoma. Pacijenti s progresivnom bolesti imali su više vrijednosti ovih faktora rasta (69,98). Aguayo i suradnici izvijestili su da su VEGF i bFGF značajno povišene u plazmi CLL pacijenata (99), te je pokazano da je bFGF neophodan za održavanje proliferacije hematopoetskih progenitorskih stanica (98). Nisam našla podataka o razini ovog faktora rasta u uvjetima respiracijske insuficijencije. In vitro istraživanja ukazuju da bi ovaj faktor mogao imati ulogu u etiologiji KOPB-a. Naime, hipoksija inducira produkciju bFGF-a u plućnim vaskularnim pericitima. Pretpostavlja se da povećana ekspresija bFGF u ovim stanicama ima ulogu u njihovoj proliferaciji i diferencijaciji u stanice glatkih mišića i na taj način sudjeluje u etiologiji suženja dišnih puteva (100).

1.4. CITOKINI

Citokini su mali polipeptidi (oko 25 kDa) koje oslobađaju razne vrste stanica, obično kao odgovor na razne vrste stimulusa i izazivaju odgovor vežući se na specifične receptore. Oni mogu djelovati autokrino, djelujući na ponašanje stanice koja ga luči, ili parakrino, djelujući na obližnju stanicu. Neki citokini mogu djelovati endokrino, odnosno utjecati na ponašanje udaljenih stanica. Ovo njihovo svojstvo ovisi o njihovoj sposobnosti da uđu u cirkulaciju i o njihovom poluvremenu života. Kemokini su podskupina citokina koji imaju kemotaktična svojstva, odnosno sposobnost poticanja stanica s odgovarajućim receptorima da migriraju prema izvoru citokina. Termin interleukini je stvoren u

nastojanju da se razvije standardizirana nomenklatura za molekule secernirane od i leukocita koje ujedno i djeluju na njih (101).

1.4.1. Interleukin-1β

Interleukin 1 uključuje dva različita proteina. Interleukin-1α (IL-1α) i interleukin-1β (IL-1β). Oni imaju centralnu ulogu u akutnoj i kroničnoj upali, kako lokalno tako i sistemski (102). Dok je IL1-β predominatni oblik u ljudi, IL1-α je dominantni oblik u miševa. Humani IL-1β sintetizira se kao prekursor od oko 35 kDa odnosno 269 aminokiselina. Zreli protein nastaje proteolitičkim cijepanjem brojnih proteaza. Zreli IL-1β sastoji se od 152 aminokiselina i molekularne je mase 17 kDa (103). IL-1β primarno stvaraju monociti i makrofagi, ali također i astrociti, oligodendroglija stanice, stanice kore nadbubrežne žlijezde, NK stanice, endotelne stanice, keratinociti, megakariociti, trombociti, neuroni, neutrofili, osteoblasti, Schwannove stanice, trofoblast, T stanice i fibroblasti (104,105). Najopširnije studije funkcije IL-1 odnose se na inicijaciju upale. Bakterijski endotoksin ili različiti ne-mikrobijalne upalne supstance induciraju produkciju IL-1, koji se oslobađa u okoliš. IL-1 inducira kapilarne endotelne stanice da secerniraju kemokine (npr. MCP-1) i da povećaju ekspresiju staničnih adhezijskih molekula (npr. E-selektin, ICAM-1 i VCAM-1) (106,107). MCP-1 aktivira mononuklearne stanice i potiče njihovu infiltraciju u okolno tkivo (108). Zajedno s IL-12, IL-1 potiče sekreciju interferona-γ (INF-γ) od NK stanica, što dovodi od daljnje aktivacije makrofaga (109,110). Također, IL-1 inducira ekspresiju MMP, što vodi k degradaciji ekstracelularnog matriksa i migraciji monocita, i pomoću MMP kataliziranoj degradaciji IL-1β (111). Učinak IL-1 nije samo ograničen na upalna zbivanja. IL-1 je povezan s oblikovanjem kostiju, njihovim remodeliranjem, sekrecijom inzulina, regulacijom apetita, regulacijom tjelesne temperature, razvojem neuronalnog fenotipa (Slika 1.8.) (112).

Učinak IL-1 je posredovan IL-1 receptorima. Mnoge stanice izražavaju dva tipa površinskih IL-1 vežućih proteina (IL1 RI i IL1 RII), te također i ne-vežući receptor pomagački protein (IL-1 RacP) (113). Prijenos signala vodi k NF-κB reguliranoj transkripciji. IL-1 RII veže IL-1, ali ne prenosi signal. Zbog toga se smatra receptorom koji sudjeluje u zaustavljanju signala (114,115).

1.4.2. Interleukin-6

Molekula IL-6 veličine je 26 kDa. Humana IL-6 cDNA sekvenca kodira protein od 212 aminokiselinskih ostataka u nizu s dva potencijalna N-glikosalna mjesta. Hidrofobni, N-terminalni, 28 aminokiselinski rezidualni signalni peptid cijepa se da bi nastao zreli protein od 184 amino kiselina s četiri cisteinske rezidue i pretpostevljene je mase od 21 kDa (116). Mišja IL-6 cDNA sekvenca je, na razini aminokiselina, 42% homologna s ljudskom (116). Sekvenca genomnog DNA za IL-6 upućuje da se gen za ovaj faktor sastoji od pet eksona i četiri introna. IL-6 je multifunkcionalni protein kojeg uglavnom stvaraju stimulirani monociti, fibroblasti i endotelne stanice. Makrofagi, T i B limfociti, granulociti, glatke mišićne stanice, keratinociti eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mastociti i glijastanice također mogu producirati IL-6 nakon stimulacije. Stvaraje IL-6 u ovim različitim stanicama regulirano je, ili pozitivno, ili negativno, različitim signalima koji uključuju IL-1, bakterijske endotoksine, TNF, PDGF, onkostatin M i viruse (19). Učinak IL-6 na različite stanice je brojan i raznolik. Učinak na B-limfocitne stanice je stimulacija diferencijacije i stvaranje protutijela (117). IL-6 također djeluje na T-limfocite, djelujući kao ko-stimulans, stimulirajući IL-2 produkciju i IL-2 ekspresiju. IL-6 pokazuje aktivnost faktora rasta za zrele stanice timusa ili perifene T-stanice i potiče diferencijaciju citotoksičnih T-stanica u prisustvu IL-2 ili INF-γ (118). IL-6 stimulira produkciju proteina akutne faze u hepatocitima i sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature (Slika 1.8.)(19). On ima učinak stimuliranja kolonija hematopoetskih stanica koštane srži (119). IL-6 također pokazuje i učinak faktora rasta i stimulira rast plazmocitoma (120), EBV-transformiranih B stanica (121), keratinocita i mezanglijskih stanica (19). Dodatne aktivnosti koje se pripisuju IL-6 uključuju: inhibiciju rasta i indukciju terminalne diferencijacije M1 mijeloidnih leukemijskih stanica (122), indukciju diferencijacije neurona (123), indukciju sazrijevanja megakariocita (19). Različita predhodno opisana djelovanja IL-6, upućuju da ovaj faktor ima značajnu ulogu posredovanju upalnog i imunog odgovora iniciranog infekcijom ili ozljedom. Iako točna funkcija IL-6 in vivo nije poznata, izvještavano je da se povišene vrijednosti IL-6 povezene uz brojne bolesti, uključujući autoimune bolesti kao što je artritis, mezanglijski proliferativni glomerulonefritis (19), psorijaza (124), upalne bolesti crijeva (125). Ekspresija IL-6 povećana je u tkivima koje prolaze kroz aktivnu angiogenezu, iako on

nema sposobnost indukcije proliferacije endotelnih stanica. IL-6 inducira neoangiogenezu indirektno inducirajući ekspresiju VEGF-a (126). Nedostatak gena za IL-6 u miševa očituje se smanjenjem reakcije akutne faze upale i smanjenom produkcijom IgA (101).

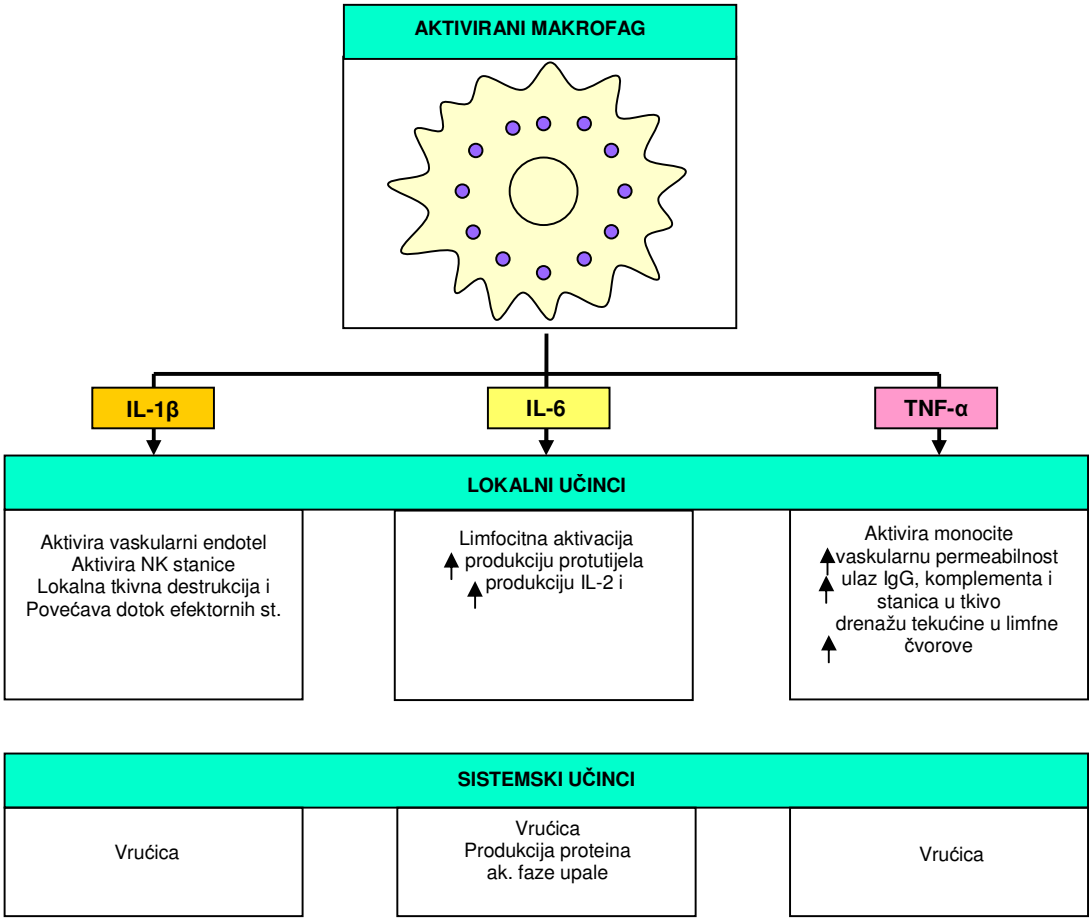
1.4.3. Faktor nekroze tumora-α

Faktor nekroze tumora-α (TNF-α) je citokin koji ima centralnu ulogu u upali i apoptozi. TNF-α je transmembranski, nekovalentno vezani homotrimerni protein. Sastoji se sastoji od 185 aminokiselina koje su glikozilirane na poziciji 73 i 172. Sintetizira se kao prekursorski protein od 212 aminokiseline. Monociti izražavaju barem pet različitih molekularnih formi TNF-α mase od 21,5-28 kDa. Oni se uglavnom razlikuju prema posttranslacijskoj alteraciji kao što su glikozilacija i fosforilacija (127). Solubilna forma TNF-α je rezidua od 157 aminokiselina. Ona se otpušta od C terminalnog dijela trensmembranskog proteina, aktivnošću TNF-α-konvertirajućeg enzima (TACE), membranski vezane dezintegrirane metaloproteinaze (128). Glavni izvor TNF-α su stimulirani monociti, fibroblasti i endotelne stenice. Makrofazi, T i B limfociti, granulociti, glatke mišićne stanice eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mastociti, glija stanice i keratinociti također mogu producirati TNF-α nakon stimulacije. Fiziološki stimulusi za produkciju TNF-α su IL-1, bakterijski endotoksini, PDGF i onkostatin M (101).

Dva identificirana receptora s visokim afinitetom za humani TNF-α su TNF RI i TNF RII. Uloga TNF- α i njegovih receptora u obrani domaćina i upalnim odgovorima dobro je dokumentirana. Za TNF-α izvještavano je da potiče infiltraciju upalnih stanica potičući adheziju leukocitnih molekula na stanice endotela, djeluje kao kemotaktična tvar za monocite i aktivira mehanizam ubijanja fagocita (129). Nedostatak TNF-α ili njegovih receptora može povećati podložnost infekcijama intracelularnim patogenima kao što je Listerija, dovodi do periodične pojave febrilnih stanja (101). TNF-α također može imati ulogu u razvoju limfoidnog tkiva. Miševima koji nemaju gen za TNF-α nedostaju B stanični folikuli slezene i sposobnost da oblikuju germinalne centre (130). Druga potencijalna fiziološka uloga TNF-α i njegovih receptora uključuje regulaciju diferencijacije matičnih hematopoetskih stanica i progenitorskih stanica (131). Uz TNF-α

vežu se i brojni patofiziološki procesi. Povezan je s nereguliranom pro-upalnim djelovanjem i smatra se da je centralni medijator endotoksin-induciranog septičkog šoka (132). TNF-α djeluje na krvne žile, osobito venule povećavajući protok krvi, povećavajući vaskularnu permeabilnost što dovodi do ekstravazacije imunoglobulina G, komplementa, tekućine i stanica. Također povećava endotelnu adhezivnost za leukocite i trombocite. Na taj način njegovo lokalno otpuštanje dovodi do izlaska tekućine, proteina i stanica u inficirano tkivo. Povećana količina tekućine drenira se u limfne čvorove i na taj način TNF-α doprinosi obrani domaćina (Slika 1.8.). Također dolazi do formiranja ugrušaka u malim žilama čime se sprječava širenje infekcije. Kada postoji sistemska infekcija, ili sepsa s bakterijama koje potiću produkciju TNF-α, tada se on oslobađa iz makrofaga u krv i na sličan način djeluje na sve male krvne žle. To tada može dovesti do septičnog šoka, diseminirane intravaskularne koagulacije i posljedičnog multiplog otkazivanja organa i smrti (101). Kaheksija (ili gubitak tjelesne mase) također se veže uz dugotrajno cirkuliranje TNF-α (133). Druge bolesti s potencijalnim učinkom TNF- α uključuju asmu (134), tip 2 dijabetes (135), Crohnovu bolest (134), i reumatoidni artritis (136).

Slika 1.8. Lokalni i sistemski učinci citokina (za objašnjenje vidi tekst)



1.4.4. Citokini i hipoksija

Osim upalnim zbivanjem, sve je više znanstvenih dokaza da hipoksija inducira značajne promjene imunološkog sustava, a mononuklearne stanice su osobito osjetljive na hipoksemiju u zdravih ljudi (138). In vitro studije ukazuju da hipoksija potiče endotelne stanice krvnih žila na sekreciju IL-6 što dovodi do povećanja njihove propusnosti (139). Produkcija IL-6 potaknuta hipoksijom nastaje zbog aktivacije jezgrinog faktora-κB (140). Ovu sposobnost sekrecije IL-6 kao odgovor na hipoksiju također pokazuju i stanice glatkih mišića krvnih žila i mononukleari. Kako ove stanice zadržavaju vijabilnost nakon izlaganja hipoksiji, autori smatraju da se radi o fiziološkom odgovoru na hipoksiju, a ne patofiziološkom učinku kao posljedici stanične ozljede (141,142). Pokazano je da je produkcija IL-6 viša u monocita pacijenata koji boluju od sindromom apneje tijekom

spavanja, te da primjena kontinuirane nazalne ventilacije s pozitivnim tlakom (CPAP) značajno smanjuje razinu serumskog IL-6 kao i njegovu produkciju u monocitima (143,144). U eksperimentalnim hipoksičnim uvijetima humani alveolarni makrofazi i mononuklearne stanice periferne krvi pojačano luče IL-1β (145,146). U eksperimentalnim uvijetima, hipoksija potiče produkciju TNF-α u humanim alveolarnim makrofazima (145), mononuklearima i makrofazima periferne krvi (146,147). Također, sistemska hipoksija se veže uz aktivaciju TNF-α sistema u pacijenata s KOPB-om (148). Nadalje, u pacijenata s sindromom apneje tijekom spavanja povišena je razina TNF- α (143).

1.4.5. Citokini u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti

KOPB je karakterizirana prisutnošću kronične lokalne upale dišnih puteva, a sve je više znanstvenih dokaza sistemske upale u pacijenata s stabilnom bolesti, kao i tijekom epizode akutnog pogoršanja.

Nije u potpunosti jasan mehanizam na koji se u bolesnika s KOPB-om razvija sistemska upala. Postoji mogućnost da se upalni proces širi iz lokalno zahvaćenih dišnih puteva i plućne vaskulature kroz sistemsku cirkulaciju potičući generaliziranu reakciju. Također postoji mogućnost postojanja genetskih odnosno konstitucionalnih faktora koje predisponiraju pacijente s KOPB-om na sistemsku i lokalnu upalu. Uz to, ne može se ni potpuno odbaciti potpuno obrnuta hipoteza, odnosno da sistemska upala uzrokuje oštećenja dišnih puteva što dovodi do KOPB-a (149).

Najčešći uzroci akutnog pogoršanja KOPB-a su infekcije traheobronhalnog stabla i zagađenje zraka (2). Prema nekim istraživanjima u oko polovice pacijenata akutna pogoršanja KOPB uzrokovana su bakterijskim infekcijama (150), a Seemungal i suradnici pokazali su da je oko 40% pogoršanja KOPB uzrokovano virusnom infekcijom, uglavnom rinovirusima (151). Iako se zagađenje zraka smatra važnim uzrokom pogoršanja KOPB-a, mehanizam ovog pogoršanja je uglavnom nepoznat. Kako su pogoršanja ove bolesti usko vezana uz virusne infekcije, postoji hipoteza da zagađenje samo povećava osjetljivost na virusne infekcije (152). IL-1, IL-6, TNF-α predstavljaju proinflamatorne citokine koji se oslobađaju različite vrste stanica i imaju široki spektar djelovanja u upalnom i imunološkom odgovoru. Povišena razina IL-1β, IL-6, TNF-α i IL-

8 nalazi se u sputumu KOPB pacijenata, a ona dodatno raste tijekom pogoršanja ove bolesti (153). Akutna su pogoršanja KOPB-a vezana uz virusnu ili bakterijsku infekciju karakterizirana su povećanom lokalnom i sistemskom produkcijom IL-6 (154-156). Bakterijska upala dišnih puteva dovodi do lućenja IL-1β i TNF-α, proinflamatornih citokina koje predominantno luče alveolarni makrofazi te predstavlja prvu liniju obrane od plućnih patogena (157). Akutna virusna infekcija s rinovirusima i respiratornim sincicijskim virusom stimulira monocite na sintezu IL-6 (151,156). Picornavirusi, odgovorni za prehladu, također induciraju lokalnu sintezu IL-6 u dišnim putevima (158). U 24% pacijenata sa stabilnim KOPB-om identificirana je infekcija respiratornim sincicijskim virusom, a u 16% neki drugi virusi. U pacijenata u kojih je u stabilnom stanju identificirana virusna infekcija imaju veću koncentraciju serumskog IL-6 (151).

Studije izvještavaju da TNF-α može imati potencijalnu ulogu u procesima gubitka masnog tkiva i skeletne muskulature što vodi do kaheksije (159). Serumska razina TNF-α nađena je viša u KOPB pacijenata s manjim BMI, što se povezuje s njegovim učinkom na tjelesnu masu i održavanje energetske homeostaze, te u posredovanje akutnog upalnog odgovora (145,159,161). Polimorfizam promotornog područja TNF-α gena vezan uz njegovu pojačanu produkciju, etološki se povezuje uz KOPB u Tajvanske populacije, no on nije potvrđena u drugim studijama (162, 163). Joos i sur pokazali su da je polimorfizam gena za IL-1β vezan uz stupanj pada plućne funkcije u pušaća, što upućuje na povećanu genetsku predispoziciju za razvoj oštećenja pluća (164).

1.4.6. Utjecaj citokina na eritropoezu

Kao što je navedeno, većina KOPB pacijenata s pridruženom respiracijskom insuficijencijom pokazuju neadekvatan eritropoetski odgovor na hipoksični stimulus. Pacijenti sa kroničnom upalom, što je karakteristika KOPB-a, često imaju anemiju karakteristika anemije kronične bolesti (AKB).

Više različitih faktora doprinose razvoju AKB. Novije studije ukazuju na to da anemija kronične bolesti (AKB) može biti posljedica aktivacije imunog i upalnog sistema i oslobađanja citokina kao što su IL-1, TNF-α i INF-γ koji potencijalno mogu posredovati razvoju anemije. Koncentracija ovih citokina povišena je u plazmi pacijenata s tumorom ili drugim kroničnim bolestima i korelira s stupnjem anemije. U pacijenata s reumatoidnim artritisom, nađena je povišena serumska koncentracija IL-1, te je ona

značajno korelirala sa stupnjem anemije (165). Kliničke i eksperimentalne studije pokazuju da kronično izlaganje TNF-α može dovesti do anemije (166). Pacijenti koji su u sklopu prve faze kliničkih studija primali TNF-α razvili su anemiju, neovisno o dozi primjenjenog lijeka (167). Miševi i štakori u kojih je kronično primjenjivan TNF-α, također su razvili anemiju koja je imala karakteristike AKB (166).

U AKB životni vijek eritrocita je skraćen, ali važniji faktor koji doprinosi razvoju anemije je nespospobnost eritropoeze da dostatno kompenzira ovaj skraćeni vijek E. Mehanizmi koji su uključeni u ovaj proces su: 1) oštećeni metabolizam željeza, 2) supresija eritrogenih progenitorskih stanica i 3) neadekvatna produkcija EPO. Studije ukazuju da svi ovi procesi mogu biti posredovani citokinima. U kliničkim studijama, izolirana perfuzija uda s rekombiniranim humanim TNF-α dovodi do hipoferemije, produkcije feritina i smanjenja cirkulirajućeg transferinskih receptora (168). IL-1 može Razina EPO u plazmi pacijenata koji pate od teške upale često je niska u odnosu na koncentraciju hemoglobina u krvipovećati produkciju feritina, što može djelovati kao hvatač željeza koji bi inače bio korišten za eritropoezu (169). Tijekom infekcija, malgnih bolesti ili imunoloških bolesti, IL-1, IL-6, TNF-α induciraju produkciju α1-antitripsina, proteina akutne faze koji je sposoban inhibirati vezanje transferinskog receptora za transferin (170). Ponavljana primjena TNF-α u štakora dovodi do diseritropoeze i skraćenja životnog vijeka eritrocita (166).

IFN-γ, IL-1 i TNF-α imaju suprimirajući učinak na eritrogene progenitorske stanice kao što su CFU-E. U pacijenata s AKB, eritroidne progenitorske stanice normalno odgovaraju na EPO in vitro, ali je njihov rast suprimiran in vivo (170). Ovaj neadekvatan odgovor vjerojatno je posljedica supresivnog efekta IL-1-α ili β i TNF-α na stanice. Čini se da TNF također ima direktni utjecaj na eritrogene progenitorske stanice potencirajući njihovu apoptozu (171). Inhibitorni efekt IL-1 i TNF-α na CFU-E u miševa može biti poništen primjenom EPO (172). Ovaj nalaz sugerira da terapeutski učinak rhEPO zamijećen u pacijenata s AKB može djelomično biti posljedica poništenja supresivnog efekta citokina na eritrogene progenitorske stanice (173). Mehanizmi inhibicije produkcije EPO biti će detaljnije izneseni u daljnjem tekstu.

1.4.7. Odnos citokina i eritropoetina

Iako je produkcije EPO uglavnom regulirana parcijalnim tlakom kisika, neka istraživanja pokazuju da in vitro i u nekim kliničkim stanjima ona može biti modulirana pomoću citokina, hormona i genetskim alteracijama (165-167, 173-179). IL-1β, IL-6 i TNF-α inhibiraju hipoksijom potaknuto lučenje EPO iz stanica hepatoma - Hep3B stanica. Ovaj učinak direktno je ovisan o dozi primjenjenih citokina, pri čemu je IL-1β ima najjači učinak. Supresivni efekti IL-a i TNF-α na produkciju EPO stanica hepatoblastoma nastaje na razini EPO mRNA. IL-1α ili β i TNF-α mogu inhibirati produkciju EPO u izoliranim stanicama bubrega štakora (180). Novije studije sugeriraju pak da IL-1β i TNF-α suprimiraju in vitro ekspresiju EPO gena i sekreciju EPO proteina aktivacijom transkripcijskih faktora GATA-2 i NF-κB (181). Eksperimentalni podaci upućuju da TNF-α, iz aktiviranih makrofaga, može izazvati stabilizaciju HIF-1 u stanicama pod normooksičnim uvjetima, te da IL-1β i TNF-α stimuliraju vezanje HIF-1 za DNA (174-176).

U pacijenata sa kroničnim upalnim bolestima, solidnim tumorima i leukemijama pokazano je da TNF-α može pojačati supresivni efekt na sekreciju EPO (167-179).

1.4.8. Odnos citokina i faktora rasta krvnih žila

Brojne studije koje koriste modele karakterizirane neovaskularizacijom potaknutom različitim stimulusima kao što je hipoksija, kronična upala, rast tumora, cijeljenje upućuje na povećanu ekspresiju proinflamatornih citokina i faktora rasta u ovim modelima, te na njihovu međusobnu povezanost. Dok studije uglavnom upućuju na inhibitorni učinak proinflamatornih citokina na ekspresiju EPO, sugeriraju poticajni učinak na sintezu faktora rasta krvnih žila. U daljnjem tekstu detaljnije će biti opisan ovaj međuodnos.

1.4.8.1. Odnos citokina i vaskularnog endotelnog faktora rasta

Kao i eritropoetina, i ekspresija VEGF gena je uz hipoksijom, modulirana brojnim faktorima uključujući citokinima i hormonima. Na mišjem modelu ishemične retinalne neovaskularizacije, pokazano je da se makrofazi/mikroglija stanice aktiviraju nakon ishemije. Pokazano je da razina TNF-α značajno viša četiri dana nakon hipoksije, te da on sudjeluje u retinalnoj neovaskularizaciji putem indukcije sinteze VEGF-a (182).

Indukcija ekspresija VEGF-a pomoću TNF-α pokazana je i na modelu humanih glioma stanica (183). U normooksičnim uvjetima IL-1β povećava koncentraciju HIF-1α proteina i aktivira VEGF gen putevima koji su ovisni o NF-κB. Također IL-1 povećava stabilnost VEGF mRNA (184). IL-6 povećava ekspresiju VEGF-a transkripcijskim mehanizmom preko STAT-3 (185). Učinak IL-6 nije posredovan isključivo pomoću DNA elemenata u području promotorskog područja, nego i kroz specifične motive locirane u području 5'-netranslatiranog područja VEGF mRNA (186).

1.4.8.2. Odnos citokina i bazičnog faktora rasta fibroblasta

In vitro studije upućuju da bi IL-6 mogao posredovati pojačanu regulaciju bFGF-a. Smatra se da ovaj učinak nastaje preko JAK/STAT3 i PI3-kinaza/AKT puteveva (187). Također, eksperimenti upućuju da TNF-α ima utjecaja na ekspresiju ovog faktora rasta, no podaci su kontradiktorni. Dok eksperimentalni radovi na glija stanicama retine upućuju da TNF-α stimulira njegovu ekspresiju, eksperimanti s mastocitima ukazuju da TNF-α smanjuje ekspresiju b-FGF m-RNA (186,188). Uz to, studije ukazuju da b-FGF može inducirati sintezu VEGF-a (183).

1.5. CILJEVI

Opći je cilj ovog istraživanja je ocijeniti da li postoji određen odnos između razine EPO, VEGF-a, bFGF-a, te citokina IL-1β, IL-6, TNF-α prije i poslije korekcije hipoksije u složenom kliničkom modelu KOPB pacijenata s akutnim pogoršanjem kronične respiracijske insuficijencije.

Specifični ciljevi su slijedeći:

1. Opisati temeljne karakteristike ispitivane populacije.
2. Opisati nalaz parametara krvne slike (E, Hb, Hct, L, Tr), EPO, ispitivanih angiogenetskih faktora (VEGF, bFGF) i citokina (IL-1β, IL-6, TNF-α) u hipoksemičnih KOPB bolesnika.
3. Odrediti međusobnu povezanost EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α, te njihovu povezanost s ostalim varijablama u stanju značajne hipoksije. Definirati prediktorske varijable koje najbolje predskazuju EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α kao zavisne varijable.
4. Ocijeniti mogućnost definiranja latentnog sažimanja velikog broja parametara.

5. Prikazati dinamiku respiracijskih, hematoloških parametara i EPO nakon korekcije hipoksemije, tijekom 28 dana praćenja. Prikazati promjenu VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α 24 sata nakon korekcije hipoksemije.
6. Ocijeniti međusobne povezanosti EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α, te njihovu povezanost s ostalim varijablama nakon korekcije hipoksemije.
7. Ocijeniti da li među brojnim inicijalno određenim faktorima postoje varijable koje predskazuju DLO_2 kao krajni ishod liječenja.

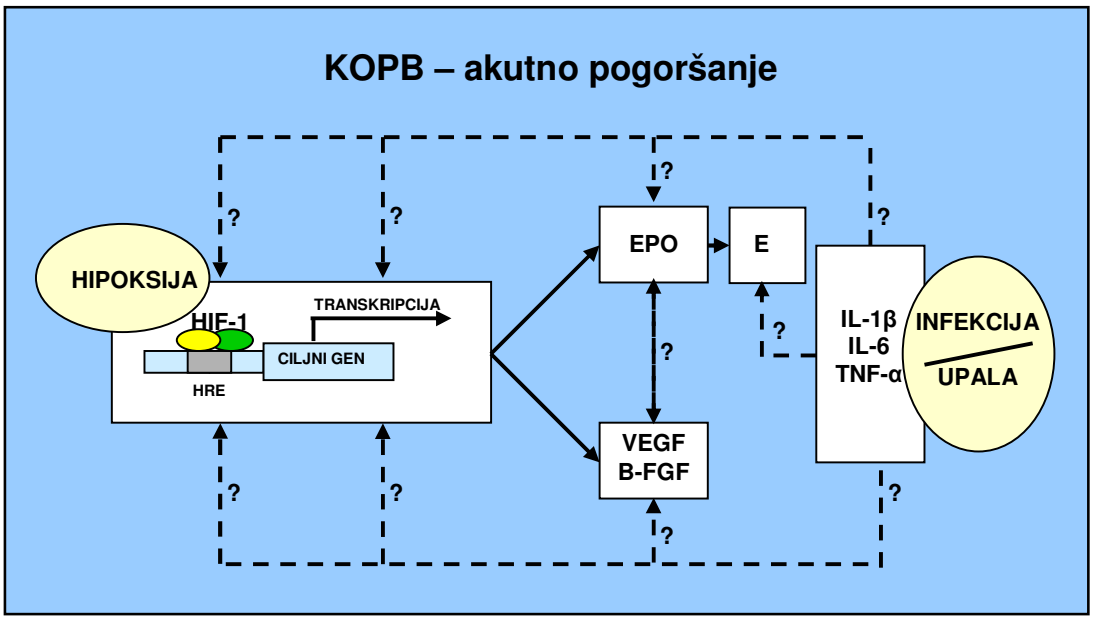
1.6. SVRHA RADA

Nadamo se da će ovo istraživanje pridonijeti nadopuni postojećeg znanja o odnosu između hipoksije, eritropoeze i angiogeneze u složenom kliničkom modelu KOPB-a s posljedičnom respiracijskom insuficijencijom. Također, nadamo se da će rezultati ovog rada pridonijeti boljem poznavanju patogeneze ove bolesti, te da će posredno, ali i neposredno unaprijediti kliničku praksu u rješavanju ovog čestog kliničkog problema.

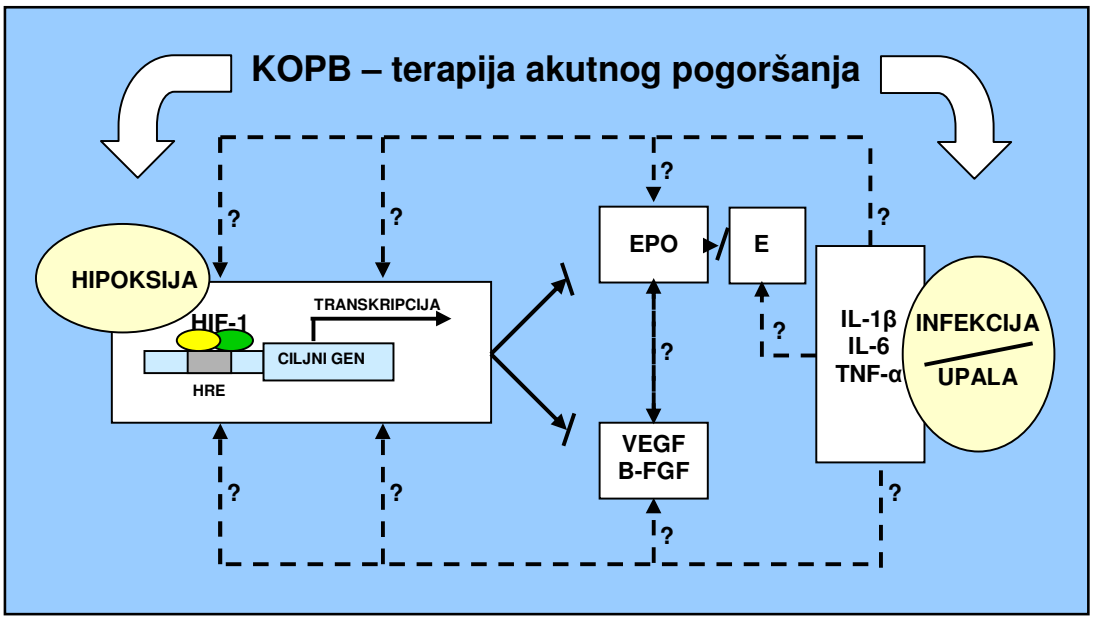
2. HIPOTEZA

U ovom radu želimo istražiti dvije hipoteze. Prva je da postoji određeni odnos, tj. povezanost između istraživanih parametara u KOPB modelu vezanom uz značajnu hipoksiju. Druga temeljna hipoteza je da nakon korekcije hipoksemije i započete ostale terapije koja ima i protuupalne učinke, dolazi do promjene u razini izraživanih čimbenika (slika 1.9.a. i 1.9.b.). Kao nit vodilja odabran je odnos između hipoksije i eritropoeze, koji se uvelike razlikuje u istraživačkom kliničkom modelu od dobro utemeljene fiziološke situacije.

Slika 2.1.a. Model za istraživanje odnosa između hipoksije, faktora rasta i citokina (za objašnjenje vidi tekst)



Slika 2.1.b. Model za istraživanje odnosa između faktora rasta i citokina nakon korekcije hipoksije (za objašnjenje vidi tekst)



3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Ispitivanu populaciju činilo je 57 KOPB pacijenata. U istraživanje su konsekutivno obuhvaćeni svi KOPB bolesnici hospitalizirani radi akutnog pogoršanja kronične respiracijske insuficijencije. Ispitanici su zadovoljavali slijedeće kriterije za uključivanje, odnosno isključivanje iz studije:

3.1.1. Kriteriji za uključivanje:

- KOPB čija je dijagnoza postavljena u u skladu s dijagnostičkim kriterijem Američkog pulmološkog društva (185).
- PaO_2 pri primitku $\leq$ 53 mmHg.

3.1.2. Kriteriji za isključivanje:

- neadekvatna renalna i hepatalna funkcija (vrijednost serumskog kreatinina, ureje i jetrenih enzima više od 3 puta iznad referentnih vrijednosti)
- nekontrolirana sistemska infekcija
- predhodno dijagnosticirana maligna bolest
- predhodno dijagnosticirana sistemska upalna bolest
- primjenom kisika nepostignuta korekcija $PaO_2 \geq$ 50-60 mmHg, odnosno Sat $\geq$ 80-90%
- predhodno započeto dugotrajno liječenje kisikom
- psihičko stanje kod kojeg se ne očekuje suradnja pacijenta

3.2. PLAN RADA

U pacijenta koji su zadovoljili ulazne kriterije, prije započete terapije uzeta je krv za inicijalne nalaze. Inicijalni nalazi uključivali su: analizu dišnih plinova u arterijskoj krvi i acidobaznog statusa (PaO_2, $PaCO_2$, $SatHbO_2$, i pH), kompletnu krvnu sliku (E, Hb, Hct, MCV, MCH, L, Tr), rutinske biokemijske nalaze (AST, ALT, GGT, bilirubin, urea, kreatinin), EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α.. Potom je započeto liječenje u skladu s dobrom kliničkom praksom. U skladu s individualnim potrebama pacijenta korišten je kisik, β2-agonisti, antikolinergici, teofilin, kortikosteroidi, diuretici, hipotenzivi,

antibiotici. Kisik je primjenjivan kontinuirano, 24 sati dnevno, u najmanjem protoku kojim je zadovoljavajuće korigirana hipoksemija. Kisik je primjenjivan nazalnom sondom, a ukoliko je pacijent retinirao CO_2 korištena je Venturi maska. Cilj terapije kisikom bila je korekcija hipoksemije na $PaO_2 \geq$ 50-60 mmHg, ili $SaHbO_2 \geq$ 80-90% (9). Radi procjene adekvatnosti korekcije hipoksemije, sat vremena po početku liječenja učinjena je analiza dišnih plinova u arterijskoj krvi i ovisno o nalazima korigiran je protok kisika. U pacijenata u kojih je postignuta zadovoljavajuća korekcija hipoksemije nastavljeno je praćenje laboratorijskih parametara. Dišni plinovi u aretrijskoj krvi i acidobazni status, parametari krvne slike, rutinski biokemijski parametri, te EPO određivani su drugi, osmi, četrnaesti i dvadeset i osmi dan liječenja. Analiza VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α ponovljena je drugog dana liječenja. Tablica 3.1. prikazuje raspored učinjenih laboratorijskih analiza.

Po postignutom maksimalnom kliničkom poboljšanju provedeno je testiranje plućne funkcije. Maksimalno kliničko poboljšanje procjenjeno je temeljem anamnestičkih podataka, kliničkog pregleda i laboratorijskih analiza. Smatrano je da je ono postinuto ukoliko su ovi parametri govorili u prilog rješavanja razloga akutnog pogoršanja. Također, ono je podrazumjevalo značajno smanjenje subjektivnih tegoba bolesnika, poboljšanje auskultatornog nalaza nad plućima, stabilne vrijednosti dišnih plinova u razmaku od barem dva dana.

U pacijenata u kojih je nakon maksimalnog kliničkog oporavka postojala još uvijek potreba za primjenu kisika postavljena je indikacija za dugotrajno liječenje kisikom. Kriteriji za dugotrajno liječenje kisikom bili su: $PaO_2 \leq 55$ mmHg pri udisanju sobnog zraka, ili $PaO_2 \leq 60$ mmHg uz prisutnost policitemije, kliničkih znakova plućnog srca ili plućne hipertenzije (2,9).

Tablica 3.1.: Raspored učinjenih laboratorijskih analiza

vrijeme / param.	start	1. sat	2. dan	8. dan	14. dan	28. dan
ABS	+	+	+	+	+	+
KKS	+		+	+	+	+
biokem.	+		+	+	+	+
EPO	+		+	+	+	+
VEGF	+		+			
bFGF	+		+			
IL-1β	+		+			
IL-6	+		+			
TNF-α	+		+			

3.3. LABORATORIJSKI TESTOVI

3.3.1. Analiza dišnih plinova, acidobaznog statusa

Za određivanje dišnih plinova i acidobaznog statusa uzimana je arterijske krv u heparinizirani špricu. Ovi parametri analizirani su rutinskom metodom, a za analizu je korišten aparat naziva "1306pH/ Blood Gas Analyzer" proizvođača Instrumentation Laboratory.

3.3.2. Analiza parametara krvne slike i biokemijskih parametara

Za određivanje parametara krvne slike (E, Hb, Hct, MCV, MCH, Tr i L), biokemijskih parametara (AST, ALT, GGT, bil, urea, kreatinin) korištena je venska krv. Ovi su parametri analizirani rutinskom laboratorijskim testovima.

Parametri krvne slike određivani su na hematološkom analizatoru «Coulter», model «Microdiff 18».

Za referentni interval hematoloških parametara korištene su vrijednosti dobivene u sklopu istraživanja autorica Flegar-Meštrić Z. i Jagarinec N (189). Na temelju tog istraživanja referentni raspon broja E za muškarce iznosi 4,34 - 5,72 x 10^{12}/L, koncentracije

hemoglobina 138 - 175 g/L, hematokrita 0,415 - 0,53. Za žene referentni raspon broja E iznosi 3,86 - 5,08 x 10^{12}/L, hemoglobina 119 - 157 g/L, hematokrita 0,356 - 0,47. Referentni raspon za MCV iznosi 83 – 97,2 fl, a za MCH 27,4 – 33,9 pg. Referentni interval za broj L iznosi 3,4 -9,7 x 10^9/L, a za broj Tr 158 – 424 x 10^9/L.

Biokemijski parametri (AST, ALT, GGT, bilirubin, urea, kreatinin) određivani su na biokemijskom analizatoru «Cobas Miri» proizvođača «Roche». Sve su metode standardizirane po IFCC-u.

Referentne vrijednosti AST za muškarce su do 38 U/L, za žene do 30 U/L.

Referentne vrijednosti ALT za muškarce su do 48 U/L, za žene do 36 U/L.

Referentne vrijednosti GGT za muškarce su 11 - 55 U/L, za žene 9 - 35 U/L.

Referentne vrijednosti bilirubin su 5 – 26 μmol.

Referentne vrijednosti ureje su do 2,6 – 8,3 mmol.

Referentne vrijednosti kreatinina su do 35 – 115 μmol.

3.3.3. Određivanje koncentracije eritropoetina u krvnom serumu

EPO je mjeren pomoću komercijalno dostupnog ELISA testa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Sangui Bio Tech Inc. – Santa Ana, CA, USA)). Za ovaj test koristi se krvni serum bez dodataka. Reagens se sastoji od ovčjih poliklonalnih protutijela na humani EPO vezanih za biotin i mišjih monoklonalnih protutijela na humani EPO vezanih za peroksidazu. Tijekom inkubacije protutijela se vežu za EPO u uzorku. Intenzitet žute boje, koja zaostaje nakon prekida reakcije, direktno je proporcionalan koncentraciji EPO u uzorku. Raspon normalnih vrijednosti za EPO u odrasle populacije je od 4,3-32,9 U/l. Serum za određivanje faktora rasta i citokina smrzavan je unutar jednog sata nakon uzimanja uzorka na -80 ^oC. Svi su uzorci analizirani istovremeno, nakon završetka studije (190).

3.3.4. Određivanje koncentracije VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α u krvnom serumu

Serum za određivanje angiogenih faktora i citokina također je smrzavan unutar jednog sata nakon uzimanja uzorka na -80 ^oC. Svi su uzorci analizirani istovremeno, nakon završetka studije.

VEGF, bFGF i citokini određivani su pomoću ELISA testa (R&D Systems-Minnaepolis, USA). Radi se o kvantitativnoj sendvič-enzim-imunoesej tehnici. Za ovaj test korišten je krvni serum. Monoklonalna protutijela specifična za VEGF, bFGF odnosno citokine predhodno su nanesena na mikropaletu. Standard i uzorak pipetiraju se u bunariće i prisutni VEGF, bFGF odnosno citokin veže se za protutijela. Nakon ispiranja nevezanih supstanca, enzim-vezano poliklonalno protutijelo, specifično za ispitivanu supstancu, dodaje se u bunariće. Slijedi ispiranje kako bi se uklonilo nevezano protutijelo-enzim reagens, potom se dodaje otopina supstrata u bunariće i razvija se boja čiji je intenzitet proporcionalan količini ispitivanog supstrata koji se vezao u inicijalnom koraku. Nakon što se razvoj boje zaustavi, njen se intenzitet mjeri.

Srednja vrijednost VEGF-a u serumu zdravih ljudi iznosi 220 pg/ml, a raspon se kreće od 62-707 pg/ml. Prema podacima proizvođača serumi zdravih ljudi su uvijek (u 100% slučajeva) detektibilni na VEGF.

Prema podacima proizvođača, korištenjem ovog kita, u serumu zdravih ljudi nije moguće detektirati bFGF.

U serumu zdravih ljudi vrijednost IL-1β je niža od 3,9 pg/ml.

Prema analizama proizvođača u 83% zdravih ispitanika vrijednosti IL-6 u serumu niže su od 3,12 pg/ml, a 17% ispitanika ima vrijednosti od 3,12-12,5 pg/ml.

Vrijednosti TNF-α u serumu zdravih ljudi niže su od 15,6 pg/ml, ukolko se analiza izvrši ovom metodom (191).
Analiza faktora rasta i citokina izvršena je na Odjelu za labaratorijsku dijagnostiku KBC Rebro u Zagrebu.

3.3.5. Određivanje parametara plućne funkcije

Od testova plućne funkcije učinjeno je spirometrijsko testiranje i bronhodilatacijski test nakon udisanja 200 µg salbutamola. Praćeni parametri bili su FEV_1, FVC, FEV_1/FVC. Oni su određivani nativno i 20 minuta nakon inhalacije navedenog bronhodilatatora. Korišten je aparat naziva "Master Screen", proizvođaća Jaeger.

3.4. ETIČKA NAČELA

Ovo je istraživanje odobrilo Etičko povjerenstvo «Specijalne bolnice za plućne bolesti». Svi su sudionici ispitivanja dali informirani pristanak nakon razgovora kojim su im objašnjene metode, ciljevi i očekivane koristi istraživanja.

3.5. STATISTIČKE METODE

Prikupljeni podaci analizirani su prikladnim statističkim metodama. U obradi podataka korišteni su statistički pogrami StatView i Statistica 6. Za svaku kontinuiranu varijablu izračunati su osnovni opisni statistički pokazatelji. Oni uključuju aritmetičku sredinu, minimalnu i maksimalnu vrijednost, geometrijsku sredinu, medijan i mjere varijabilnosti. Mjere varijabilnosti uključuju standardnu devijaciju, koeficijent varijabilnosti i standardnu grešku. Nominalne varijable prikazane su u obliku udjela unutar cjelokupne populacije. Za svaku je kontinuiranu varijablu procijenjen i oblik distribucije, te je normalnost distribucije testirana Kolmogorov-Smirnov testom.

Za grubu procjenu povezanosti svih kontinuiranih varijabli u sustavu korištena je matrica korelacija. Jednostavna regresijska analiza korištena je za izračunavanje zasebne povezanosti pojedinih varijabli. Neparametrijski testovi (Mann-Whitney i Kruskall-Wallis) korišteni su za ocjenu povezanosti nominalnih sa kontinuiranim varijablama i međusobnu povezanost nominalnih varijabli. Za ocjenu povezanosti dviju nominalnih varijabli korišten je χ^2 test. Za usporedbu vrijednosti praćenih u nekoliko točaka korišten je parni t-test, a za dodatne izvendene varijable primjereni neparametrijski testovi.

Kako se radi o složenom i multidimentzionalnom sustavu sa velikom brojem izmjerenih parametara za analizu su korištene i multivarijatne analize. Za ispitivane faktore rasta i citokine učinjena je stepwisse regresijska analiza kako bi se identificirale varijable koje ih najbolje predskazuju ako se u obzir uzmu odnosi unutar cijelog sustava. Također, učinjena je faktorska analiza s ciljem redukcije broja varijabli i detekcije strukture među varijablama.

3.5.1. Opis varijabli

Osnovni opisni statistički pokazatelji izračunati su zasebno za svaku kontinuiranu varijablu pri čemu je:

Aritmetička sredina (X) mjera prosjeka, a izračunava se iz formule:

$$X = \sum Xi \,/\, N$$

gdje je X = aritmetička sredina

Xi = različite pojedinačne vrijednosti

N = broj ispitanika

Standardna devijacija (SD) je mjera varijabilnosti. Izračunava iz formule:

$$\Sigma = [\sum(x_i-\mu)^2/N]^{1/2}$$

gdje je : μ aritmetička sredina populacije

N veličina populacije

Raspon predstavlja razliku između najmanjeg i najvećeg rezultata, najjednostavnija je mjera grupiranja rezultata oko neke srednje vrijednosti, ali i nesigurna mjera varijabilnosti, jer svaki pojedini osamljeni rezultat znatno povećava raspon ne mijenjajući grupiranje rezultata oko aritmetičke sredine.

Geometrijska sredina **(GS)** je «zbirni» parametar koji je koristan kada mjerna skala nije linearna. Izračunava se pomoću slijedeće formule:

$$GS=(X_1*X_2*...X_n)^{1/n}$$

gdje je n veličina uzorka.

Medijan **(MED)** je vrijednost koja se u nizu rezultata poredanih po veličini, nalazi točno u sredini i mjera je centralne tendencije. Prednost medijana pred aritmetičkom sredinom je u tome što jedan ekstreman rezultat neće promijeniti medijan uvjetovan samo brojem rezultata.

Koeficijent varijabilnosti (CV) pokazuje koliki postotak vrijednosti aritmetičke sredine iznosi vrijednost standardne devijacije. Računa se prema formuli:

$$CV=SD*100/X$$

gdje je SD= standardna devijacija

X= aritmetička sredina

Standardna greška (SG) predstavlja mjeru odstupanja (varijabilnosti) aritmetičkih sredina uzoraka iz jedne populacije od aritmetičkih sredina populacije, a ujedno i

pogrešku kojoj se izlažemo zaključujući o populaciji na temelju uzoraka. Veličina pogreške ovisi o varijabilnosti mjerenog obilježja s kojom je upravno proporcionalna, kao i s veličinom uzorka.

Interval pouzdanosti (CI) geometrijske sredine specificira raspon vrijednosti unutar kojih nepoznati populacijski parametar, u ovom slučaju geometrijska sredina nože biti. Ovi se intervali mogu izračunati za različite intervale pouzdanosti. Ukoliko želimo biti 95 % sigurni da interval sadrži stvarnu vrijednost geometrijske sredine populacije, onda izračunavamo 95% interval pouzdanosti.

Tip distribucije je važan dio opisa varijable, koja nam govori o učestalosti vrijednosti u različitim rasponima varijable. Najinformativnije je vizualno ispitivanje podataka korištenjem *histograma*. Da bi se utvrdila vjerojatnost da uzorak dolazi iz normalno raspodijeljene populacije, može se izvesti *Kolmgorov-Smirnov test*. Ovaj se test temelji na maksimalnoj razlici između kumulativne distribucije uzoraka i pretpostavljene kumulativne distribucije. Ako je, pomoću ovog testa, dobivena d varijabla značajna, treba se odbaciti hipoteza da je distribucija normalna. U većini software programa, izražena vjerojatnost značajnosti izračinava se prema Massey-u. Ukoliko mean i standardna devijacija za pretpostavljeno normalnu distribuciju nisu poznati (npr. one su procijenjene iz podataka) vrijednosti dobivene po Massey-u nisu valjane. Umjesto toga u određivanju da li je Kolmogorov-Smirnov d statistički značajan trebaju biti korištene takozvane *Lilliefors-ove* vjetojatnosti. Ukoliko varijabla nije bila normalne distribucije, njena se raspodjela pokušala približiti normalnoj na način da se logaritmira.

3.5.2. Analiza povezanosti (univarijatna-bivarijatna)

Matricom korelacija prikazana je povezanost svih kontinuiranih varijabli u sustavu. U tablici su navedeni koeficijenti povezanosti pojedinih varijabli (koeficijent korelacije - Pearson R).

Korelacija je mjera povezanosti između dviju varijabli. Koeficijent korelacije može varirati od -1,00 do 1,00. Vrijednost od -1,00 predstavlja savršeno negativnu korelaciju, dok vrijednost od 1,00 predstavlja savršeno pozitivnu korelaciju. Vrijednost 0,00 predstavlja nedostatak korelacije.

Regresijska analiza korištena je za određivanje individualnih koeficijenta korelacija pojedinih kontinuiranih varijabli. Ovim testom je izračunata i statistička značajnost povezanosti pojedinih varijabli.

Parni t-test je korišten za identifikaciju razlika unutar iste grupe varijabli mjerene npr. u različitim vremenskim intervalima u iste populacije.

3.5.3. Neparametrijski testovi

Neparametrijske metode su metode neovisne o raspodjeli (eng. *distribution free methods*) koje se primjenjuju u slučajevima kada raspodjele očigledno nisu normalne ili kad je veličina uzorka premala, a postoji sumnja u normalnost.
Neparametrijske metode su većinom testovi značajnosti za dva ili više nezavisna uzorka i nude nekoliko testova čija je hipoteza:

$$H_0 \ldots..F(z) = G(z), \text{ za sve } z$$

gdje je:

F(z) = funkcija distribucije obilježja u populaciji X,
G(z) = funkcija distribucije obilježja u populaciji Y.

Najkorišteniji test za testiranje značajnosti ove hipoteze između dva nezavisna uzorka je ***Mann- Whitney U- test***. To je najosjetljiviji neparametrijski test.kojim se definira:
Rx = suma rangova opažanja x_i i
Ry = suma rangova opažanja y_i; te izraz T:

$$T = Rx - n1\,(n1 + 1)/\,2$$

Pod uvjetom da je nul- hipoteza točna, odnosno da su raspodjele u populacijama X i Y jednake, izraz T ima raspodjelu čije su donje granične vrijednosti ($T_{Gran.\,D}$), a gornje granične vrijednosti (T_{GranG}), te vrijedi:

$$T_{GranG} = n_1 n_2 - T_{Gran.\,D}$$

Nul- hipoteza se prihvaća ako vrijedi

$$T_{Gran.\,D} < T < T_{GranG}$$

U slučaju kada hipoteza pretpostavlja da više populacija ima istu distribuciju (H_0) nasuprot alternativnoj da nemaju (H_1), koristi se test ***Kruskal l- Wallis*** koji je u potpunosti analogan Mann - Whitney U- testu i vrijedi:

$$T = 12/ N(N + 1) \Sigma (R^2_i / n_i) – (N (N + 1)/ 4)$$

gdje raspodjela veličine T ima približno oblik hi- kvadrat raspodjele sa k-1 stupnjeva slobode, a nul- hipoteza biva prihvaćena ako je:

$$T < X^2_{1-\alpha}(k-1)$$

Hi- kvadrat (χ^2) testom analizira se međusobna povezanosti nominalnih varijabli. Osnovna postavka izračunavanja Hi kvadrat testom je razlika između opaženog i očekivanog podatka. Prema tome formula za izračunavanje je:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$$

pri čemu je O – opaženi podatak

E – očekivani podatak

3.5.4. Multivarijatne metode

Multivarijatni ili multidimenzionalni analitičkim postupcima pretpostavljaju analizu više kontinuiranih varijabli istovremeno s ciljem prepoznavanja složenosti i važnosti veza među njima.

Stepwisse regresija je model kojim se služimo da bi definirali prediktorske varijable koje najbolje predskazuju kriterijsku, odnosno zavisnu varijablu. Ona uzima u obzir odnos između multiplo povezanih varijabli, a ne samo odnos između prediktorske i zavisne varijable. Stepwisse regresija je tehnika «gradnje» čiji osnovni postupak uključuje: (1) identifikaciju incijalnog modela, (2) ponavljano «stepping» tj. ponavljano mjenje modela u prethodnom koraku oduzimajući ili dodajući prediktorsku varijablu u skladu s «kriterijima koračanja» i (3) zaustavljanje traženja kada «stepping» više nije moguć prema zadanim kriterijima, ili kada je postignut zadani broj koraka. Koristili smo «prema naprijed ulaznu» metodu (forward entry method) koja za svaki korak izračunava ulazni parametar (entry statsitic). Za kontrolu ulaza u model definiran je F za uključivanje u model (F-to-enter), a za izbacivanje iz modela F za isključivanje (F-to-remove). Kao Fza

uključivanje uzeta je vrijednost 4,000, a za F za isključivanje 3,996. Kritična vrijednost za ulaz u model mora nadvladati onu za uklanjanje iz modela.

Faktorska analiza je korištena radi redukcije broja verijabli i radi detekcije strukture odnosa među varijablama. Osnovna ideja faktorske analize je kombinacija dviju varijabli u jedan faktor. Formira se regresijska linija koja najbolje zbraja linearni odnos među varijablama. Cilj je definirati novu varijablu koja je najbolje odgovara regresijskoj liniji i najbolje hvata «bit» dviju varijabli (190,191).

4. REZULTATI

U ovom radu ukupno je analizirano 106 izvornih kontinuiranih, 12 izvornih nominalnih i 8 izvedenih varijabli. Najprije će biti opisani inicijalni parametri i njihovi međusobni odnosi, a potom parametri dobiveni praćenjem u predhodno određenim vremenskim intervalima i njihovi međusobni odnosi.

4.1. Kliničke i demografske karakteristike

Kliničke i demografske karakteristike pacijenata uključenih u studiju prikazani su u tablici 4.1. Podaci su prikazani zasebno prema spolu. Kontinuirane su varijable prikazane kao srednja vrijednost ± SD, a nominalne kao udio u populaciji. U tablici su navedene i razine značajnosti raspodjele pojedinog parametra prema spolu koje su za kontinuirane varijable izračunati Mann – Whitney testom, za nominalne varijable χ^2 testom**.** Iz tablice je vidlijivo da je ispitivanu skupinu činilo 57 pacijenata, 26 muškaraca i 31 žena. Prosječna starost ispitivane skupine bila je 69 godina. Svi su pacijenti imali KOPB, čija je dijagnoza postavljena u skladu s dijagnostičkim kriterijima Američkog pulmološkog društva (281). Kronični simptomi KOPB-a u svih ispitanika trajali su duže od 2 godine. Također, u svih su ispitanika simptomi akutnog pogoršanja trajali barem 24 sata prije prijema u bolnicu. Simptomi akutne upale dišnih puteva zabilježeni su u 36 ispitanika (u 15 muškaraca i 21 žene), a u 17 pacijenata (u 9 muškaraca i 8 žena) registrirana je pneumonija na rendgenogramu pluća. U tablici je prikazana učestalost globalne kardijalne dekompenzacije, a također je zasebno prikazana i učestalost izolirane lijevostrane, odnosno desnostrane dekompenzacije srca. Izolirani znakovi popuštana desnog srca nađeni su u 5 ispitanika (1 muškarac i 4 žene), a lijevog u 21 ispitanika (9 muškaraca i 12 žena). Nije nađeno statistički značajne razlike u raspodjeli ovih kliničkih podataka među spolovima. Znakovi globalnog popuštanja srca nađeni su u 21 pacijenta (5 muškaraca i 12 žena). Ovo je jedini parametar koji je statistički značajno različito raspoređen među spolovima. U 26 ispitanika (10 muškaraca i 16 žena) nađena je kombinacija znakova popuštanja srca i upale dišnih puteva. 17 pacijenata (5 muškaraca i 12 žena) imalo je anamnezu povišenog krvnog tlaka, a povišene vrijednosti krvnog tlaka pri prijemu zabilježene su u 20 ispitanika (7 muškaraca i 13 žena). Nije nađeno statistički

značajne razlike u raspodjeli ovih parametara, kao ni u raspodjeli apsolutnih vrijednosti krvnog tlaka u populaciji.

Tablica 4.1. Kliničke i demografske karakteristike ispitivane populacije i usporedba između muškaraca i žena

karakteristike pacijenata	vrijednost	muškarci	žene	p
broj pacijenata	57 (100)	26	31	-
dob (godine)	69,0 ± 9,8	66,8 ± 10,3	70,9 ± 9,2	0,1207
klinička dijagnoza KOPB-a	73,1 ± 21,9	75,7 ± 19,6	70,7 ± 23,9	0,4208
trajanje kronični simptoma duže od 2 godine	57 (100)	26	31	-
trajanje akutnog pogoršanja duže od 24 h	57 (100)	26	31	-
akutna upala dišnih puteva	36 (63)	15	21	0,6116
pneumonija na rendgenogramu	17 (30)	9	8	0,6647
dekompenzacija desnog srca	5 (9)	1	4	0,4630
dekompenzacija lijevog srca	21 (37)	9	12	0,9653
globalna srčana dekompenzacija	21 (37)	5	16	0,0245
kombinacija srčane dekompenzacije i infekcije	26 (46)	10	16	0,4679
anamneza povišenog krvnog tlaka	17 (30)	5	12	0,1901
povišeni krvni tlak pri prijemu	20 (35)	7	13	0,3659
sistolički krvni tlak	138,9 ± 22,8	139,3 ± 24,5	138,5 ± 31,9	0,8005
dijastolički krvni tlak	78,6 ± 13,1	79,3 ±24,5	78,0 ± 11,6	0,9849
srednji arterijski tlak pri prijemu	98,7 ± 15,2	99,3 ± 13,5	99,3 ± 17,5	0,7895

Na tablici 4.2. navedeni su najčešće korišteni lijekovi prije hospitalizacije i lijekovi čija je primjena započeta pri prijemu u bolnicu, te njihova raspodjela prema spolu. Prije hospitalizacije najčešće su korišteni selektivni agonisti β2-adrenergičkih receptora, antikolinergici, teofilin, inhalacijski glukokortikosteroidi, diuretici i ACE inhibitori. Nije nađeno statistički značajne razlike u raspodjeli upotrebe ovih lijekova među spolovima. Prije hospitalizacije prosječno je korišteno 3,8 lijekova. Pri hospitalizaciji, osim navedenih lijekova, često su korišteni aminofilin, antibiotici i kortikosteroidi parenteralno. Nije nađeno razlike u raspodjeli ovih lijekova prema spolu, osim što su antikolinergici češće korišteni u muškaraca.

Tablica 4.2. Lijekovi korišteni prije prijema u bolnicu i terapija započeta pri prijemu u bolnicu

Kronična terapija uzimana prije prijema u bolnicu				
selektivni agonisti β2-adrenergičkih receptora	23 (40)	13	10	0,2762
antikolinergik	11 (19)	7	4	0,3171
teofilin	49 (86)	23	26	0,6967
glukokortikosteroid	10 (18)	6	4	0,5117
diuretici	29 (51)	12	17	0,6985
ACE inhibitor	12 (21)	6	6	0,5373
broj korištenih lijekova	3,8 ± 2,4	4,4 ± 2,54	3,4 ± 2,1¸9	0,1313
terapija započeta pri hospitalizaciji				
selektivni agonisti B2-adrenergičkih receptora	50 (88)	23	27	0,8035
antikolinergik	12 (21)	9	3	0,0483
aminofilin	49 (86)	23	26	0,9091
glukokortikosteroid	22 (39)	13	9	0,1813
diuretik	45 (79)	20	25	0,9373
ACE inhibitor	17 (30)	4	13	0,0585
antibiotik	35 (61)	15	20	0,7995
broj korištenih lijekova	5,4 ± 1,5	5,5 ± 1,22	5,2 ± 1,65	0,3525

INICIJALNI NALAZI

4.2. OPIS INICIJALNIH NALAZA

4.2.1. Respiracijske, hematološke i biokemijske karakteristike

U ispitivane populacije određivani su respiracijski, hematološki i biokemijski parametri u svrhu njenog pobližnjeg opisivanja. Od respiracijskih parametara određivani su PaO_2, $PaCO_2$, pH, Sat. Postbronhodilatacijske vrijednosti FVC, FEV_1, FEV_1/FVC određivani su postignutom maksimalnom kliničkom poboljšanju. Oni su navedeni ovdje jer su odraz uznapredovalosti bolesti i pridonose opisu populacije. Od hematoloških parametara određivani su: E, Hb, Hct, MCV, MCH, L i Tr. U ispitivane populacije određeni su slijedeći biokemijski parametri; urea, kreatinin, AST, ALT, GGT, bilirubin. U tablici 4.2. ovi su parametri prikazani kao njihova srednja vijednost ± SD zasebno po spolu. Također je prikazana značajnost razlike u raspodjeli ovih parametara među spolovima izračunata pomoću Mann – Whitney testa.

Hematološki, biokemijski parametri, kao i rezultati analize dišnih plinova u arterijskoj krvi ravnomjerno su raspoređeni među spolovima.

Rezultati **analize dišnih plinova** u arterijskoj krvi ukazuju da su svi pacijenti uključeni u studiju bili značajno hipoksemični u trenutku prijema u bolnicu udišući sobni zrak. Najviša inicijalna vrijednost PaO_2 bila je 53 mmHg, što je vrijednost određena ulaznim kriterijem. Srednja vrijednost cijele populacije iznosila je 45,66 ± 5,17, a najniža 32,6 mmHg.

Srednja vrijednost $PaCO_2$ za cijelu populaciju bila je blago iznad referentnih vrijednosti i iznosila je 45,25 ± 9,02 mmHg. Vrijednosti $PaCO_2$ širokog su raspona i kreću se od 29,1 - 65,0 mmHg. Dakle, one se protežu od vrijednosti nižih od referentnih vrijednosti koje klinički odgovaraju hiperventilaciji do značajno viših od referentnih vrijednosti koje odgovaraju hipoventilaciji. U 51 % pacijenata zabilježen je $PaCO_2 > 45$ mmHg, odnosno globalna respiracijska insuficijencija. U 33 % pacijenata $PaCO_2$ bio je veći od 50 mmHg, što znači da su imali klinički značajnu hiperkapniju.

Aritmetička sredina varijable pH bila je unutar fizioloških vrijednosti i iznosila je 7,45 ± 0,06. U 52 % ispitanika ova varijabla je bila unutar referentnog raspona. U 4 % pacijenta

zabilježena je acidoza (ph < 7,359), a u 44 % pacijenata alkaloza (ph > 7,45). Raspon je bio od 7,3 - 7,64.

Prosječna vrijednost Sat bila je niska, ispod referentnih vrijednosti i iznosila je 80,07 ± 7,24. U svih je ispitanika ovaj parametar bio niži od referentnog raspona.

Srednja vrijednost ispitivanih **parametara plućne funkcije** bila je očekivano niska. Srednja vrijednost postbronhodilatacijskog FVC, FEV_1 i FEV1/FVC govori za opstrukciju dišnih puteva koja perzistira nakon bronhodilatacijske terapije. Postbronhodilatacijski FEV_1/FVC u svih je pacijenata niži od 0,7 što je u skladu s dijagnozom KOPB-a. Među određivanim parametrima plućne funkcije FVC je značajno viši u muškaraca nego u žena. Nije nađeno statistički značajne razlike u raspodjeli FEV_1 i FEV_1/FVC prema spolu.

Ispitivana je populacija karakterizirana slijedećim paramatrima **crvene krvne slike**.

Srednja vrijednost broja E iznosila je 5,31 ± 0,73 x 10^{12}/L, koncentracije Hb 151,06 ± 23,3 g/L, Hct 0,46 ± 0,66, MCV 86,33 ± 8,02 μm^3, MCH 28,47 ± 3,22 pg.

Srednja vrijednost parametara crvene krvne slike u *muškog dijela populacije* bila je unutar referentnih vrijednosti. Raspon parametara ovih parametara bio je širokog raspona, vrijednosti od ispod do iznad referentnog intervala. Srednaj vrijednost broja E iznosila je 5,3 ± 0,8 x 10^{12}/L. U 12 % pacijenta zabilježen je sniženi broj E, a najniža zabilježena vrijednost iznosila je 3,9 x 10^{12}/L. U 38 % pacijenata zabilježena je povišena vrijednost broja E. Najviša zabilježena vrijednost iznosila je 6,45 x 10^{12}/L. Koncentracija Hb niža od referentnog intervala zabilježena je u 31 % pacijenata i najniža vrijednost iznosila je 108 g/L, dok je viša od referentnog intervala zabilježena u 35 % pacijenata. Najviša zabilježena vrijednost Hb iznosila je 204 g/L. Vrijednost Hct ispod referentnog intervala zabilježena je u 23 % ispitanika, najniža zabilježena vrijednost iznosila je 0,35. Vrijednost Hct iznad referentnog raspona zabilježena je u 19 % pacijenata i najviša zabilježena vrijednost iznosila je 0,58. Srednja vrijednost staničnih indeksa bila je unutar referentnih vrijednosti.

Parametri crvene krvne slike u *ženskog dijela populacije*, također, pokazuju široki raspon. Srednja vrijednost broja E bila je iznad referentnog raspona u ovog dijela populacije. Samo u jedne pacijentice (3 %) nađena je snižena vrijednost broja E i ona je iznosila 3,48

x 10^{12}/L. U 68 % pacijentica zabilježen je povećan broj E, i najviša vrijednost iznosila je 7,0 x 10^{12}/L. Koncentracija Hb i Hct izvan referentnog intervala zabilježeni su u jednakog broja pacijentica. Snižene vrijednosti ovih varijabli nađene su u 10 % pacijentica, a povišene u 32 % pacijentica. Najniža zabilježena vrijednost za Hb iznosila je 109,8 g/L, a za Hct 0,33. Najviša zabilježena vrijednost za Hb iznosila je 190 g/L, a za Hct 0,57. Srednja vrijednost staničnih indeksa bila je unutar referentnih vrijednosti.

Srednja vrijednost **broja L** gledajući ukupnu populaciju iznosila je 10,01 ± 4,991 x 10^9. Srednja vrijednost u muškaraca bila je iznad referentnih vrijednosti i iznosio je 10,8 x 10^9/L. U 58 % ispitanika ovaj je parametar nađen iznad referentnih vrijednosti, a niti u jednog ispitanika on nije bio niži od referentnih vrijednosti. Srednja vrijednost broja L u žena bila je unutar referentnih vrijednosti i iznosila je 9,4 x 10^9/L. U 32 % ispitanica ovaj je parametar nađen iznad referentnih vrijednosti, a niti u jednom uzorku on nije bio niži od referentnih vrijednosti.

Srednja vrijednost **broja Tr** unutar cijelokupne populacije bila je 292,65 ± 133,42 x10^9/L. Srednja vrijednost ove varijabla bila je unutar referentnih vrijednosti i raspona je od blago sniženih vrijednosti do onih iznad referentnih vrijednosti (113,6 - 732,8 x 10^9/L). U 6 ispitanika ovaj je parametar iznad referentnih vrijednosti. Prosječna vrijednost u muškaraca iznosila je 304,75 ± 129,45 x 10^9/L, a raspon 125,9-654,0 x 10^9/L. Medijan je u žena iznosio 282,49±137,96 x 10^9/L, a raspon 113,6-732,8 x 10^9/L. Normalna raspodjela ovih varijabli potvrđena je Kolmogorov - Smirnov testom (p= n.s.).

Iz tablice je vidljivo da su srednje vrijednosti **parametara bubrežne funkcije**, ureje i kreatinina, unutar referentnog raspona. U 11 pacijenata vrijednosti ureje zabilježene su iznad referentnog raspona, a najviša zabilježena vrijednost iznosila je 16,2 mmol. Ova povišena vrijednost je manja od dvostruke normalne vrijednosti. U 8 pacijenata zabilježena je povišena vrijednost kreatinina. Najviša zabilježena vrijednost iznosila je 142 μmol, što je tek blago iznad referentnog raspona. Ove varijable normalne su raspodjele izračunate Kolmogorov - Smirnov testom (p= n.s.).

Srednja vrijednost **parametara jetrene funkcije** bila je unutar referentnog raspona. Samo u 3 pacijenta zabilježena je povišena vrijednost ALT i GGT, te u 4 pacijenta povišena vrijednost AST. AST je nađena povišenih vrijednosti u 5 pacijentica, ALT u 4

pacijentice, a GGT u 10 pacijentica. U 5 je ispitanika bilirubin bio povišenih vrijednosti. Niti u jednog ispitanika ove vrijednosti nisu bile tri puta više od gornje granice referentnog raspona, pa su time zadovoljeni kriteriji za uključivanje u studiju. Normalna raspodjela ovih varijabli potvrđena je Kolmogorov - Smirnov testom (p= n.s.).

Tablica 4.3. Respiracijske, hematološke i biokemijske karakteristike ispitivane populacije i usoredba između muškaraca i žena

parametar	muškarci	žene	p
PaO_2 (mmHg)	44,9 ± 5,7	46,2 ± 4,7	0,2965
$PaCO_2$ (mmHg)	43,6 ± 10,5	46,6 ± 7,5	0,4063
$SatHbO_2$ (%)	79,3 ± 8,3	81,9 ± 6,1	0,2851
pH	7,45 ± 0,06	7,45 ± 0,06	> 0,9999
FVC	2,92 ± 0,87	1,71 ± 0,53	0,0074
FEV_1	1,24 ± 1,01	0,80 ± 0,28	0,3465
FEV1/FVC	0,40 ± 0,17	0,48 ± 0,11	0,1448
E (x 10^{12}/L)	5,3 ± 0,8	5,3 ± 0,7	0,6882
Hb (g/L)	155,0 ± 27,4	147,8 ± 19,0	0,2577
Hct	0,47 ± 0,07	0,45 ± 0,06	0,4180
MCV (fl)	86,1 ± 8,9	86,5 ± 7,5	0,9996
MCH (pg)	28,7 ± 3,5	28,3 ± 2,9	0,5453
L (x 10^9/L)	10,8 ± 3,5	9,4 ± 6,0	0,3583
Tr (x 10^9/L)	304,8 ± 129,5	282,5 ± 138,0	0,6233
ureja (mmol/L)	7,1 ± 3,3	7,0 ± 2,8	0,7187
kreatinin (µmol/L)	94,9 ± 21,0	81,5 ± 21,4	0,0665
AST (U/L)	27,2 ± 22,1	24,0 ± 12,7	0,4562
ALT (U/L)	26,0 ± 33,4	20,8 ± 22,6	0,5662
GGT (U/L)	32,1 ± 5,5	32,1 ± 21,8	0,9170
bilirubin (µmol)	32,4 ± 66,0	49,0 ± 96,3	0,3530

4.2.2. Eritropoetin i angiogeni faktori rasta

U ispitivane populacije određivani su slijedeći faktori rasta: EPO, VEGF i bFGF. Njihovi osnovni opisni statistički pokazatelji prikazani su na tablici 4.4.

Tablica 4.4. Opis faktora rasta

	X	SD	SG	MIN	MAKS	CV	GS	MED
EPO 1	41,42	83,54	11,06	2,00	342,00	2,01	14,26	11,00
VEGF 1	1041,98	1096,95	146,58	5,40	5725,00	1,05	656,50	580,00
b FGF 1	6,03	2,45	,32	2,80	15,00	,40	5,64	5,70

Srednja vrijednost **EPO** dobivenog iz inicijalnog uzorka bila je iznad referentnih vrijednosti i iznosila je 41,42 U/L. Median je iznoso 11,00 U/L što upućuje da EPO u većine pacijenata nije bio povišenih vrijednosti. Ova je varijabla bila širokog raspona i kretala se od minimalno detektibilnih vrijednosti (2 U/L), do izrazito povišenih vrijednosti (342 U/L). Koncentracija EPO bila je unutar referentnih vrijednosti u 38/57 (67%) ispitanika, ispod referentnih vrijednosti u 10/57 (17%) pacijenta, a povišen samo u 9/57 (16%) pacijenta. U 7/57 (12%) inicijalnih uzoraka nađena je vrlo visoka koncentracija EPO, viša od 100 U/L. Devet uzoraka povišene koncentracije EPO odgovorno je za povišenu srednju vrijednost EPO, koja se značajno razlikuje od vrijednosti aritmetičke i geometrijske sredine. Srednja vrijednost ove varijable u muške populacije iznosila je 32,4 ± 66,0 U/L, a u ženske populacije 49,0 ± 96,3 U/L. 95% interval pouzdanosti medijana za ovu varijablu iznosi 19,25 - 63,59 U/L. Distribucija ove varijable značajno se razlikovala od normalne, Kolmogorov – Smirnov test: $d = 0,408$; $p < 0,001$. Zbog toga je izvedena njena logaritamska transformacija, te je kao takva korištena u testovima korelacija. Nakon transformacije Kolmogorov – Smirnov testom dobiven je slijedeći rezultat: $d = 0,130$, p = n.s. Grafom 4.1. prikazana je distribucija varijable EPO i njene logaritamske transformacije.

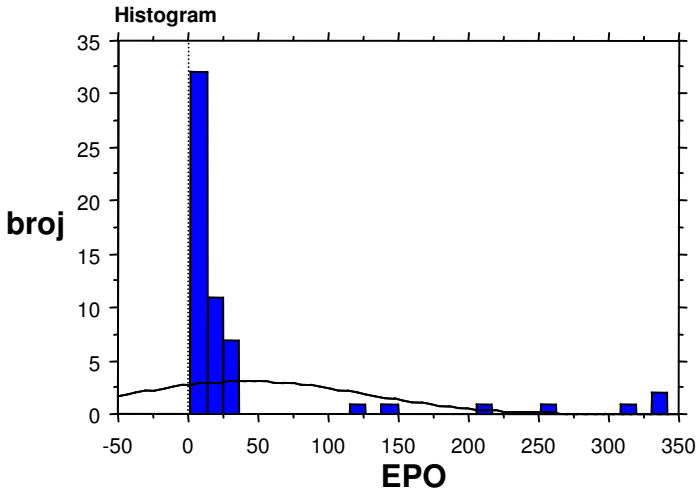
Srednja vrijednost varijable **VEGF** dobivene iz početnih uzoraka iznosila je 1041,99 pg/ml, što je 4,7 puta viša vrijednost u odnosu na srednju vrijednost dobivenu na uzorku zdravih ljudi (269). Standardna devijacija za ovu varijablu iznosi 1096,95 što upućuje na njenu veliku varijabilnost. Srednja vrijednost ove varijable u muškog dijela ispitivane populacije iznosila je 1296,84 ± 1355,55 pg/ml, a u ženskog dijela populacije 836,47 ±

798,91 pg/ml. Ova je varijabla širokog raspona, koji se kreće od izuzetno niskih do ekstremno povišenih vrijednosti, odnosno od 5,4 pg/ml do 5725 pg/ml. 95% interval pouzdanosti prosječne vrijednosti ove varijable iznosi 750,92 - 1333,04 pg/ml. Distribucija ove varijable također je značajno različita od normalne, Kolmogorov – Smirnov test $d = 0,213$, $p < 0,05$. Nakon logaritamske transformacije Kolmogorov – Smirnov testom dobiven je slijedeći rezultat $d = 0,11593$, $p =$ n.s., te je ovako transformirana varijabla korištena u testovima povezanosti. Graf 4.2. prikazuje histogram raspodijele početne varijable VEGF, kao i njene izvedene varijable.

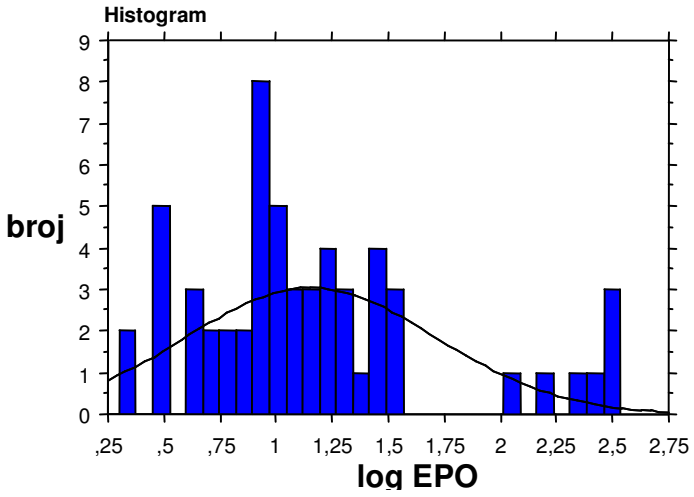
Srednja inicijalna vrijednost varijable **bFGF** iznosila je 6,039 pg/ml. Ova varijabla pokazala je najmanji stupanj varijabilnosti među ispitivanim faktorima rasta i njena je standardna devijacija iznosila 2,459. Srednja vrijednost ovog parametra u muškog dijela ispitivane populacije iznosila je 6,3 ± 2,599 pg/L, dok je za ženski dio populacije iznosila 5,829 ± 2,363 pg/L. 95% interval pouzdanosti prosječne vrijednosti ove varijable iznosi 5,38 - 6,68 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov test za ovu varijablu iznosio je $d = 0,2114$, $p< 0,05$, dok je za logaritmiranu varijablu $d= 0,16795$, $p= 0,10$, te je kao takva korištena u testovima korelacija. Na grafu 4.3 prikazani su histogrami raspodjele izvorne i transformirane varijable.

Graf 4.1. Histogram raspodjele inicijalne varijable EPO i njegove logaritamske transformacije

Graf 4.1.a. Raspodjela EPO

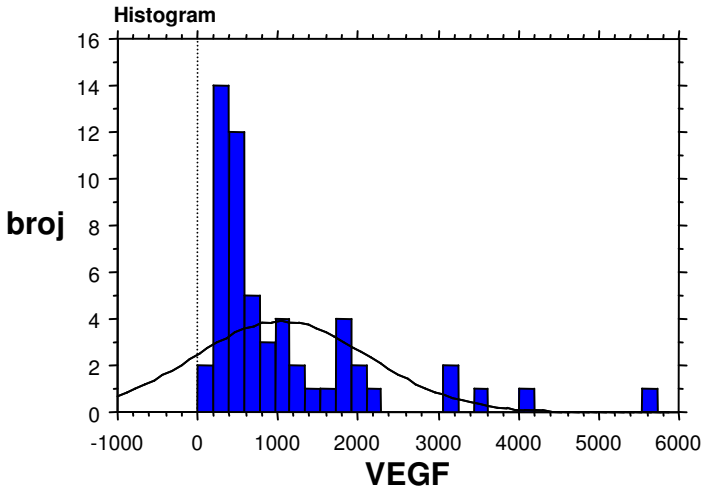


Graf 4.1.b. Raspodjela logaritamske transformacije EPO

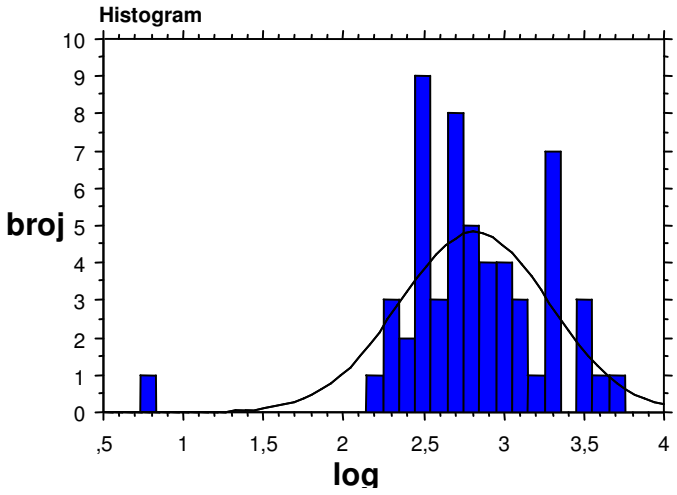


Graf 4.2. Histogram raspodjele inicijalne varijable VEGF-a i njegove logaritamske transformacije

Graf 4.2.a. Raspodjela VEGF-a

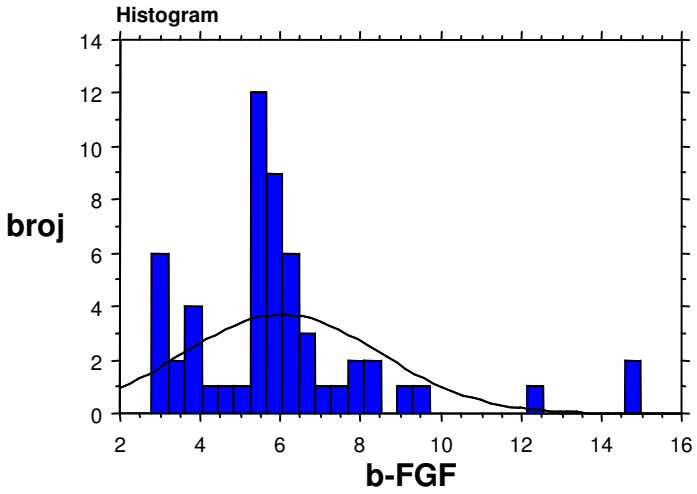


Graf 4.2.b. Raspodjela logaritamske transformacije VEGF-a

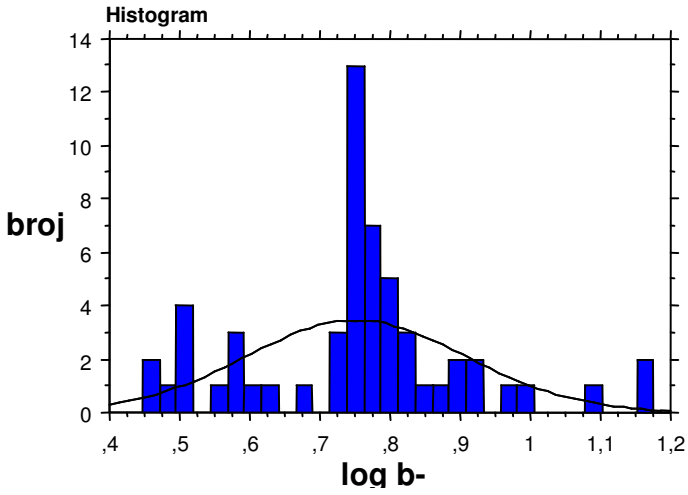


Graf 4.3. Histogram raspodjele inicijalne varijable b-FGF i njegove logaritamske transformacije

Graf 4.3.a. Raspodjela b-FGF-a



Graf 4.3.b. Raspodjela logaritamske transformacije b-FGF-a



4.2.2. Citokini

U ispitivane populacije određivani su slijedeći citokini: IL-1β, IL6, i TNFα. Njihovi osnovni opisni statistički pokazatelji prikazani su na tablici 4.5.

Tablica 4.5. Opis citokina

	X	SD	SG	MIN	MAKS	CV	GS	MED
IL-1β 1	2,341	1,686	,229	,200	11,100	,720	1,909	2,000
IL- 6 1	45,666	86,502	11,559	3,000	477,300	1,894	20,201	19,050
TNF-α 1	10,127	3,038	,784	6,500	16,200	,300	9,758	8,900

Parametar **IL-1β** bio je među ispitivanim citokinima najnižih apsolutnih vrijednosti. Njegova srednja vrijednost dobivena iz početnih uzoraka iznosila je 2,341 pg/ml. Unutar ove grupe varijabla ona pokazuje najmanju varijabilnost i njena je standardna devijacija iznosila 1,686. Raspon ovog parametra kreće se od 0,2 pg/L do 11,1 pg/L. Vrijednosti aritmetičke sredine, geometrijske sredine i medijana vrlo su bliske što upućuje na normalnu raspodjelu ove varijable. Samo u 4 ispitanika ova je varijabla bila iznad 3,9 pg/ml, što je najviša vrijednost zabilježena ovim testom u zdravih pojedinaca prema podacima proizvođača (191). 95% interval pouzdanosti medijana za ovu varijablu iznosi 1,89-2,79 pg/ml. Srednja vrijednost ove varijable u muškog dijela ispitivane populacije iznosila je 2,50 ± 2,24 pg/ml, a u ženskog dijela populacije 2,213 ± 1,08 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov testom potvrđeno je da se raspodjela ove varijable ne razlikuje značajno od normalne, $d = 162$, $p < 0,15$, no u logaritmiranom je obliku njena distribucija bila još bliža normalnoj (K – S test: $d = 0,125$, p = n.s.), te je kao takva korištena u testovima korelacija.

Srednja vrijednost inicijane varijable **IL-6** iznosila je 45,67 pg/ml. U ovoj grupi varijabla ovaj je parametar bio najveće varijabilnosti i njegova je standardna devijacija iznosila 86,50. Raspon je ove varijable vrlo širok i kreće se od 3 pg/ml do izrazito visokih vrijednosti, odnosno 477,30 pg/ml. U čak 54 ispitanika ova je varijabla bila viša od 3,12 pg/ml, što je najviša vrijednost nađena u 90% zdravih ispitanika. U 35 ispitanika vrijednost IL-6 bila je iznad 12,5 pg/ml, što je najviša zabilježena vrijednost u zdravih ljudi ovim testom prema podacima proizvođača (191). 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti ove varijable iznosio je 22,71-68,62 pg/ml. Srednja je vrijednost ove varijable

u muškog dijela ispitivane populacije iznosila 35,54 ± 28,00 pg/ml, a u ženskog dijela populacije 53,84 ± 113,74 pg/ml. Za ovu je varijablu Kolmogorov – Smirnov test iznosio: d = 0,311, p < 0,01, dok je za logaritamski transformiranu varijablu ovaj test iznosio: d = 0,074, p = n.s. Zbog toga je ovako transformirana varijabla korištena u testovima povezanosti.

Aritmetička sredina varijable **TNF-α** iznosila je 10,13 pg/ml. Niske vrijednosti standardne devijacije, koeficijenta varijabilnosti i standardne greške upućuju na nisku varijabilnost ovog parametra. Najniža detektibilna vrijednost ovog analita korištenim testom bila je < 1,6 pg/ml. Minimalna dobivena vrijednost iznosila je 6,5 pg/ml, a maksimalna 16,2 pg/ml. 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti ove varijable iznosio je 8,70 - 11,54 pg/ml. U muškog dijela populacije srednja vrijednost ovog analita iznosila je 11,48 ± 3,58 pg/ml, a u ženskog 9,45 ± 2,67 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov test za izvorni oblik varijable iznosio je d = 0,261, p = 0,2, no Lilliefors testa bio je signifikantan (p < 0,01). Zbog toga je izvršena logaritamska transformacija i ove varijable, te je tada Kolmogorov – Smirnov test iznosio d = 0,232, p = n.s., a Lilliefors test p < n.s. I ova je varijabla u testovima korelacija korištena u logaritmiranom obliku.

4.3. ANALIZA POVEZANOSTI INICIJALNIH NALAZA (UNIVARIJATNA-BIVARIJATNA)

Matricom korelacija dat je pregled koeficijenata povezanosti svih istraživanih kontinuiranih varijabli u sustavu, a potom su odabrane statistički značajne korelacije prikazane regresijskim krivuljama. Svi su ispitivani faktori rasta i citokini u testovima povezanosti korišteni u logaritmiranom obliku.

4.3.1. Matrica korelacija svih istraživanih kontinuiranih varijabli

Tablica 4.6. prikazuje matricu korelacija svih istraživanih kontinuiranih varijabli u sustavu dobivenih prije početka liječenja. U tablici su navedeni koeficienti povezanosti pojedinih varijabli izračunate jednostavnom regresijskom analizom. Analiza je učinjena zasebno za svaku varijablu. Na ovaj je način analizom obuhvaćen maksimalni broj ispitanika. Shematski su označene razine značajnosti pojedinih povezanosti izračunate pomoću jednostavne regresijske analize na slijedeći način: crno: p > 0,05, plavo: 0,05 ≤ p > 0,0001, crveno p: ≤ 0,0001.

Tablica 4.6. Matrica korelacija svih istraživanih kontinuiranih varijabli u sustavu

	EPO	VEGF	bFGF	IL1	IL6	TNF	PO2	PCO2	pH	Sat	SE	E	Hb	Hct	MCV	MCH	L	Tr	AST	ALT	GGT	bil	urea
EPO	1,00	,21	,27	-,19	-,12	-,27	**-,38**	,03	-,00	-,24	,00	-,06	-,20	-,11	-,16	-,20	,07	,13	,22	**,31**	,17	,05	,41
VEG		1,00	,13	-,12	,23	,17	**-,34**	,03	,13	**-,34**	**,29**	-,14	-,09	-,09	,09	,08	**,27**	**,39**	,207	,23	,04	-,06	,23
bFGF			1,00	-,26	,11	-,07	,03	-,21	,25	,02	-,01	-,02	,12	,10	,09	,10	,09	,24	,05	,10	-,13	**,29**	,26
IL-1				1,00	,09	-,08	-,13	-,05	,01	-,01	-,04	,15	,09	,01	,01	-,02	,16	-,08	**-,44**	**-,41**	-,11	,21	-,10
IL-6					1,00	,22	-,24	**-,33**	**,44**	-,02	,61	-,21	**-,36**	**-,32**	-,17	-,18	**,67**	**,34**	,24	,17	-,12	,14	**,30**
TNF						1,00	,27	-,10	-,10	,05	,17	,28	-,20	-,15	-,33	-,34	,05	-,12	,11	,09	-,04	,02	-,35
PO2							1,00	**-,35**	,14	**,83**	,12	-,17	,02	-,10	,01	,17	-,24	-,19	-,03	-,08	-,09	-,04	-,25
PCO2								1,00	-,55	**-,51**	**-,47**	**,30**	**,41**	**,47**	**,29**	,16	-,23	-,25	,02	,03	,22	-,18	-,01
pH									1,00	**,45**	**,47**	**-,38**	**-,30**	**-,33**	,07	,09	**,35**	**,54**	-,13	-,12	-,09	**,41**	,09
Sat									,	1,00	,24	**-,29**	-,15	-,26	-,03	,10	,02	-,10	-,05	-,05	,07	,11	-,20
SE											1,00	**-,61**	**-,59**	**-,61**	-,02	-,01	**,44**	**,62**	,11	,15	-,03	-,05	,02
E												1,00	**,68**	**,76**	**-,30**	**-,33**	-,05	**-,30**	-,12	-,17	-,19	,19	,12
Hb													1,00	**,94**	**,44**	**,47**	-,10	**-,31**	-,19	-,24	,04	,17	-,08
Hct														1,00	**,39**	**,27**	-,08	**-,27**	-,14	-,25	,04	,22	,07
MCV															1,00	**,90**	-,03	,09	-,04	-,11	**,33**	,04	-,14
MCH																1,00	-,08	-,02	-,08	-,10	**,28**	-,01	-,24
L																	1,00	**,48**	,10	,10	,06	,18	,23
Tr																		1,00	,01	,12	-,05	,09	,11
AST																			1,00	,87	,25	-,20	**,49**
ALT																				1,00	,27	-,19	**,36**
GGT																					1,00	-,14	-,11
Bil																						1,00	,20
Urea																							1,00
Krat																							
FEV1																							
FVC																							
RR sist																							
RR dijast																							
TT																							
DOB																							

Legenda: U pojedinom polju označen je koeficijent korelacije s predznakom. Statistička značajnost pojedinih korelacija označena je na slijedeći način:
$p \leq 0{,}0001$ crvenom bojom; $0{,}0001 > p \leq 0{,}05$ plavom bojom; $p > 0{,}05$ crnom bojom.

Iz tablice se vidi da su u sustavu prisutne multiple značajne povezanosti koje se razlikuju po jačini i smjeru. Za potrebe ovog rada posebno će biti analizirane i grafički prikazane povezanosti naslovnih parametara s ostalim kontinuiranim varijablama. U daljnjem tekstu bit će izdvojene značajne povezanosti ostalih kontinuiranih varijabli.

Inicijalne vrijednosti **PaO_2** očekivano značajno pozitivno koreliraju s Sat ($p<0,0001$). Ova varijabla negativno korelira s $PaCO_2$ ($p=0,0078$).

Rezultati provedene analize ukazuju da inicijalne vrijednosti **$PaCO_2$** pozitivno koreliraju s E ($p=0,0282$), Hb ($p=00017$), Hct ($p=0,003$), MCV ($p=0,0328$). Osim toga, ova varijabla značajno negativno korelira s SE ($p=0,0005$), pH ($p<0,0001$), Sat ($p<0,0001$), i dobi ($p=0,0304$).

Početne su vrijednosti **pH** značajno pozitivno povezane s početnim vrijednostima Sat ($p=0,0003$), SE ($p=0,0005$), L ($p=0,0098$), Tr ($p<0,0001$), bilirubina ($p=0,0025$). Pored toga, ova varijabla negativno korelira s E ($p=0,0045$), Hb ($p=0,0257$), Hct ($p=0,0153$).

Nađena je značajna negativna korelacija **Sat** s E ($p=0,0408$).

SE značajno pozitivno korelira s Tr ($p<0,0001$) i L ($p=0,0013$), a značajno negativno s E ($p<0,0001$), Hb ($p<0,0001$), Hct ($p<0,0001$).

Broj **E** značajno pozitivno korelira s inicijalnim vrijednostima Hb ($p<0,0001$), Hct ($p<0,0001$), kreatininom ($p=0,0085$), a negativno s MCV ($p=0,0248$), MCH ($p=0,0129$) i Tr ($p=0,0251$).

Hb značajno pozitivno korelira s Hct ($p<0,0001$), MCV ($p=0,0008$), MCH ($p=0,0003$), a negativno s Tr ($p=0,0189$) i dobi ($p=0,0203$).

Hct također značajno pozitivno korelira s MCV ($p=0,0034$) i MCH ($p=0,048$). Ova varijabla značajno negativno korelira s Tr ($p=0,043$) i dobi ($p=0,0203$).

Nađena je visoka pozitivna korelacija **MCV** s MCH ($p<0,0001$) i GGT ($p=0,0193$). Ova varijabla negativno korelira s dobi ($p=0,003$) i kreatininom ($p=0,0172$).

MCH značajno pozitivno korelira s GGT ($p=0,0419$), a negativno s kreatininom ($p=0,0075$) i dobi ($p<0,0001$).

Broj **L** značajno pozitivno korelira s brojem Tr ($p=0,0008$).

AST pozitivno korelira s ALT ($p<0,0001$) i urejom ($p=0,0002$).

ALT značajno pozitivno korelira s urejom ($p=0,0072$).

GGT značajno negativno korelira s dobi ($p=0,0401$).

Ovim je testom nađena značajna pozitivna korelacija **ureje** s kreatininom (p=0,0006) i dobi (p=0,0305).

FVC očekivano, statistički značajno korelira s FEV_1 (p<0,0001).

Kreatinin značajno pozitivno korelira s tjelesnom težinom (p=0,0474) i negativno s dobi (p=0,0014).

Siatolički **krvni tlak** značajno pozitivno korelira s dijastoličkim krvnim tlakom (p<0,0001).

4.3.2. Analiza korelacija faktora rasta i citokina s ostalim kontinuiranim varijablama

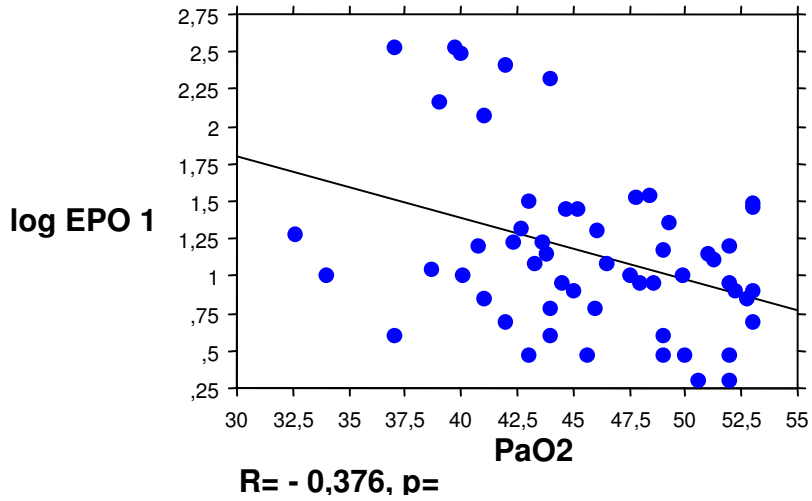
Svi su ispitivani faktori rasta i citokini u testovima povezanosti korišteni u logaritmiranom obliku.

4.3.2.1. Analiza povezanosti log EPO 1 s drugim varijablama

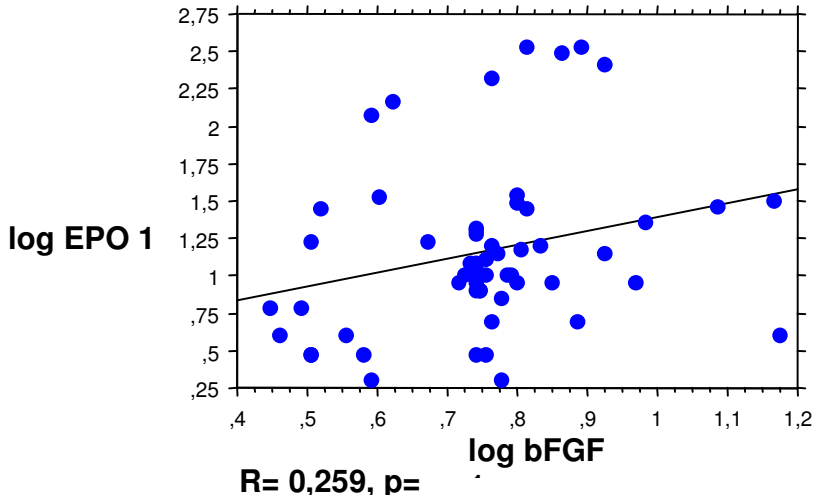
Regresijskom analizom otkrivene su slijedeće značajne povezanosti s varijablom log EPO. Statistički značajna pozitivna korelacija nađena je s inicijalnim vrijednostima ALT (R = 0,376, p = 0,0043), urejom (R = 0,306, p = 0,020) kreatininom (R= 0,294, p=0,029). Značajna negativna korelacija nađena je između inicijalnih vrijednosti log EPO i inicijalnih vrijednosti PaO_2 (R = -0,376, p = 0,0043). Nađena je granično značajna pozitivna korelacija ove varijable s inicijalnim vrijednostima log bFGF (R= 0,259, p= 0,054), te granično značajna negativna s sistoličkim krvnim tlakom (R=0,272, p= 0,0511). Analizirajući zasebno korelacije prema spolovima nađena je i značajna negativa korelacija log EPO s log IL-1β (R= -0,421, p= 0,0405) u muškog dijela populacije i statistički značajnu pozitivnu korelaciju log EPO s inicijalnim nalazom log VEGF (R= 0,370, p=0,04) u žena. Povezanosti EPO s PaO_2 i b-FGF prikazane su regresijskim krivuljama (graf 4.4.).

Graf 4.4. Povezanost log EPO 1 s odabranim varijablama

Graf 4.4.a. log EPO 1 vs PaO_2



Graf 4.4.b. log EPO 1 vs log bFGF 1

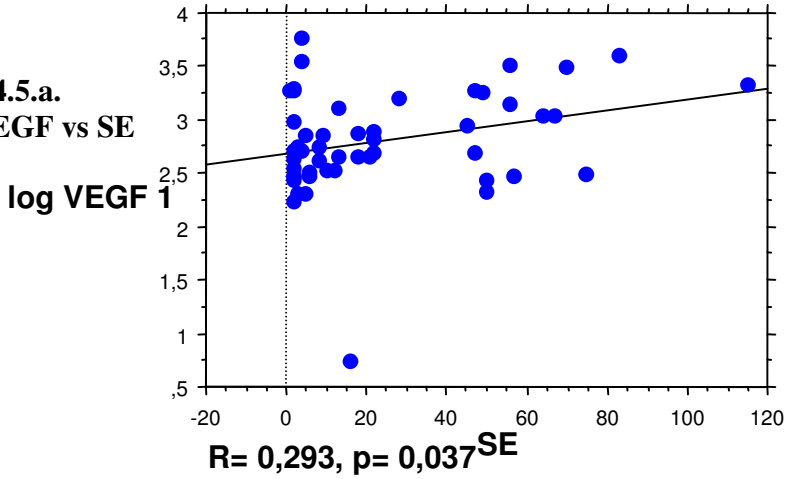


4.3.2.2. Analiza povezanosti log VEGF 1 s drugim varijablama

Regresijskom analizom dobivene su slijedeće statistički značajne povezanosti s varijablom log VEGF. Statistički značajna pozitivna korelacija nađena je s inicijalnim razinama SE (R = 0,293, p = 0,037), brojem L (R = 0,273, p = 0,0415) i Tr (R = 0,383, p = 0,003). Statistički značajna negativna korelacija nađena je s inicijalnim vrijednostima PaO_2 (R = -0,34, p = 0,0111) i Sat (R = -0,338, p = 0,0153). Povezanosti log VEGF s SE, L, Tr, PaO_2 i Sat prikazane su na Grafu 4.5.

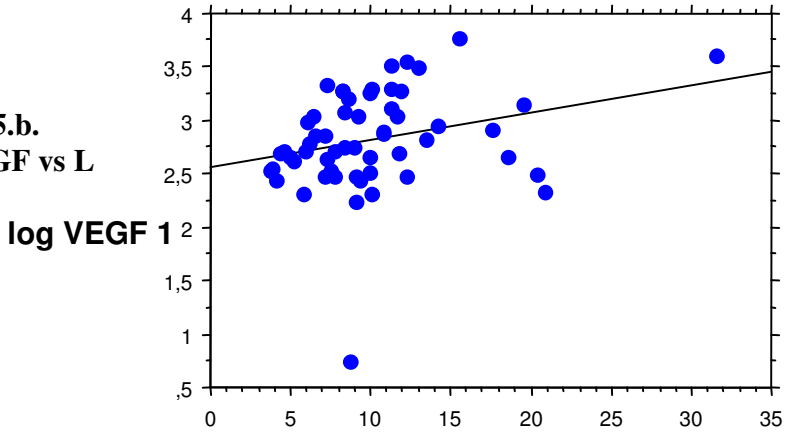
Graf 4.5. Povezanost log VEGF 1 s odabranim varijablama

Graf 4.5.a.
log VEGF vs SE



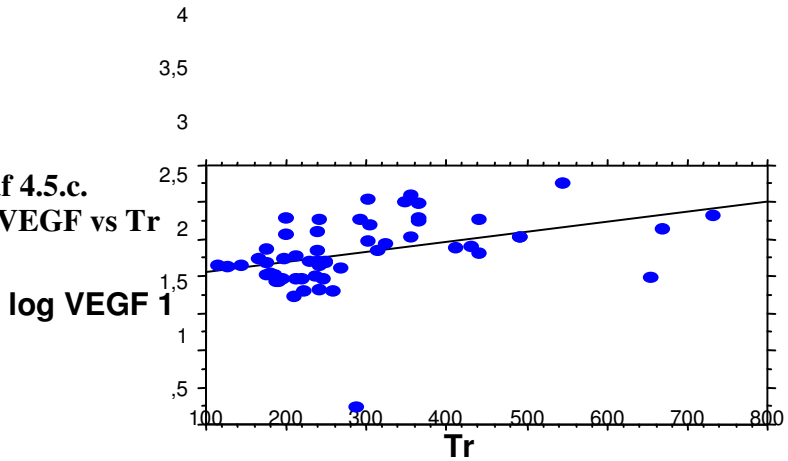
R= 0,293, p= 0,037

Graf 4.5.b.
log VEGF vs L



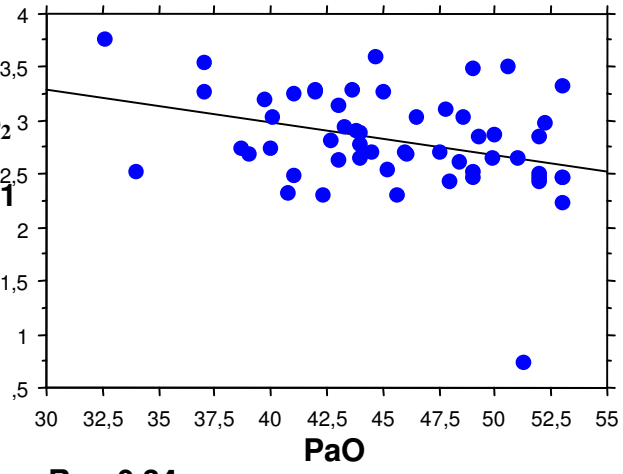
R= 0,273, p= 0,0415

Graf 4.5.c.
log VEGF vs Tr



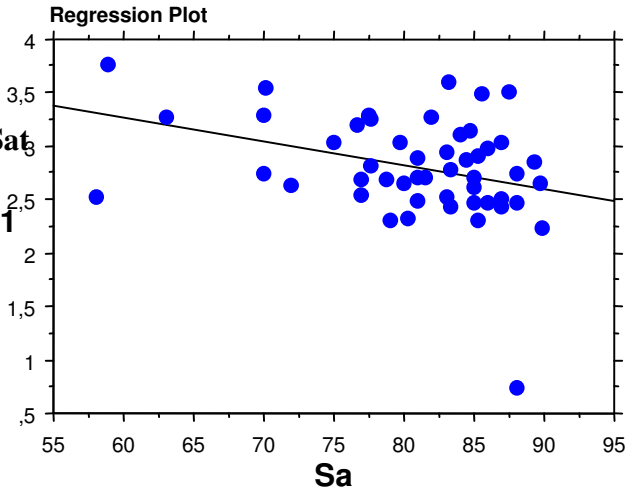
R= 0,383, p=

Graf 4.5.d.
log VEGF vs PaO_2



R= - 0,34, p=

Graf 4.5.e.
log VEGF vs Sat

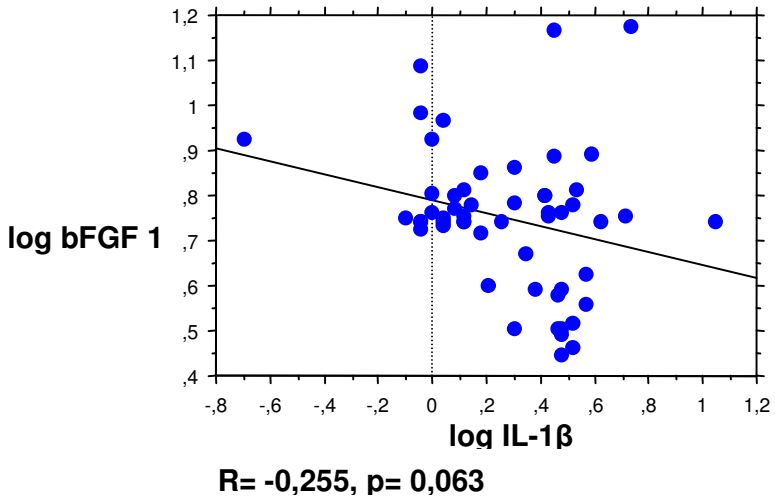


R= -0,338, p=

4.3.2.3. Analiza korelacija log b-FGF 1 s drugim varijablama

Regresijskom analizom dobivene su slijedeće značajne povezanosti s varijablom log bFGF. Statistički značajna pozitivna korelacija nađena je između inicijalnih vrijednosti log b-FGF i inicijalnih vrijednosti bilirubina (R = 0,285, p = 0,0369), a statistički granično značajna s urejom (R = 0,262, p= 0,0557), te granično negativna s inicijalnom varijablom log IL-1β (R = -0,255, p = 0,063). Korelacija log b-FGF s log IL-1β prikazana je regresijskom krivuljom (graf 4.6.).

Graf 4.6. Povezanost log b-FGF 1 s IL-1β 1

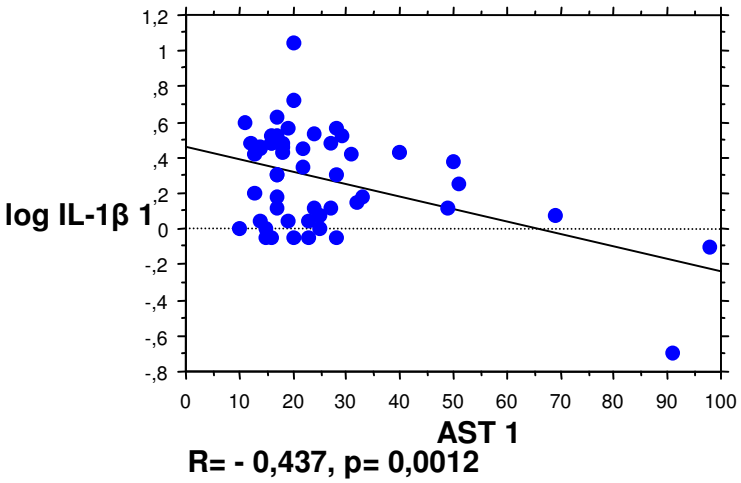


4.3.2.4. Analiza korelacija log IL-1β 1 s drugim varijablama

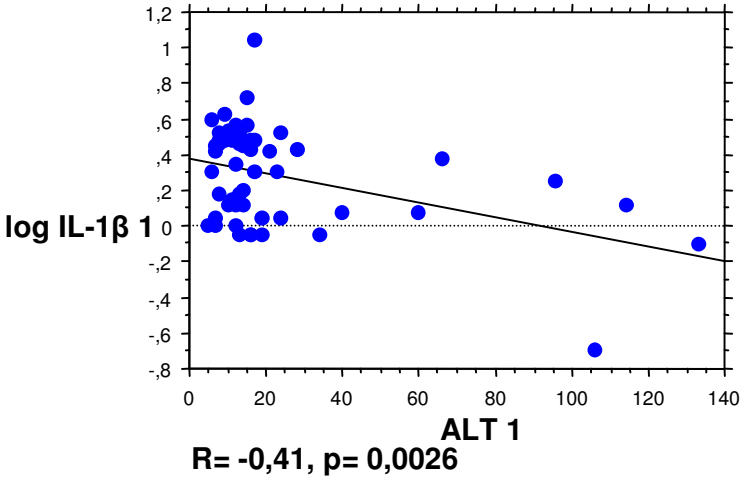
Regresijskom je analizom nađena značajna negativna korelacija između log IL-1β i inicijalnih vrijednosti AST (R = - 0,437, p = 0,0012) i ALT (R = - 0,41, p = 0,0026). Ove su korelacije prikazane na grafu 4.7.

Graf 4.7. Povezanost log IL-1β 1 s odabranim varijablama

Graf 4.7.a. log IL-1β 1 vs AST 1



Graf 4.7.b. log IL-1β 1 vs ALT 1

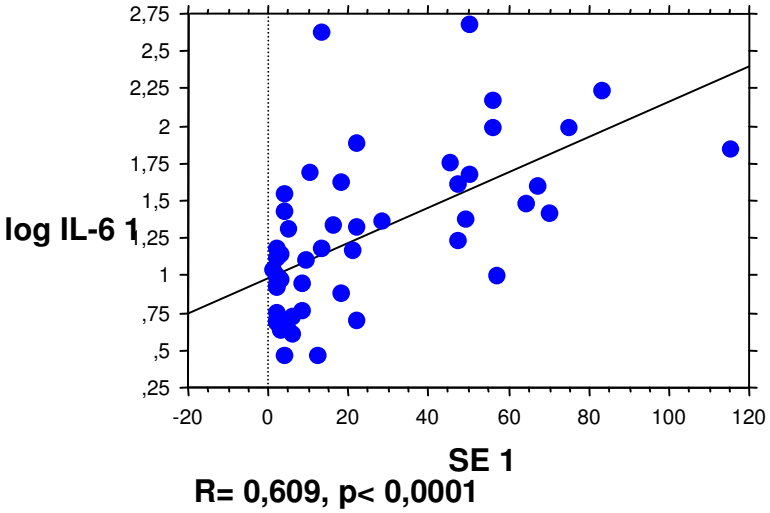


4.3.2.5. Analiza korelacija log IL-6 s drugim varijablama

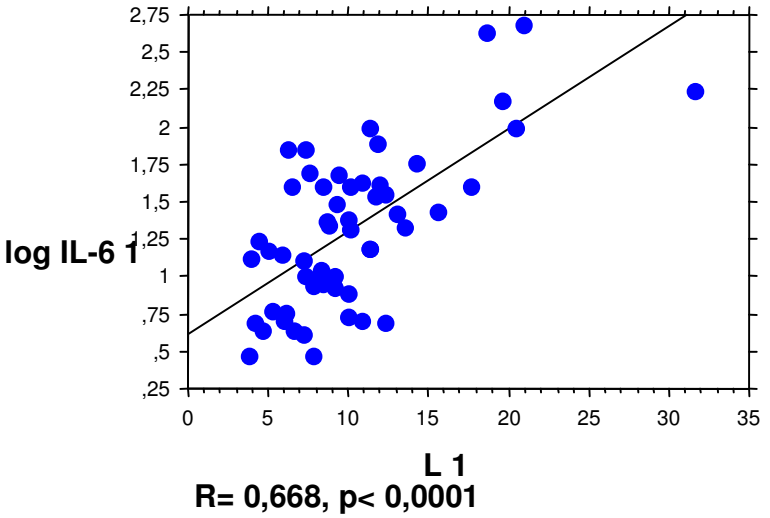
Regresijskom je analizom dobivena statistički značajna pozitivna korelacija varijable log IL-6 s pH (R= 0,441, p= 0,0008), brojem L (R = 0,668, p < 0,0001), SE (R = 0,609, p < 0,0001), brojem Tr (R = 0,344, p = 0,0094), urejom (R = 0,302, p = 0,0266), dobi (R = 0,291, p = 0,0294). Statistički značajna negativna korelacija dobivena je s inicijalnim vrijednostima $PaCO_2$ (R = - 0,336, p = 0,0121), Hb (R = -0,358, p = 0,0067), i Hct (R = - 0,316, p = 0,0187). Korelacije IL-6 s brojem L, SE, $PaCO_2$, Hb prikazane su na grafu 4.8.

Graf 4.8. Povezanost log IL-6 1 s odabranim varijablama

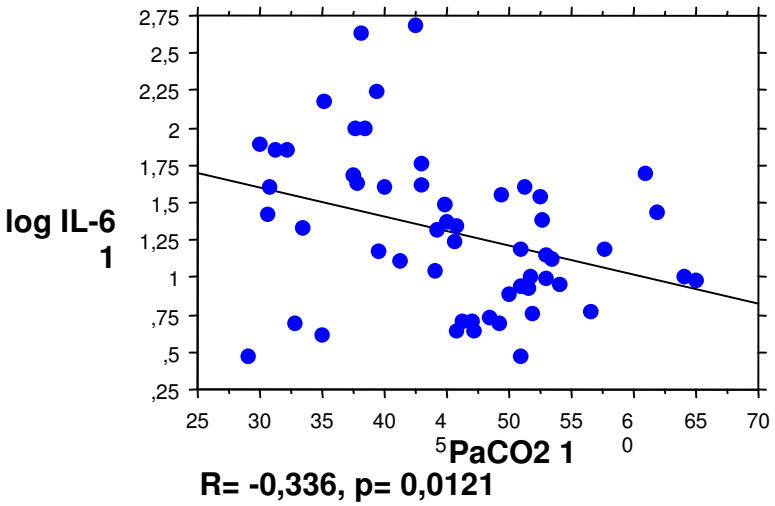
Graf 4.8.a. log IL-6 1 vs SE 1



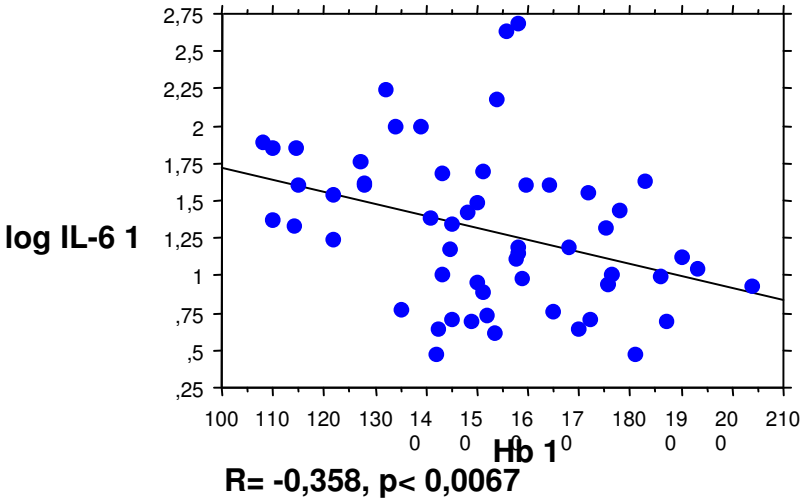
Graf 4.8.b. log IL-6 1 vs L 1



Graf 4.8.c. log IL-6 1 vs $PaCO_2$ 1



Graf 4.8.d. log IL-6 1 vs Hb 1



4.3.2.6. Analiza povezanosti log TNF-α s ostalim varijablama

Ovom je analizom dobiveno da log TNF-α značajno pozitivno korelira s dobi (R= 0,543, p= 0,0365).

4.3.3. Neparametrijski testovi

4.3.3.1. Analiza povezanosti spola s parametrima crvene krvne slike, ispitivanim faktorima rasta i citokinima

Za analizu povezanosti nominalnih s kontinuiranim varijablama korišten je Mann-Whitney neparametrijski test. Ni za jednu ispitivanu varijablu nije nađeno razlike u raspodjeli prema spolovima. Faktori značajnosti pojedinih povezanosti navedeni su u tablici 4.7.

Tablica 4.7. Povezanost spola s parametrima crvene krvne slike, ispitivanim faktorima rasta i citokinima

VARIJABLE	Z	p
E	-0,857	0,931
Hb	-1,138	0,255
Hct	-0,921	0,356
EPO	-1,594	0,111
VEGF	-1,030	0,303
bFGF	-0,288	0,773
IL-1β	-0,741	0,741
IL-6	-1,698	0,089
TNF-α	-0,919	0,358

4.3.3.2. Analiza povezanosti ispitivanih faktora rasta i citokina s lijekovima korištenim prije prijema u bolnicu

Mann-Whitney neparametrijskim testom analizirana je povezanost najčešće korištenih lijekova prije hospitalizacije i ispitivanih faktora rasta i citokina. Ovom je analizom dobivena statistički značajna povezanost korištenja furosemida i inicijalne razine bFGF-a

(p=0,0002). U skupini u kojoj je korišten furosemid prosječna vrijednost bFGF-a iznosila je 6,17 ± 3,09 pg/ml, a u skupini koja ga nije koristila 5,80 ± 1,72.

4.3.3.3. Analiza povezanosti podskupina varijable EPO s ostalim varijablama

S obzirom na široki raspon varijable EPO i njenu distribuciju značajno različitu od normalne, povezanost log EPO s drugim varijablama detaljnije je analizirana. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, a kao točka loma određena je vrijednost medijana koja je iznosila 9 U/l. Mann-Whitney analizom dobili smo da se ove dvije skupine bolesnika značajno razlikuju po inicijalnim vrijednostima PaO_2 i IL-6. Skupina s nižim vrijednostima EPO karakterizirana je višim vrijednostima PaO_2 i nižim vrijednostima IL-6. Na tablici 4.8. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije ovih parametara u dvije skupine bolesnika i značajnost njihovih razlika.

Tablica 4.8. Povezanost podskupina varijable EPO s ostalim varijablama

VARIJABLE	< 9 U/L	> 9 U/L	Z	p
PaO_2	47,43±4,77	44,31±5,25	-2,365	0,018
IL-6	25,87±30,61	60,48±108,44	-1,957	0,05

4.3.3.4. Analiza povezanosti podskupina varijable VEGF s ostalim varijablama

S obzirom da je varijabla VEGF također širokog raspona i distribucije značajno različite od normalne, njena povezanost s drugim varijablama je detaljnije analizirana. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. Za točku loma određena je vrijednost medijana koja je iznosila 580 pg/ml. Mann-Whitney analizom dobili smo da se ove dvije skupine ispitanika statistički značajno razlikuju po broju L, Tr, SE i IL-6. Skupina s višim vrijednostima VEGF karakterizirana je višim vrijednostima L, Tr, SE, a nižim vrijednostima IL-6. Srednje vrijednosti ovih parametara, njihove standardne devijacije i statističke razine značajnosti prikazane su u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Povezanosti podskupina varijable VEGF s ostalim varijablama

VARIJABLE	< 580 pg/ml	> 580 pg/ml	Z	p
L	8,86±4,57	11,4±5,2	-2,450	0,014
Tr	224,92±94,0	362,18±134,9	-4,539	<0,0001
SE	16,11±20,21	36,09±31,75	-1,959	0,050
IL-6	49,63±116,54	41,7±40,36	-2,720	0,007

4.4. MULTIVARIJATNE ANALIZE

4.4.1. Stepwisse regresija

Za svaki ispitivani faktor rasta i citokin zasebno učinjena je stepwisse regresijska analiza kako bi definirali prediktorske varijable koje ih najadekvatnije predskazuju. Kao zavisne varijable korištene su logaritamski transformirane varijable faktora rasta i citokina, a kao nezavisne varijable korištene su sve inicijalne kontinuirane varijable. U svakoj je analizi korišteno 29 nezavisnih varijabli: PaO_2, $PaCO_2$, pH, Sat, FVC, FEV_1, FEV_1/FVC, E, Hb, Hct, MCV, MCH, L, Tr, urea, kreatinin, AST, ALT, GGT, bilirubin, dob, tjelesna težina, sistolički i dijastolički RR, te faktori rasta, odnosno citokini koji trenutno nisu bili zavisna varijabla. Analize su učinjene na 38 ispitanika, u kojih je bila potpuna baza podataka. Stepwisse regresija je tehnika gradnje modela (eng. model building technicque), a u ovoj analizi korišten je postupak gradnje prema naprijed (forward entry method). Za kontroliranje učinka uključivanja, odnosno isključivanja iz modela definirana je F vrijednost. Za F-za uključivanje u model (eng. F-to-enter) uzeta je vrijednost 4,000, a za F-za isključivanje iz modela (eng. F-to-remove) uzeta je vrijednost 3,996. Prema tako definiranim kriterijima, u nekoliko koraka definirane su nezavisne varijable koje najbolje predskazuju zavisnu varijablu.

4.4.1.1. Stepwisse regresija s log EPO kao zavisnom varijablom

Stepwisse regresijska analiza s log EPO kao zavisnom varijablom izvršena je u tri koraka. Prva u model ušla je varijabla PaO_2 s F-to-enter koeficijentom 12,261, potom log bFGF s koeficijentom 9,261 i u trećem koraku urea s koeficijentom 6,43. Na osnovu ove analize

možemo reći da, uzevši u obzir odnose unutar cijelog sustava, log EPO kao zavisnu varijablu najbolje predskazuju PaO_2, log bFGF i ureja (tablica 4.10.).

Tablica 4.10. Stepwisse regresija s log EPO kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log EPO vrs 29 nezavisne varijable
Korak: 3

	Koeficijent	SG	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Odsječak	1,674	,818	1,674	4,191
PaO2	-,046	,014	-,387	10,179
ureja	,070	,027	,312	6,430
log bFGF	1,551	,561	,332	7,642

4.4.1.2. Stepwisse regresija s log VEGF kao zavisnom varijablom

Stepwisse regresijska analiza s log VEGF kao zavisnom varijablom izvršena je u tri koraka. Prva u model ušla je varijabla Tr s F-to-enter koeficijentom 24,735, potom pH s koeficijentom 7,321 i u trećem koraku log bFGF s koeficijentom 5,298. Stoga, možemo reći da log VEGF kao zavisnu varijablu najbolje predskazuju Tr, pH i log bFGF (tablica 4.11.).

Tablica 4.11. Stepwisse regresija s log VEGF kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log VEGF vrs. 29 nezavisne varijable
Korak: 3

	Koeficijant	SG	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Odsječak	21,527	6,217	21,527	11,988
pH	-2,701	,845	-,401	10,211
T	,003	4,441E-4	,803	39,615
log bFGF	,832	,362	,281	5,298

4.4.1.3. Stepwisse regresija s log b-FGF kao zavisnom varijablom

Stepwisse regresijska analiza s log b-FGF kao zavisnom varijablom izvršena je u dva koraka. Prva je u model ušla varijabla log EPO s F-to-enter koeficijentom 9,735, potom log IL-1β s koeficijentom 5,299. Na osnovu ove analize možemo reći da s obzirom na

multiple interakcije u sustavu, log b-FGF kao zavisnu varijablu najbolje predskazuju log EPO i log IL-1β (tablica 4.12.).

Tablica 4.12. Stepwisse regresija s log b-FGF kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log bFGF 1 vrs. 29 nezavisne varijable
Korak: 2

	Koeficijent	SG	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Osječak	,594	,055	,594	115,514
log EPO	,138	,041	,540	11,586
log IL 1	-,179	,078	-,365	5,299

4.4.1.5. Stepwisse regresija s log IL-1β kao zavisnom varijablom

Stepwisse regeresijskom analizom s log IL-1β završena je u prvom korku. Jedina je u model ušla varijabla AST s koeficijentom 13,504 (tablica 4.13.).

Tablica 4.13. Stepwisse regresija s log IL-1β kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log IL 1 1 vs. 29 nezavisne varijable
Korak: 1

	Coeficient	S	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Odsječak	.509	.074	.509	48.030
AS	-.008	.002	-.522	13.504

4.4.1.4. Stepwisse regresija s log IL-6 kao zavisnom varijablom

Stepwisse regeresijskom analizom identificirana su četiri faktora koja najbolje određuju log IL-6 kada se cijeli sustav promatra kao cjelina. Ova četiri faktora su: L, FEV_1, ALT i Sat. Prva je u sustav ušla varijabla L s F-to-enter koeficijentom 16,094, potom FEV_1 s 15,073, slijedila je AST s 4,715, te Sat s koeficijentom 7,576 (tablica 4.14.).

Tablica 4.14. Stepwisse regresija s log IL-6 kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log IL 6 vrs. 29 nezavisne varijable
Korak: 4

	Koeficijent	SG	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Odsječak	1,312	,427	1,312	9,442
Sat	-,013	,005	-,293	7,576
L	,050	,014	,398	12,278
ALT	,005	,002	,334	8,963
FEV1	,339	,065	,540	27,061

4.4.1.6. Stepwisse regresija s log TNF-α kao zavisnom varijablom

Ovom analizom identificirane su AST, dob, E i log VEGF kao nezavisne varijable koje najbolje predskazuju log TNF-α kao zavisnu varijablu. Prva je u model ušla varijabla AST s F-to-enter koeficijentom 39,33, potom dob s 4,925, slijedio je broj E s 7,285, te log VEGF s koeficijentom 2356,427 (tablica 4.15.).

Tablica 4.15. Stepwisse regresija s log TNF-α kao zavisnom varijablom

Variable u modelu
log TNF α vrs. 29 nezavisne varijable
Korak: 4

	Koeficijent	SG	Std. Koef.	F-za-uklanjanje
Odsječak	,728	,005	,728	24107,393
DOB	,009	5,984E-5	,472	21964,462
E	-,063	,001	-,137	2488,976
AST	,019	3,641E-5	1,091	284319,538
log VEGF 1	-,143	,003	-,185	2356,427

4.4.2. FAKTORSKA ANALIZA

S ciljem redukcije broja varijabli i detekcije strukture i odnosa među varijablama učinjena je faktorska analiza. U analizu su uključene 23 kontinuirane varijable koje zadovoljavaju kriterije normalne raspodjele. U analizu su uključene logaritamski transformirane varijable EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α jer su ovako transformirane varijable imale normalnu distribuciju. Iz tablice 4.16.c. vidi se koje su kontinuirane varijable uključene u analizu. Analiza je učinjena na 42 slučajeva, u kojih je

bila potpuna baza podataka. Iz tablice 4.16.a. vidljivo je da stupnjevi slobode iznose 275, Batlerov Chi kvadrat 1271,765, te da je p vrijednost je manja od 0,0001. Procijenjeni broj faktora bio je 11.

Na tablici 4.16.b. ovih je 11 faktora označeno kao 11 vrijednosti. Za ove novonastale faktore izračunate su varijance izvučene pomoću faktora, tzv. «Eigen» vrijednosti. Također je procijenjen ukupni dio varijance koju «kontrolira» pojedini faktor. Vidljivo je da Faktor 1 ima najveću «Eigen» vrijednost i ona iznosi 4,873 što je 21,2 % ukupne varijance. «Eigen» vrijednost faktora 2 iznosi 3,732, što je 16,2 % ukupne varijance. «Eigen» vrijednost faktora 3 iznosi 2,942, što je 12,8 % ukupne varijance. «Eigen» vrijednost faktora 4 iznosi 2,181, što je 9,5 % ukupne varijance. Prvih četiri faktora «kontroliarju» 59,7 % ukupne varijance, a ostali faktori u manjoj mjeri doprinose ukupnoj varijanci.

Tablica 4.16. Faktorska analiza

Tablica 4.16.a.

Sažetak faktorske analize

Broj varijabli	23
Proc. broj faktora	11
Broj faktora	7
Broj slučajeva	42
Broj nedostajećih	15
Stupnjevi slobode	275
Bartlettov X kvadrat	1271,765
P-vrijednost	<,0001

Metoda izdvajanja faktora: Principal Components
Pravilo izdvajanja: određenom metodom
Metoda transformacije: Orthotran/Varimax

Tablica 4.16.b.

"Eigen" vrijednosti

	veličina	Varianca Prop.
vrijednost 1	4,873	,212
vrijednost 2	3,732	,162
vrijednost 3	2,942	,128
vrijednost 4	2,181	,095
vrijednost 5	1,897	,082
vrijednost 6	1,305	,057
vrijednost 7	1,065	,046
vrijednost 8	,802	,035
vrijednost 9	,782	,034
vrijednost 10	,720	,031
vrijednost 11	,580	,025

Tablica 4.16.c. prikazuje ovih 4 faktora dobivenih bez rotacije. Opisali smo prvih četiri faktora izabrani prema kriteriju svaki zasebno predstavljaju barem 9% ukupne varijance, odnosno da mu je «Eigen» vrijednost veća od 2.

Tablica 4.16.c.

Nerotirani Faktori

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
PaO2	,085	-,608	-,023	-,540
PaCO2	,596	,474	,337	,028
pH	-,384	-,508	,063	,212
Sat	-,126	-,727	,092	-,457
SE	-,720	-,356	,218	,249
E	,456	,329	-,640	,150
H	,795	,150	,117	,247
Hct	,792	,264	,023	,283
MC	,474	-,044	,788	,188
MC	,455	-,137	,767	,134
L	-,575	-,094	,161	,558
T	-,511	,055	,147	,470
AST	-,468	,485	,347	-,399
ALT	-,538	,492	,319	-,397
GGT	,058	,131	,597	-,195
bi	,216	-,165	-,350	,126
urea	-,384	,652	-,049	-,078
kreat	-,141	,463	-,492	-,054
epo log	-,280	,603	-,043	,034
log VEGF 1	-,312	,366	,263	,343
log bFGF 1	-,123	,362	-,116	-,050
log IL 1 1	,178	-,442	-,239	,388
log IL 6 1	-,623	-,075	-,007	,414

Faktor 1 odlikuje se visokom pozitivnom korelacijom s $PaCO_2$, E, Hb, Hct, MCV, MCH, te visokom negativnom korelacijom s SE, brojem L, Tr, AST, ALT, urejom, log VEGF i log IL-6. Klinički bi se moglo raditi o bolesnicima s hiperkapnijom, izrazitom policitemijom u kojih pri pogoršanju nije dominiralo infektivno zbivanje.

Faktor 2 je karakteriziran pozitivnom korelacijom s $PaCO_2$, brojem E, AST, ALT, GGT, urejom, kreatininom, EPO, log b-FGF i log VEGF, te negativnom s PaO_2, pH, Sat, SE i log IL-1β. Ovaj faktor mogao bi odgovarati grupi bolesnika s globalnom respiracijskom insuficijencijom, a više vrijednosti transferaza mogle bi upućivati na akutnu desnostranu kardijalnu dekompenzaciju. Više vrijednosti retenata mogle bi upućivati na prerenalno oštećenje bubrežne funkcije. Niži pH mogao bi ukazivati na akutno pogoršanje globalne respiracijske insuficijencije. Akutna hipoksija je aktivirala sustav EPO i angiogenetskih

faktora, ali nema eritropoetskog odgovora. Moguće je da je prošlo premalo vremena od lučenja EPO ili je eritropoeza blokirana na kasnijim fazama.

Faktor 3 karakteriziran je pozitivnom korelacijom s $PaCO_2$, MCV, MCH, AST, ALT, GGT, a negativnom s brojem E i bilirubinom. Klinički se radi o bolesnicima s makrocitnom anemijom i oštećenjem jetrene funkcije, a najveća korelacija s GGT govori za moguću leziju uzrokovanu alkoholom.

Faktor 4 ima visoku pozitivnu korelaciju s brojem L, Tr, log VEGF, log IL-1β i log IL-6, te negativnu s PaO_2, Sat, AST i ALT. Pozitivna korelacija s brojem L i proupalnim citokinima (IL-1β i IL-6) mogla bi upućivati na upalno (infektivno) zbivanje u grupe bolesnika sa znakovima aktivacije angiogeneze i parcijalnom respiracijskom insuficijencijom, kojoj u prilog govore negativne korelacije s PaO_2 i Sat.

NALAZI NAKON POČETKA LIJEČENJA

4.5. DINAMIKA DIŠNIH PLINOVA, PARAMETARA KRVNE SLIKE, RUTINSKIH BIOKEMIJSKIH NALAZA I EPO NAKON POČETKA LIJEČENJA

U sklopu istraživanja praćena je dinamika vrijednosti dišnih plinova u arterijskoj krvi, parametara krvne slike, rutinskih biokemijskih nalaza i EPO. Osim inicijalnih vrijednosti, ove su varijable određivane drugog, osmog, četrnaestog i dvadeset i osmog dana liječenja. Dišni plinovi određivani su i sat vremena po početku liječenja. Dinamika je ovih varijabli grafički prikazana pomoću Box-Whisker plot-ova, a značajnost njihove promjene izračunata je parnim t-testom.

4.5.1. Dinamika dišnih plinova i značajnost promjena

Srednja je vrijednost **PaO_2** nakon sat vremena liječenja iznosila 66,1 ± 12,78 mmHg. Drugog dana liječenja srednja vrijednost PaO_2 iznosila je 66,9 ± 11,26 mmHg. Najniža zabilježena vrijednost drugog dana liječenja bila je 50 mmHg. Dakle, u svih je ispitanika došlo do zadovoljavajuće korekcije hipoksemije. Sat vremana po početku liječenja vrijednosti PaO_2 statistički su značajno više od inicijalnih (p= 0,0001). Nakon prvog sata liječenja vrijednosti PaO_2 su stabilne i statistički se zanačajno ne razlikuju u odnosu na vrijednosti u ostalim izmjerenim točkama (graf 4.9).

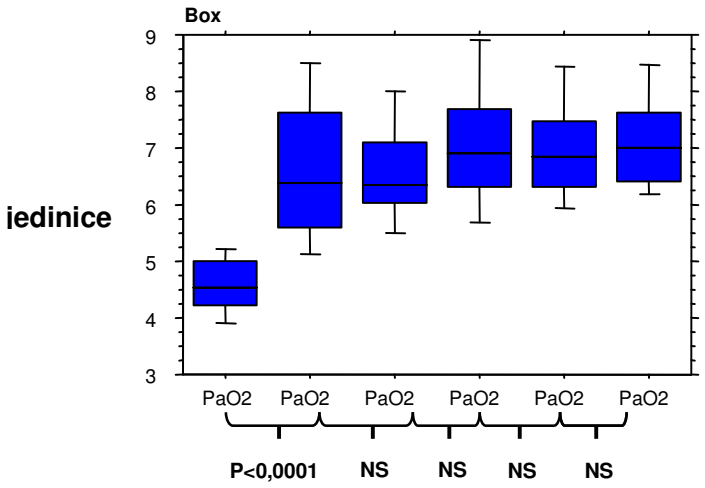
Srednje vrijednost **$PaCO_2$** sat vremena po početku liječenja iznosila je 47,54 ± 10,5 mmHg što je umjereno iznad referentnih vrijednosti i vrijednost umjereno viša od

inicijalne. Raspon ove varijable je širok i kreće se od hipo do hiperkapnijskih vrijednosti (28,4-85,0 mmHg). Drugog dana liječenja srednja vrijednost $PaCO_2$ iznosila je 50,09 ± 10,8 mmHg, a raspon je tada bio nešto manji (31,3-81 mmHg). Inicijalna vrijednost $PaCO_2$ statistički je značajno različita u odnosu na sve mjerene uzorke ($p < 0,0147$), da bi 28. dana liječenja ona ponovno pala i statistički se ne razlikuje od inicijalne ($p = 0,849$) (graf 4.9.).

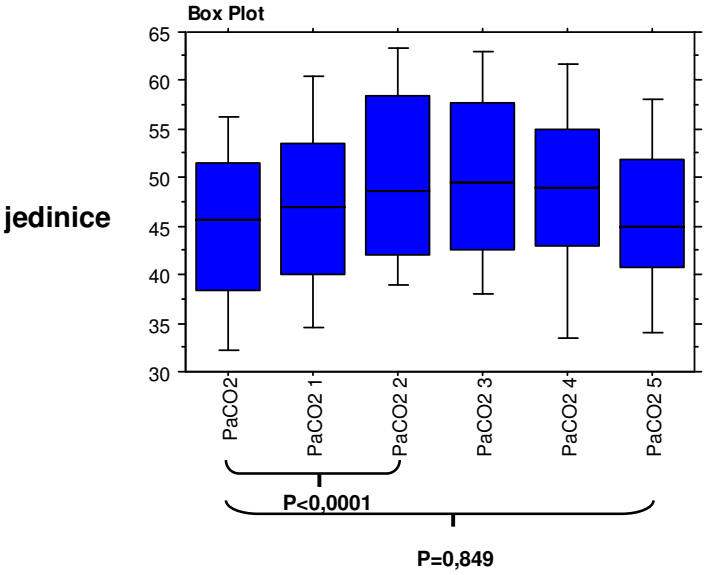
Na grafu 4.9. prikazana je dinamika PaO_2 i $PaCO_2$ pri čemu je inicijalna točka označena brojem 0, nakon sat vremena liječenja brojem 1, drugi dani liječenja brojem 2, osmi dani liječenja brojem 3, četrnaesti dani brojem 4 i dvadeset i osmi dani liječenja brojem 5.

Graf 4.9. Dinamika dišnih plinova i značajnost projena

Graf 4.9.a. Dinamika PaO_2



Graf 4.9.b. Dinamika $PaCO_2$



4.5.2. Dinamika parametara krvne slike i značajnost promjena

Broj E, koncentracija Hb i Hct pokazuju istu dinamiku promjena. Sve tri varijable značajno padaju već prvog dana nakon početka terapije, a najnižih su vrijednosti četrnaesti dan po početku liječenja. Vrijednosti zabilježene dvadeset i osmi dan liječenja nešto su više od onih izmjerenih četrnaesti dan, ali se od njih statistički značajno ne razlikuju.

Srednja vrijednost **broja E** drugog dana liječenja iznosi 5,08 ± 0,7410 x ^{12}/L što je značajno niža vrijednost od inicijalne (p=0,0095). Najniža vrijednost ovog parametra zabilježena je četrnaestog dana liječenja kada iznosi 4,87 ± 0,687 x ^{12}/L, što je također značajno niža vrijednost od inicijalne (p=0,0013).

Srednja vrijednost **Hb** drugog dana liječenja iznosila je 143,94 ± 23,71 g/L, što je također statistički značajno niža vrijednost u odnosu na inicijalnu (p < 0,0001). Najniža vrijednost ovog parametra izmjerena je četrnaesti dan liječenja i iznosila je 134,87 ± 21,39 g/L, što je za 9,6 % niža od inicijalne (p < 0,0001). Uzorak izmjeren nakon dvadeset i osam dana liječenja neznatno je viši od onog izmjerenog četrnaestog dana liječenja i iznosi 139,94 ± 23,99 g/L (p = 0,230). Posljednji uzorak je za 9,5 % niži od inicijalnog (p = 0,049).

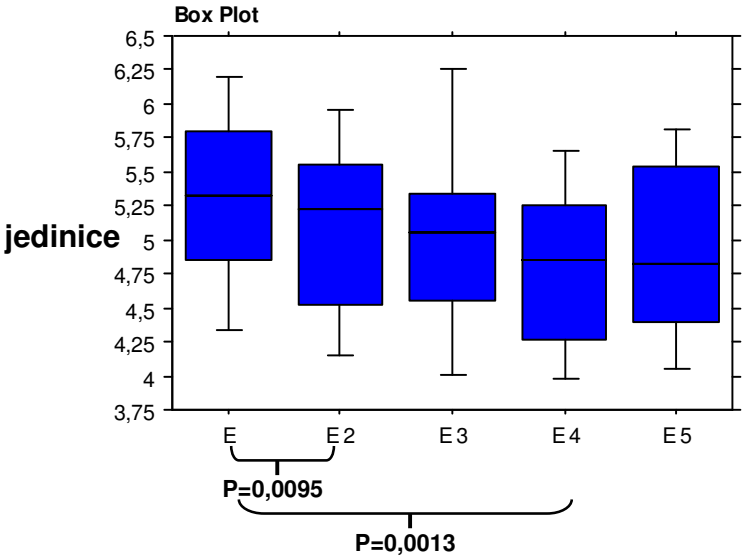
Srednja vrijednost **Hct** drugog dana liječenja značajno je niža od inicijalne i iznosi 0,454 ± 0,07 (p = 0,033). Najniža vrijednost ovog parametra izmjerena je četrnaesti dan liječenja i iznosila je 0,42 ± 0,072 (p < 0,0001). Uzorak izmjeren nakon dvadeset i osam dana liječenja neznatno je viši od onog izmjerenog četrnaestog dana liječenja i prosječne je vrijednosti 0,419 ± 0,07 (p = 0,002).

Vrijednosti staničnih indeksa **MCV i MCH** ne mijenjaju se značajno tijekom liječenja (p>0,068, odnosno p>0,159).

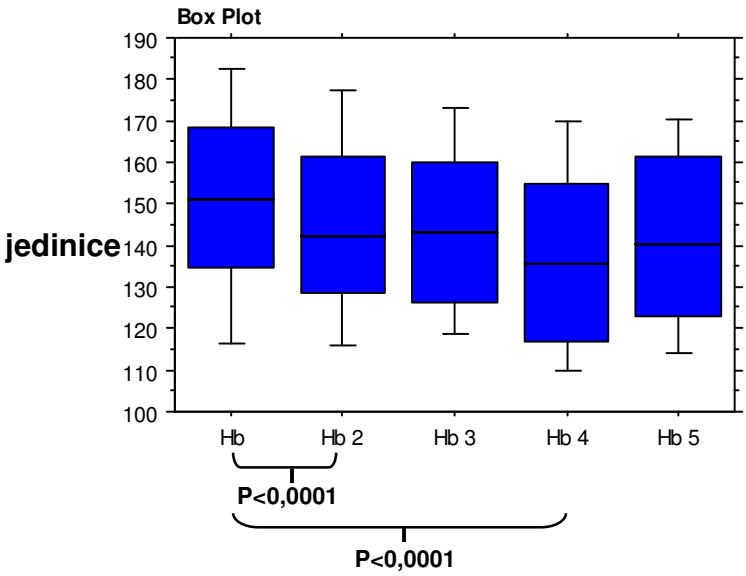
Dinamika E i Hb prikazana je na grafu 4.10. Inicijalna je točka označena brojem 1, drugi dan liječenja brojem 2, osmi dani liječenja brojem 3, četrnaesti dani brojem 4 i dvadeset i osmi dani liječenja brojem 5.

Graf 4.10. Dinamika E i Hb i značajnost promjena

Graf 4.10.a. Dinamika E

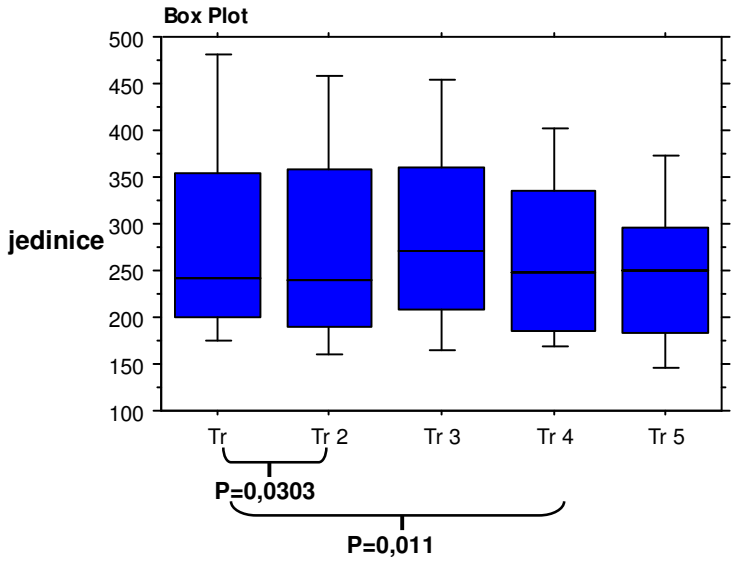


Graf 4.10.b. Dinamika Hb



U odnosu na inicijalne vrijednosti broj **Tr** statistički je značajno niži drugog dana liječenja i iznosi 277,67 ± 116,77 (p = 0,0303). U 6 ispitanika vrijednost Tr drugog dana liječenja bila je iznad referentnog intervala. Ova varijabla se najznačajnije razlikuje od inicijalnih 14-tog dana liječenja kada je prosječne vrijednosti 266,55 ± 98,71 (p = 0,011). Najniža prosječna vrijednost nađena je dvedeset i osmog dana liječenja kada iznosi 255,8 ± 102,17 (p = 0,029). Dinamika ove varijable prikazana je na grafu 4.11.

Graf 4.11. Dinamika Tr i značajnost promjene



Broj **L** pokazuje tendenciju pada s nastupom liječenja i već je značajno niži drugog dana liječenja kad je prosječna vrijednost 9,31 ± 3,93 (p = 0,014). Najniže vrijednosti su četrnaestog dana liječenja. Tada prosječna vrijednost iznosi 8,08 ± 3,43 i najznačajnije se razlikuje od inicijalnih (p = 0,0007).

4.5.3. Dinamika rutinskih biokemijskih parametara i značajnost promjena

Za sve rutinski određivane biokemijske parametre analizirana je značajnost promjena. Među analiziranim varijablamo jedino se AST značajno mijenja. Njena prosječna vrijednost pada s početkom liječenja. Drugog dana liječenja prosječna vrijednost ove varijable je 22,00 ± 11,47 U/L, što je granično značajna promjena u odnosu na inicijalne

vrijednosti (p = 0,056). Najniže vrijednosti su četrnaestog dana liječenja kada iznose 18,4 ± 8,22 U/L, i najznačajnije se razlikuju od inicijalnih (p = 0,015).

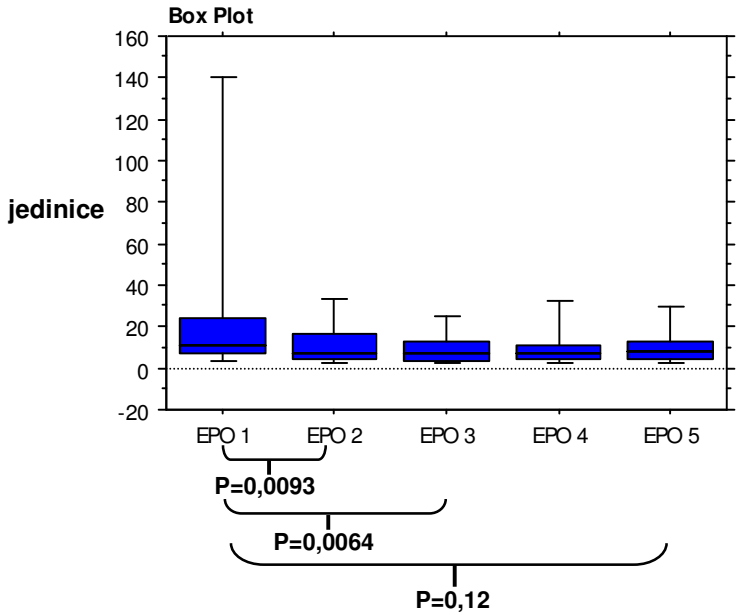
4.5.4. Dinamika EPO nakon početka liječenja i značajnost promjena

Tablica 4.17. Dinamika EPO

	X	SD	SG	MIN	MAKS	CV.	GS	MED
EPO 2	14,102	16,923	2,242	2,000	77,900	1,200	8,646	7,300
EPO 3	10,800	10,131	1,379	2,000	43,800	,938	7,659	7,300
EPO 4	18,173	42,371	6,388	2,000	249,100	2,332	8,160	7,600
EPO 5	17,483	36,716	6,206	2,000	214,900	2,100	8,627	7,900

Drugog dana lječenja EPO pada i njegova srednja vrijednost iznosi 14,1 ± 16,9 U/L. Ovo je statistički značajno niža vrijednost u odnosu na inicijalnu (p = 0,0093). 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti ove varijable iznosi 9,62-18,58 U/L. Također, raspon ove varijable bio je mnogo manji od inicijalne i maksimalna zabilježena vrijednost iznosila je 77,9 U/L. Osam dana nakon početka liječenja srednja vrijednost EPO statistički je značajno niža od inicijalne i iznosi 10,8 ± 10,13 U/L (p = 0,0064). Četrnaesti i dvadesetosmi dan liječenja zabilježen je ponovni porast prosječne vrijednosti EPO i ona se više statistički ne razlikuju značajno od inicijalnih (p > 0,12). Također, četrnaesti i dvadesetosmi dan liječenja ova varijabla je ponovno vrlo širokog raspona i kreće se od donjih detektibilnih vrijednosti do izrazito visokih vrijednosti, iznad 200 U/l. Dinamika EPO prikazana je na grafu 4.12.

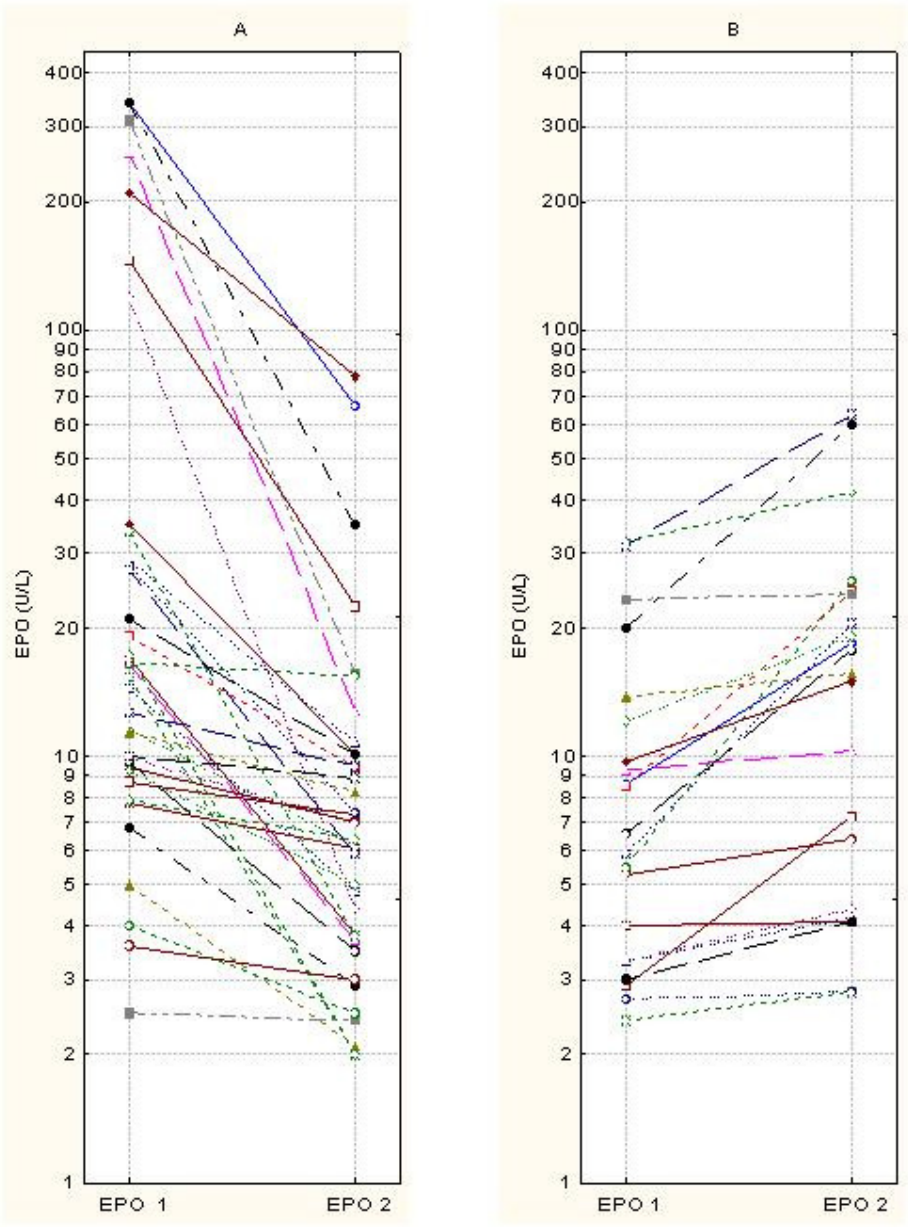
Graf 4.12. Dinamika EPO i značajnost promjene



4.5.4.1. Dinamika EPO nakon korekcije hipoksemije prema grupama

Detaljna analiza dinamike varijable EPO u individualnih pacijenata pokazala je da ova varijabla ne pokazuje jednaki uzorak u svih pacijenata. U 36/57 pacijenata (17 muškaraca, 19 žena), zamijećen je pad u razini EPO unutar 24 sata liječenja. U preostalih 21 pacijenata (9 muškaraca i 12 žena) EPO je porastao unutar istog intervala. Na ovaj su način prepoznate dvije grupe pacijenat s različitim odgovorom na korekciju hipoksemije: grupa A koja je veća (čini je 63,2 % pacijenata), i u koje je zamijećen očekivani pad EPO i grupa B (čini je 36,8% pacijenata) u koje je zamijećen neočekivani porast EPO nakon korekcije hipoksemije. Ova je dinamika parametra EPO prikazana grafom 4.13.

Graf 4.13. Dinamika EPO nakon korekcije hipoksemije prema grupama



4.5.4.2. Analiza povezanosti grupe pacijenata s različitim odgovorom EPO na korekciju hipoksemije s ostalim kontinuiranim varijablama

Dvije grupe pacijenata s različitim odgovorom EPO na korekciju hipoksemije (grupa A i grupa B) međusobno su uspoređene s obzirom na sve izmjerene varijable kako bi se

eventualno prepoznali faktori odgovorni za ovaj različiti odgovor među ispitanicima. Ova je analiza izvršena Mann – Whitney testom. Značajna je razlika nađena jedino s obzirom na inicijalne vrijednosti log EPO (p = 0,0015), inicijalne vrijednosti broja E (p = 0,0278) i korištenje ACE inhibitora tijekom bolničkog liječenja. Inicijalne su vrijednosti EPO i broja E bile više u grupe A. U grupe A srednja vrijednost za EPO iznosila je 59,70 ± 100,93 U/L, a za E 5,489 ± 0,658 x ^{12}/L. U grupe B je srednja vrijednost za EPO iznosila 10,10 ± 9,07 U/L, a za E 5,01 ± 0,77 x ^{12}/L. ACE inhibitori korišteni su češće u skupini A.

4.6. ANGIOGENI FAKTORI RASTA I CITOKINI NAKON POČETKA LIJEČENJA

Ispitivani su angiogeni faktori rasta i citokini, osim inicijalno, određivani i drugi dan liječenja. Ovi će parametri biti najprije opisani, a potom će njihova promjena biti grafički prikazana pomoću Box-Whisker plot-ova. Varijable su označene na slijedeći način: 1-inicijalna vrijednost, 2-vrijednost nakon 24 sata liječenja. Značajnost promjena je izračunata pomoću parnog t-testa i prikazana na grafu.

4.6.1. Opis parametara VEGF i bFGF nakon početka liječenja

Osnovni opisni statistički parametri dobiveni za uzorke drugog dana liječenja prikazani su u tablici 4.18.

Tablica 4.18. VEGF i bFGF nakon početka liječenja

	X	S	SG	MIN	MAKS	CV	GS	MED
VEGF 2	1039,248	1192,267	165,338	7,900	5262,000	1,147	610,883	512,000
b FGF 2	6,073	2,922	,405	2,700	23,700	,481	5,686	5,800

Srednja je vrijednost varijable **VEGF** izmjerene u drugoj točci tek neznatno niža od inicijalne i iznosila je 1039,2 ± 1192,3 pg/ml. 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti ove varijable iznosi 750,93-1333,05 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov test za ovu varijablu iznosi: d=0,216, p< 0,05, a za logaritmirani oblik d= 0,1028, p= n.s.

Srednja je vrijednost varijable **bFGF** izmjerene u drugoj točci također tek neznatno niža od inicijalne i iznosila je 6,1 ± 2,9 pg/ml. 95% interval pouzdanosti prosječne vrijednosti ove varijable iznosi 5,39 - 6,69 pg/ml. Kolgmorov – Smirnov test za ovu varijabli u

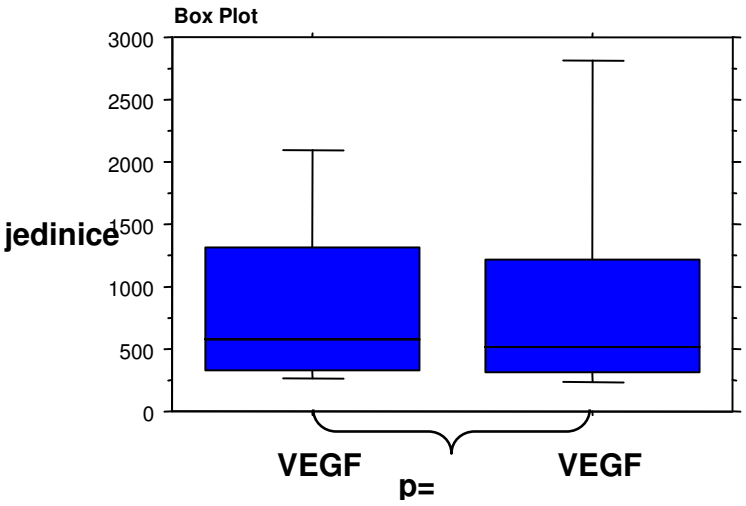
izvornom obliku iznosi: d= 0,2824, p< 0,01, no Lilliefors test je značajan (p< 0,01). I u logaritmiranom se obliku distribucija ove varijable značajno razlikuje od normalne, K – S test: d= 0.18958, p< 0,05.

4.6.2. Grafički prikaz promjene VEGF i b FGF i analiza značajnost promjena nakon početka liječenja

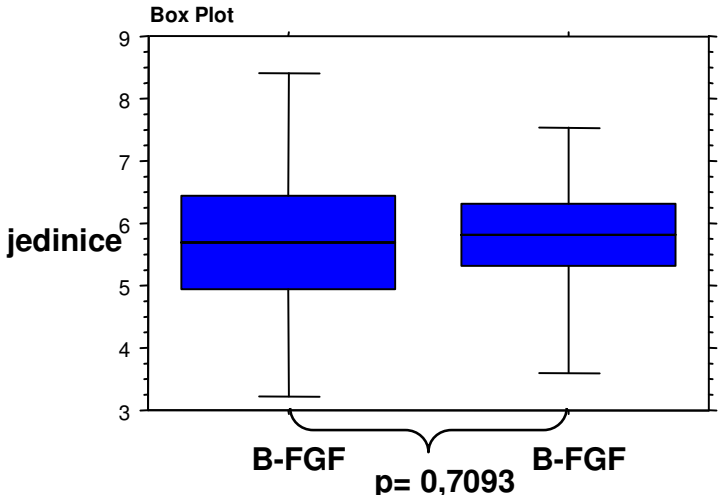
Na grafu 4.14. prikazana je promjena varijabli ispitivanih angiogenih faktora rasta nakon početka liječenja. Varijabla VEGF ne mijenja se značajno unutar prvih 24 sata liječenja (p= 0,1566). Varijabla bFGF se također ne mijenja se značajno unutar prvih 24 sata liječenja (p= 0,7093).

Graf 4.14. Promjena VEGF i b-FGF nakon početka liječenja i analiza značajnosti

Graf 4.14.a. Promjena VEGF-a



Graf 4.14.b. Promjena b-FGF-a



4.6.3. Opis parametara IL-1β, IL-6 i TNF-α nakon početka liječenja

Osnovni opisni statistički parametri dobiveni iz uzoraka prikupljenih drugog dana liječenja prikazani su u tablici 4.19.

Tablica 4.19. Citokini nakon početka liječenja

	X	SD	SG	MIN	MAKS	CV	GS	MED
IL 1 2	2,063	1,483	,208	,100	8,600	,719	1,615	1,900
IL 6 2	29,506	28,606	3,967	2,900	133,800	,970	18,502	16,800
TNF 2	9,831	2,441	,677	6,800	14,400	,248	9,575	8,700

Srednja je vrijednost varijable **IL-1β**, izmjerene nakon 24 sata liječenja, tek neznatno niža od početne i iznosi 2,1 ± 1,5 pg/ml. Raspon je ove varijable, također, tek neznatno uži od inicijalne i kreće se od 0,1 do 8,6 pg/ml. 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti za ovu varijablu iznosi 1,67-2,46 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov test iznosio je: $d = 0,1489$, $p > 0,02$, no Lilliefors test je bio značajan ($p < 0,01$). Zbog toga je varijabla logaritmirana, raspodjela ovako transformirane varijable nije se značajno razlikovala od normalne (K- S test; $d = 0,108$, p = n.s.).

Srednja je vrijednost varijable **IL-6**, izmjerene u drugoj točci, niža je od početne i iznosi 29,5 ± 28,6 pg/ml. Među ovom skupinom varijabli, ona je ujedno i najvećeg stupnja varijabilnosti. Raspon je uži od inicijalne i kreće se od 2,9 do 133,8 pg/ml. 95% interval pouzdanosti medijana za ovu varijablu iznosi 21,92-37,10 pg/ml. Kako je njena distribucija bila značajno različita od normalne (K – S test; $d = 0,19997$, $p < 0,05$), logaritmirana je. Ovako transformirana varijabla bila je normalne distribucije ($d = 0,0835$, p = n.s.).

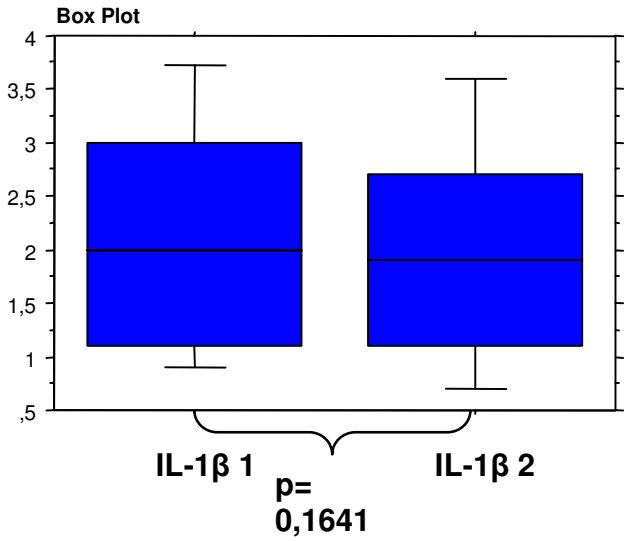
Srednja je vrijednost varijable **TNF-α**, izmjerene nakon 24 sata liječenja, tek neznatno niža od početne i iznosi 9,8 ± 2,4 pg/ml. Raspon je ove varijable tek neznatno uži od inicijalne i kreće se od 6,8 do 14,4 pg/ml. 95% interval pouzdanosti medijana iznosi 8,09-11,58 pg/ml. Kolmogorov – Smirnov test je iznosio: $d= 0,2639$, $p > 0,02$, no Lilliefors test je bio značajan ($p < 0,05$). Zbog toga je varijabla logaritmirana, raspodjela ovako transformirane varijable nije se značajno razlikovala od normalne (K- S test; $d = 0,2377$, p = n.s.).

4.6.4. Grafički prikaz promjene IL-1β, IL-6 i TNF-α i analiza značajnost promjena nakon početka liječenja

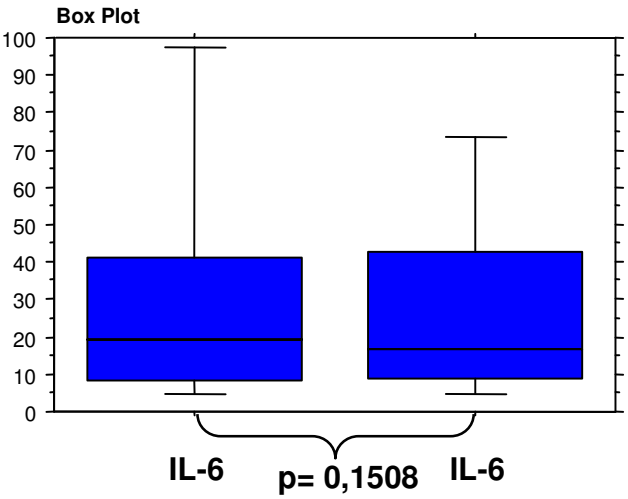
Dinamika varijabli citokina također je prikazana pomoću Box-Whisker plot-ova, kao i značajnost ovih promjena (graf 4.15.). Niti jedna od ispitivanih varijabli se ne mijenja značajno, a pojedini indeksi značajnosti za ove varijable iznose: IL-1β: p = 0,1641, IL-6: p = 0,1508, TNF-α: p = 0,8811.

Graf 4.15. Promjena IL-1β, IL-6 i TNF-α nakon početka liječenja i analiza značajnosti

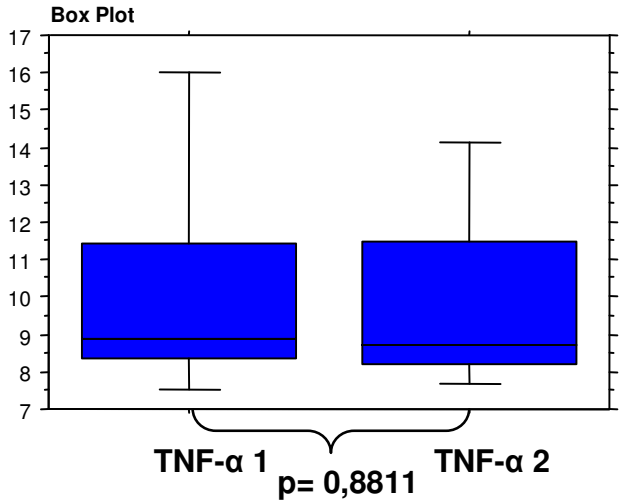
Graf 4.15.a. Promjena IL-1β



Graf 4.15.b. Promjena IL-6



Graf 4.15.c. Promjena TNF-α



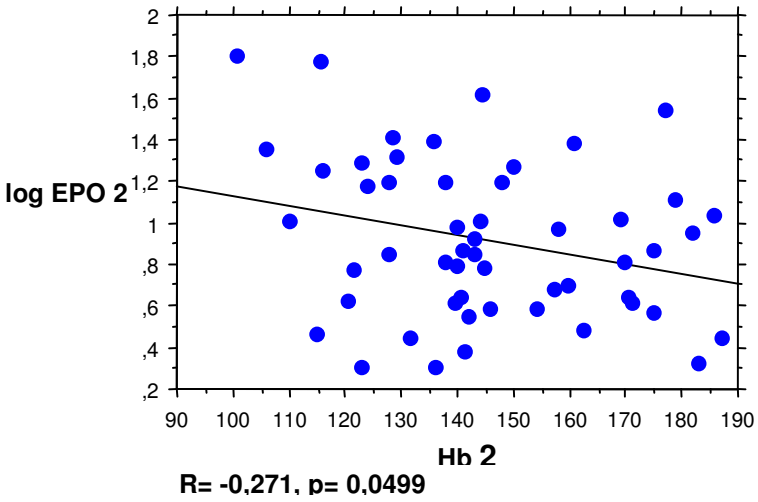
4.7. ANALIZA POVEZANOSTI NALAZA IZMJERENIH U DRUGOJ TOČCI (UNIVARIJATNA-BIVARIJATNA)

S obzirom na mogući odnos hipoksije i istraživanih faktora, od interesa je bilo istražiti da li se međuodnosi u sustavu mijenjaju nakon korekcije hipoksije.

4.7.1. Analiza povezanosti log EPO 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

Logaritamski transformirana varijabla EPO izmjerena 24 sata nakon početka liječenja statistički značajno pozitivno korelira brojem Tr 2 (R = 0,421, p = 0,0017) i GGT 2 (R = 0,32, p = 0,0222) izmjerenim u drugoj točci. Ova varijabla ststistički značajno negativno korelira s Hb 2 izmjerenim nakon korekcije hipoksemije (R = -0,271, p = 0,0499). Korelacija log EPO 2 s Hb 2 prikazana je grafom 4.16.

Graf 4.16. Povezanost log EPO 2 s Hb 2

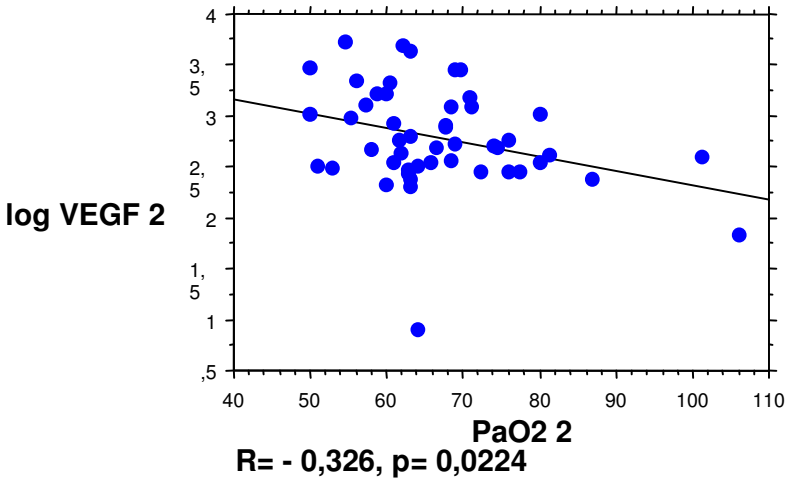


4.7.2. Analiza povezanosti log VEGF 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

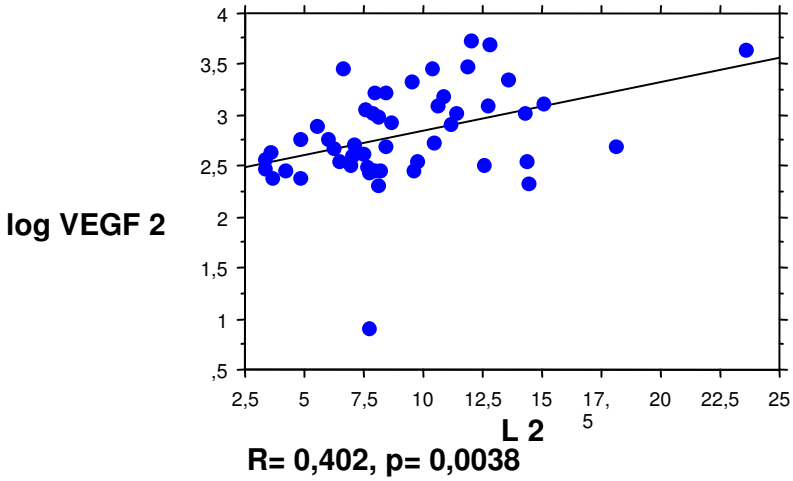
Regresijskom analizom dobiveno je da log VEGF 2 značajno pozitivno korelira sa log IL6 2 (R = 0,349, p = 0,0112), brojem L 2 (R = 0,402, p = 0,0038), brojem Tr 2 (R = 0,34, p = 0, 0156), a značajno negativno s PaO_2 2 (R = -0,326, p = 0,0224). Ove su korelacije prikazane grafom 4.17.

Graf 4.17. Povezanost log VEGF 2 s odabranim varijablama

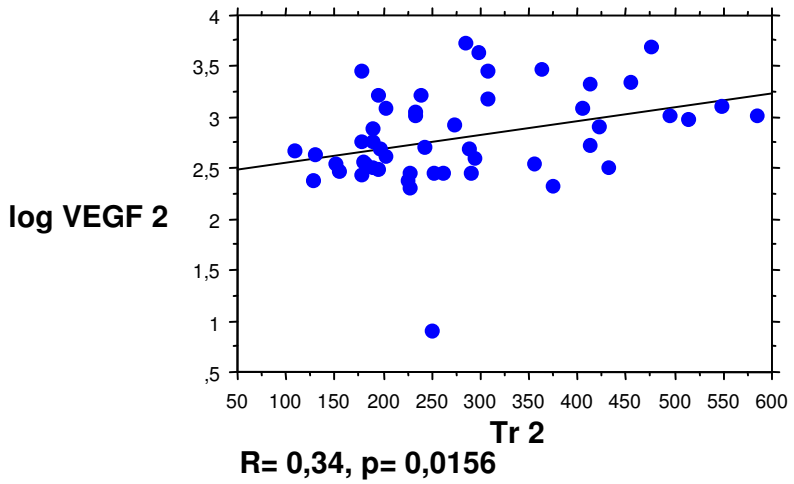
Graf 4.17.a. log VEGF 2 vs log PaO_2 2



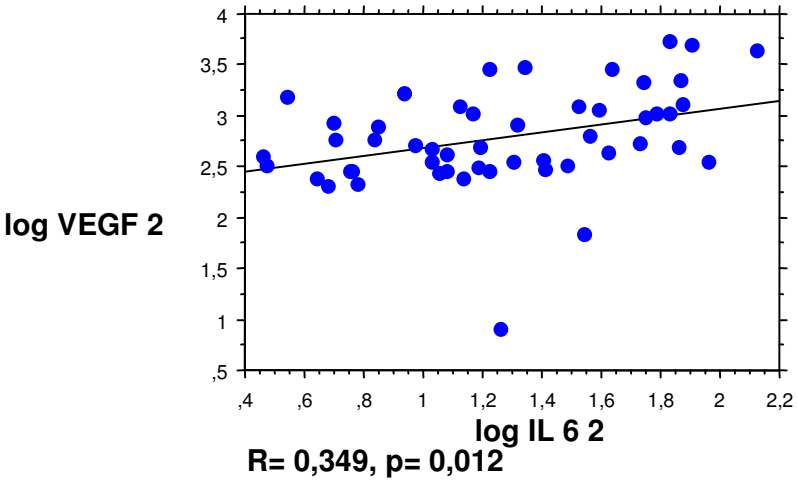
Graf 4.17.b. log VEGF 2 vs L 2



Graf 4.17.c. log VEGF 2 vs Tr 2



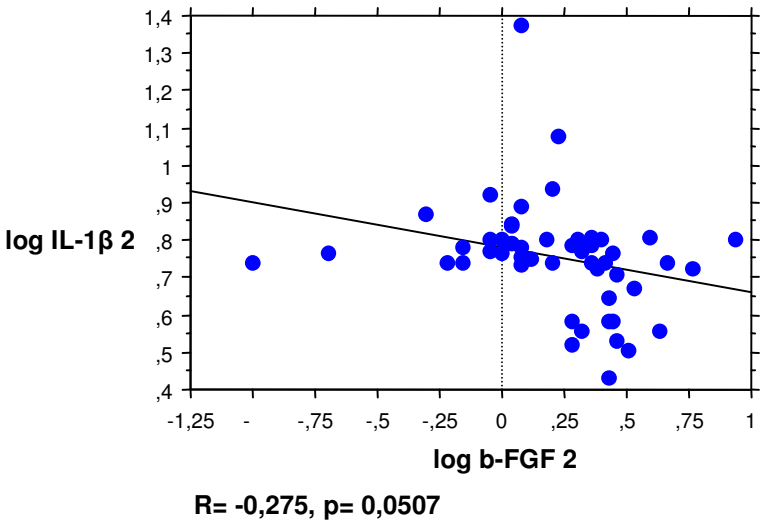
Graf 4.17.d. log VEGF 2 vs log IL-6 2



4.7.3. Analiza povezanosti log bFGF 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

Regresijskom analizom nađena je statistički granično značajna negativna korelacija s log IL-1β 2 (R = -0,275, p = 0,0507). Ova povezanost prikazana je grafom 4.18.

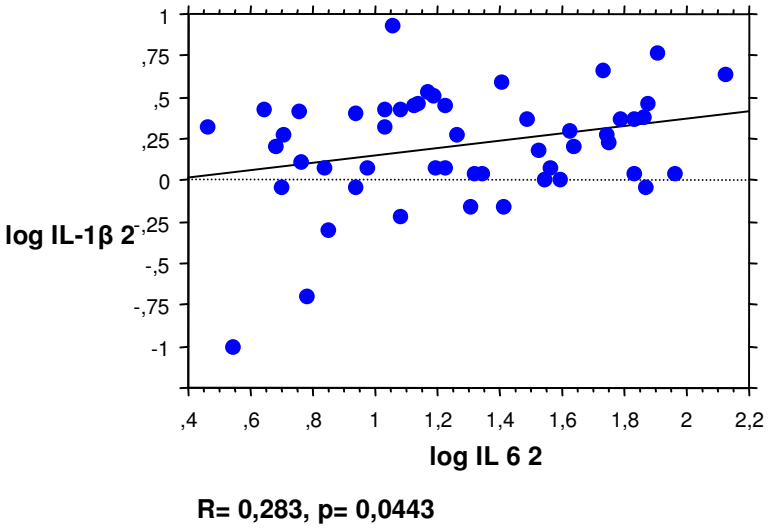
Graf 4.18. Povezanost log b-FGF 2 s log IL-1β 2



4.7.4. Analiza povezanosti log IL-1β 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

Ovom je analizom dobivena značajna pozitivna korelacija log IL-1β izmjerenog nakon korekcije hipoksemije s log IL-6 izmjerenim u drugoj točci (R = 0,283, p = 0,0443). Odnos između IL-1β 2 i IL-6 2 prikazan je grafom 4.19.

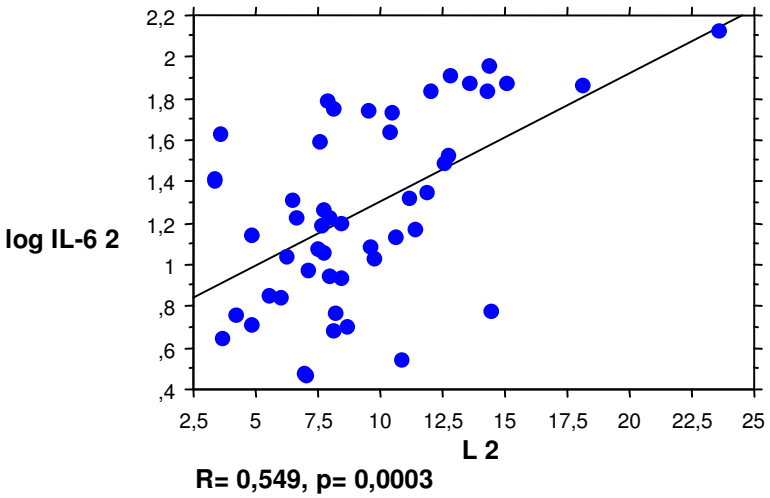
Graf 4.19. Povezanost log IL-1β 2 s log IL-6 2



4.7.5. Analiza povezanosti log IL-6 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

Ovom je analizom dobiveno da logaritamski transformirana varijabla IL-6 izmjerena nakon korekcije hipoksemije značajno pozitivno korelira sa sa slijedećim varijablama izmjerenim nakon korekcije hipoksemije: brojem L (R = 0,549, p < 0,0001), Tr (R = 0,488, p = 0,0003), urejom (R = 0,347, p = 0,0155). Korelacija log IL-6 2 s L 2 prikazana je grafički.

Graf 4.20. Povezanost log IL-6 2 s L 2



4.7.6. Analiza povezanosti log-TNF-α 2 s ostalim kontinuiranim varijablama

Ovom je analizom dobiveno da logaritamski transformirana varijabla TNF-α 2 pozitivno korelira sa parametrom ureje izmjerenim nakon početka liječenja (R = 0,631, p = 0,0206), te negativno s $PaCO_2$ (R = - 0,677, p = 0,011) i pH (R = -0,706, p = 0,007).

4.8. NEPARAMETRIJSKI TESTOVI

4.8.1. Analiza povezanosti ispitivanih faktora rasta i citokina s lijekovima korištenim tijekom bolničkog liječenja

Mann-Whitney neparametrijskim testom nije dobiveno značajne povezanosti između najčešće korištenih lijekova tijekom hospitalizacije (navedenih u tablici 4.2.) i ispitivanih faktora rasta i citokina.

4.9. DUGOTRAJNO LIJEČENJE KISIKOM

4.9.1. Opis varijable DLO_2

Po postignutom maksimalnom kliničkom poboljšanju, kriterije za DLO_2 postignuti su u 25/57 ispitanika, dok je u preostalih 32 pacijenta postignuto kliničko poboljšanje koje nije zahtijevalo daljnju terapiju kisikom.

4.9.2. Analiza povezanosti DLO_2 s ostalim varijablama

Mann – Whitney neparametrijskim testom nađena je značajna povezanost potrebe za DLO_2 i inicijalne vrijednosti $PaCO_2$, broja E, koncentracije Hb, Hct. Također je nađena značajna povezanost između potrebe za DLO2 i vrijednosti varijable TNF-α izmjerene drugog dana liječenja. U tablici 4.20. prikazani su indeksi značajnosti ovih korelacija, kao i indeksi značajnosti povezanosti varijable DLO_2 s ostalim ispitivanim faktorima rasta i citokinima.

Tablica 4.20. Povezanost DLO_2 s ostalim varijablama

DLO_2	Z	p
$PaCO_2$	-2,021	0,045
E	-2180	0,0293
Hb	-3,513	0,0004
Hct	-3,581	0,0003
log EPO 1	-0,147	0,8828
log EPO 2	0,652	0,451
log VEGF 1	0,4584	0,742
log VEGF 2	-0,800	0,3681
log b-FGF 1	-1,001	0,317
log b-FGF 2	-0,21	0,8337
log IL-1β 1	-0,142	0,8871
log IL-1β 2	-0,464	0,6427
log IL-6 1	-1,849	0,0644
log IL-6 2	-0,760	0,4473
log TNF-α 1	-0,857	0,3913
log TNF-α 2	-2,451	0,0157

5. RASPRAVA

Ovo je istraživanje provedeno na konsekutivnoj grupi KOPB pacijenata koji su primljeni u bolnicu radi akutnog pogoršanja sa značajnom respiracijskom insuficijencijom. Ova je studija pokazala da je u većine ispitanika unatoč teškoj i dugotrajnoj hipoksiji eritropoetski odgovor neadekvatan s obzirom na stupanj hipoksije. Hipoksija nije uspjela inducirati produkciju EPO u većine ispitanika. Ispitivani angiogeni faktori su povećane ekspresije. Među ispitivanim citokinima nađene su povišene vrijednosti IL-6. Razina EPO značajno se mijenja već unutar 24 sata nakon korekcije hipoksemije što je praćeno adekvatnim promjenama u crvenoj krvnoj slici. Ispitivani angiogenetski faktori i citokini ne mijenjaju se značajno 24 sata nakon korekcije hipoksemije. U ovom radu mjerena je serumska razina navedenih istraživačkih parametara. Razlog za to je 1) da je u KOPB-u vrijednosti u serumu moguće metodološki pouzdano i istovremeno odrediti i 2) da u KOPB-u nema dovoljno konsolidiranih podataka o serumskim vrijednostima istraživačkih parametara, a nerijetko su podaci kontradiktorni.

Kliničke i demografske karakteristike. Ispitivanu skupinu činilo 57 pacijenata, od čega 26 muškaraca i 31 žena. Prema tome, među ispitanicima bilo je nešto više žena. Do nedavno su sve epidemiološke studije pokazivale značajno višu prevalenciju i mortalitet od KOPB-a u muškaraca. Velikom studijom provedenom u Velikoj Britaniji 1997. godine prevalencija KOPB-a procijenjena je na 1,7% u muškaraca i 1,4% među ženama. Ovaj je podatak objašnjavan spolno-ovisnom razlikom u izloženosti rizičnim faktorima. U zemljama u razvoju neke studije su pokazale blago višu prevalenciju KOPB-a u žena u odnosu na muškarce. To je vjerojatno odraz izloženosti onečišćenjima zraka u kući kao što su pare pri kuhanju i izgaranju goriva. Novije studije ukazuju na porast prevalencije ove bolesti u žena, što se objašnjava sve većem izlaganju žena dimu cigareta, njavećem rizičnom faktoru za nastajanje KOPB-a. Nedavna velika epidemiološka studija provedena u SAD-u pokazala je gotovo jednaku prevalenciju ove bolesti između žena i muškaraca. Prema studiji provedenoj 1997 u Velikoj Britaniji, prevalencija KOPB-a porasla je za 25% u muškaraca i 69% u žena u razdoblju od 1990. do 1997 (1,2).

Prosječna starost ispitivane skupine bila je 69 godina i nije nađena statistički značajna razlika u dobi među spolovima. KOPB ima najveću prevalenciju sedmom i osmom

desetljeću života, a nakon toga prevalencija pada uglavnom zbog mortaliteta. Prema novim epidemiološkim studijama, koje se temelje na procjeni opstruktivnih smetnji ventilacije, one se mogu u pušaća registrirati mnogo ranije, već od 25-45 godine života (2).

Na osnovu anamnestičkih podataka, kliničke slike, rutinskih laboratorijskih analiza i kliničkog tijeka smatramo da je u ispitivane skupine najčešći neposredni uzrok pogoršanja i potrebe za hospitalizacijom bila kombinacija respiratornog infekta i kardijalne dekompenzacije, što je zabilježeno u 46% slučajeva. Čak je 63% bolesnika imalo respiratorni infekt pri hospitalizaciji, a 30% registriranu pneumoniju na rendgenogramu. Najčešćim uzrocima pogoršanja KOPB-a smatraju se infekcije traheobronhalnog stabla i onečišćenja zraka. Prema nekim istraživanjima u oko polovice pacijenata akutna pogoršanja KOPB-a uzrokovana su bakterijskim infekcijama (150), a Seemungal i suradnici pokazali su da je oko 40% pogoršanja KOPB-a uzrokovano virusnom infekcijom, uglavnom rinovirusima (151). Tako se zagađenje zraka smatra važnim uzrokom pogoršanja KOPB-a, a mehanizam ovog pogoršanja uglavnom je nepoznat. Kako su pogoršanja KOPB-a usko vezana uz virusne infekcije, postoji hipoteza da zagađenje samo povećava osjetljivost na virusne infekcije (152). U ispitivanoj populaciji 83% bolesnika imalo je znakove popuštanja srca, od čega 37% ljevostranu kardijalnu dekompenzaciju, 9% izoliranu desnostranu kardijalnu dekompenzaciju, a 37% globalno srčano popuštanje. Ovako veliki udio bolesnika s znakovima kardijalne dekompenzacije ne iznenađuje. Ljevostrana kardijalna dekompenzacija i edem pluća predstavljaju važan uzrok pogoršanja respiracijske insuficijencije (7). Sistemska upala u KOPB-u kao i infekcija respiratornog trakta prepoznate su kao zasebni faktori nastajanja koronarne bolesti srca iako mehanizam nije u potpunosti objašnjen (148,153). Plućno srce i plućna hipertenzija razvijaju se u teškom stadiju KOPB-a, obično nakon razvoja teške hipoksemije (niže od 60 mmHg), često uz hiperkapniju. To je najčešća kardiovaskularna komplikacija KOPB-a i vezana je uz lošu prognozu bolesti. Faktori za koje se zna da pogoduju razvoju plućne hipertenzije u pacijenata s KOPB-om uključuju vazokonstrikciju, remodeliranje plućnih arterija s zadebljanjem stjenke krvnih žila i smanjenjem lumena. Destrukcija kapilara vezana uz emfizem dodatno povećava tlak u plućnim arterijama. Vazokonstrikcija ima nekoliko uzroka. Oni uključuju hipoksiju koja

dovodi do kontrakcije glatkih mišića plućnih krvnih žila, oštećenje mehanizama o endotelu ovisne vazodilatacije, kao što je reducirana sinteza i oslobađanje NO te abnormalnu produkciju vazokonstriktornih peptida kao što je ET-1.

Plućna hipertenzija i redukcija plućne vaskulature radi emfizema vodi ka hipertrofiji desnog srca i desnostranoj dekompenzaciji. Desnostrana kardijalna dekompenzacija vezana je uz vensku stazu i trombozu i može voditi emboliji pluća i daljnjoj kompromitaciji plućne cirkulacije (2). 30% naših pacijenata imalo je anamnezu povišenog krvnog tlaka, a povišene vrijednosti krvnog tlaka pri prijemu zabilježene su u 35% ispitanika. Nije nađeno statistički značajne razlike u raspodjeli ovih parametara, kao ni u raspodjeli apsolutnih vrijednosti krvnog tlaka u ispitanoj populaciji.

Najčešće korišteni lijekovi prije hospitalizacije bili su bronhodilatatori i inhalacijski kortikosteroidi. Međunarodno prihvaćeni terapijski algoritmi za racionalno liječenje ove bolesti temelje se na upotrebi ove dvije skupine lijekova. Diuretici i hipotenzivi često su upotrebljavani lijekovi u ove skupine bolesnika, što je odraz učestalog kardiovaskularnog komorbiditeta. Osnovu farmakološkog liječenja pogoršanja KOPB-a čini povećanje doze bronhodilatatora i primjena sistemskog kortikostiroida. U pacijenata koji imaju povećani volumen sputuma koji je purulentan opravdano je primjeniti antibiotik (2).

Na temelju navedenog smatramo da ispitivani uzorak bolesnika reprezentativan za KOPB bolesnike u akutnom pogoršanju. Međutim, kako se radi o prospektivnoj, interventnoj studiji prethodno su, uz ulazne, definirani i isključni kriteriji (kao na primjer teže oštećenje bubrežne i jetrene funkcije). Na ovaj način su eliminirani iz studije neki od konsekutivnih bolesnika, koji su zadovoljili kriterije za uključivanje. Kako je zbog tog razloga iz studije isključeno manje od 5 % ispitanika, smatramo da je uzorak na kojem je vršeno ispitivanje reprezentativan za KOPB sa akutnim pogoršanjem. Ipak ovu činjenicu treba imati na umu u interpretaciji posebno onih rezultata (npr. urea, kreatinin, transaminaze i sl.), čije povišene vrijednosti iznad prethodno zadane razine isključuju bolesnike iz studije.

INICIJALNI NALAZI

Respiracijske, hematološke i biokemijske karakteristike. Rezultati **analize dišnih plinova** u arterijskoj krvi ukazuju da su svi pacijenti uključeni u studiju bili značajno hipoksemični u trenutku prijema u bolnicu udišući sobni zrak. Najviša inicijalna

vrijednost PaO_2 bila je 53 mmHg, što je određeno ulaznim kriterijima. Respiracijska insuficijencija obilježje je uznapredovalog KOPB-a. Ona nastaje kao posljedica periferne opstrukcije dišnih putova, destrukcije parenhima i abnormalnosti plućnih krvnih žila što sve vodi hipoksemiji (2). Daljnjom progresijom bolesti nastupa hiperkapnija.

Srednja vrijednost $PaCO_2$ u ispitivane skupine bolesnika bila je blago iznad referentnih vrijednosti. Ova je varijabla bila vrlo širokog raspona i kretala se od vrijednosti nižih od referentnih vrijednosti koje klinički odgovaraju hiperventilaciji do značajno viših od referentnih vrijednosti koje odgovaraju hipoventilaciji. U 51 % pacijenata zabilježen je $PaCO_2$ veći od 45 mmHg, odnosno globalna respiracijska insuficijencija. U 33 % pacijenata $PaCO_2$ bio je veći od 50 mmHg, što znači da su imali klinički značajnu hiperkapniju koja je uvijek znak teške alveolarne hipoventilacije (7).

Aritmetička sredina vrijednosti pH bila je unutar fizioloških vrijednosti. Samo je u 4% ispitanika zabilježena acidoza. Ispitivanu skupinu činili su KOPB bolesnici s kroničnom respiracijskom insuficijencijom u kojih je prema anamnestičkim podacima akutno pogoršanje trajalo više od 24 sata. Normalne ili čak povišene vrijednosti pH u bolesnika s globalnom respiracijskom insuficijencijom također upućuju na to da je hipoksemija dovoljno dugo trajala da je moglo doći do aktivacije kompenzatornog mehanizma sineteze bikarbonatnih iona.

Prosječna vrijednost saturacije hemoglobina kisikom bila je niska i u skladu s niskim vrijednostima PaO_2.

Parametri plućne funkcije analizirani su nakon maksimalnog terapijskog učinka (u pravilu pred kraj hospitalizacije), kako bi dobili uvid u stupanj uznapredovalosti bolesti. Možemo reći da je prosječna vrijednost ovih parametara nakon inhalacije bronhodilatatora bila je niska. Nalaz postbronhodilatacijskog FEV1/FVC manjeg od 0,7 u svih ispitanika govori za opstrukciju dišnih puteva koja perzistira i nakon inhalacije bronhodilatora i dozvoljava dijagnozu KOPB-a (1,2). Prema literaturnim podacima, iako s progresijom bolesti dolazi do pogoršanja izmjene dišnih plinova, korelacija između rutinskih testova plućne funkcije i značajnosti hipoksemije odnosno hiperkapnije je slaba. Ipak, značajna respiratorna insuficijencija je rijetka ukoliko je FEV_1 veći od 1 litre (194). Prosječna vrijednost FEV_1 u ispitivane populacije iznosila je 0,89 litre, a

postbronhodilatacijska vrijednost 0,99 litre, što govori u prilog očekivanoj teškoj respiracijskoj insuficijenciji.

Raspon parametara **crvene krvne slike** vrlo je širok u ispitivane populacije i kreće se od vrijednosti ispod do vrijednosti iznad referentnih intervala. Kao kriterij za procjenu anemije, normocitemije i policitemije uzeta je koncentracije Hb. Prema tome je 31% muškaraca bilo anemično, 34% normocitemično, a 35% policitemično. U ženskog dijela ispitivane populacije 10% ispitanica bilo je anemično, 58% normocitemično i 32% policitemično. U muškog dijela populacije srednja vrijednost broja E bila je unutar referentnih vrijednosti, dok je u žena ovaj parametar bio blago iznad referentnih vrijednosti. Dakle, dugotrajna i teška hipoksija nije uspjela adekvatno inducirati eritropoezu u većine ispitanika. Međutim, čak je u 68% žena nađen povišen apsolutni broj E. Ovaj nalaz je u diskrepanci s nalazom koncentracije Hb i Hct koji je nađen povišenih vrijednosti samo u trećine ispitanica. Ovaj podatak mogao bi upućivati na značajniju indukciju eritropoeze u žena koja je pak majnje adekvatna radi nedostatka drugih potrebnih elemenata kao što je npr. željezo. I drugi su autori neadekvatan eritropoetski odgovor na hipoksiju nastojali objasniti nedostatkom željeza, no ovaj mehanizam nije jednoznačno ustanovljen (49). Srednja vrijednost staničnih indeksa bila je unutar referentnih vrijednosti.

Iako je na temelju fizioloških postavki za očekivati kompenzatornu policitemiju u KOPB bolesnika sa značajnom respiracijskom insuficijencijom brojni literaturni izvještaji, kao i rezultati ove studije to ne potvrđuju. Konfliktni su izvještaji o primjerenosti porasta mase eritrocita u bolesnika s KOPB i posljedičnom hipoksemijom kada se kompariraju sa odgovorom zdravih ljudi na hipoksiju. Neki su autori izvijestili da je porast mase eritrocita neprimjeren za stupanj hipoksemije, dok su drugi izvijestili da postoji korelacija između mase eritrocita i saturacije arterijske krvi kisikom u pacijenata s KOPB-om (37,38,40). U studiji Fitzpatrick-a i suradnika eritrocitna masa je bila povišena u 25% pacijenata. Ulazni kriterij u ovu studiju bio je viši PaO_2 nego u naše, gornja granica PaO_2 bila je 65 mmHg. U toj je studiji eritrocitoza nađena u pacijenata s najtežom dnevnom hipoksijom, manjom od 45 mmHg i najnižom noćnom saturacijom (195). U studiji na odabranoj grupi KOPB pacijenata u stabilnoj fazi bolesti i vrijednostima $PaO_2 < 60$ mmHg policitemija je nađena u 58,62% pacijenta s KOPB-om (39). U studiji koja je

rađena na populaciji bolesnika s emfizemom, također u stabilnoj fazi bolesti, unatoč hipoksemiji s PaO_2 manjim od 60 mmHg, niti jedan pacijent nije bio policitemičan, a u 11% pacijenata nađena je anemija (196). Ispitanici u našoj studiji karakterizirani su kroničnom respiracijskom insuficijencijom, no za razliku od prethodnih studija njihova važna karakteristika je akutno pogoršanje. Nedvojbeno je međutim, da unatoč hipoksiji izostaje adekvatni fiziološki odgovor eritropoeze, što jasno ukazuje na poremećaj u sustavu hipoksija-eritropoeza koji je prisutan u KOPB-u..

Srednja vrijednost **broja L** u muškaraca bila je iznad referentnih vrijednosti, a u žena unutar referentnih vrijednosti. Raspon se kretao od normalnih do povišenih vrijednosti. Ovakav široki raspon odgovara kliničkom stanju bolesnika i mogućem međudjelovanju brojnih faktora kao što je virusni / bakterijski infekt sa upalom i stres.
Srednja vrijednost **broja Tr** bila je unutar referentnih vrijednosti.

Srednje su vrijednosti rutinskih **biokemijskih parametara** bile unutar referentnog raspona. Određivani parametri bubrežne i jetrene funkcije niti u jednog ispitanika nisu bili tri puta viši od gornje granice referentnog raspona što je određeno ulaznim kriterijima.

Eritropoetin. Ovo je ispitivanje pokazalo da je u većine teško hipoksemičnih KOPB pacijenata značajno oštećen eritropoetinski odgovor na hipoksiju. Srednja vrijednost ovog parametra bila je blago iznad referentnih vrijednosti, no medijan je iznosio 11,00 U/L. Vrijednost medijana unutar nisko normalnih vrijednosti upućuje da EPO u većine pacijenata nije bio povišen. Ova je varijabla bila širokog raspona i kretala se od minimalno detektibilnih vrijednosti (2 U/L), do izrazito povišenih vrijednosti (342 U/L). Snižena koncentracija EPO nađena je u 17% ispitanika, unutar normalnih vrijednosti u 67%, a iznad referentnih vrijednosti samo u 16% ispitanika. U 12% ispitanika ova varijabla bila je iznad 100 U/L, što možemo smatrati vrlo visokim vrijednostima. Ovaj relativno mali postotak uzoraka povišene koncentracije EPO odgovoran je za ukupnu povišenu prosječnu vrijednost EPO.

Nizak nalaz EPO u većine ispitanika u skladu je s neadekvatnim eritropoetskim odgovorom. Različite studije izvještavaju o izrazito varijabilnom nalazu EPO u bolesnika s KOPB-om i ne nalaze konzistentne povezanosti između stupnja hipoksemije, razine

EPO i policitemije. U studiji u kojoj su ispitivanu skupinu činili bolesnici s KOPB-om i sličnim stupnjem hipoksemije kao u našoj (raspon PaO_2 41,3-59,3 mmHg), 70% ispitanika je imalo normalne vrijednosti EPO (55). Ovaj je nalaz komparabilan s našim rezultatima. U studiji KOPB pacijenata u stabilnoj fazi bolesti i vrijednostima $PaO_2 < 60$ prosječna vrijednost EPO bila je iznad referentnih vrijednosti, no također vrlo varijabilnog nalaza (39). U studiji Millera i sur. 20% ispitanika s kroničnom plućnom bolesti imalo je povišeni EPO. U ovoj studiji raspon PaO_2 bio je jasno iznad onog u našoj studiji (51-100 mmHg) (197). Wedzicha i sur. radili su istraživanju u kojem su KOPB bolesnici s hipoksemijom i policitemijom uspoređivani sa hipoksemičnim KOPB bolesnicima bez policitemije i sa zdravom populacijom. U policitemičnih KOPB bolesnika nađene su više vrijednosti EPO u odnosu na zdravu populaciju i granično značajno više u odnosu na nepolicitemične KOPB bolesnike podudarne po stupnju dnevne hipoksije. Određivajući uzorke u više navrata, nađena je jača varijabilnost EPO u policitemične grupe bolesnika u odnosu na nepolicitemičnu. Značajniji stupanj noćne desaturacije u policitemične skupine bolesnika smatraju razlogom veće koncentracije EPO i jačeg eritropoetskog odgovora (53). U svim je navedenim studijama EPO određivan RIA tehnikom. U našem je istraživanju korišten ELISA test koji se smatra najosjetljivijim testom za kvantitativno određivanje EPO (198).

Istražen je i potencijalni utjecaj korištenih lijekova na serumsku koncentraciju EPO. Pokazano je da fenoterol, selektivni agonist β2-receptora, povećava koncentraciju EPO u serumu, ali isti učinak nije dokazan za inhalacije velikih doza salbutamola (199,200). Također je pokazano da glukokortikoidi mogu utjecati na fetalnu bubrežnu, ali ne i majčinu ekspresiju EPO gena u eksperimentalnih životinja, iako njihova terapijska vrijednost i utjecaj na EPO sintezu još nije u potpunosti jasan (201). Na primjer, poznato je da deksametazon može dovesti do redukcije u sekreciji EPO inhibitornih citokina iz monocita (202). Ipak, u djece s akutnom leukemijom i u pacijenata s reumatoidnim artritisom, liječenje kortikosteroidima može popraviti vrijednosti hemoglobina bez utjecaja na serumsku aktivnost EPO (203). Nadalje, nekoliko grupa autora izvjestilo je da ACE inhibitori mogu smanjiti serumsku razinu EPO (204,205). U našem istraživanju nismo našli povezanosti između inicijalne serumske koncentracije EPO i najčešće korištenih lijekova.

Naša je studija pokazala da je u bolesnika s KOPB-om i posljedičnom kroničnom respiratornom insuficijencijom koja se produbljuje zbog akutnog pogoršanja EPO uglavnom nizak. To je neobičan i neočekivani nalaz i jasno je da hipoksija nije uspjela inducirati EPO sintezu u većine ispitivanih pacijenata. Na osnovu ovog istraživanja nije moguće reći na kojem se stupnju složene kaskade produkcije EPO dogodila blokada.
Naime, kako je u uvodnom dijelu izneseno produkcija EPO obuhvaća niz procesa koji se pojednostavljeno mogu prikazati na slijedeći način: 1.) stanica prepoznaje hipoksiju još za sada nepotpuno razjašnjenim mehanizmima koji vjerojatno uključuju hem protein, 2.) u hipoksičnim uvjetima dolazi do stabilizacije HIF-1α podjedinice, 3) HIF-1α podjedinica se spaja s HIF-1β podjedinicom koja je konstitutivno izražena i čine HIF-1 kompleks, 4) HIF-1 kompleks se translocira u jezgru, 5) veže se za HRE elemente EPO gena i inducira transkripciju, 6) mRNA napušta jezgru, 7) VHL protein regulira ekspresiju mRNA na postranskripcijskoj razini, 8) mRNA ulazi u ribosome, 9) u ribosomima se odvija sinteza proteina, 10) gotovi protein se izlučuje iz stanice u ekstracelularni prostor. Ukoliko je u serumu povećana koncentracija proteina, u ovom slučaju EPO, možemo smatrati da je sustav u cjelini aktiviran i uspješan. Snižena razina produkta, kao u našem slučaju, govori za inhibiciju, a zahvatne točke mogu biti različite i u načelu u obzir dolaze sve prethodno navedene.

Uz to, serumska razina proteina može ovisiti i o nekim drugim faktorima. Tako će nedostatak specifičnih receptora uz normalnu produkciju dovesti do povišenih vrijednosti proteina. Ukoliko je pak produkt imunološki ili neimunološki vezan uz druge supstance test ga vjerojatno neće detektirati. Pri tome je otvoreno pitanje da li takav produkt može aktivirati specifične receptore. Oko 10 % EPO se izlučuje urinom, a ostatak se vjerojatno razgrađuje jetrenim stanicama. S obzirom na to, teoretski bi jetrena insuficijencija, uz normalno stvaranje EPO, mogla dovesti do njegove povišene razine.

Istraživani sustav karakteriziran je neadekvatnom eritropoezom s obzirom na stupanj hipoksemije. Moguće da je proces eritropoeze, uz neadekvatnu sintezu EPO, inhibiran i na kasnijim stupnjevima. Aktivacija specifičnih receptora na ciljnim stanicama uzrokuje složenu kaskadnu aktivaciju intracelularnih događanja s krajnjim efektom produkcije eritrocita. Ponovno kao i kod razine istraživanog produkta u serumu, visoke vrijednosti konačnog produkta govore za uspješnu aktivaciju čitavog sustava. U tom slučaju možemo

pretpostaviti da postoji aktivirani sustav u svim svojim dijelovima (od prepoznavanja hipoksije do stvaranja eritrocita). Izostanak reakcije može biti posljedica ometanja na bilo kojem od prethodno opisanih koraka. Također, ona može biti posljedica direktne supresije eritrogenih progenitorskih stanica citokinima, poremećaja u metabolizmu i ugradnji neophodnih elemenata kao što je željezo, ili pojačane eliminacije konačnog produkta – eritrocita (npr. hiperhemolizom). Zaključno, ovaj rad nedvojbeno pokazuje da u većine ispitivanih bolesnika hipoksija nije uspjela aktivirati čitavu potrebnu kaskadu staničnih procesa koji bi doveli do povećanja razine hemoglobina kao što je slučaj u fiziološkom modelu hipoksije. Pri tome veliki dio zatajenja ukupne funkcije može se svesti na ranu fazu procesa, tj. na zatajenje očekivanog povećanja produkcije EPO.

Faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF). Važan je nalaz ove studije da pacijenti s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti i pridruženom teškom hipoksemijom imaju značajno višu razinu serumskog VEGF-a kada se kompariraju s normalnom populacijom. Srednja vrijednost ove varijable, dobivene iz početnih uzoraka, iznosila je 1042 ± 1097 pg/ml. Prosječna se vrijednost ove varijable bitno razlikuje od medijana koji iznosi 580 pg/ml, što je odraz njene nepravilne distribucije. Ova je varijabla širokog raspona koji se kreće od 5,4 pg/ml do 5725 pg/ml. Prema podacima proizvođača srednja vrijednost VEGF-a u serumu zdravih ljudi iznosi 220 pg/ml, a raspon se kreće od 62-707 pg/ml (191). U ispitivane je skupine, samo u dva uzorka zabilježena vrijednost niža od 220 pg/ml. S obzirom da interval pouzdanosti za ovu varijablu iznosi 750,92-1333,04, možemo reći da su vrijednosti ovog parametra značajno više od referentnih. U studiji provedenoj na populaciji davatelja krvi dobivene serumske vrijednosti VEGF-a komparabilne su sa vrijednostima navedenim od proizvođača. U toj studiji ovaj je parametar bio raspona 15-500 pg/ml, a srednje vrijednosti 159,7±126,2 pg/ml (207).

Upadhyay i sur. izvješćuju da je serumska razina VEGF-a u bolesnika s KOPB-om u stabilnoj fazi bolesti značajno viša u odnosu na zdravu populaciju, a također su nađene značajno više vrijednosti ovog parametra u bolesnika s akutnim pogoršanjem KOPB-a u odnosu na one u stabilnoj fazi bolesti (207). U navedenom radu nije analiziran stupanj pogoršanja niti stupanj hipoksije vezan za akutno pogoršanje.

In vitro istraživanjima pokazano je da je hipoksija snažan induktor VEGF mRNA ekspresije u brojnih stanica, kako normalnih, tako i transformiranih. Ovi eksperimentalni

modeli uključivali su stanice retine, glija stanice, makrofage, a također upućuju na mogućnost da endotelne stanice produciraju VEGF kao odgovor na hipoksiju, te da posjeduju autokrini mehanizam djelovanja (208). Povećanje sekrecije biološki aktivnog VEGF-a iz stanica izloženih hipoksiji ostvaruje se na dva načina. Djelomično ono nastaje radi porasta transkripcije posredovane vezanjem HIF-1 za elemente odgovora na hipoksiju VEGF gena, a djelomično zbog porasta VEGF mRNA stabilnosti, vjerojatno vezanjem za RNA vežući protein (76). *In vivo* istraživanja pokazala su da je hipoksija snažan induktor oslobađanja VEGF-a u fiziološkim i brojnim patološkim situacijama s posljedicom neoangiogeneze koja vodi povećanoj perfuziji i poboljšanju tkivne oksigenacije. Pokazano je da fizički napor povećava ekspresiju VEGF-a, kao i HIF-1β u poprečnoprugastim mišićima ljudi, te da ovaj porast korelira s koncentracijom laktata u venskoj plazmi pripadajućeg mišića (209). VEGF je pojačano izražen u tkivu ishemičnog miokarda, mozga, kao i ishemičnih ekstremiteta (210-212). Smatra se da je VEGF neophodan za razvoj kolateralnih krvnih žila pri oporavku infarciranog područja, odnosno premoštavanju periferne arterijske okluzije. *In vivo* ispitivanja ukazuju da hipoksija u respiratorno insuficijentnih pacijenata može inducirati sintezu VEGF-a. Naime, u pacijenata s sindromom apneje u snu i teškom hipoksijom nađena je povišena razina VEGF-a (77,78).

Kako je KOPB složeni klinički sindrom, hipoksija vjerojatno nije jedini faktor koji je povezan s povećanom ekspresijom ovog faktora rasta. Naime, dobro je poznato da brojni faktori mogu utjecati na serumsku razinu VEGF-a. Među najčešćim stanjima koja se povezuju s povišenom razinom VEGF-a ubraja se i kronična upala. KOPB je karakteriziran kroničnom lokalnom upalom traheobronhalnog stable, koja se dodatno aktivira u stanjima egzacerbacije. VEGF je nađen značajno viših vrijednosti u sputumu KOPB bolesnika nego u serumu, što bi moglo sugerirati njegovu lokalnu produkciju u dišnim putevima (81). Simultano mjerenje VEGF u serumu i sputumu, moglo bi potvrditi ovaj model.

Danas se KOPB sve više promatra kroz prizmu, ne samo kronične lokalne, već i sistemske upale (153). Sistemska upala vjerojatno doprinosi povećanoj sintezi VEGF-a. U posljednjem je desetljeću značajno napredovalo u razumijevanje molekularnih mehanizama regulacije upalnih procesa u kroničnih upalnih bolesti. Dokazi vezani uz

različita ispitivanja čvrsto upućuju da T-limfociti imaju ključnu ulogu u započinjanju i održavanju upale. Ovaj njihov učinak nije vezan samo uz produkciju solubilnih medijatora, već i kroz kontaktne interakcije između brojnih stanica preko membranskih receptora i njihovih liganda. Signaliziranje preko CD40 and CD40 liganda put je koji je vjerojatno uključen u sve ove procese. T-stanice se primarno aktiviraju preko dendritičkih stanica ili upalnih citokina, te potom aktiviraju monocite/makrofage, endotelne stanice, glatke mišićne stanice i fibroblaste da produciraju proinflamatorne citokine kao što su TNF-α i IL-6. Također CD40 ligand na upalnim mjestima stimulira fibroblaste i tkivne monocite/makrofage na stvaranje VEGF-a koji potičući neoangiogenezu promovira i podržava kroničnu upalu (213). Tako je povišena razina VEGF-a nađena u brojnih kroničnih upalnih i autoimunih bolesti, kao što je tuberkuloza i rematoidni artritis (67,214). Također, povišene vrijednosti VEGF-a nađene su u serumu pacijenata s akutnim infekcijama (215,216).

Ispitivani je klinički model karakteriziran kroničnom upalom na koju se nadovezalo akutno pogoršanje do kojeg je u većine ispitanika došlo kao posljedica akutne infekcije. S obzirom na prethodno navedeno, za očekivati je da i ovaj mehanizam doprinosi povećanoj ekspresiji VEGF-a.

Što se tiče patofiziološkog značenja ovog nalaza, može se pretpostaviti da je povećana produkcija VEGF-a predstavlja adaptivni mehanizam koji pridonosi stvaranju novih krvnih žila u ishemičnim područjima. Ova je pretpostavka podržana novijim studijama koje su pokazale da u pacijenata s koronarnom bolesti srca, stupanj hipoksijom induciranog VEGF-a korelira s mjerom kolateralne formacije krvnih žila (217). Zanimljivo je razmišljanje Schulz-a i sur. koji su proučavali pacijente sa sindromom apneje u snu. Poznato je da pacijenti sa sindromom apneje u snu imaju povećani rizik od kardiovaskularnog obolijevanja i smrtnosti. Ipak, neki pacijenti s teškom noćnom desaturacijom rijeđe razvijaju kardiovaskularne bolesti. U tih su pacijenata nađene značajno više vrijednosti VEGF-a, te su pretpostavili da oslobađanje VEGF-a predstavlja adaptivni mehanizam koji je protuteža pojavljivanju OSA vezane kardiovaskularne bolesti (78).

Više je radova pokazalo korelaciju serumskih vrijednosti VEGF-a s ishodom nekih solidnih tumora (69-71). Daljnje studije odnosa serumske razine VEGF-a i konačnog

ishoda KOPB-a mogle bi omogućiti ocjenu korisnosti serumske razine ovog faktora kao biomarkera prognoze bolesti.

Bazični faktor rasta fibroblasta. Srednja inicijalna vrijednost bFGF iznosila je 6,0 ± 2,5 pg/ml. Ova je analiza izvršena ELISA metodom pomoću kitova proizvođača R&D Systems. Proizvođač je ovom metodom analizirao trideset uzoraka seruma zdravih ljudi i zanimljivo je da je u svim uzorcima bFGF bio nedetektabilan, za razliku od plazme gdje je u dijelu zdravih ispitanika detektibilan, što smatramo vrlo neobičnim i neočekivanim (191). U već prije spomenutoj studiji provedenoj na zdravim davateljima krvi serumske vrijednosti bFGF-a bile su detektabilne u svih ispitanika. Srednja vrijednost ukupne ispitivane populacije iznosila je 1,54±1,98 pg/ml, a 95% interval pouzdanosti za srednju vrijednost 1,01-1,98 pg/ml (206). Kako interval pouzdanosti za ovu varijablu u našoj studiji iznosi 5,38-6,68 pg/ml možemo je smatrati značajno višom nego u navedene studije.

Ekstenzivnim proučavanjem dostupne literature, nisam našla podataka o razini ovog faktora rasta u serumu ili plazmi pacijenata s KOPB-om, te u skupine pacijenta s respiracijskom insuficijencijom vezanom uz KOPB ili neku drugu etiologiju. In vitro istraživanja ukazuju da bi ovaj faktor mogao imati ulogu u etiologiji KOPB-a. Naime, hipoksija inducira produkciju bFGF-a u plućnim vaskularnim pericitima, te se pretpostavlja da povećana lokalna ekspresija bFGF u ovim stanicama ima ulogu u njihovoj proliferaciji i diferencijaciji u stanice glatkih mišića, te na taj sudjeluje u etiologiji suženja dišnih puteva (100).

Istraživanjima in vitro pokazano je da stanice pojačano stvaraju bFGF-a u hipoksičnim uvjetima, te da do značajnog porasta dolazi već sat vremena nakon izlaganja hipoksiji (218). Također, in vivo istraživanja pokazuju da hipoksija i ishemija potiču stvaranje bFGF-a. Na štakorskom je modelu pokazano da se ekspresija bFGF gena povećava u skeletnim mišićima nakon fizičkog napora (219). Na modelu ishemičnog miokarda pokazano je da makrofazi kao odgovor na hipoksiju, uz VEGF, produciraju b-FGF (75,96). U pacijenata sa solidnim tumorom i pridruženom anemijom nađena je značajna korelacija između sistemske hipoksije i serumskog b-FGF-a. U ovih je pacijenata serumska razina b-FGF-a značajno negativno korelirala s razinom hemoglobina (97). Na

štakorskom modelu pokazano je da u uvjetima kronične hipoksije dolazi do pojačane ekspresije bFGF-a u mozgu (220).

Također, nekoliko kliničkih modela ukazuje da postoji povezanost između kronične upale i ekspresije bFGF-a. Pokazano je da sistemska upala u pacijenata na peritonealnoj dijalizi povezana s povećanom plazmatskom koncentracijom bFGF-a. Nađena je značajna pozitivna korelacija između plazmatske razine bFGF-a, fibrinogena i IL-6 (221). Sinovijalni fibroblasti pacijenata s reumatoidnim artritisom, među ostalim citokinima, pojačano stvaraju i bFGF, te se smatra da trajna produkcija citokina ima važnu ulogu u podržavanju i aktivaciji kronične upale u ovih pacijenata (222). Mastociti imaju važnu ulogu u razvoju kronične upale i brojnih poremećaja koji su karakterizirani neovaskularizacijom. Pokazano je da su u stanjima kronične upale oni važan izvor bFGF-a (223,224).

Za očekivati je da sistemska kronična upala ima utjecaja i na razinu bFGF-a u pacijenta s KOPB-om. U daljnjoj analizi bilo bi zanimljivo odrediti pokazatelje kronične upale, CRP i fibrinogen, u ove skupine pacijenata, te ih korelirati s razinom bFGF-a.

U ispitivanom je modelu dobiveno da primjena furosemida ima utjecaja na koncentraciju bFGF-a u serumu. To je zanimljiv podatak i teško ga je objasniti na temelju dosadašnjih spoznaja, s obzirom da u literaturi nisam našla podataka o njihovom međusobnim odnosu.

Interleukin-1β. Prosječna vrijednost IL-1β iznosila je 2,341 pg/ml. Raspon se ovog parametra kreće od minimalnih detektibilnih vrijednosti (0,2 pg/L) do 11,1 pg/L. Samo u 4 ispitanika ova je varijabla bila iznad 3,9 pg/ml, što je prema podacima proizvođača najviša vrijednost zabilježena u zdravih pojedinaca (191). 95% interval pouzdanosti srednje vrijednosti ove varijable iznosi 1,89-2,79 pg/ml. Kako je vrijednost ove varijable niža od 3,9 pg/ml u zdravih ljudi, možemo reći da se vrijednosti dobivene u ispitivane skupine ne razlikuju značajno od referentnih.

Povišena razina IL-1β, nalazi se u sputumu KOPB pacijenata, a ona dodatno raste tijekom pogoršanja ove bolesti (158). Pokazano je da mononukleari pacijenta s KOPB-om inficirani Chlamydiom pneumoniae pojačano luče IL-1β u odnosu na zdrave ljude. Ovaj nalaz sugerira da mononukleari KOPB bolesnika imaju manju sposobnost

balansiranja proinflamatornog imunog odgovora tijekom egzacerbacije bolesti radi intracelularne infekcije (225). Bakterijska upala dišnih puteva dovodi do lučenja IL-1β i TNF-α, proinflamatornih citokina koje predominantno luče alveolarni makrofazi te predstavlja prvu liniju obrane od plućnih patogena (157). Povišene sistemske vrijednosti IL-1β vežu se uz gubitak mišićne mase ovih bolesnika (226). Kao i u drugih kroničnih upalnih stanja gubitak tjelesne i mišićne mase s oštećenjem respiratorne i periferne mišićne funkcije često se vidi u bolesnika s KOPB-om. Gubitak tjelesne težine smatra se direktnim lošim prognostičkim pokazateljem u KOPB-u. Mehanizmi koji odvode do proteinske degradacije nisu u potpunosti rasvijetljeni, ali mogu biti posljedica sistemske upale i djelovanja proupalnih citokina (226).

Interleukin-6. Srednja vrijednost IL-6 u ispitivane je populacije iznosila 45,6 pg/ml. Ovaj je parametar bio izrazito varijabilan i njegova je standardna devijacija iznosila 86,502. Raspon je bio od niskih 3 pg/ml do izrazito visokih vrijednosti, odnosno 477,3 pg/ml. U čak 54 ispitanika ova je varijabla bila viša od 3,12 pg/ml, što je najviša vrijednost nađena u 90% zdravih ispitanika ovim testom. U 35 ispitanika vrijednost IL-6 bila je iznad 12,5 pg/ml, što je najviša zabilježena vrijednost u zdravih ljudi prema korištenom testu (191). Interval pouzdanosti srednje vrijednosti za ovu varijablu iznosi 22,71-68,62 pg/ml, pa možemo reći da su vrijednosti ovog parametra značajno više od referentnih. Wedzicha i sur. prospektivno su pratili razinu IL-6 u pacijenata sa srednje teškom do teškom KOPB-i u stabilnoj fazi bolesti, u egzacerbaciji i u rekonvalescenciji. Za analizu je korišten isti test kao i u našoj studiji. U stabilnoj fazi bolesti srednje vrijednost IL-6 iznosila je 4,3 pg/ml. U stadiju pogoršanja došlo je do značajnog porasta razine IL-6 (prosječno za 1,1 pg/ml), i prosječno je iznosila 6,15 pg/ml. Pogoršanje je bilo definirano prisutnošću barem jednog velikog i jednog malog simptoma. Velikim simptomima smatrali su se pogoršanje dispneje, pojava purulentnog sputuma i povećanje količine sputuma, a malim simptomima nazalna kongestija, simptomi prehlade, piskanje u prsima i kašalj (154). U navedenoj studiji pacijenti su bili blažeg oblika bolesti i prosječni FEV_1 u stabilnoj fazi je iznosio 1,06, što je znatno više nego u naših ispitanika. U navedenoj studiji prosječna saturacija hemoglobina kisikom bila je 94 % u stabilnoj fazi bolesti, a 93,8 % u pogoršanju, što je značajno više nego u naših ispitanika. Naša i navedena studija komparabilne su po dobi ispitanika.

IL-6 primarno proizvode monociti i makrofazi, osobito u stanjima akutne virusne infekcije. Pokazano je da monociti pojačano produciraju IL-6 pri infekciji respiratornim sincicijskim virusom, rinovirusima i pikornavirusima (151,156,158). U 24% pacijenata sa stabilnim KOPB-om identificirana je infekcija respiratornim sincicijskim virusom, a u 16% neki drugi virusi. U pacijenata u kojih je u stabilnom stanju identificirana virusna infekcija imaju veću koncentraciju serumskog IL-6 (151). Povišena razina IL-6 nađena je u KOPB bolesnika s srednje teškim i teškim KOPB i nije ju moguće korelirati sa stupnjem težine bolesti (227). Povećana serumska razina IL-6 nađena je u KOPB pacijenata s reduciranom mišićnom masom i sugerira vezu između kronične sistemske upale i sistemskih učinaka KOPB-a (228). U ispitivane populacije nismo našli linearne povezanosti serumske koncentracije IL-6 i tjelesne težine.

In vitro studije, kao i studije na kliničkim modelima karakteriziranim hipoksijom pokazale su da hipoksija može inducirati povećanu ekspresiju IL-6 (139,143,144,149).

Povišenu koncentraciju IL-6 u naših ispitanika možemo smatrati rezultatom djelovanja upale, odnosno infekta i sistemske hipoksije.

Faktor nekroze tumora-α. Prosječna vrijednost TNF-α u naših ispitanika iznosila je 10,13 pg/ml. Minimalna dobivena vrijednost iznosila je 6,5 pg/ml, a maksimalna 16,2 pg/ml. Interval pouzdanosti prosječne vrijednosti ove varijable iznosio je 8,70-11,54 pg/ml. S obzirom da je u zdravih ljudi, prema korištenom testu ovaj parametar niži od 15 pg/ml (191), možemo reći da se vrijednosti dobivene na ispitivanom modelu ne razlikuju značajno od referentnih. Nismo našli razlike u raspodjeli ovog parametra prema spolu.

Više je studija pokazalo da je u bolesnika s KOPB-om povišena razina cirkulirajućeg TNF-α. TNF-α koji se još zove i kaheksin veže se uz gubitak tjelesne mase u ovih bolesnika. Takabatake i sur. izvijestili su da KOPB bolesnici u imaju značajno više serumske vrijednosti TNF-α u odnosu na zdrave ljude (148). Prosječna vrijednost u njihovih ispitanika iznosila je 6,15 ± 1,08 pg/ml. Kontrolnu skupinu činili su zdravi muškarci, podudarni po dobi. Srednja serumska vrijednost TNF-α u kontrolnoj skupini iznosila je 5,41 ± 1,6 pg/ml. Za analizu je korišten isti test kao i u našem ispitivanju. Komparirajući naše rezultate s rezultatima ove studije možemo reći da su naši rezultati viši. Ove dvije populacije komparabilne su s obzirom na dob. Razlika je u tome što su ispitanici u našoj studiji bili u akutnom pogoršanju, dok su navedenoj studiji bili u

stabilnoj fazi bolesti. Također ispitanici u našoj studiji imali su značajniju hipoksemiju. Prosječna vrijednost PaO_2 u navedenoj studiji bila je 62 ± 9,5 mmHg. U navedenom je istraživanju nađena korelacija između stupnja hipoksemije i serumske razine ovog citokina što upućuje da hipoksemija aktivira TNF-α sustav (148). Povezanost između stupnja hipoksije i ekspresije TNF-α nismo našli u našoj studiji. U studiji provedenoj na KOPB bolesnicima u stabilnoj fazi bolesti pokazno je da pacijenti u kojih je dominirao kronični bronhitis imaju oko 2 puta nižu serumsku razinu TNF-α u odnosu na one u kojih je dominirao emfizem. Između ove dvije skupine bolesnika nije bilo razlike u stupnju opstrukcije dišnih puteva. Pacijenti s kroničnim bronhitisom imali su niže vrijednosti PaO_2 i više $PaCO_2$ u odnosu na grupu s emfizemom, ali je procijenjeno da pacijenti s emfizemom imaju jaču relativnu tkivnu hipoksiju (229). Nađena povećana serumska razina TNF-α nađena je u KOPB pacijenata s reduciranom mišićnom masom i sugerira vezu između kronične sistemske upale i sistemskih učinaka KOPB-a (159,229). Teško je reći koje su stanice primarni izvor cirkulirajućeg TNF-α u ovih bolesnika. Pokazano je da monociti KOPB bolesnika s gubitkom tjelesne težine spontano produciraju velike količine TNF-α (230). Hipoksija je snažan pokretač niza procesa u organizmu, uključujući i imuni sustav, a mononukleari su osobito osjetljivi na hipoksiju (137). Prema tome, moguće je da su oni glavni izvor ovog citokina. Sistemska upala u pacijenata s KOPB-om veže se uz visoku prevalenciju sistemskih komplikacija kao što su kaheksija, osteoporoza i ateroskleroza u ovih pacijenata. Ipak, još uvijek ima puno nepoznanica vezanih uz patogenezu ovog procesa, odnosno poznavanja ključnih upalnih medijatora i razumijevanje njihovih interakcija. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se ocijenila mogućnost modifikacije rizika komplikacija kontrolom sistemske upale.

POVEZANOSTI INICIJALNIH NALAZA

Rezultati analize povezanosti ustanovili su brojne i multiple statistički značajne povezanosti između kliničkih, respiracijskih, hematoloških, biokemijskih varijabli i istraživanih faktora rasta i citokina u bivarijatnim parametrijskim i neparametrijskim testovima. Ove multiple povezanosti valja, međutim, razmotriti s oprezom i uzeti u obzir mogućnost „statističkog artefakta“, koji je analogan „statističkoj iluziji“ u nađenim povezanostima. Ovaj poznati fenomen se u analizama često zanemaruje, iako nerijetko dovodi do „informacijske buke“. Opisani fenomen posebno treba imati na umu pri analizi

povezanosti multivarijatnim metodama, jer tada u izračun ulaze samo oni entiteti (bolesnici) s potpunom bazom podataka. Ukoliko neki podatak (pa makar i samo jedan) nedostaje isključuje se entitet iz analize. Posljedica je da ukupni broj entiteta na kojima je izračun napravljen varira, uvijek je manji od ukupnog broja entiteta, pa se dobiveni rezultati moraju vrlo oprezno interpretirati.

Obzirom na temeljnu hipotezu u ovom radu prvenstveno su istraživani faktori rasta i citokini, te će u daljem tekstu biti posebno raspravljeni. Kako su svi istraživani faktori rasta i citokini bili distribucije značajno različite od normalne, u testovima povezanosti korišteni su u logaritmiranom obliku čime je postignuta zadovoljavajuća normalnost raspodjele. Za svaki ispitivani faktor rasta i citokin učinjena je zasebno stepwisse regresijska analiza s ciljem definiranja prediktorske varijabli koje ih najadekvatnije predskazuje. Kao nezavisne varijable korištene su sve inicijalne kontinuirane varijable. U ovoj analizi korišten je postupak gradnje prema naprijed. Za F-za uključivanje u model vrijednost uzet je 4,000, a F- za isključivanje iz modela vrijednost uzet je 3,996. Prema tako određenim kriterijima definirane su nezavisne varijable koje najbolje predskazuju zavisnu varijablu.

U prvom dijelu rasprave povezanosti inicijalnih nalaza biti će komentirani nalazi bivarijatne analize, te multivarijatne (stepwisse regresija), uspoređene sa nalazima u literaturi i sa mogućom patogenetskom ulogom, a u drugom dijelu će biti raspravljene istraživačke multivarijatne analize (faktorska analiza) inicijalnih nalaza.

Analiza povezanosti EPO s drugim varijablama. Regresijskom analizom s EPO kao zavisnom varijablom dobivena je statistički značajna negativna korelacija s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi. Na temelju poznavanja fizioloških modela, ova značajna povezanost bila je očekivana. Ovakvu povezanost našli su i drugi autori proučavajući ovaj model (53,55).

Značajna pozitivna korelacija nađena je s inicijalnim vrijednostima ureje i kreatinina. Ove nalaze teško je objasniti. Dobro je poznato da se EPO sintetizira u stanicama smještenim uz peritubularne kapilare bubrega, te da je u renalnoj insuficijenciji ova sinteza smanjena. S obzirom na to za očekivati je obrnutu korelaciju s pokazateljima bubrežne funkcije. U ovo ispitivanje uključeni su, međutim, samo bolesnici koji nisu

imali značajno poremećenu bubrežnu funkciju. Najviša zabilježena vrijednost ureje bila manje od dva puta iznad referentnih vrijednosti, a vrijednost kreatinina tek neznatno povišena.

Nađenu značajno pozitivnu povezanost s ALT također je teško objasniti. Ako ALT shvatimo kao pokazatelj oštećenja jetrenih stanica hipoksijom, odnosno kao pokazatelj teže hipoksije onda bi u takvih bolesnika mogli očekivati više vrijednosti EPO. Uz to, jetra je glavno mjesto razgradnje EPO. Teoretski možemo pretpostaviti da pri narušenoj jetrenoj funkciji jetra manje razgrađuje EPO čime dolazi do njegovog nakupljanja. Prema ulaznim kriterijima bolesnici s težim oštećenjem jetrene funkcije nisu uključeni u studiju.

Jednostavnom regresijskom analizom nađena je granično značajna pozitivna korelacije ove varijable s inicijalnim vrijednostima b-FGF-a. S obzirom da EPO i bFGF dijele zajedničke mehanizme aktivacije gena ovakva je korelacija očekivana. Na isti način objašnjavamo i nađenu značajno pozitivnu korelaciju s VEGF-om u ženskog dijela populacije.

Analizirajući zasebno korelacije prema spolovima nađena je i značajna negativa korelacija EPO s IL-1β u muškog dijela populacije. U in vitro uvjetima pokazano je da IL-1β inhibiraju hipoksijom potaknuto lučenje EPO na raznim modelima stanica (172,180), pa je stoga ova korelacija bila očekivana.

Također, bazičnim istraživanjima na raznim modelima staničnih linija nađen je negativni učinak TNF-α i IL-6 na ekspresiju EPO (180,181). Ovaj efekt nismo potvrdili na našem ispitivanom kliničkom modelu. Koeficijent korelacija TNF-α i EPO bio je visok i negativnog predznaka, ali ne i statistički značajan. Koeficijent povezanosti IL-6 i EPO je pak bio pozitivan i visok, ali također nije bio statistički značajan.

S obzirom da je varijabla EPO bila širokog raspona i distribucije značajno različite od normalne, njena povezanost s drugim varijablama u sustavu detaljnije je analizirana neparametrijskim testovima. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, a kao točka loma određena je vrijednost medijana koja je iznosila 9 U/l. Ovako oblikovane skupine bolesnika značajno su se razlikovale po inicijalnim vrijednostima parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i IL-6. Skupina s višim vrijednostima EPO karakterizirana je nižim

vrijednostima parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi. I na ovaj način potvrđen je snažan pozitivan utjecaj hipoksije na ekspresiju EPO (23,28,33,34).

In vitro istraživanjima nađeno je da citokini imaju negativni utjecaj na ekspresiju EPO, te da IL-6 inhibira hipoksijom potaknuto lučenje EPO iz stanica (180). Naši podaci govore međutim za obrnuti odnos jer je skupina s višim vrijednostima EPO karakterizirana višim vrijednostima IL-6. Zbog složenosti sustava jednostavne bivarijatne analize mogu zavesti, jer u potpunosti ne uvažavaju latentne međuovisnosti sa drugim prisutnim obilježjima. Jednako tako, jasno je da su u pravilu *in vitro* uvjeti pokusa bitno različiti od *in vivo* uvjeta čime se može objasniti rezultat izmjerenih podataka u složenom kliničkom modelu.

Stepwisse regresijska analiza s EPO kao zavisnom varijablom izvršena je u tri koraka. Prva u model ušla je varijabla parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi, potom log bFGF i u trećem koraku urea. Na osnovu ove analize možemo reći da su ova tri parametra, neovisno jedan od drugog, najznačajnije povezani s EPO. Neočekivan je nalaz pozitivne povezanosti EPO i parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi dobiven ovom analizom, a koji je u suprotnosti s nalazom jednostavne regresijske analize. S obzirom na manji broj analiziranih entiteta ovaj nalaz treba uzimati sa oprezom. Nezavisna je povezanost s bFGF-om kao proangiogenim faktorom očekivana s obzirom da je poznat njihov zajednički mehanizam aktivacije gena. Ovaj bi nalaz mogao sugerirati da su u ovih bolesnika paralelno aktivirana oba kompenzatorna mehanizma: eritropoeza i angiogeneza. I ovom analizom se ponovno ureja nameće kao varijabla značajne povezanosti s EPO. Teško je objasniti ovu povezanost, jer kao što sam već ranije napomenula ispitanici u našoj studiji nisu imali značajno narušenu bubrežnu funkciju.

Analiza povezanosti VEGF s drugim varijablama. Jednostavnom regresijskom analizom nađena je statistički značajna negativna korelacija ovog parametra s inicijalnim vrijednostima parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i saturacije hemoglobina kisikom. Ovaj nalaz sugerira da je hipoksija značajni triger otpuštanju VEGF-a u našoj skupini pacijenata. Na temelju dosadašnjih spoznaja o aktivacije ekspresije VEGF gena i uloge ovog faktora u raznim fiziološkim i patološkim stanjima karakteriziranim hipoksijom ovaj je nalaz bio očekivan (64,65,74).

U ovoj studiji nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između vrijednosti VEGF-a i inicijalnih razina indikatora upale kao što su sedimentacija eritrocita i broj leukocita. Ovaj nalaz sugerira da je i u ovom modelu akutna upala doprinijela visokoj razini VEGF-a, kao što je to pokazano i u drugih pacijenata s akutnim infekcijama (72). Iako VEGF statistički značajno pozitivno korelira s brojem leukocita ovaj se nalaz ne bi mogao objasniti direktnim oslobađanjem VEGF-a iz ovih stanica pod djelovanjem hipoksije. Naime, in vitro su studije pokazale, da leukociti ne produciraju značajne količine VEGF-a kao odgovor na izoliranu hipoksiju (231).

Dobivena je značajna pozitivna korelacija između ispitivane varijable i broja trombocita što nije neočekivan nalaz obzirom da je poznato da trombociti stvaraju VEGF. Međutim, nađena povezanost malo je vjerojatno posljedica oslobađanja VEGF-a iz ovih stanica kao odgovor na hipoksiju (231). Više autora opisuje da je serumska razina VEGF-a viša u odnosu na onu u plazmi i to objašnjava oslobađanjem VEGF-a iz trombocita tijekom koagulacije *in vitro*. Zbog toga neki ispitivači preporučuju primjenu plazme, a ne seruma pri određivanju VEGF-a (59). Korištenje seruma za analizu moguć je metodološki nedostatak naše studije. Ipak, s obzirom da je u ovoj studiji praćena promjena VEGF-a nakon korekcije hipoksemije u ispitanika s normalnim brojem Tr smatramo upotrebu ovog uzorka adekvatnom.

U eksperimentalnim je uvjetima pokazano da IL-1, IL-6 i TNF-α mogu inducirati produkciju VEGF-a (232-235). Na ovom modelu analizama povezanosti nismo našli značajne povezanosti između inicijalnih vrijednosti VEGF-a i ispitivanih citokina.
Na ovoj populaciji bolesnika nije nađeno razlike u raspodjeli VEGF-a među spolovima U studiji na zdravim davateljima krvi također nije nađeno razlike u raspodjeli VEGF-a među spolovima (206).
S obzirom da je varijabla VEGF također bila širokog raspona i distribucije značajno različite od normalne, njen odnos s drugim varijablama je detaljnije analiziran neparametrijskim testovima. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, a točka loma je bila vrijednost medijana ove varijable. Prvu skupinu činili su ispitanici u kojih je VEGF bio niži od 580 pg/ml, a drugu skupinu ispitanici s vrijednostima VEGF višim od 580 pg/ml. Ove su se dvije skupine ispitanika statistički značajno razlikovale po broju leukocita, trombocita, brzini sedimentacije eritrocita i koncentraciji IL-6.

Prosječna vrijednost broja leukocita i brzina sedimentacije eritrocita bila je značajno viša u skupini bolesnika s višim VEGF-om. Ovaj je nalaz sukladan rezultatima jednostavne regresijske analize i sugerira značajnu ulogu akutne upale u aktivaciji VEGF sustava.
Više vrijednosti broja trombocita u ispitanika s višim nalazom VEGF-a upućuju na značajnu ulogu trombocita u ukupnoj količini ovog angiogenog faktora u serumu.
Koncentracija IL-6 nađena je nižom u grupi ispitanika s višim vrijednostima VEGF-a.

Ovaj nalaz sugerira da IL-6 ima ulogu u ekspresiji ovog faktora rasta u ovom složenom kliničkom modelu. I *in vitro* istraživanjima pokazano je postojanje povezanosti između ova dva parametra, ali obrnutog predznaka. Naime, nađeno je da IL-6 povećava ekspresiju VEGF-a transkripcijskim mehanizmom preko STAT-3, te da je ovaj pozitivan učinak IL-6 posredovan pomoću DNA elemenata u području promotorskog područja i kroz specifične motive locirane u području 5'- netranslatiranog područja VEGF mRNA (185,186,235). Ponovno bi naglasili da su uvjeti *in vitro* pokusa bitno različiti od *in vivo* uvjeta, čime se može objasniti razlika izmjerenih podataka u složenom kliničkom modelu.

Na temelju Stepwisse regresijske analize možemo reći da VEGF kao zavisnu varijablu najbolje i neovisno predskazuju trombociti, pH i bFGF. Nalaz značajne pozitivne povezanosti s brojem trombocita u skladu je s nalazom jednostavne regresijske analize. Značajnu pozitivnu korelacija s acidobaznim statusom nije jednostavno objasniti. Više od polovice ispitanika bilo je u globalnoj respiracijskoj insuficijenciji kod prijema. Moguće je da su pacijenti s višim pH oni u kojih pogoršanje duže trajalo i koji su uspjeli efikasnije aktivirati kompenzatorni mehanizam sinteze bikarbonatnih iona. Ovo duže trajanje pogoršanja, a time i hipoksije moguće je posredno povezati s jačom aktivacijom VEGF sustava. S obzirom da se VEGF djelomično oslobađa iz trombocita procesom koagulacije, nezavisna povezanost trombocita i VEGF je očekivana (59). Statistički značajna neovisna povezanost VEGF i bFGF je očekivana s obzirom da VEGF i bFGF dijele zajednički mehanizam aktivacije gena reguliran hipoksijom, a koji je posredovan pomoću HIF-a (76,95). Ova značajna pozitivna povezanost sugerira zajedničku aktivaciju oba faktora u ispitivanih bolesnika u aktivaciji kompenzatornog procesa neoangiogeneze.

Analiza povezanosti bFGF-a s drugim varijablama. Analizom je dobivena statistički značajna pozitivna korelacija između inicijalnih vrijednosti bFGF i inicijalnih vrijednosti bilirubina, te granično značajna pozitivna korelacija s urejom. Ovu je povezanost teško obrazložiti na temelju dosadašnjih spoznaja i opravdava daljnja istraživanja. Ponovno je potrebno naglasiti da s obzirom na ulazne kriterije u istraživanje nisu uključeni bolesnici sa značajnom renalnom i/ili jetrenom insuficijencijom.

In vitro istraživanjima pokazano da se sinteza bFGF-a snažno aktivira u hipoksičnim uvjetima regulacijom pomoću HIF-a (95). Također, u brojnim je radovima pokazana pojačana ekspresija ovog faktora u stanjima lokalne i sistemske hipoksije (93-95). S obzirom na ove spoznaje, očekivali smo značajnu linearnu povezanost razine bFGF-a i stupnja hipoksemije koju nismo potvrdili u našoj studiji. S obzirom da su vrijednosti ovog parametra značajno povišene u ispitivanoj grupi vjerujemo da je hipoksija jedan od činitelja koji su doveli do njegove pojačane ekspresije. Možda bi analiza na većem uzorku potvrdila ovaj međusobni utjecaj i linearnost korelacije između stupnja hipoksemije i razine bFGF-a. Uz to, nije moguće isključiti fiziološki fenomen „sve ili ništa“, prema kojem hipoksija, bez obzira na stupanj uzrokuje povećanu razinu bFGF-a.

U ovoj je studiji nađena granično značajna negativna korelacija inicijalne razine bFGF-a s inicijalnom razinom IL-1β. Nisam našla literaturnih podataka o utjecaju ovog citokina na ekspresiju bFGF-a. Nasuprot ovom nalazu, *in vitro* istraživanjima nađeno je da IL-1β stimulira HIF-1 signalni put, put koji je odgovoran i za regulaciju ekspresije bFGF gena kao odgovora na hipoksiju (184). Naravno, radi se o različitim metodologijama i teško je za očekivati da bi se rezultate *in vitro* istraživanja mogli direktno prevesti na složeni istraživani sustav u kojem postoje brojni međuodnosi.

In vitro studije upućuju da bi IL-6 mogao posredovati pojačanu regulaciju bFGF-a (187), te je u nekim kliničkim modelima kronične upale nađena pozitivna korelacija između razine IL-6 i bFGF-a (220). Ovakav odnos međutim nije potvrđen u ovoj studiji, ali nije ni isključen.

U našoj studiji nije nađeno značajne razlike u raspodjeli bFGF-a između muškaraca i žena. U studiji provedenoj na zdravim davateljima krvi nađena je razlika u raspodjeli bFGF-a po spolu. U muškaraca su vrijednosti bile niže od 4,0 pg/ml, a u žena niže od 10,8 pg/ml (206). Autori nisu komentirali ovu značajnu razliku među spolovima. Jedna

od rijetkih situacija u kojoj u odraslih ljudi postoji fiziološka angiogeneza je ženski reproduktivni ciklus (58). Srednja dob ispitanica u toj studiji bila je 43 godine (raspon 20-72 godine) i u velikog postotka je za očekivati postojanje ciklusa. U našoj je studiji prosječna vrijednost ovog parametra u žena bila niža nego u muškaraca, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Prosječna dob ispitanica u našoj studiji je bila 69 godina.

Rezultati stepwisse regresijska analiza upućuju da, s obzirom na multiple interakcije u sustavu, bFGF kao zavisnu varijablu najbolje neovisno predskazuju EPO i IL-1β. Nalaz značajne pozitivne korelacija EPO i bFGF dobiven je i jednostavnom regresijskom analizom. Značajna neovisna pozitivna povezanost varijable bFGF i IL-1β sugerira njihov značajan međuodnos u ovom sustavu. Jednostavnom regresijskom analizom dobivena je granično značajna pozitivna korelacija između ove dvije varijable.

Analiza povezanosti IL-1β s drugim varijablama. Analizom je nađena značajna negativna korelacija između IL-1β kao zavisne varijable i inicijalnih vrijednosti AST i ALT. Na temelju dosadašnjih spoznaja teško je objasniti ovu značajnu povezanost. Pokazano je da je razina IL-1 povišena u bolesnika s cirozom jetre što je odraz trajne upalne reakcije u ovih pacijenata (236). Ponovno valja napomenuti da su vrijednosti transferaza u većine naših ispitanika bile unutar normalnog raspona. Najviše su vrijednosti bile određene ulaznim kriterijem i bile su najviše tri puta iznad normalnih vrijednosti.

U posljednjem se desetljeću intenzivno istražuje odnos hipoksije i citokina. U eksperimentalnim hipoksičnim uvjetima (tlak kisika 1% ili manji) humani alveolarni makrofazi i mononuklearne stanice periferne krvi pojačano luče IL-1β (145,146). Čini se da i geni koji kodiraju citokine također spadaju u veliku skupinu gena koji mogu biti regulirani parcijalnim tlakom kisika. Potencijalno objašnjenje regulacije je da hipoksija utječe na transkripcijsku razinu ekspresije ovih gena, ali mehanizam nije poznat (215,216). Također je pokazano da izlaganje raznih tkiva hipoksiji značajno inducira ekspresiju raznih citokina među kojima i IL-1β i da povećana produkcija ovih citokina ima značajnu ulogu u patogenezi raznih bolesti kao što je preeklampsija ili ishemična ozljeda mozga (237,238). Povezanost IL-1β s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi nismo potvrdili u našem ispitivanom modelu. Moguće je da se hipoksična indukcija ovog

citokina, pokazana u navedenim eksperimentalnim modelima, ne može direktno primijeniti na model KOPB pacijenata. Ova se dva modela razlikuju po primjenjenom intenzitetu hipoksičnog okruženja. Parcijalni tlak kisika primjenjen na kulture stanica iznosi 1% ili manje. Osim toga, brojni su faktori u međuodnosu u živom organizmu. Npr. tkivna hipoksija može biti smanjena porastom minutnog volumena srca ili pomakom kisik - hemoglobin disocijacijske krivulje.

Analiza povezanosti IL-6 s drugim varijablama. Regresijskom je analizom dobivena statistički značajna pozitivna korelacija ove varijable s brojem leukocita i brzinom sedimentacije eritrocita. Kako je IL-6 proinflamatorni citokin ova je korelacija bila očekivana.

Također je nađena značajna pozitivna korelacija IL-6 s pH, za što nismo našli jednostavno objašnjenje. U našem je ispitivanju čak 44% ispitanika bilo u alkalozi, a najviša je zabilježena vrijednost bila 7,64. Na modelu bolesnika sa šećernom bolešću u ketoacidozi nađena je povećana razina raznih citokina u plazmi među kojim i IL-6 (239). U našoj studiji povezanost je obrnuta u odnosu na navedenu.

U našoj je studiji nađena značajna pozitivna korelacija s brojem trombocita. Trombociti su sposobni oslobađati razne biološki aktivne supstance. Nedavna otkrića vezana uz upalnu aktivnost trombocita postavila su temelje za poznavanje do sada još nepoznate uloge trombocita u upali. Stimulirani trombociti sintetiziraju proinflamatorne citokine kao što je IL-1β, no nisam našla podatak da sintetiziraju IL-6 (240).

U ispitivanom sustavu nađena je značajna pozitivna korelaciju s urejom. U bolesnika s terminalnom fazom renalne insuficijencije nalaze se povišene razine brojnih citokina u cirkulaciji, među kojima i IL-6. Ovaj se nalaz veže uz razvoj sistemskog upalnog odgovora u ovih bolesnika (241). Najviša vrijednost ureje u naših ispitanika bila je manja od dva puta iznad referentnih vrijednosti, pa je teško objasniti ovaj nalaz što opravdava daljnje istraživanje.

Na ispitivanom modelu nađena je značajna korelacija s dobi. Za kroničnu upalu smatra se da igra važnu ulogu u razvoju bolesti i oštećenju funkcije organa tijekom procesa starenja. Uz to, pokazano je da je razina IL-6 niža u ljudi koji su fizički aktivniji (242). Možda je moguće postaviti hipotezu da s godinama dolazi do progresije KOPB-a, a s tim

u vezi i intenziviranja sistemske upale i porasta cirkulirajućih citokina. Također, za očekivati je da je u starijih bolesnika KOPB, kao i pridružene bolesti, u takvoj fazi da im značajnije ograničava kretanje nego mlađim bolesnicima. Grupa autora našla je povezanost između koncentracije IL-6 u izdahnutom zraku KOPB bolesnika i dobi i smatraju je ona odraz upale traheobronhalnog stabla (243)

Značajna negativna korelacija dobivena je s inicijalnim vrijednostima hemoglobina i hematokrita. Već sam višekratno napomenula da veliki postotak KOPB bolesnika ima neadekvatan eritropoetski odgovor s obzirom na stupanj hipoksije, te da je KOPB karakteriziran sistemskom upalom. Brojne bolesti koje su karakterizirane kroničnom sistemskom upalom imaju anamiju kronične bolesti, što je u skladu nalazom provedenog istraživanja. Studije ukazuju da u etiologiji anamije kronične bolesti važnu ulogu imaju citokini. Mehanizam kojim citokini utječu na eritropoezu je složen i nije u potpunosti objašnjen. Za IL-6 je pokazano da tijekom infekcija, malignih bolesti ili imunoloških bolesti inducira produkciju α1-antitripsina, koji je sposoban inhibirati vezanje transferinskog receptora za transferin (170). Također, IL-6 inhibira hipoksijom potaknuto lučenje EPO iz stanica (180). I naše istraživanje jasno upućuje na moguću ulogu IL-6 u razvoju anamije kronične bolesti u KOPB bolesnika.

Statistički značajna negativna korelacija dobivena je s inicijalnim vrijednostima parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi. To je očekivano i sukladno nalazu povezanosti s pH, ali je na temelju dosadašnjih spoznaja teško objasniti patofiziološku ulogu.

In vitro studije ukazuju da hipoksija potiče sekreciju IL-6 u raznih staničnih linija (139-142). Ovaj učinak nastaje putem aktivacije jezgrinog faktora-κB (140). Pokazano je da je sekrecija ovog citokina povećana i u nekih kliničkih stanja karakteriziranih hipoksijom te se smanjuje nakon njene korekcije (143,144). Na ispitivanom modelu nismo potvrdili linearnu povezanost IL-6 i stupnja hipoksije, iako izrazito povišena vrijednosti u bolesnika koji su prema ulaznim kriterijima u studiju izrazito hipoksični govori (slično kao kod bFGF-a) o jasnoj povezanosti hipoksije i visokih vrijednosti IL-6.

Analizom su identificirane e četiri varijable koje najbolje predskazuju IL-6 kada se cijeli sustav promatra kao cjelina. Ova četiri faktora su: broj leukocita, FEV_1, ALT i saturacija hemoglobina kisikom.

Snažna neovisna povezanost IL-6 i broja leukocita logična je s obzirom na poznavanje uloge ovog proinflamatornog citokina u akutnoj upali i u skladu je s rezultatima jednostavne bivarijatne analize (117).

Značajna pozitivna korelacija između FEV_1 i IL-6 mogla bi govoriti da je IL-6 odraz lokalno uznapredovalog procesa. Za IL-6 je pokazano da je povišenih koncentracija u izdahnutom zraku i sputumu, te je zamijećen njegov daljnji porast u akutnom pogoršanju bolesti (153,243). Također, epitelne stanice bronha KOPB bolesnika pojačano luče IL-6 (244). FEV_1 je u naših bolesnika mjeren po postignutom kliničkom poboljšanju i odražava stupanj uznapredovalosti bolesti. U literaturi nisam našla podataka o direktnoj povezanosti IL-6 sa stupnjem razvoja KOPB-a.

Stepwisse regresijska analiza govori za značajnu pozitivnu povezanost IL-6 s AST. Pokazano je da je serumska razina IL-6 povišena u bolesnika s cirozom jetre što potiče trajnu upalnu reakciju u ovih pacijenata (236). S obzirom da su vrijednosti transferaza u većine naših ispitanika bile unutar normalnog raspona, nađena linearna povezanost je zanimljiva, iako je teško procijeniti njeno pravo značenje.

Značajna nezavisna pozitivna korelacija sa saturacijom hemoglobina kisikom predstavlja također zanimljiv nalaz s obzirom da je *in vitro* i *in vivo* istraživanjima pokazan negativni odnos IL-6 i stupnja hipoksije(139,140,144). Ovim je potvrđena složenost ispitivanog kliničkog ali i metodološkog statističkog analitičkog modela što opravdava dalje istraživanje nađenog interesantnog fenomena. Također, s obzirom na manji broj analiziranih entiteta ove nalaze treba uzimati sa oprezom.

Analiza povezanosti TNF-α s drugim varijablama. Ovom je analizom dobiveno da TNF-α značajno pozitivno korelira s dobi. Kako je ovaj citokin jedan od glavnih medijatora sistemske upale možda je i ovu povezanost moguće barem djelomično objasniti progresijom sistemske upale vezane uz KOPB s dobi uz pojavu i drugih sistemskih bolesti koje su karakterizirane kroničnom upalom kao što je ateroskleroze, a s tim u vezi porasta cirkulirajućih citokina.

U eksperimentalnim uvjetima, hipoksija potiče produkciju TNF-α u raznih stanica (145-147). Također, sistemska s hipoksija veže uz aktivaciju TNF-α sistema u pacijenata s KOPB-om i sindromom apneje tijekom spavanja (143,148). U našoj studiji nismo našli povezanosti između stupnja hipoksije i ekspresije TNF-α., ali zbog tehničke greške u dijelu bolesnika vrijednost TNF-a nije izmjerena, pa navedene zaključke treba uzeti sa oprezom.

Stepwisse analizom identificirane su AST, dob, broj eritrocita i VEGF kao nezavisne varijable koje najbolje i nezavisno predskazuju TNF kao zavisnu varijablu. Prva je u model ušla varijabla AST, potom dob, slijedio je broj eritrocita, te VEGF.

Značajnu pozitivnu povezanost TNF-α s AST, analogno kao i povezanost IL-6 s istim parametrom, teško je objasniti. Povišena razina TNF-α nađena je u bolesnika s teškim oštećenjem jetrenog parenhima, no naši bolesnici prema ulaznom kriteriju to nisu imali (236).

Nađena pozitivna korelacija s dobi u skladu je s rezultatima jednostavne regresijske analize. Neovisnu pozitivnu korelaciju s brojem eritrocita predstavlja iznenađenje i suprotna je očekivanjima. Prema današnjim saznanjima TNF-α se veže uz razvoj anemije kronične bolesti (165,166). Smatra se da TNF-α utječe na eritropoezu na više stupnjeva. TNF-α inhibira produkciju EPO, ima suprimirajući učinak na eritrogene progenitorske stanice i dovodi do diseritropoeze i skraćenja životnog vijeka eritrocita (166,170,179,180).

Pozitivna neovisna povezanost TNF-α i VEGF-a mogla bi upućivati da u ovom kliničkom modelu postoji njihova značajan međuodnos. I u nekim eksperimentalnim modelima pokazan je pozitivni međuodnos ova dva faktora (186). Rezultati učinjene analize mogu biti posljedica neprepoznatih latentnih povezanosti što omogućuju multivarijatne analize, ali obzirom na mali broj analiziranih entiteta ove nalaze treba uzimati sa oprezom.

Povezanost spola s parametrima crvene krvne slike, ispitivanim faktorima rasta i citokinima. Nije nađeno značajne razlike u raspodjeli apsolutnih vrijednosti parametara krvne slike među spolovima. Ovaj podatak govori da je fiziološka razlika od oko 10% u parametrima krvne slike izbrisana u ove populacije bolesnika i upućuje na mogućnost da

su žene sposobnije adekvatnije odgovoriti na hipoksiju kompenzatornim mehanizmom pojačane eritropoeze.

MULTIVARIJATNA ISTRAŽIVAČKA FAKTORSKA ANALIZA

Kako istraživani klinički model predstavlja složeni sustav s brojnim varijablama pokušano je metodom multivarijatne istraživačke analitike reducirati podatke i odrediti strukturu sustava. Zbog toga je primjenjena metoda faktorske analize. U analizu su uključene 23 kontinuirane varijable koje zadovoljavaju kriterije normalne raspodjele i logaritamski transformirane varijable EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α. Na ovaj način prepoznata su slijedeće četiri faktora koja su zajedno kontrolirala 60% ukupne varijance:

Faktor 1 koji bi klinički mogao odgovarati grupi bolesnika s hierkapnijom, izrazitom policitemijom u kojih pri pogoršanju nije dominiralo infektivno zbivanje.

Faktor 2 bi mogao odgovarati grupi bolesnika s globalnom respiracijskom insuficijencijom, uz akutnu desnostranu kardijalnu dekompenzaciju i prerenalno oštećenje bubrežne funkcije. Niži pH mogao bi ukazivati na akutno pogoršanje globalne respiracijske insuficijencije. Visoki nalaz EPO, VEGF i bFGF mogao bi ukazivati da je akutna hipoksija aktivirala sustav EPO i angiogenetskih faktora, ali nema eritropoetskog odgovora. Moguće je da je prošlo premalo vremena od lučenja EPO ili je eritropoeza blokirana na kasnijim fazama. Ovaj nalaz upućuje da neadekvatan eritropoetski odgovor u ovih bolesnika ne možemo jednoznačno komentirati nedostatnom produkcijom EPO, već je vjerojatno eritropoeza ometana i na kasnijim stupnjevima.

Faktor 3 klinički bi mogao odgovarati bolesnicima s makrocitnom anemijom i oštećenjem jetrene funkcije, a najveća korelacija s GGT govori za moguću leziju uzrokovanu alkoholom.

Faktor 4 mogao bi odgovarati bolesnicima s akutnim upalnim (infektivnim) zbivanjem i znakovima aktivacije angiogeneze i parcijalnom respiracijskom insuficijencijom.

NALAZI NAKON POČETKA LIJEČENJA

Ova studija je osmišljena kao interventna studija, te se u skladu sa drugom temeljnom hipotezom rada željelo ocijeniti dinamiku događanja nakon početka terapije koja se

temelji na dobroj kliničko praksi, a u kojoj je bitan terapijski zahvat korekcija hipoksemije. Longitudinalnim praćenjem bolesnika uspoređuju se nalazi u svakog pojedinog bolesnika, te se radi o vjerodostojnom, kontroliram pokusu u kojem je za svaki istraživani parametar bolesnik sam sebi kontrola. Stoga se metodološki gledano dobiveni rezultati mogu smatrati konzistentnim. Također, primijenjene su potpuno iste analitičke i istraživačke metode što bitno doprinosi vjerodostojnosti.

U sklopu istraživanja praćena je dinamika vrijednosti dišnih plinova u arterijskoj krvi, parametara krvne slike, rutinskih biokemijskih nalaza i EPO. Osim inicijalnih vrijednosti, ove su varijable određivane drugog, osmog, četrnaestog i dvadeset i osmog dana liječenja. Dišni plinovi određivani su i sat vremena po početku liječenja radi kontrole oksigenacije i korekcije protoka kisika.

Dinamika dišnih plinova i značajnost promjena. Sat vremena po početku liječenja postignut je značajni porast vrijednosti **parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi**. Drugog dana liječenja srednja vrijednost parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi još je diskretno porasla. Najniža zabilježena vrijednost drugog dana liječenja bila je 50 mmHg. Kako je cilj terapije kisikom bio postići parcijalni tlaki kisika u arterijskoj krvi između 50-60 mmHg možemo smatrati da je u svih ispitanika došlo do zadovoljavajuće korekcije hipoksemije. Nakon prvog sata liječenja vrijednosti ovog parametra su stabilne i statistički se zanačajno ne razlikuju u odnosu na vrijednosti u ostalim izmjerenim točkama.

Korekcija hipoksemije praćena je umjerenim porastom **parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi**, već sat vremena po početku liječenja. Prosječno je ova varijabla porasla za 2,5 mmHg što klinički nije značajno, no statistički je ovaj porast bio značajan. Drugog dana liječenja zabilježen je dodatni porast ove varijable i ona je tada prosječno bila za 4,8 mmHg viša od inicijalne. Inicijalna je vrijednost parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi statistički bila značajno različita u odnosu na sve mjerene uzorke, da bi 28. dana liječenja ona ponovno pala i statistički se ne više nije razlikovala inicijalne.

Primjena kisika u KOPB bolesnika u pogoršanju osnovne bolesti može imati za posljedicu porast parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi za 5-10 mmHg

(9). Prosječni porast ovog parametra u naših ispitanika bio je čak nešto manji. U studiji Ström i sur., koja je rađena na pacijentima u stabilnoj fazi bolesti, također je s primjenom kisika zabilježen porast parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi. Ovaj je porast bio manji nego što se očekuje u bolesnika u akutnom pogoršanju. On je prosječno iznosio 3 mmHg unutar 24 sata liječenja i nije se mijenjao slijedećih 3 dana liječenja. Nakon mjesec dana liječenja došlo do njegovog pada i nije nađeno statistički značajne razlike između inicijalnih vrijednosti parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi i kontrolnih nakon mjesec dana liječenja (55). U kliničkoj praksi čest je strah od primjene kisika u bolesnika s globalnom respiracijskom insuficijencijom. Naime u tih je bolesnika hipoksija glavni stimulus centra za disanje. Korekcijom hipoksije može doći do depresije centra za disanje i posljedične hiperkapnije koja vodi respiracijskoj acidozi i konačno do CO_2 narkoze. Ova komplikacija nije uobičajena terapiji kisikom niskih protoka i najbolje se izbjegava titracijom doze kisika održavajući parcijalni tlaki kisika u arterijskoj krvi između 60 i 65 mmHg. Manju retenciju ugljičnog dioksida pacijenti dobro toleriraju. U ovih je pacijenata aktiviran kompenzatorni mehanizam sinteze i resorpcije bikarbonatnih iona, te su na taj način sposobni održavati acidobaznu ravnotežu. Sposobnost pacijenata da toleriraju retenciju ugljičnog dioksida može biti adaptivni mehanizam smanjenja dišnog rada, jer povišena koncentracija alveolarnog ugljičnog dioksida rezultira njegovom povećanom ekskrecijom u svakom udahu (9). Podaci naše studije također ukazuju da je terapija kisikom sigurna metoda liječenja ukoliko se primjenjuje kontrolirano i nisko dozirano.

Dinamika parametara krvne slike i značajnost promjena. Tijekom liječenja dolazi do značajnih promjena parametara krvne slike.

Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrit pokazuju istu dinamiku promjena. Sve tri varijable značajno padaju već prvog dana nakon početka terapije, a najnižih su vrijednosti četrnaesti dan po početku liječenja.

Srednja vrijednost **hemoglobina** već je drugog dana liječenja bila statistički značajno niža od inicijalne. Tada je prosječno bila za 7,16 g/L niža od inicijalne vrijednosti, što je iznosilo 4,6 %. Najniža vrijednost ovog parametra bila je četrnaesti dan liječenja kada je bio za 11,2 % niži od inicijalnih. Tada je u odnosu na inicijalne vrijednosti zabilježen pad

od 16,85 g/L. Uzorak izmjeren nakon dvadeset i osam dana liječenja bio je neznatno viši od onog izmjerenog četrnaestog dana liječenja, ali se od njega nije statistički značajno razlikovao. Tada je prosječno bio za 7,4 % niži od inicijalnog, što je bilo statistički značajno.

Poznato je da dugotrajno liječenje kisikom dovodi do pada hematokrita. U velikoj studiji u kojoj su ispitivanu populaciju činili kronično hipoksični KOPB pacijenti u stabilnoj fazi bolesti značajan pad hematokrita zabilježen je tek 12 mjeseci po početku terapije. Oni navode da je nakon 18 mjeseci dugotrajnog liječenja kisikom hematokrit bio niži za 9,2 % u odnosu na inicijalnu vrijednost. Ovi su pacijenti primali kisik u odgovarajućem protoku prosječno 17,7 sati/dan, za razliku od naših ispitanika kod kojih je kisik primjenjivan kontinuirano (42). U studiji Ström i sur. tri mjeseca po početku dugotrajnog liječenja kisikom prosječna vrijednost hemoglobina pala je za 4,6 % U toj je studiji kisik korišten oko 15 sati / dnevno (55). Navedene se studije razlikuju od naše po tome što se radi o pacijentima u stabilnoj fazi bolesti, i što je terapija provođena značajno manje sati na dan. Bolesnicima u našoj studiji kisik je primjenjivan kontinuirano, 24 sati dnevno.
Za razliku od navedenih studija, mi smo zabilježili promptni i značajni pad broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita. Malo je vjerojatno da je ovaj promptni učinak na parametre crvene krvne slike direktan odraz promjene serumske razine EPO. Poznato je da eritrociti žive 120 dana i eritropoeza se ne zaustavlja trenutno nakon pada razine EPO. Promjene u sintezi eritrocita zahtijevaju oko četrnaest dana da postanu manifestne. Volumen plazme nije određivan u naših pacijenata, ali nije vjerojatno da se promjene u koncentraciji hemoglobina budu objašnjene hemodilucijom. Naime većina naših pacijenta bila je manifestno kardijalno dekompenzirana u trenutku prijema u bolnicu, što je stanje karakterizirano s viškom tekućine, i većina je pacijenata dobivala diuretike tijekom bolničkog liječenja. Također ovaj pad je prevelik da bi bio objašnjen uzimanjem krvi u dijagnostičke svrhe.

U odnosu na inicijalne vrijednosti prosječni broj **trombocita** statistički je značajno niži drugog dana liječenja. Tada je od inicijalnih vrijednosti niži za 5 %. Ova varijabla se najznačajnije razlikuje od inicijalnih četrnaestog dana liječenja kada je za 8,9 % niža od inicijalnih. Teško je objasniti ovakve značajne promjene broja trombocita koje su mnogo veće od volumena uzete krvi.

Broj **leukocita** pokazuje tendenciju pada s nastupom liječenja i već je značajno niži drugog dana liječenja, a najnižih je vrijednosti četrnaestog dana liječenja. Ovakve promjene broja leukocita u skladu su s kliničkim tijekom bolesti i izlječenjem infekta koji je bio prisutan u velikog broja ispitanika pri hospitalizaciji.

Dinamika rutinskih biokemijskih parametara i značajnost promjena. Za sve rutinski određivane biokemijske parametre analizirana je značajnost promjena. Među analiziranim varijablama jedino se AST značajno mijenja. Njena prosječna vrijednost postepeno pada s početkom liječenja i značajno je niža od inicijalnih četrnaestog dana liječenja. Možda je moguće ovu promjenu povezati s postignutom kardijalnom rekompenzacijom i rješavanjem zastojnih promjena u jetri.

Dinamika EPO i značajnost promjena. Drugog dana liječenja EPO značajno pada i njegova srednja vrijednost iznosi 14,1 ± 16,9 U/L. Interval pouzdanosti za ovu varijablu iznosi 9,62 - 18,58 U/L, pa možemo reći da su vrijednosti ovog parametra drugog dana liječenja ne razlikuju značajno od referentnih. Raspon je ove varijable drugog dana liječenja bio mnogo manji od inicijalne kao i maksimalna zabilježena vrijednost. Prosječna vrijednost EPO dalje pada tijekom prvog tjedna liječenja i najnižih je vrijednosti osmog dana liječenja. Daljnjim praćenjem zamijećen je ponovni porast ove varijable i vrijednosti dobivene četrnaestog i dvadesetosmog dana liječenja statistički se ne razlikuju od inicijalnih.

Sličnu dinamiku zamijetili su i Ström i sur. u stabilnih KOPB bolesnika koji su započeli dugotrajno liječenje kisikom. Oni opisuju značajno niži nalaz serumskog EPO nakon 24 sata i nakon 3 dana liječenja u odnosu na inicijalne vrijednosti. Vrijednosti izmjerene nakon 1 mjesec i nakon tri mjeseca liječenja nisu se više značajno razlikovale od inicijalnih (55). Teško je objasniti ovakvu dinamiku EPO. Možda se bolesnici nakon tjedan dana liječenja s općim oporavkom više kreću pa pri tome ulazili u faze značajnije hipoksemije. Neki autori preporučaju povećanje protoka kisika za 1 litru/min pri fizičkoj aktivnosti i tijekom spavanja. Pacijentima u našoj studiji primjenjivan je kisik u protoku koji je baždaren na temelju nalaza dišnih plinova u arterijskoj krvi i acidobaznog statusa u mirovanju i budnom stanju (42,245).

Detaljnom analizom varijable EPO u naših pacijenata otkrivene su dvije različite dinamike. U 63% ispitanika zamijećen je očekivani pad u razini EPO unutar 24 sata liječenja, dok je u preostalih 37% ispitanika EPO porastao unutar istog intervala. Ovo je neočekivan i iznenađujući nalaz. Na ovaj su način prepoznate dvije grupe pacijenata s različitim odgovorom na korekciju hipoksemije: grupa A u koje je zamijećen pad EPO (što je nalaz koji je očekivan na temelju praćenja dinamike u fiziološkim uvjetima) i grupa B u koje je došlo do porasta EPO nakon korekcije hipoksemije (što je potpuno neočekivano i zahtijeva i opravdava podrobniju analizu). Ove dvije grupe pacijenata međusobno su uspoređene s obzirom na sve izmjerene varijable kako bi se eventualno prepoznali faktori odgovorni za ovaj različiti odgovor među ispitanicima. Značajna je razlika nađena s obzirom na inicijalne vrijednosti EPO i inicijalne vrijednosti broja eritrocita. Inicijalne su vrijednosti EPO i broja eritrocita bile više u grupe u kojoj je zamijećen pad EPO. Udio pacijenata u kojih je su korišteni ACE inhibitori bio je manji u skupini B. Ovaj nalaz upućuje da ACE inhibitori mogu doprinjeti padu EPO razine tijekom hospitalizacije. Ovaj je nalaz u skladu s izvještajima drugih autora koji su pokazali da ACE inhibitori mogu sniziti koncentraciju EPO (204,205). Porast EPO u značajnog broja ispitanika sugerira da je on inicijalno bio inhibiran nekim faktorom/ima koji se promptno mijenjaju s korekcijom hipoksemije. Nažalost, ovom studijom nismo uspjeli identificirati o kojim se faktorima radi i tako potvrditi moguću ulogu ostalih faktora rasta i citokina na neobičnu dinamiku EPO u dijela bolesnika.

Promjena VEGF i bFGF nakon početka liječenja. Ispitivani angiogenetski faktori nisu se značajno promijenili tijekom prvih 24 sata praćenja. Srednja je vrijednost varijable **VEGF** izmjerene u drugoj točci tek neznatno niža od inicijalne i iznosila je 1039,2 ± 1192,3 pg/ml. Interval pouzdanosti za ovu varijablu iznosi 750,93 - 1333,05 pg/ml, pa možemo reći da su vrijednosti ovog parametra i nakon korekcije hipoksemije značajno više od referentnih. Oskudne su studije o kinetici ovog angiogenog faktora rasta. Dinamičke promjene serumske razine VEGF-a praćene su na štakorskom modelu akutnog infarkta. Autori su pokazali da 6 sati nakon akutnog infarkta dolazi do značajnog porasta koncentracije VEGF-a u serumu, te da ona dalje raste i doseže maksimalnu koncentraciju 24 sata nakon ligature koronarne arterije. Potom, tijekom slijedećih 14 dana, dolazi do postepenog pada koncentracije ovog faktora rasta, ali je i nakon 14 dana

razina VEGF-a i dalje značajno povišena u ovom modelu (212). Ovaj se eksperimentalni model značajno razlikuje od modela istraživanog u sklopu ove studije.

Upadhyay i sur. opisali su pad serumske koncentracije VEGF po postignutom oporavku nakon akutnog pogoršanja u KOPB bolesnika (206). Oni nisu mjerili serumsku koncentraciju VEGF-a u točno određenom vremenskom razmaku već pri prijemu i na dan otpuštanja iz bolnice. Iako nije navedeno koliko je prosječno trajala hospitalizacija za očekivati je da se radi o većem intervalu nego u našoj studiji. Kako je već prethodno raspravljeno u kliničkom modelu KOPB-a s akutnim pogoršanjem kronične respiracijske insuficijencije, brojni su faktori koji imaju ulogu u indukciji ekspresije VEGF gena. S obzirom da je hipoksemija snažan induktor stvaranja i lučenja VEGF-a, za očekivati je da prestankom ovog stimulusa dolazi do gašenja njegove sinteze. Hipoksija nepobitno ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije ovog gena, ali osim hipoksije važnu ulogu u regulaciji sinteze VEGF-a ima i upala. Za komponentu upale koja uzrokuje povišenu stvaranje VEGF-a nije vjerojatno da će se povući tako brzo kao što se hipoksemija može brzo korigirati terapijskom aplikacijom kiska.

Moguće je da postoji razlika u brzini gašenja sinteze nakon korekcije hipoksemije između EPO i VEGF-a, pa bi tek dalje praćenje moglo sa sigurnošću odgovoriti na ovo pitanje.

Srednja je vrijednost varijable **bFGF** izmjerene u drugoj točci također tek neznatno niža od inicijalne i iznosila je 6,1 ± 2,9 pg/ml. S obzirom da interval pouzdanosti za ovu varijablu iznosi 5,39-6,69 pg/ml, možemo reći da su vrijednosti ovog parametra u ispitivane populacije i 24 sata nakon korekcije hipoksemije značajno više nego u zdravih ljudi.

Promjena IL-1β , IL-6 i TNF-α nakon početka liječenja. Ispitivani se citokini ne mijenjaju statistički značajno tijekom prvih 24 sata liječenja.

Srednja je vrijednost varijable svih ispitivanih citokina nešto niža nakon prvih 24 sata liječenja, ali ta promjena nije statistički značajna. Poluživot citokina je vrlo kratak. Poluživot TNF-α iznosi 6-7 minuta i počinje padati oko 18 sati nakon izlaganja hipoksiji (145,146). Iako je u eksperimentalnim uvjetima pokazan pad citokina nakon prestanka hipoksičnog stimulusa, u složenom sustavu kao što je KOPB u akutnom pogoršanju brojni su faktori koji mogu djelovati na njihovu ekspresiju (139,147). Vjerojatno

najznačajniji među njima je akutna upala za koju nije vjerojatno da se može korigirati unutar 24 sata.

POVEZANOST NALAZA IZMJERENIH U DRUGOJ TOČCI (NAKON KOREKCIJE HIPOKSEMIJE)

Učinjena je analiza povezanosti svih faktora rasta i citokina s ostalim određivanim varijablama 24 sata po početku liječenja kako bi se ocijenio odnos među varijablama nakon korekcije hipoksemije. U analizama povezanosti korištene su logaritamski transformirane varijable ispitivanih faktora rasta i citokina jer se u ovako formiranih varijabli distribucija nije značajno razlikovala od normalne.

Analiza povezanosti EPO 2 s ostalim kontinuiranim varijablama. Ova varijabla statistički je značajno pozitivno korelirala s brojem trombocita i GGT nakon korekcije hipoksemije. Ove povezanosti teško je objasniti na temelju dosadašnjih spoznaja i opravdavaju daljnje istraživanje. Neočekivan je i neobičan nalaz značajne negativne povezanosti EPO s hemoglobinom izmjerenim nakon korekcije hipoksemije. Na temelju poznavanja fiziološke uloge EPO za očekivati je korelaciju suprotnog predznaka.

Analiza povezanosti VEGF 2 i bFGF 2 s ostalim kontinuiranim varijablama. Na ovom modelu nađena je značajna pozitivna korelacija između VEGF-a i IL-6 izmjerenog nakon korekcije hipoksemije. Ovaj nalaz snažno upućuje da i u ovom sustavu postoji međusobni odnos između ove dvije varijable. Prethodna su istraživanja također pokazala da je razina IL-6 povišena u tkivima u kojima se odvija aktivna neoangiogeneza. IL-6 može inducirati angiogenezu, iako ne može direktno inducirati proliferaciju endotelnih stanica. Naime, IL-6 inducira neoangiogenezu indirektno povećavajući ekspresiju VEGF gena. Pokazano je da učinak IL-6 nije samo posredovan pomoću DNA elemenata na promotorskoj regiji, nego također i kroz specifične motive locirane na području 5'-netranslatiranog područja VEGF mRNA (186). I nakon korekcije hipoksemije dobivena je značajna pozitivna korelacija ovog faktora s brojem leukocita, što također upućuje da akutna upala ima značajnu ulogu u njegovoj ekspresiji. Također, dobivena je očekivana značajna povezanost s brojem trombocita koja je očekivana. Značajna negativna korelacija s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi upućuje na snažan međuodnos ovih varijabli.

Kao u analizi inicijalnih odnosa i u ovoj točci nađena je granično značajna negativna korelacija razine bFGF-a razinom IL-1β.

Analiza povezanosti IL-1β 2, IL-6 2 i TNF-α 2 s ostalim kontinuiranim varijablama. Dobivena značajna pozitivna korelacija log-IL-1β i IL-6 izmjerenim u drugoj točci ukazuje na simultanu aktivaciju ova dva proinflamatorna citokina.

Nakon korekcije hipoksemije nađena je značajna pozitivna korelacija IL-6 s brojem leukocita, trombocita i urejom. Ovakva je korelacija nađena i analizom inicijalnih varijabli.

Ovom je analizom dobiveno da TNF-α pozitivno korelira sa urejom, te negativno s parcijalnim tlakom ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi i pH izmjerenim nakon početka liječenja. U literaturi postoje podaci o pojačanoj ekspresiji ovog citokina u bolesnika s kroničnom renalnom insuficijencijom (241). Značajnu pozitivnu korelaciju s urejom u naših ispitanika teško je objasniti, jer većina naših ispitanika nije imala poremećenu renalnu funkciju. Na modelu bolesnika sa šećernom bolešću u ketoacidozi nađena je povećana razina TNF-α u plazmi (239). U samo 4% naših ispitanika zabilježena je acidoza. U literaturi nisam našla podataka o utjecaju hiperkapnije ili ugljičnog dioksida na koncentraciju TNF-α. Osobito je neobična povezanost istog predznaka TNF-α s pH i parcijalnim tlakom ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi, s obzirom da je dobro poznat utjecaj parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida na acidobazni status.

DUGOTRAJNO LIJEČENJE KISIKOM

Opis varijable dugotrajnog liječenja kisikom. Dugotrajno liječenje kisikom označava kućno liječenje dugotrajnim udisanjem kisika, a primjenjuje se u bolesnika s kroničnom respiracijskom insuficijencijom. U naših je ispitanika indikacija za dugotrajno liječenje kisikom postavljena na prema opće prihvaćenim smjernicama. Indikacija za dugotrajno liječenje kisikom postavljena je nakon maksimalnog kliničkog poboljšanja ukoliko je parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi bio manji ili jednak 55 mmHg pri udisanju sobnog zraka, ili manji ili jednak 60 mmHg uz prisutnost policitemije, kliničkih znakova plućnog srca ili plućne hipertenzije (2,9).

Prema ovim kriterijima indikacija za dugotrajno liječenje kisikom postavljena je u 44% ispitanika, dok je u preostalih 56% pacijenta postignuto kliničko poboljšanje koje nije zahtijevalo daljnju terapiju kisikom.

Analiza povezanosti varijable dugotrajnog liječenja kisikom s ostalim varijablama prije početka liječenja. Poznato je da dvije trećine pacijenata koji imaju indikaciju za dugotrajno liječenje kisikom pri završetku liječenja pogoršanja KOPB-a, nemaju više indikacijske vrijednosti nakon slijedeća tri mjeseca praćenja. Zbog toga preporuke za postavljanje indikacije za dugotrajno liječenje kisikom preporučaju odgodu ove odluke i praćenje pacijenta mjesec do tri mjeseca (2,42). Pokušali smo pronaći faktore koji bi nam na početku liječenja mogli predvidjeti koji će pacijent zadovoljiti kriterije za dugotrajno liječenje kisikom. Od svih ispitivanih faktora samo su parcijalni tlak ugljičnog dioksida, broj eritrocita, koncentracije hemoglobina, hematokrita, te TNF-α izmjeren drugog dana liječenja korelirali s ovim ishodom liječenja. Dakle prema ovoj analizi KOPB bolesnici hospitalizirani u akutnom pogoršanju s vrijednostima parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi nižim ili jednakim 53 mmHg imaju veću šansu da će trebati dugotrajno liječenje kisikom ukoliko imaju globalnu respiracijsku insuficijenciju i policitemiju. Ipak, snaga predikcije ovih parametara nije velika i klinički dovoljno pouzdana.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu istraživan je odnos hipoksije, eritropoeze, angiogeneze i citokinske ekspresije na modelu KOPB bolesnika karakteriziranih značajnom hipoksemijom. Na temelju dobivenih rezultata možemo donjeti slijedeće specifične zaključke:

1. Ispitivanu skupinu činili su tipični KOPB bolesnici hospitalizirani radi akutnog pogoršanja sa značajnom respiracijskom insuficijencijom.

2. **Prije početka liječenja** ispitivani su parametari bili slijedećih karakteristika:

2.1. Ustanovljene su slijedeće promjene u krvnoj slici:

2.1.1. U većine ispitanika hipoksija nije inducirala produkciju **eritrocita**. Samo je 35% muškaraca i 32% žena bilo policitemično.

2.1.2. Srednja vrijednost broja **leukocita** u muškaraca bila je iznad blago referentnih vrijednosti i iznosila je 10,8 ± 3,5, a u žena unutar referentnih vrijednosti i iznosila je 9,4 ± 6,0.

2.1.3. Srednja vrijednost broja **trombocita** bila je unutar referentnih vrijednosti u oba spola.

2.2. Hipoksija nije uspjela inducirati **EPO** sintezu u većine ispitanika. Ova je varijabla bila unutar referentnih vrijednosti u 67 % ispitanika, ispod referentnih vrijednosti u 17,5 %, a povišen samo u 15,5 % ispitanika.

2.3. Ova skupina bolesnika karakterizirana je povišenim vrijednostima ispitivanih angiogenetskih faktora.

2.3.1. **VEGF** je bio povišen. Srednja vrijednost ove varijable iznosila je 1042,00 pg/ml. Raspon ove varijable je širok i kreće se od izuzetno niskih do ekstremno povišenih vrijednosti.

2.3.2. **b-FGF** je bio povišen. Srednja vrijednost ove varijable bila je povišena i iznosila je 6,04 pg/ml.

2.4. Ispitivani sustav karakterizira varijabilnost nalaza ispitivanih citokina u serumu:

2.4.1. Vrijednosti **IL-1β** bile su unutar referentnog raspona. Njegova srednja vrijednost iznosila je 2,34 pg/ml.

2.4.2. Ispitivana skupina pokazuju izrazito povišene vrijednosti **IL-6**. Srednja vrijednost ovog parametra iznosila je 45,67 pg/ml. Raspon je ove varijable vrlo širok i kreće se od niskih do izrazito visokih vrijednosti.

2.4.3. Očekivana indukcija **TNF** sustava hipoksijom nije potvrđena u ove skupine bolesnika. Njegova srednja vrijednost iznosila je 10,13 pg/ml.

3. Univarjatnim i multivarijatnim testovima povezanosti nađene su slijedeće značajne povezanosti među inicijalnim varijablama:

3.1. Statistički granično značajno pozitivna korelacija **EPO** s b-FGF govori za istovremenu indukciju oba sustava. Značajno negativna korelacija s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi očekivana je na temelju poznavanja fizioloških modela. Nađenu statistički značajno pozitivnu korelaciju s ALT, urejom i kreatininom teško je objasniti na temelju dosadašnjih spoznaja. Od analiziranih varijabli razinu EPO neovisno, statistički značajno definiraju parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi, bFGF i ureja.

3.2. Statistički značajna negativna korelacija **VEGF**-a sa parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi i saturacijom hemoglobina kisikom potvrđuju hipotezu da je hipoksija snažan induktor VEGF sinteze u ovom kliničkom modelu. Statistički značajna povezanost s brojem leukocita i brzinom sedimentacije eritrocita sugerira da je i u ovom modelu akutna i kronična upala doprinjela visokoj razini VEGF-a. Značajna pozitivna korelacija razine VEGF-a i broja trombocita očekivana je. U multivarijatnoj stepwise regresijskoj analizi kao značajni neovisni prediktori serumske razine VEGF-a izlučeni su broj trombocita, pH i bFGF.

3.3. Statistički granično značajna negativna korelacija **bFGF**-a s varijablom IL-1β upućuje na ulogu citokina u ekspresiji bFGF-a u ovom kliničkom modelu. Nađenu značajnu povezanost korištenja furosemida i inicijalne razine bFGF-a

teško je objasniti na temelju dosadašnjih spoznaja. Stepwise regresijkom analizom dobivena je značajna povezanost bFGF sa EPO i IL-1β, što ukazje na međusobnu interakciju ovih varijabli.

3.4.IL-1β značajno negativno korelira s vrijednostima AST i ALT i ove je povezanosti teško objasniti na temelju dosadašnjih spoznaja, dok u multivarijatnoj stepwise regresiji, praktički sve neovisne prediktore absorbira AST.

3.5.IL-6 značajno pozitivno korelira s brojem leukocita i brzinom sedimentacije eritrocita. S obzirom da je IL-6 proinflamatorni citokin ova je korelacija bila očekivana. Na temelju dosadašnjih spoznaja teško je objasniti značajnu pozitivnu korelaciju ovog parematra s brojem trombocita, pH i urejom. Moguće je da je značajna pozitivna korelacija IL-6 s dobi povezana s progresijom KOPB-a sa starošću, a s tim u vezi i intenziviranjem sistemske upale i porastom cirkulirajućih citokina. Stepwise regresija otkriva da serumsku razinu IL-6 najbolje predskazuju broj leukocita, FEV_1, ALT i saturacija hemoglobina kisikom.

3.6. Moguće je da je značajna pozitivna korelacija **TNF-α** s dobi posljedica progresije sistemske upale vezane uz KOPB s godinama trajanja bolesti. Uz to, moguće je da pojava drugih sistemskih bolesti koje su karakterizirane kroničnom upalom doprinose porastu cirkulirajućih citokina. U multivarijatnoj analizi razinu serumskog TNF-α najbolje predskazuju AST, dob, broj eritrocita i VEGF.

4. Kako se radi o složenom sustavu s brojnim međusobnim povezanostima izvršena je i **eksploratorna multivarijatna faktorska analiza** s ciljem redukcije broja varijabli i otkrivanja strukture latentne povezanosti. Na ovaj način definirana su 4 faktora koji zajedno kontroliraju 59,7 % varijance. Ti bi faktori mogli odgovarati slijedećim skupinama bolesnika:

Faktor 1 mogao bi odgovarati bolesnicima s hiperkapnijom i izrazitom policitemijom.

Faktor 2 mogao bi odgovarati grupi bolesnika s akutnim pogoršanjem globalne respiracijske insuficijencije, akutnom desnostranom kardijalnom dekompenzacijom i prerenalnim oštećenjem bubrežne funkcije. Akutna hipoksija aktivirala je sustav EPO i angiogenetskih faktora, ali bez adekvatnog eritropoetskog odgovora. Moguće je da neadekvatna eritropoeza posljedica prekratkog vremena od lučenja EPO ili blokade u kasnijim fazama stvaranja eritrocita.

Faktor 3 mogao bi odgovarati bolesnicima s makrocitnom anemijom i oštećenjem jetrene funkcije.

Faktor 4 mogao bi upućivati na bolesnike s parcijalnom respiracijskom insuficijencijom i znakovima aktivacije angiogeneze u kojih je infektivno zbivanje dovelo do akutnog pogoršanja.

5. Praćenjem varijabli **nakon korekcije hipoksemije** dobili smo odgovor na drugu temeljnu hipotezu ovog rada:

5.1. Dišni plinovi se mijenjaju na tipični način, potvrđujući učinkovitost provedenih terapijskih zahvata:

5.1.1. **parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi** statistički značajno raste već sat vremena po početku liječenja i potom vrijednosti ostaju stabilne tijekom svih 28 dana, što znači da je postignuta stabilna korekcija hipoksemije tijekom cijelog vremena praćenja.

5.1.2. Po početku liječenja dolazi do umjerenog, ali statistički značajnog porasta **parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi**. Temeljem poznavanja patofizioloških mehanizama, ovaj porast je očekivan i nije klinički značajan. Vrijednosti se ovog parametra značajno ne mjenjaju tijekom daljnjeg lječenja sve do dvadeset i osmog dana kada ponovno padaju i statistički se ne razlikuje značajno od inicijalnih. Podaci naše studije ukazuju da je terapija kisikom sigurna metoda liječenja ukoliko se primjenjuje kontrolirano i nisko dozirano.

5.2. **Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrit** pokazuju jednaku dinamiku s početkom liječenja. Sve tri varijable značajno padaju već prvog dana nakon početka liječenja, a najnižih su vrijednosti četrnaesti dan praćenja. Dakle, korekcija hipoksemije dovodi do očekivanog pada parametara crvene krvne slike i ovi se nalazi ponašaju analogno očekivanjima izvedenim iz fizioloških modela.

5.3. **EPO** očekivano značajno pada već drugog dana liječenja i njegova srednja vrijednost iznosi 14,1 ± 16,9 U/L. Najniža srednja vrijednost EPO zabilježena je četrnaesti dan praćenja i iznosila je 10,8 ± 10,13 U/L. Četrnaesti i dvadesetosmi dan praćenja srednja vrijednost ove varijable i dalje je niža od inicijalne, ali se više od njih statistički značajno ne razlikuju. Detaljnijom analizom prepoznate su dvije grupe pacijenat s različitim odgovorom na korekciju hipoksemije: grupa A koju je činilo 63,2 % pacijenata i u koje je zamijećen očekivani pad EPO i grupa B koju je činilo 36,8 % pacijenata u koje je zamijećen neočekivani porast EPO nakon korekcije hipoksemije. Ove dvije skupine bolesnika značajno se razlikuju s obzirom na inicijalne vrijednosti log-EPO i inicijalne vrijednosti broja E. Inicijalne su vrijednosti EPO i broja E više u grupi A. Porast EPO u značajnog broja ispitanika sugerira da je on inicijalno bio inhibiran nekim faktorom/ima koji se promptno mijenjaju s korekcijom hipoksemije. Navedeni neočekivani nalaz predstavlja novu spoznaju te ukazuje na složenost ispitivanog kliničkog modela u usporedbi s fiziološkom modelom odnosa između hipoksije i povišenja hemoglobina u cirkulaciji.

5.4. VEGF, bFGF, IL-1β, IL6 i TNF-α ne mijenjaju se značajno 24 sata po korekciji hipoksemije, što je važna spoznaja i doprinos poznavanju regulacijskih zbivanja u istraživanom modelu. Moguće je da je potrebno više vremena za gašenje sinteze angiogenih faktora rasta, te da bi se dužim periodom praćenja registrirala dinamika. Također, osim hipoksije važnu ulogu u regulaciji sinteze VEGF-a ima i upala. Za komponentu upale koja uzrokuje povišenu stvaranje VEGF-a nije vjerojatno da će se povući tako brzo kao što se hipoksemija može brzo korigirati terapijskom aplikacijom kiska. Isto tako, vjerojatno bi

određivanje citokina nakon kontrole upale/infekcije otkrilo dinamiku proinflamatornih citokina.

6. Testovima korelacija nađene su slijedeće značajne povezanosti među varijablama izmjerenim 24 sata po korekciji hipoksemije:

Na temelju dosadašnjih spoznaja teško je objasniti značajnu pozitivnu korelaciju **EPO** s brojem trombocita i GGT. Značajna negativna korelacija ovog parametra s hemoglobinom je neočekivana. Na temelju poznavanja fizioloških mehanizama za očekivati je korelacija suprotnog predznaka. Značajna pozitivana korelacija između **VEGF-a** i IL-6 upućuje da i u ovom sustavu postoji međusni odnos između ove dvije varijable kao što je pokazano i istraživanjima drugih modela. Značajna pozitivna korelacija ovog faktora s brojem L upućuje da akutna upala ima značajnu ulogu u njegovoj ekspresiji. Značajna pozitivna povezanost s brojem trombocita očekivana je. Značajna negativna korelacija s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi upućuje na važnu ulogu hipoksije u ekspresiji ovog angiogenog faktora. Značajno negativna korelacija **bFGF** s IL-1β upućuje na ulogu citokina u ekspresiji bFGF-a u ovom kliničkom modelu. Značajna pozitivna korelacija **IL-1β** i IL-6 ukazuje na simultanu aktivaciju ova dva proinflamatorna citokina. Kao i analizom povezanosti inicijalnih varijabli, dobivena je značajno pozitivna korelacija **IL-6** sa brojem leukocita, trombocita i urejom.Na temelju dosadašnjih spoznaja teško je objasniti nađeni značajno pozitivnu korelaciju **TNF-α** s urejom, te negativnu s parcijalnim tlakom ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi i pH.

7. Po **postignutom maksimalnom kliničkom poboljšanju** procijenjena je potreba za **dugotrajno liječenje kisikom**.

7.1. Kriterije za dugotrajno liječenje kisikom postignuti su u 44% ispitanika, dok je u preostalih 56% pacijenta postignuto kliničko poboljšanje koje nije zahtijevalo daljnju terapiju kisikom.

7.2. Među ispitivanim varijablama statistički značajnu predikciju za dugotrajno liječenje kisikom pokazuju inicijalni nalaz parcijalni tlak ugljičnog dioksida, hemoglobin i hematokrit. Dakle, prema ovoj analizi KOPB bolesnici hospitalizirani u akutnom pogoršanju s vrijednostima parcijalnog tlaka kisika

nižim ili jednakim 53 mmHg imaju veću šansu da će trebati dugotrajno liječenje kisikom ukoliko imaju globalnu respiracijsku insuficijenciju i policitemiju. Ipak, snaga predikcije ovih parametara nije velika i klinički dovoljno pouzdana.

Na temelju iznesenog možemo izreći opći zaključak:

Rezultati ovog rada ukazuju da je kompenzatorni eritropoetski odgovor na hipoksiju u KOPB bolesnika neadekvatan i različit od odgovora zdravih ljudi na ovaj stimulus. Nizak nalaz EPO u većine ispitanika upućuje da je eritropoeza predominantno inhibirana na razini produkcije EPO, a ne na kasnijim stupnjevima eritropoeze. Nejasno je da li je niska serumska razina EPO, posljedica specifičnog poremećaja, npr na razini neadekvatnog prepoznavanja hipoksičnog stimulusa, greške u složenoj kaskadi prenošenja informacije, transkripciji gena ili pak sekreciji gotovog proteina.

Povišene vrijednosti VEGF-a i bFGF-a ukazuju da je u ove skupine bolesnika aktiviran proces neoangiogeneze kao važan način adaptacije tkiva i organizma na hipoksiju. Nađene povezanosti upućuju da je i u ovom sustavu hipoksija snažan induktor VEGF produkcije, ali da u ekspresiji ovog faktora vjerojatnu ulogu imaju akutna i kronična upala. Pretpostavljenu citokinsku ulogu u inhibiciji sineteze EPO nismo uspjeli jasno dokazati u ovom radu. Među ispitivanim citokinima jedino je IL-6 bio značajno povišenih vrijednosti. Iako nismo potvrdili njegov direktni utjecaj na ekspresiju EPO, značajna negativna korelacija IL-6 s razinom hemoglobina i hematokrita upućuje na njegovu važnu ulogu u eritropoetskom sustavu ove skupine bolesnika.

Korekcija hipoksemije, dovodi do očekivanog pada vrijednosti parametara eritropoeze te se u tom pogledu nalazi u kliničkom modelu ponašaju analogno očekivanjima izvedenim iz studiranja fizioloških modela. Jednako tako, u većine bolesnika događa se i očekivani pad razine EPO. Međutim, neočekivano je zabilježen porast EPO u značanom broju bolesnika što govori u prilog reverzibilne inicijalne inhibicije. Za razliku od EPO, ispitivani angiogeni faktori rasta i citokini ne mijenjaju se značajno tijekom prvih 24 sata nakon korekcije hipoksemije. U ekspresiji angiogenih faktora, a posebno citokina važnu ulogu ima upala, koju nije moguće tako brzo korigirati uobičajenim terapijskim mjerama.

Među istraživanim parametrima u složenom kliničkom modelu ustanovljene su zanimljive multiple povezanosti i interakcije što se pokušalo iskoristiti i za predikciju potrebe za dugotrajnim liječenjem kisikom. Nađena je značajna povezanost samo sa stupnjem globalne respiracijske insuficijencije i policitemije, ali snaga predikcije ovih parametara nije velika i klinički dovoljno relevantna.

7. SAŽETAK

Aktivacija eritropoeze i angiogeneze hipoksijom predstavljaju važne homeostatske mehanizme koji balansiraju metaboličke potrebe organizma i dopremu kisika organima putem krvnih žila. Regulacija ovih fizioloških mehanizama u KOPB-u vezanom uz hipoksiju nije jasna. U istraživanje je konsekutivno uključeno 57 tipičnih bolesnika s KOPB-om i teškom hipoksemijom. EPO, VEGF-a, bFGF-a, IL-1β, IL-6, TNF-α određivani su u predhodno određenim vremenskim intervalima. Inicijalno je EPO bio povišen samo u 15,5% ispitanika. Srednja vrijednost ove varijable iznosila je 41,42±83,54 U/L. VEGF i b-FGF bili su povišeni. Srednja vrijednost za VEGF iznosila je 1042,00±1097 pg/ml, a za b-FGF 6,04±2,45 pg/ml. Od ispitivanih je citokina IL-6 bio povišenih vrijednosti i njegova srednja vrijednost je bila 45,67±86,5 pg/ml. EPO značajno negativno korelira s PaO_2 (p=0,0043). VEGF značajno pozitivno korelira s L (p=0,0415), SE (p=0,037) i negativno s PaO_2 (p=0,0111) i Sat (p=0,0153). Nakon korekcije hipoksemije, EPO značajno pada već drugog dana liječenja i njegova srednja vrijednost iznosi 14,1±16,9 U/L (p=0,0093). Prepoznate su dvije grupe pacijenat s različitim odgovorom na korekciju hipoksemije: grupa A koju je činilo 63,2% pacijenata i u koje je zamijećen očekivani pad EPO i grupa B koju je činilo 36,8% pacijenata u koje je zamijećen neočekivani porast EPO nakon korekcije hipoksemije. VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6 i TNF-α ne mijenjaju se značajno 24 sata po korekciji hipoksemije.

U zaključku, nizak nalaz EPO u većine ispitanika upućuje da je neadekvatan eritropoetski odgovor na hipoksiju u KOPB bolesnika predominantno inhibirana na razini produkcije EPO, a ne na kasnijim stupnjevima eritropoeze. Neočekivano je zabilježen porast EPO, nakon korekcije hipoksemije, u značanom broju bolesnika što govori u prilog reverzibilne inicijalne inhibicije. Nije nađena povezanost ove inhibicije s analiziranim faktorima rasta i citokinima. Povišene vrijednosti VEGF-a i bFGF-a ukazuju da je u ove skupine bolesnika aktiviran proces neoangiogeneze kao važan način adaptacije tkiva i organizma na hipoksiju. Nađene povezanosti upućuju da je i u ovom sustavu hipoksija snažan induktor VEGF produkcije, ali da u ekspresiji ovog faktora vjerojatnu ulogu ima akutna i kronična upala.

8. ABSTRACT

TITLE: Serum level of erythropoietin, angiogenic factors and cytokines before and after the severe hypoxaemia correction in chronic obstructive pulmonary disease patients

AUTHOR: Gordana Pavliša (2006.)

Activation of erythropoesis and angiogenesis by hypoxia represent important homeostatic mechanisms which balance between methabolic requirements of the organism and the oxygen delivery to organs through blood vessels. The regulation of these physiologic mechanisms in hypoxia-related COPD is not clear. Fifty-seven consecutive patients with COPD in acute exacerbation of chronic respiratory failure entered the study. EPO, VEGF, bFGF, IL-1β, IL-6, TNF-α were serially taken. Initial EPO value was above the reference range in only 15,5%. The mean of this variable was 41,42±83,54 U/L. VEGF and b-FGF were elevated. The mean VEGF and b-FGF were 1042,00±1097 and 6,04±2,45 pg/ml consecutively. Among the investigated cytokines IL-6 values were elevated with a mean of 45,67±86,5 pg/ml. EPO correlated significantly negative to PaO_2 (p=0,0043). VEGF correlated significantly positive to L (p=0,0415), SE (p=0,037) and negative to PaO_2 (p=0,0111) and Sat (p=0,0153). After the hypoxemia correction, EPO was significantly reduced already on the 2^{nd} day of treatment to a value of 14,1±16,9 U/L (p=0,0093). EPO did not show a unique pattern in all the patients. In 63,2% of patients, a fall in EPO levels was observed, but in 36,8% EPO rose within the first 24 hours of follow-up. VEGF, bFGF, IL-1β, IL6 and TNF-α were not significantly changed 24 hours after the correction of hypoxemia. In conclusion, low values of EPO in the majority of patients indicate that inadequate erythropoietic reaction to hypoxia in COPD patients is predominantly hampered at the level of EPO production, instead at subsequent stages of erythropoesis. The rise of EPO in a significant number of patients, after hypoxemia correction stands in favour of reversible initial inhibition. Elevated values of VEGF and bFGF indicate that the process of angiogenesis is activated in this group of patients as an important way of tissue and organism adaptation to hypoxia. The relations we found indicate that hypoxia is a strong inductor of VEGF production in this system, but that acute and chronic inflammation also has a probable role in the expression of this factor.

9. LITERATURA

1. Pavičić F, Tudorić N. Kronična opstruktivna plućna bolest. U: Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, urednici. Interna medicina. 2. izdanje. Zagreb: Naprijed; 2003. p.707-714.
2. Global Iniative for Chronic Obstructive Lung Disease. World Health Organisation, National Institute of Health, br 2701, Apr, 2001 (2004 obnovljeno).
3. National Center for Health Statistics. Current estimates from the National Health Interview Survey, United States,1995. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Vital and Health Statistics; 1995. Publication No 96-1527.
4. Soriano JR, Maier WC, Egger P, Visick G, Thakrar B, Sykes J. Recent trends in physician diagnosed COPD in women and men in the UK. Thorax 2000; 55: 789-794.
5. National Heart, Lung, and Blood Institute. Morbidity and mortality: chartbook on cardiovascular, lung, and blood diseases. Bethesda MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1998. Dostupno sa: www. Nhlbi.nih.gov/nhlbi/seiin/other/cht-boook/htm.
6. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzo H, Cosio MG. Alveolar inflamation and its relation to emphysema in smokers. Am J Resp Crit Care Med 1995; 152: 1666-1672.
7. Pavičić F, Samaržija M. Respiracijska insuficijencija. U: Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, urednici. Interna medicina. 2. izdanje. Zagreb: Naprijed; 2003. p.772-775.
8. Barbera JA, Roca J, Ferrer A, Felez MA, Diaz O, Roger N, Rodriguez-Roisin R. Mechanisms of worsening gas exchange during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 1997; 10: 1285-1291.
9. Vrbanić V. Liječenje kisikom. U: Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, urednici. Interna medicina. 2. izdanje. Zagreb: Naprijed; 2003. p.397-400.
10. Nocturnal oxygen therapy trial group (NOTT). Continuous or nocturnal oxygen therapiy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. Ann Intern Med 1980; 93: 391-398.
11. Weitzenblum E, Sautegeau A, Ehrhart M, Mammosser M, Pelletier A. Long-term oxygen therapy can reverse the progression of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 493.

12. Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, Persico G. Role of soluble mediators in angiogenesis.Eur J Cancer 1996; 32A: 2401-2412.
13. Jelkmann W, Metzen, E. Erythropoietin in the control of red cell production. Anat Anz 1996; 178: 391-403.
14. Silva M, Grillot D, Benit A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. Blood 1996; 88: 1576-1582.
15. Nagata Y, Kiefer F, Watenabe T, Todokoro K. Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin. Blood 1999; 93: 3347-3354.
16. Weiss G, Houston T, Kastner S, Johrer K, Grunewald K, Brock JH. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. Blood 1997; 89: 680-67.
17. Krantz SB. Erythropoietin. Blood 1991; 77: 419-434.
18. Vainchenker W, Constantinescu SN. Unique Activating Mutation in JAK2 (V617F) Is at the Origin of Polycythemia Vera and Allows a New Classification of Myeloproliferative Diseases. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2005;195-200.
19. Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. Clin Immunol Immunopathol 1992; 62: S60-S65.
20. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of kidney in erythropoesis. Nature 1957; 313: 806-810.
21. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12969-1273.
22. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1995; 270: 1230-1237.
23. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarkis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5680-5684.
24. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O_2 tension. Am J Physiol 1996; 271: C1172-C1180.

25. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M. Intracellular localisation of human HIF-1alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci 2003; 116: 1319-1326.
26. Wang GL, Jiang BH. Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer reguleted by cellular O2 tension. Proc Natl Acad SCI USA 1995; 92: 5510-5514.
27. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarly upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. J Biol Chem 1996; 271: 32253-32259.
28. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia – inducible factor-1. Biol Chem 1997; 378: 609-616.
29. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulatin of DNA binding activity by hypoxia. J Biol Chem 1993; 268: 21513-21518.
30. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes Dev 2001; 15: 2675-2686.
31. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nature Medicine 2003; 9: 677-684.
32. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev 1996; 76: 839-885.
33. Adamson JW, Longo DL. Anemia and Polycythemia. Harrison's Online [serial on line] 2003 Feb [cited 2006 Feb 2]; 10 (61): [20 screns]: Available from URL: http://harrisons.accessmedicine.com/
34. Weil JV, Jameson J, Brown DW, Grover RF. The red cell mass-arterial oxygen relationship in normal man: application to patients with chronic obstructive airways disease. J Clin Invest 1968; 47:1627-1639.
35. Erslev AJ. Drug therapy: erythropoietin. N Engl J Med 1991; 324:1339-1344.
36. Reynafarje C, Ramos J, Faura J, Villavicencio D. Humoral control of erythropoetic activity during and after altitude expousure. Proc Soc E Biol Med 1963; 116: 649-650.
37. Faura J, Ramos J, Reynafarje C, English E, Finne P, Finch CA. Effects of altitude on erythropoiesis. Blood 1969; 33: 668-676.

38. Eckard U, Bountellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Baner C. Role of erythropoietin formations in response to acute hypobaric hypoxia. J Appl Physiol 1989; 66: 1785-1788.
39. Tassiopoulos S, Kontos A, Konstantopoulos K, Hadzistavrou C, Vaiopoulos G, Aessopos A, Tassiopoulos T. Erythropoietic response to hypoxaemia in diffuse idiopathic pulmonary fibrosis, as opposed to chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med 2001; 95: 471-475.
40. Vanier T, Dulfano MJ, Wu C. Emphysema, hypoxia and the polycathaemia response. N Eng J Med 1963; 269: 169-178.
41. Tsantes AE, Papadhimitriou SI, Tassiopoulos ST, Bonovas S, Paterakis G, Meletis I, Loukopoulos D. Red cell macrocytosis in hypoxemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med 2004 ;98:1117-1123.
42. Nocturnal oxygen therapy trial group (NOTT). Continuous or nocturnal oxygen therapiy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. Ann Intern Med 1980; 93: 391-398.
43. Calverley PM, Leggett RJ, McElderry L, Flenley DC. Cigarette smoking and secondary polycythemia in hypoxic cor pulmonale. Am Rev Respir Dis 1982 ;125: 507-510.
44. Tsantes AE, Tassiopoulos ST, Papadhimitriou SI, Bonovas S, Poulakis N, Vlachou A, Filioussi K, Loukopoulos D. Theophylline treatment may adversely affect the anoxia-induced erythropoietic response without suppressing erythropoietin production. Eur J Clin Pharmacol 2003; 59: 379-383.
45. Pavliša G. Razina serumskog eritropoetina u akutnom pogoršanju kronične respiracijske insuficijencije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; Zagreb 2003.
46. Livingstine JL, Lewis JG, Reid L, Jefferson KE. Diffuse interstitial pulmonary fibrosis. Quart J Med 1964; 33: 71-103.
47. Crystal RG. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. Ann Intern Med 1976; 85: 769-788
48. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitinal lung diseases of unknown cause. Disorders characterised by chronic inflamation of the lower respiratory tract. N Engl J Med 1984; 310: 154-166.

49. Fielding J, Zorab PA. Polycythaemia and iron deficiency in pulmonary 'emphysema'. Lancet 1964; ii: 284-286.
50. Ratto O, Briscoe WA, Morton JW, Comroe JH. Anoxemia secondary to polycythemia and polycythaemia secondary to anoxemia. Am J Med 1955; 19: 958-965.
51. Filley GF, Beckwitt HJ, Reeves JT, Mitchell RS. Chronic obstructive bronchopulmonary disease II. Oxygen transport in two clinical types. Am J Med 1968; 44: 26-38.
52. Guidet B, Offenstadt G, Boffa G, Najman A, Baillou C, Hatzfeld C, Amstutz P. Polycythemia in chronic obstructive pulmonary disease. A study of serum and urine erythropoietin and medullary erythroid progenitors. Chest 1987 ;92 :867-870.
53. Wedzicha JA, Cotes PM, Empey DW, Newland AC, Royston JP, Tam RC. Serum immunoreactive erythropoietin in hypoxic lung disease with and without polycythemia. Clin Sci 1985; 69: 413-422.
54. Graudal N, Galloe AM, Nielsen OJ. Erythropoietin in chronic obstructive pulmonary disease. Relationship between serum erythropoietin, blood hemoglobin and lung function-effect of the calcium antagonist isradipine on serum erythropoietin. Respiration 1991; 58: 141-144.
55. Ström K, Odeberg H, Anderson AC, Boe J, Singer J, Svensson G. S-erythropoietin levels decrease in patents with chronic hypoxia starting domiciliary oxygen therapy. Eur Resp J 1991; 4: 820-823.
56. Balter MS, Daniak N, Chapman K, Sorba SA, Rebuck AS. Erythropoietin response to acute hypoxemia in patients with chronic pulmonary disease. Chest 1992; 102: 482-5.
57. Casale R, Pasqualetti P. Diurnal rhythm of serum erythropoietin circulating levels in chronic obstructive pulmonary disease. Panminerva Med 1997; 39: 183-185.
58. Janeway CA, Travers P. Functional analysis of VEGF-B. U: Janeway CA, Travers P. Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology 5. izdanje. New York and London: Garland Publishing; 2001. [citirano 2006 Feb 2]: Dostupno sa: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/
59. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995;146: 1029-1039.

60. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 7192-7197.
61. 80 Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem 1992; 267: 26031-26037.
62. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 1992; 255: 989-991.
63. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 1995; 376: 62-66.
64. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. J Biol Chem 2001; 276: 26969-26979.
65. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F, Vacca A, Dammacco F, Ribatti D. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. Leukemia 2003;17: 1961-1966.
66. Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, Fusenig NE, Mueller MM. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. Lab Invest 1999; 79: 1573-1582.
67. Koch AE, Harlow LA, Haines GK. Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. J Immunol 1994; 152: 4149-4156.
68. Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. Diabetes Metab Rev 1997; 13: 37-50.
69. Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, Prove A, Benoy I, De Pooter C, Martin M, Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. Br J Cancer 1997; 76: 238-243.

70. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997; 90: 3167.
71. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. Histol Histopathol 2004; 19: 37-42.
72. Sack U, Hoffmann M, Zhao XJ, Chan KS, Hui DS, Gosse H, Engelmann L, Schauer J, Emmrich F, Hoheisel G. Vascular endothelial growth factor in pleural effusions of different origin. Eur Respir J 2005; 25 :600-604.
73. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 2004; 9 Suppl 1:2-10.
74. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Detsch R, Jamieson SW, Thistlewaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. NEJM 2000; 342: 626-633.
75. Tomanek RJ, Zheng W, Yue X. Growth factor activation in myocardial vascularization: therapeutic implications. Mol Cell Biochem 2004; 264: 3-11.
76. Shih SC, Claffey KP. Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. Int J Exp Pathol 1998; 79: 347-357.
77. Imagawa S, Yamaguchi Y, Higuchi M, Neichi T, Hasegawa Y, Mukai HY, Suzuki N, Yamamoto M, Nagasawa T. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Blood 2001; 98:1255-1257.
78. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. Am J Resp Crit Care Med 2002; 165: 67-70.
79. Kasahara, Y, Tuder, RM, Taraseviciene-Stewart, L, et al. Inhibition of VEGF receptors cause lung cell apoptosis and emphysema. J Clin Invest 2000; 106:1311-1319.
80. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. Am J Respir Crit Care Med 2001;163: 737-744.

81. Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Med 2003;114: 354-358.
82. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. Prog Growth Factor Res 1989; 1: 207-235.
83. Klagsbrun M, Smith S, Sullivan R, Shing Y, Davidson S, Smith J, Sasse J. Multiple forms of basic fibroblast growth factor: differential amino-terminal cleavages by tumor cell and brain-derived acid proteinases. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 1839-1843.
84. Burgess W H, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Annu Rev Biochem 1989; 58: 575-606.
85. Baid A, Bohlen P. Fibroblast growth factors. U: Sporn MB, Roberts AB urednici. Peptide growth factors and their receptors. New York: Springer-Verlag; 1990. p 369.
86. Quarto N, Finger FP, Rifkin DB."The NH2-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal". Journal of cellular physiology 1991; 147: 311.
87. Bugler B, Amalric F, Prats H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. Mol Cell Biol 1991; 11: 573–577.
88. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrilid KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC. Nucleotide sequence of bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. Science 1986; 2333: 545-548.
89. Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic and acid fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. J Biol Chem 1986; 261: 5631-5637.
90. Feige JJ, Baird A. Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor. J Biol Chem 1988; 263: 14023-9.
91. Tsuda T, Kaibuchi K, Kawahara Y, Fukuzaki H, Takai Y. Induction of protein kinase C activation and Ca2+ mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. FEBS Lett 1985; 191: 205-210.
92. Connolly DT, Stoddard BL, Harakas NK, Feder J. Human fibroblast-derived growth factor is a mitogen and chrmottractant for endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1987; 144: 705-712.

93. Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, Yamamoto M, Itoh H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. J Vasc Surg 2005; 41: 82-90.

94. Detillieux KA, Cattini PA, Kardami E. Beyond angiogenesis: the cardioprotective potential of fibroblast growth factor-2. Can J Physiol Pharmacol 2004; 82: 1044-1052.

95. Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. Histopathology 2005; 46: 31-36.

96. Panutsopulos D, Zafiropoulos A, Krambovitis E, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Spandidos DA. Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. J Transl Med 2003; 1: 6.

97. Porta C, Imarisio I, De Amici M, Bonomi L, Paglino C, Biscaldi E, Zimatore M, Sartore-Bianchi A, Danova M, Moratti R, Riccardi A. Pro-neoangiogenic cytokines (VEGF and bFGF) and anemia in solid tumor patients. Oncol Rep 2005; 13: 689-695.

98. Kashiwakura I, Takahashi T. Fibroblast growth factor and ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. Leuk Lymphoma 2005; 46: 329-333.

99. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 2000; 96: 2240-2245.

100. Wang L, Xiong M, Che D, Liu S, Hao C, Zheng X. The effect of hypoxia on expression of basic fibroblast growth factor in pulmonary vascular pericytes. J Tongji Med Univ 2000; 20: 265-267.

101. Janeway CA, Travers P. Walport M, Shlomchik MJ. An introduction to immunobiology and innate immunity. U: Janeway CA, Travers P. Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology 5. izdanje. New York and London: Garland Publishing; 2001. [citirano 2006 Feb 2]: Dostupno sa: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/

102. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1.Eur Cytokine Netw 1994; 5: 517-531.

103. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay J R, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J,

Ding G J-F, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin T-T, Lee TD, Shively JE, MacCross M, Mumford RA, Schmidt J A, Tocci M J. A novel heterodimeric cysteine protease is requiredfor interleukin-1-beta processing in monocytes. Nature 1992; 356: 768-774.

104. Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM, Miller DK. IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. J Immunol 1997; 159: 5964-5972.

105. Sporri B, Bickel M, Limat A, Waelti ER, Hunziker T, Wiesmann UN. Juxtacrine stimulation of cytokine production in cocultures of human dermal fibroblasts and T cells. Cytokine 1996; 8: 631-635.

106. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. J Immunol 1990;144: 3034-3038.

107. Kupper TS, Groves RW. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. J Invest Dermatol 1995; 105: 62S-66S.

108. Rollins BJ. Chemokines. Blood 1997; 90: 909-928.

109. Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. J Immunol 1995; 155: 4347-4354.

110. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. Adv Immunol 1996; 62: 61-130.

111. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1996; 271: 14657-14660.

112. Ling ZC, Efendic S, Wibom R, Abdel-Halim SM, Ostenson CG, Landau BR, Khan A. Glucose metabolism in Goto-Kakizaki rat islets. Endocrinology 1998; 139: 2670-5.

113. Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of

interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). J Biol Chem 1997; 272: 7727-7731.

114. Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. Clin Immunol Immunopathol 1994; 72: 9-14.

115. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 8957-8961.

116. Van Snick J, Cayphas S, Szikora JP, Renauld JC, Van Roost E, Boon T, Simpson RJ. cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. Eur J Immunol 1988; 18: 193-197.

117. Kikutani H, Taga T, Akira S, Kishi H, Miki Y, Saiki O, Yamamura Y, Kishimoto T. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. J Immunol 1985; 134: 990-995.

118. Tosato G, Pike SE. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocytes. J Immunol 1988; 141: 1556-1562.

119. Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC, Ogawa M. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. Blood 1988; 71: 1759-1763.

120. Van Damme J, Van Beeumen J, Decock B, Van Snick J, De Ley M, Billiau A. Separation and comparison of two monokines with lymphocyte-activating factor activity: IL-1 beta and hybridoma growth factor (HGF). Identification of leukocyte-derived HGF as IL-6. J Immunol 1988; 140: 1534-1541.

121. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, Jones KD, Pike SE. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6).Science 1988; 39: 502-504.

122. Shabo Y, Lotem J, Rubinstein M, Revel M, Clark SC, Wolf SF, Kamen R, Sachs L. The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. Blood 1988; 72: 2070-2073.

123. Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. Neurosci Lett 1989; 104: 340-344.

124. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6367-6371.

125. Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993; 104: 1285-1292.

126. Watson JM, Berek JS, Martinez-Maza O. Growth inhibition of ovarian cancer cells induced by antisense IL-6 oligonucleotides. Gynecol Oncol 1993; 49: 8-15.

127. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors-a matter of life and death. Br J Pharmacol 2002; 135: 855-875.

128. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988; 53: 45-53.

129. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 1998; 281: 1680-1683.

130. Taniguchi T, Takata M, Ikeda A, Momotani E, Sekikawa K. Failure of germinal center formation and impairment of response to endotoxin in tumor necrosis factor alpha-deficient mice. Lab Invest 1997; 77: 647-658.

131. Dybedal I, Bryder D, Fossum A, Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. Blood 2001; 98: 1782-1791.

132. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature 1987; 330: 662-664.

133. Finck BN, Johnson RW. Tumor necrosis factor-alpha regulates secretion of the adipocyte-derived cytokine, leptin. Microsc Res Tech 2000; 50: 209-215.

134. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma.Immunol Cell Biol 2001; 79: 132-140.
135. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. Cell 2001; 104: 517-529.
136. D'Haens G. Anti-TNF therapy for Crohn's disease. Curr Pharm Des 2003; 9: 289-94.
137. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu Rev Immunol 2001; 19: 163-196.
138. Pedersen BK, Kappel M, Klokker M, Nielsen HB, Secher HN. The imune system during exposure to extreme physiologic conditions. Int J Sports Med 1994; 15: S116-S121.
139. Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, Hynes KL, Schumacker PT, Gewertz BL. Endotelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. Am J Physiol 1999; 277: 1057-1065.
140. Matsui H, Ihara Y, Fujio Y, Kunisada K, Akira S, Kishimoto T, Yamauchi-Takihara K. Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. Cardiovasc Res 1999; 42:104-112.
141. Tamm M, Bihl M, Eickelberg O, Stulz P, Perruchoud AP, Roth M. Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platet –activating factor and platet-derived growth factor in primary human lung cells. Am J Resp Cell Mol Biol 1998; 19: 653-661.
142. Naldini A, Carraro F, Silvestri S, Bocci V. Hypoxia affects cytokine production and proliferative response by human peripheral mononuclear cells. J Cell Physiol 1997; 173: 335-342.
143. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 1313-1316.
144. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, Adachi M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decresed by nasal continuous positive airway pressure. Circulation 2003; 107: 1129-1134.
145. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW. Effect of hypoxia on relese of IL-1 and TNF by human alveolar macrophages. Am J Resp Cell Mol Biol 1996; 14: 170-176.

146. Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE; White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. Cytokine 1991; 3: 189-194.

147. Schannell G, Waxman K, Kaml JG, Ioli G, Gatanaga T, Yamamoto R, Granger GA. Hypoxia induces a human macrophage cell line to relese tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. J Surg Res 1993; 54: 281-285.

148. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1179-1184.

149. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a metaanalysis. Thorax 2004; 59: 574-580.

150. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 336-363.

151. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, MacCallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 2001; 164:1618-23.

152. Wedzicha JA. Exacerbations. Etiology and pathophysiologic mechanisms. Chest 2002; 121: 136S-141S.

153. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl 2001; 34: 50S-59S.

154. Wedzicha JA, Seemungal TAR, MacCallum PK, Paul EA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Meade TW. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6. Thromb Haemost 2000; 84: 210-215.

155. Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. Thorax 2000; 55: 114-120

156. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL-6 in acute phase response and viral infection. Immunol Rev 1992; 127: 25-50. Ayvazian FL, Richardson DE, Silber R. Erythrokinetic studies during antimicrobial therapy in pulmonary emphysema. Amer Rev Resp Dis 1969; 100: 303-305.
157. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 1999; 160: S29-S32.
158. Subauste MC, Jacoby DB, Richards SM, Proud D. Infections of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. J Clin Invest 1995; 96: 549-457.
159. Argiles JM, Lopez-Sriano J, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Journey from cachexia to obesity by TNF. FASEB 1997; 11: 743-751.
160. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 1994; 150: 1453-1455.
161. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for the relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1996; 51: 819-824.
162. Huang SL, Su CH; Chang SC. Tumor necrosis factor-α gene polymorphism in chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1436-1439.
163. Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. Tumor necrosis factor- gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2000; 15: 281-284.
164. Joos L, McIntyre L, Ruan J, et al. Association of IL-1β and IL-1 receptors antagonist haplotypes with the rate of decline in lung function in smokers. Thorax 2001; 56: 863-866.
165. Stockenhuber F, Keil M, Wurnig C, Kurz RW, Gottsauner-Wolf M, Blacke P. Impaired erythropoietin responsiveness in anemic rheuma arthritis patients: potential relation to immune mechanisms. Clin Sci 1994; 86: 633-638.
166. Davis D, Charles PJ, Potter A, Feldmann M, Maini RN, Elliott MJ. Anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor alpha blockade. Br J Rheumatol 1997; 36: 950-956.

167. Braczkowski R, Romanawsky W, Danikiewicz A, Muc-Wierzgon M, Blazelonis A, Zubelewicz B. Decrease of erythropoietin level by human recombinant tumour necrosis factor alpha (hrec TNFalpha) in patients with advanced cancer. J Biol Regul Homeost Agents 2001; 15: 366-369.

168. Blick M, Sherwin S, Rosenblum M, Gutterman J. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. Cancer Res 1987; 47: 2986-2989.

169. Means RT, Jr. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. Stem Cells 1995; 1: 32-37.

170. Dainiak N, Kulkarni V, Howard D, Kalmanti M, Dewey MC, Hoffman R. Mechanism of abnormal erythropoiesis in malignancy. Cancer 1983; 51: 1101-1106.

171. Moldawer LL, Marano MA, Wei H, Fong Y, Silen ML, Kuo G, Manogue KR, Vlassara H, Cohen H, Cerami A, Lowroy SF. Cachectin/tumor necrosis factopr-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. FASEB J 1989; 3: 1637-1643.

172. Johnson CS, Cook CA, Furmanski P. In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): reversal with exogenous erythropoietin (EPO). Exp Hematol 1990; 18: 109-113.

173. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. J Interferon Cytokine Res 1998; 18: 555-559.

174. Zhou J, Fandrey J, Schumann J, Tiegs G, Brune B. NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284: C439-C446.

175. Sandau KB, Zhou J, Kietzmann T, Brune B. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. J Biol Chem 2001; 276: 39805-39811.

176. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. Blood 1999; 94: 1561-1567.

177. Boyd HK, Lappin TR. Erythropoietin deficiency in the anaemia of chronic disorders. Eur J Haematol 1991; 46: 198-201.

178. Capalbo S, Battista C, Delia M, Ciancio A, De Santis G, Dargenio M, Diomede D, Liso V. Evaluation of tumor necrosis factor-alpha and erythropoietin serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with anemia. Acta Haematol 2002;108 :84-89.
179. Ebrahim O, Folb PI, Robson SC, Jacobs P. Blunted erythropoietin response to anaemia in tuberculosis. Eur J Haematol 1995; 55: 251-254.
180. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. Blood 1992; 79: 1987-1994.
181. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. FASEB J 2002; 16: 1811-1813.
182. Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2004; 242: 409-413.
183. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. J Biol Chem 1996; 271: 28220-28228.
184. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. FASEB J 2003; 17: 2115-21157.
185. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patents with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152 Suppl: 77-121.
186. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 1996; 271: 736-741.
187. Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, Kuo ML. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. J Invest Dermatol 2004; 123: 1169-1175.
188. Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2004; 242: 409-413.

189. Flegar-Meštrić Z, Jagarinec N. Refrentne vrijednosti biokemijskih i hematoloških sastojaka krvi u školske djece i adolescenata grada Zagreba. U: Juretić D, Labar B, Stavljenić-Rukavina A, urednici. Zagreb: Medicinska naklada; 1997. p. 184-8.
190. Sangui BioTech, Erythropoietin Enzim-linked immunosorbent test; Catalog SDX021.
191. R&D Systems, human VEGF; Catalog DVE00, human FGF basic; catalog DFB50, human IL-1β; catalog DLB50, human IL-6; catalog D6050, human TNF-α; catalog DTA00C. Dostupno sa: www. Rndsystems.com/product-results.
192. Ivanković D i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Zagreb: Biblioteka udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta u Zagrebu, 1988
193. Statistica 6 – Electronic Textbook StatSoft. 2006 [citirano Feb 2]; [36 screens]: Dostupno sa: www.statsoftinc.com/
194. Lane DJ, Howell JB, Giblin B. Relation between airways obstruction and CO_2 tension in chronic obstructive airways disease. BMJ 1968; 3: 707-709.
195. Fitzpatrick MF, Mackay T, Whyte KF, Allen M, Tam RC, Dore CJ, et al. Nocturnal desaturation and serum erythropoietin: a study in patients with chronic obstructive pulmonary disease and in normal subjects. Clin Sci (Lond) 1993; 84: 319-324.
196. Ayvazian FL, Richardson DE, Silber R. Erythrokinetic studies during antimicrobial therapy in pulmonary emphysema. Amer Rev Resp Dis 1969; 100: 303-305.
197. Miller ME, Garcia JF, Cohen RA, Cronkite EP, Moccia Gacevedo J. Durnal levels of immunoreactive erythropoietin in normal subjects and subjects with chronic lung disease. Br J Haematol 1981; 49:180-200.
198. Wognum AW, Lansdrop PM, Eaves AC, Krystal G. An enzyme linked immunosorbent assay for erythropoietin using monoclonal antibodies, tetrameric immune complexes and substrate amplification. Blood 1989; 74: 622-628.
199. Freudenthaler SM, Schenck T, Lucht I, Gleiter CH. Fenoterol stimulates human erythropoietin production via activation of the renin angiotensin system. Br J Clin Pharmacol 1999; 48: 631-634.
200. Berglund B, Sundgot-Borgen J, Wide L. Effect of salbutamol, a beta-2-adrenergic agonist, on erythropoietin concentration in healthy males. Scand J Med Sci Sports 2002; 12: 31-33.

201. Lim GB, Dodic M, Earnest L, Jeyaseelan K, Wintour EM. Regulation of erythropoietin gene expression in fetal sheep by glucocorticoids. Endocrinology 1996; 137:1658-1663.
202. Leng HM, Kidson SH, Keraan MM, Randall GW, Folb PI. Cytokine-mediated inhibition of erythropoietin synthesis by dexamethasone. J Pharm Pharmacol 1996; 48: 971-974.
203. Amylon M, Perrine SP, Glader BE. Prednisone stimulation of erythropoiesis in leukemic children during remission. Am J Hematol 1986; 23: 179-81.
204. Huang YH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on serum levels of erythropoietin in patients on peritoneal dialysis. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2002; 22, 74-75.
205. Chatterjee B, Nydegger UE, Mohacsi P. Serum erythropoietin in heart failure patients treated with ACE-inhibitors or AT(1) antagonists. Eur J Heart Fail 2000; 2: 393-398.
206. Larsson A, Sköldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. Angiogenesis 2002; 5: 107-110.
207. Upadhyay D, Corbridge TC, Buccellato L, McClintock D, Jain M. Elevated levels of VEGF in acute exacerbation of COPD are reduced after treatment. Chest 2004; 125: 1700-1705.
208. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. Am J Physiol 1995; 268: C1362-C13628.
209. Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. Am J Physiol 1999; 276: H679-H685.
210. Hochberg I, Hoffman A, Levy AP. Regulation of VEGF in diabetic patients with critical limb ischemia. Ann Vasc Surg 2001;15 : 388-392.
211. Hayashi T, K. Abe, H. Suzuki, Y. Itoyama. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression Aater transient mddle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 1997; 28: 2039-2044.
212. Yin R, Feng J, Yao Z. Dynamic changes of serum vascular endothelial growth factor levels in a rat myocardial infarction model. Chin Med Sci J 2000; 15: 154-156.

213. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2004; 3: 35-42.

214. Matsuyama W, Hashiguhi T, Matsumoro K. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. Am Resp Crit Care Med 2000; 162: 1120-1122.

215. Pickkers P, Sprong T, Eijk LV, Hoeven HV, Smits P, Deuren MV. Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. Shock 2005; 24: 508-512.

216. Van der Flier M, van Leeuwen HJ, van Kessel KP, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. Shock 2005; 23: 35-38.

217. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P, Roguin A, Levy AP. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF; significance for the development of the coronary artery collateral circulation. Circulation 1999; 1000: 547-552.

218. Berger AP, Kofler K, Bektic J, Rogatsch H, Steiner H, Bartsch G, Klocker H. Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. Prostate 2003; 57: 57-65.

219. Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. J Appl Physiol 2001; 91: 1176-1184.

220. Ganat Y, Soni S, Chacon M, Schwartz ML, Vaccarino FM. Chronic hypoxia up-regulates fibroblast growth factor ligands in the perinatal brain and induces fibroblast growth factor-responsive radial glial cells in the sub-ependymal zone. Neuroscience 2002; 112: 977-991.

221. Stompor T, Zdzienicka A, Motyka M, Dembinska-Kiec A, Davies SJ, Sulowicz W. Selected growth factors in peritoneal dialysis: their relationship to markers of inflammation, dialysis adequacy, residual renal function, and peritoneal membrane transport. Perit Dial Int 2002; 22: 670-676.

222. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A.Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. J Exp Med 1991; 173: 569-574.

223. Qu Z, Huang X, Ahmadi P, Stenberg P, Liebler JM, Le AC, Planck SR, Rosenbaum JT. Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. Int Arch Allergy Immunol 1998; 115: 47-54.

224. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. Am J Pathol 1995; 147: 564-573.

225. Rupp J, Kothe H, Mueller A, Maass M, Dalhoff K. Imbalanced secretion of IL-1beta and IL-1RA in Chlamydia pneumoniae-infected mononuclear cells from COPD patients. Eur Respir J 2003; 22: 274-279.

226. Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. Chest 2002; 121: 127S-130S.

227. Yasuda N, Gotoh K, Minatoguchi S, Asano K, Nishigaki K, Nomura M, Ohno A, Watanabe M, Sano H, Kumada H, Sawa T, Fujiwara H. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. Respir Med 1998; 92: 993-999.

228. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL, Shale DJ. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2001;164: 1414-1418.

229. Pitsou G, Kyriazis G, Hatzizisi O, Argyropoulou P, Mavrofridis E, Patakas D. Tumor necrosis factor-alpha serum levels, weight loss and tissue oxygenation in chronic obstructive pulmonary disease. Resp Med 2002; 96: 594-598.

230. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 633-637.

231. Koehne P, Willam C, Strauss E, Schindler R, Eckhardt KU, Buhrer C. Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platets. Am J Physiol 2002; 279: H817-H824.

232. El Awad B, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Burgel T, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. Kidney Int 2000; 58 :43-50.

233. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999; 13: 9-22.
234. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, Fava RA. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. Clin Exp Immunol 1999; 115: 176-182.
235. Faffe DS, Flynt L, Mellema M, Whitehead TR, Bourgeois K, Panettieri Jr RA, Silverman ES, Shore SA. Oncostatin M causes VEGF release from human airway smooth muscle: synergy with IL-1{beta}. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 11: 115-117.
236. Eriksson AS, Gretzer C, Wallerstedt S. Elevation of cytokines in peritoneal fluid and blood in patients with liver cirrhosis. Hepatogastroenterology 2004; 51: 505-509.
237. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 1582-1588.
238. Szaflarski J, Burtrum D, Silvestrein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. Stroke 1995; 26: 1093-1100.
239. Hoffman WH, Burek CL, Waller JL, Fisher LE, Khichi M, Mellick LB. Cytokine response to diabetic ketoacidosis and its treatment. Clin Immunol 2003; 108: 175-181.
240. Ferroni P, Basili S, Davi G. Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. Curr Vasc Pharmacol 2003; 1:157-169.
241. Himmelfarb J, Le P, Klenzak J, Freedman S, McMenamin ME, Ikizler TA. Impaired monocyte cytokine production in critically ill patients with acute renal failure. Kidney Int 2004; 66: 2354-2360.
242. Jankord R, Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. Med Sci Sports Exerc 2004; 36: 960-964.
243. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. Respir Med 2003; 97: 1299-1302.
244. Patel IS, Roberts NJ, Lloyd-Owen SJ, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Airway epithelial inflammatory responses and clinical parameters in COPD. Eur Respir J 2003; 22: 94-99.
245. European Society of Pneumology. Recommendations for long term oxygen therapy (LTOT). Eur Resp J 1989; 2: 160-4.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. veljače 1973. u Brežicama, Republika Slovenija.

Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja pohađala sam Zdravstveni Obrazovni Centar u Zagrebu, smjer laboratorijski tehničar. Zahvaljujući odličnom uspjehu tijekom sva četiri razreda srednje škole, oslobođena sam polaganja završnog ispita - mature.

Godine 1991. upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 1997. godine, među prvima u svojoj generaciji.

Pripravnički staž u trajanju od godine dana obavila sam u Domu zdravlja Samobor. Od veljače 1999. do veljače 2002. radila sam kao liječnik - sekundarac u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti, Zagreb. Od veljače 2002. radim kao liječnik – specijalizant interne medicine pri istoj bolnici. Prema programu edukacije propisanom od Ministarstva zdravstva edukaciju provodim u Kliničkoj bolnici Merkur.

Poslijediplomski studij Klinička farmakologija s toksikologijom pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1998. godine, a Znanstveni poslijediplomski studij iz područja medicine i zdravstva pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2001. godine.

Aktivno sam sudjelovala na internističkim i pulmološkim kongresima, stručnim sastancima. Aktivni sam suradnik na znanstvenoistraživačkom projektu 0108107 „Prognostički faktori, dijagnostika i terapija hemoblastoza“, finciranom od MSOZ

2004. obranila sam magistarski rad pod naslovom «Razina serumskog eritropoetina u akutnom pogoršanju kronične respiracijske insuficijencije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća».
Govorim tečno engleski jezik. Udata sam, majka sam jednog djeteta.