

# Bronhoalveolarni pH i biomarkeri upale u bolesnika s idiopatskom plućnom fibrozom te u bolesnika s akutnom egzacerbacijom kronične opstruktivne plućne bolesti

---

**Lozo Vukovac, Emilija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:827951>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Emilija Lozo Vukovac, dr. med.**

**BRONHOALVEOLARNI pH I BIOMARKERI UPALE U BOLESNIKA S  
IDIOPATSKOM PLUĆNOM FIBROZOM TE U BOLESNIKA S  
AKUTNOM EGZACERBACIJOM KRONIČNE OPSTRUKTIVNE  
PLUĆNE BOLESTI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Kornelija Miše, dr. med.**

**Split, 2020.**

**Klinika za plućne bolesti KBC Split**

**Emilija Lozo Vukovac, dr. med.**

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Korneliji Miše na mentorstvu i stručnom vodstvu tijekom znanstvenih istraživanja te nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem joj se i na stvaranju poticajne radne sredine i na prenošenju znanja, iskustava i kontakata iz njene bogate karijere, na temelju čega je ovaj rad prepoznat i u inozemnim znanstvenim krugovima. Zauvijek ću biti zahvalna što je učinila za mene, ponosna i počašćena što sam ovo iskustvo dijelila s njom.

Dodatno se želim zahvaliti kolegama s Klinike za plućne bolesti koji su nesebično pomagali u izradi obje sudije.

Također se zahvaljujem svom bratu Mislavu na bezrezervnoj i entuzijastičnoj pomoći, kao važnom članu našeg tima.

Hvala svim volonterima koji su sudjelovali kao ispitanici u objema predloženim studijama.

Zahvaljujem se i svojoj majci Anki, ocu Petru i bratu Zdeslavu za njihovu bezuvjetnu ljubav i podršku.

Posebno se želim zahvaliti svom suprugu Ozrenu na neprocjenjivoj ljubavi, strpljenu, pomoći i podršci na ovom putu, što je bilo i ključno za ovaj uspjeh.

Hvala vam iz dubine mog srca.

# SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA .....	4
<b>1. UVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>2. CILJ RADA I HIPOTEZE.....</b>	<b>11</b>
2.1. CILJEVI RADA .....	12
2.2. HIPOTEZE .....	12
3.1. ISPITANICI .....	14
3.2. POSTUPCI .....	15
3.2.1. <i>Informirani pristanak</i> .....	15
3.2.2. <i>Anamnestički podaci i klinički status</i> .....	15
3.2.3. <i>Biokemijska analiza</i> .....	15
3.2.4. <i>Spirometrija</i> .....	16
3.2.5. <i>Difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid</i> .....	16
3.2.6. <i>Acidobazni status</i> .....	17
3.2.7. <i>Bronhoskopija</i> .....	17
3.2.8. <i>Određivanje bronhalnog pH i uzorkovanje aspirata</i> .....	18
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>19</b>
4.1. STUDIJA I .....	20
4.2. STUDIJA II .....	23
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
5.1. STUDIJA I .....	30
5.2. STUDIJA II .....	32
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>36</b>
6.1. STUDIJA I .....	37
6.2. STUDIJA II .....	37
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>50</b>
STUDIJA I.....	52
STUDIJA II .....	52
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>53</b>
STUDY I.....	55
STUDY II.....	55
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>57</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

**ABS** – acidobazni status

**AEKOPB** – akutna egzacerbacija kronične opstruktivne plućne bolesti

**ALP** – alkalna fosfataza

**BA** – bronhoalveolarni aspirat

**BMI** – indeks tjelesne mase

**CFA** – kriptogeni fibrogeni alveolitis

**CRP** – C – reaktivni protein

**DB9** – desni laterobazalni segmentalni bronh

**DB10** – desni posterobazalni segmentalni bronh

**DLCO** – difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid

**FEV<sub>1</sub>** – forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

**FVC** – forsirani vitalni kapacitet

**GER** – gastroezofagealni refluks

**GERB** – gastroezofagealna refluksna bolest

**Glu** – glukoza

**GOLD** – globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest

**IIP** – idiopatska intersticijska pneumonija

**IL-6** – interleukin 6

**IPF** – idiopatska plućna fibroza

**LDH** – laktat dehidrogenaza

**KCO** – transfer koeficijent difuzije

**KIZ** – kondenzat izdahnutog zraka

**KOPB** – kronična opstruktivna plućna bolest

**MRSA** – meticilin rezistentni *S. aureus*

**PaCO<sub>2</sub>** – parcijalni tlak arterijskog ugljičnog dioksida

**PaO<sub>2</sub>** – parcijalni tlak arterijskog kisika

**RAF** – reaktanti akutne faze

**S** – serum

**SD** – standardna devijacija

**TNF –  $\alpha$**  – faktor nekroze tumora  $\alpha$

**UIP** – uobičajena intersticijska pneumonija



Bolesti pluća i dišnog sustava ubrajaju se u najčešće uzroke smrti u svijetu (1.). Dišni sustav ima veliku površinu, koja je izložena krvi i vanjskoj okolini, i samim tim je podložan prodoru infektivnih i neinfektivnih čimbenika poput duhanskog dima, ispušnih plinova te inhalacijskih alergena. Tako nastale patofiziološke promjene moguće je proučavati pomoću različitih metoda. Osnovne dijagnostičke metode uključuju anamnezu, klinički pregled, slikovni prikaz prsnog koša (sumacijsku snimku prsnog koša, MSCT pluća) i funkcijske plućne testove. Upalni se medijatori iz plazme i iz urina mogu analizirati, međutim ti podaci nisu odraz upale u dišnim putevima nego sistematske upale. Osim toga, zbog prelijevanja medijatora iz drugih organskih sustava i tako nastalog pozadinskog šuma umanjena je osjetljivost i specifičnost dobivenih podataka. Jedna od novijih metoda za procjenu upale lokalizirane u plućima je analiza kondenzata izdahnutog zraka (KIZ) koji sadrži aerosoliziran sekret dišnih putova i hlapljive sastojke koji pružaju neinvazivan uvid u biokemijske i upalne procese u plućima. KIZ pruža uvid u redukcijsko-oksidacijske reakcije unutar pluća, acidobazni status te stupanj i tip upale u akutnoj i kroničnoj fazi astme, kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti, adultnom respiratornom distres sindromu, cističnoj fibrozi, idiopatskoj plućnoj fibrozi i drugim bolestima respiratornog sustava (2., 3.). Nedostaci KIZ-a su nedovoljna standardizacija uzimanja uzorka, nedostatak dokaza o izvoru čestica aerosola (ne možemo znati s koje razine dišnih puteva potječu istraživani spojevi). Postoji problem oko različitog razrjeđenja i nepostojanja pouzdanog biljega dilucije zbog čega je nemoguće dobiti pouzdanu procjenu koncentracije biljega u sekretu te je otežana standardizacija uzimanja uzorka. Važno je napomenuti kako nije provedeno dovoljno istraživanja o korelaciji koncentracije biljega u uzorku i u dišnim putevima. Manje je poznata korist analize biljega koji nisu vezani za oksidativni stres, o čemu je napravljen mali broj istraživanja (4. – 6.). Za preciznije informacije o dišnom sustavu potrebno je primijeniti metode poput induciranja sputuma ili metode poput bronhoskopije s bronhoalveolarnim lavatom (BAL) i biopsije. Upravo zbog navedenih nedostataka svih metoda javila se potreba za razvijanjem novih načina proučavanja lokalnog patološkog procesa u dišnim putevima, poput analize lokalnog pH u plućima kao mogućeg pouzdanog biljega.

Bronhoskopija je jedna od glavnih dijagnostičkih procedura u pulmologiji. Stručnjaci analizu pH pluća nameću kao novu metodu procjene upalnog procesa lokaliziranog u plućima, neovisno o koncentraciji upalnih parametara u sistemske cirkulaciji. Ova metoda određivanja pH pluća nije se do sada koristila u znanstvenim radovima u okviru istraživanja provedenih na ljudima. Naime, objavljeno je samo jedno istraživanje u kojem se određivao plućni pH. Protokol će istraživanja biti iznesen u nastavku (7.). Mjerenje bronhoalveolarnog pH u plućima se obavlja pomoću komadića testne trakice (Multistix 10 SG, Bayer AG, Leverkusen), namijenjene za

određivanje pH tjelesnih tekućina, tako što se stavi u biopsijski forceps bronhoskopa te forcepsom dođe u jedan od segmenata desnog donjeg plućnog režnja. Forceps se zadrži u segmentu donjeg desnog režnja 15 – 20 sekundi, nakon čega se semikvantitativno odredi pH vrijednost u plućima.

Idiopatska plućna fibroza (IPF) progresivna je bolest plućnog intersticija nepoznatog uzroka, koja se očituje upalom i stvaranjem vezivnog tkiva u plućnom intersticiju. Idiopatska pulmonarna fibroza (IPF), uzorka uobičajene intersticijske pneumonije (UIP) detektirane multislojnom kompjutoriziranom tomografijom, poznata je i kao kriptogeni fibrozirajući alveolitis (CFA). To je najčešći tip idiopatske intersticijske pneumonije (IIP). IIP-ovi su spontano nastale (tj. idiopatske) difuzne parenhimske plućne bolesti. Američka torakalna zajednica (ATS) izrazila je konsenzus u definiranju IPF-a kao spontanog (idiopatskog), specifičnog oblika kronične fibrozne intersticijske pneumonije ograničene na pluća i povezane s UIP-om na kompjutoriziranoj tomografiji visoke razlučivosti ili histološkom pojavljivanju na kirurškoj (torakoskopska ili otvorena) biopsiji pluća (9., 78.). Ostali IIP-ovi uključuju nespecifičnu intersticijsku pneumoniju (NSIP), deskvamativnu intersticijsku pneumoniju (DIP), intersticijsku plućnu bolest povezanu s respiratornim bronhiolitom (RB-ILD), akutnu intersticijsku pneumoniju (AIP), limfocitnu intersticijsku pneumoniju (LIP) i kriptogenu organizirajuću pneumoniju (COP).

Prevalencija i incidencija IPF-a se povećava s dobi, najčešća je to pojavnost u šestom i sedmom desetljeću života. Rijetko je IPF dijagnosticiran pacijentima mlađim od 50 godina. Prevalencija i incidencija je veća kod muškaraca nego kod žena. U Europi prevalencija IPF-a varira od 1.25 do 23.4 slučaja na 100 000 stanovnika, dok je godišnja incidencija od 0.22 do 7.4 slučaja na 100 000 stanovnika (79.). Sveukupno se incidencija IPF-a povećava u svijetu i konzervativne procjene njegove učestalosti u Europi i Sjevernoj Americi ukazuju na otprilike od 3 do 9 slučajeva na 100 000 stanovnika u godini dana (80.). Klinička se slika sastoji od progresivnog pogoršanja zaduhe s postupnim propadanjem plućne funkcije. Bolest je povezana s lošom prognozom (8., 9.). Ne postoji specifičan klinički ni patološki nalaz IPF-a pa se njegova dijagnoza temelji na isključivanju drugih mogućih uzroka bolesti plućnog intersticija. Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB) obično je prisutna kod bolesnika koji boluju od IPF-a, i to u više od 50% slučajeva (10.). Potencijalna uzročna veza između GERB-a i IPF-a je povezanost mikoraspiracije kiseline iz želuca u plućni parenhim (11. – 15.). GERB je u mnogo slučajeva neprimjetan pa tipični simptomi kao što su žgaravica i regurgitacija hrane nisu prisutni.



Dugogodišnja aspiracija kiselog želučanog sadržaja dovodi do pneumonitisa, što pridonosi kroničnoj upali i fibrozi (16.). Pretpostavlja se da je GERB važan faktor rizika za razvoj i/ili napredovanje IPF-a. U sustavnom pregledu zabilježeno je to da je 67% – 76% pacijenata s IPF-om imalo abnormalnu distalnu ezofagealnu izloženost kiselom želučanom sadržaju mjereno ambulantnom ezofagealnom pH metrijom (81.). Klasični simptomi gastroezofagealnog refluksa (GER), kao što su žgaravica i želučana regurgitacija, bili su slabi prediktori povećane ezofagealne izloženosti kiselom želučanom sadržaju distalne sluznice jednjaka kod bolesnika sa srednje teškim do teškim IPF-om. GER kod IPF bolesnika je povezan s hipotenzivnim donjim ezofagealnim sfinkterom i abnormalnom ezofagealnom peristaltikom koja je često abnormalna i u proksimalnom jednjaku (82.). Analiza podataka triju randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja pokazala je da su pacijenti koji su uzimali IPP ili H2 blokatore imali manji pad u vrijednostima forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) nakon 30 tjedana u odnosu na one koji nisu uzimali antirefluksnu terapiju (83.). Ovi podaci sugeriraju da GER pridonosi progresiji IPF-a. Također zbirni članci i metaanalize osam opservacijskih studija sugeriraju da je farmakološko liječenje GER-a povezano s redukcijom mortaliteta povezanog s IPF-om, ali ne sveukupnog mortaliteta (84.). GERB je veoma čest i u općoj populaciji, kao i kod bolesnika s nekim drugim bolestima plućnog intersticija koji dovode do plućne fibroze kao što je npr. skerodermija. Fibroza plućnog parenhima, kao tipična promjena kod IPF-a, dovodi do nemogućnosti ekspanzije pluća u inspiriju te na temelju toga dovodi i do promjena intratorakalnog pritiska koji bi mogao biti uzorak GERB-a. Koegzistencija GERB-a i IPF-a opisana u dosad objavljenjnoj znanstvenoj literaturi svakako zahtijeva daljnja istraživanja.

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je četvrti uzrok smrtnosti u svijetu te se smatra velikim javnozdravstvenim izazovom. Bolest je preventibilna, a kada se ipak razvije, zahtijeva kronično liječenje (17.). KOPB se smatra bolešću specifičnom za organ, a karakterizirana je kroničnom upalom dišnih puteva uz systemske manifestacije kao što su neuhranjenost, bolesti srca i krvnih žila te slabljenje imunološkog sustava s učestalim respiratornim infekcijama (18., 19.). Tipična karakteristika bolesti su epizode pogoršanja tj. egzacerbacije. Akutna egzacerbacija KOPB-a (AEKOPB) je karakterizirana pogoršanjem zaduhe, kašlja i produkcije sputuma u odnosu na strandardne dnevne varijacije što dovodi do potrebe za dodatnim liječenjem i/ili hospitalizacijom. Prema opservacijskim studijama, rizik od razvoja AEKOPB-a u korelaciji je s uznapredovalom dobi, produktivnim kašljem, trajanjem KOPB-a, ranijom antibiotskom terapijom, hospitalizacijom povezanom s KOPB-om tijekom prethodne godine, kroničnom hipersekrecijom mukusa, brojem eozinofila u perifernoj krvi  $> 0.34 \times 10^9$  stanica po litri, terapijom teofilinom, pojavnošću jednog ili više komorbiditeta (npr.

ishemijska bolest srca, kronično zatajenje srca ili šećerna bolest) (85.). Općenito, pogoršanje opstrukcije protoka zraka (manji volumen FEV<sub>1</sub>) povezano je s povećanim rizikom od AEKOPB-a, iako opstrukcija protoka zraka sama ne osigurava dobru procjenu rizika egzacerbacije (86.). Egzacerbacije nisu samo povezane s progresijom bolesti, već i s povećanim mortalitetom. Infektivni uzročnici egzacerbacije najčešće su bakterije, virusi i atipični patogeni. Procjenjuje se da respiratorne infekcije uzrokuju oko 70% AEKOPB-a. Virusne i bakterijske infekcije uzrokuju najviše egzacerbacija, dok su atipične bakterije relativno rijedak uzrok (99., 100.). Preostalih 30% egzacerbacija nastaje zbog onečišćenja okoliša, plućne embolije ili nepoznate etiologije (86.). Brojna su istraživanja provedena radi pronalaska biljega upale i tkivnog oštećenja koji bi upućivali na stupanj težine egzacerbacije i ukazivali na brzinu progresije KOPB-a (20., 21.). Mnogi bolesnici pokazuju i znakove sistemske upale, naročito tijekom egzacerbacije KOPB-a. Sistemska upala očituje se povećanom koncentracijom upalnih biljega i biljega tkivnog oštećenja: C-reaktivnog proteina (CRP), laktične dehidrogenaze (LDH), alkalne fosfataze (ALP), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina 6 (IL-6), interleukina 8 (IL-8) i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) te promjenom acidobaznog statusa (20., 21.). Povećana razina glukoze u krvi se povezuje s povećanom učestalošću egzacerbacija KOPB-a. Razina glukoze iz aspirata pluća također je u korelaciji s većom učestalošću MRSA (meticilin rezistentni *S. aureus*) pozitivnih mikrobioloških kultura sputuma te potrebom za strojnom ventilacijom bolesnika s AEKOPB-om (23. – 25.).

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) povezana je s kroničnom upalom koja uglavnom pogađa plućni parenhim i periferne dišne putove i rezultira nepovratnim i progresivnim ograničenjem protoka zraka. Tu upalu karakterizira povećani broj alveolarnih makrofaga, neutrofila i T limfocita, koji se regrutiraju iz cirkulacije. KOPB dovodi do kronične, nepovratne upale pluća. U patologiji su uključeni i stanični i humoralni imunološki procesi (87.). Značajan dio pacijenata ima i druge manifestacije bolesti (npr. kardiovaskularne bolesti, metaboličke bolesti, bolesti kostiju i kaheksiju) koje su povezane sa sustavnom upalom (88.). Upalni biljezi, uključujući citokine, povezani su s plućnom bolešću i sustavnom patologijom. Navedeni cirkulirajući citokini mogu biti "preliveni" iz upale pluća ili inducirani odvojeno od patoloških procesa u plućima. Dokazi za potonje su razlike u profilima citokina u plućima i cirkulaciji, a samo jedan dio bolesnika s KOPB-om pokazuje značajan porast pojedinačnih cirkulirajućih citokina (88.).

Citokini nisu biološki biljezi specifični za bolest, budući da se mogu podići zbog mnogih različitih razloga (npr. infekcije, autoimuniteta i intrinzične upale), koji mogu biti i subklinički.

To je jedan od razloga zašto je teško identificirati pojedine citokine, koji cirkuliraju u krvi, kao specifične biljege bolesti za KOPB. Neka od prethodnih istraživanja su obučala širok raspon sistemskih citokina kod KOPB-a (89. – 92.), dok su druga ispitivala samo nekoliko njih. Općenito, relativno velike skupine bolesnika i kontrole bile su obvezne pokazati statistički značajno povećanje pojedinačnih citokina u KOPB-u, a različitim istraživanjima je zaključeno da različiti citokini povišeni (93. – 98.).

Kako bi se pomnije istražili upalni biljezi i biljezi tkivnog oštećenja u bolesnikovim plućima s IPF-om i KOPB-om, korišten je bronhoalveolarni aspirat za određivanje pH pluća kao i za određivanje općeprihvaćenih biljega upale CRP-a i TNF- $\alpha$  te općeprihvaćene biljege tkivnog oštećenja LDH-a i ALP-a koje ćemo odrediti lokalno u plućima i sistemno. Naime, do sada nije utvrđivan bronhoalveolarni pH i upalni biljezi te biljezi tkivnog oštećenja u plućima bolesnika koji boluju od IPF-a i AEKOPB-a.

Cilj je istražiti značaj određivanja lokalnog bronhoalveolarnog pH kao mogućeg biljega upale i progresije bolesti u bolesnika s IPF-om i AEKOPB-om, čime bi se dobili podaci o upalnom zbivanju lokaliziranog u plućima, što bi u konačnici dalo uvid o patofiziološkom zbivanju u ovim bolestima. Kod bolesnika s IPF-om se, u do sada objavljenim znanstvenim istraživanjima, koristila 24-satna pH metrija jednjaka, što je invazivna i dugotrajna metoda. Također, analiza KIZ-a je korištena za određivanje pH pluća kod bolesnika s IPF-om i AEKOPB-om, međutim, kao što je u uvodu izneseno, pretraga je nestandardizirana te se radi o metodi s višestrukim nedostacima.

## **2. CILJ RADA I HIPOTEZE**

## **2.1. Ciljevi rada**

### *Studija I*

Cilj je ovog istraživanja pridonijeti shvaćanju patofiziologije IPF-a. Poznato je to da bolesnici s IPF-om imaju povišene upalne biljege u sklopu općeg upalnog odgovora. Veliki broj bolesnika s IPF-om ima GERB i niski bronhoalveolarni pH. Stoga želimo utvrditi imaju li IPF bolesnici s GERB-om, u odnosu na one bez GERB-a, razlike u bronhoalveolarnom pH kao i upalnim biljezima te biljezima tkivnog oštećenja u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu.

### *Studija II*

Cilj je ovog istraživanja usporediti upalne biljege i biljege tkivnog oštećenja u sistemske cirkulaciji s upalnim biljezima i biljezima tkivnog oštećenja u plućima u bolesnika s AEKOPB-om i KOPB bolesnika. Također, odrediti bronhoalveolarni pH te utvrditi postoji li korelacija navedenog sa sistemskim upalnim parametrima. Uz navedeno, napravili smo mikrobiološku analizu uzročnika iz uzorka bronhoalveolarnog aspirata kako bismo utvrdili koji bakterijski uzročnik najviše povećava razinu upalnih biljega i biljega tkivnog oštećenja sistemno i u plućima. Naposljetku, odredili smo i razinu glukoze u bronhoalveolarnom aspiratu kako bismo utvrdili povezanost s upalnim parametrima i s prisutnošću patogenih mikrobioloških uzročnika.

## **2.2. Hipoteze**

### *Studija I*

Bolesnici s IPF-om imat će niži bronhoalveolarni pH i višu razinu biljega upale u serumu i bronhalnom aspiratu u odnosu na bolesnike s GERB-om.

IPF bolesnici s pozitivnim simptomima gastroezofagealnog refluksa imat će niži bronhoalveolarni pH i višu razinu upalnih biljega i biljega tkivnog oštećenja u serumu i bronhalnom aspiratu u odnosu na IPF bolesnike negativne na gastroezofagealne simptome.

### *Studija II*

Bolesnici s AEKOPB-a imat će viši bronhoalveolarni pH u odnosu na stabilne KOPB bolesnike.

Bolesnici s AEKOPB-a s izoliranom bakterijom iz bronhoalveolarnog aspirata imat će viši bronhoalveolarni pH, višu razinu upalnih biljega i biljega tkivnog oštećenja u serumu (CRP, LDH) i bronhalnom aspiratu (CRP, LDH) te nižu vrijednost glukoze u bronhalnom aspiratu u odnosu na bolesnike s AEKOPB-om bez izolirane bakterije u bronholaveolarnom lavatu.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### 3.1. Ispitanici

Ispitivana skupina u Studiji I sastoji se od bolesnika s IPF-om te kontrolne skupine bolesnika s GERB-om. Na temelju proučene literature i do sada napravljenih sličnih radova uključeno je 30 ispitanika koji boluju od IPF-a te 31 kontrolni bolesnik s GERB-om. Za izračun veličine uzorka koristili smo *Power/Sample Size Calculator* (uz zadanu graničnu p-vrijednost 5% i snagu istraživanja od 80%). Kontrolna skupina po dobi i spolu odgovara ispitivanoj skupini. IPF je bolesnicima dijagnosticiran prema važećim kriterijima *American Thoracic Society* za dijagnozu IPF-a, dok je GERB dijagnosticiran prema smjernicama *American College of Gastroenterology*. Bolesnici s GERB-om u terapiji nisu uzimali H2 blokatore niti inhibitore protonske pumpe. Kod svih IPF bolesnika kao mogući uzrok nastanka bolesti isključeni su slijedeći entiteti: bolesti uvjetovane okolišnim čimbenicima, profesionalnim oboljenjima, sustavnim imunološkim bolestima i hipersenzitivnim pneumonitisom. Ispitanicima je učinjena imunodijagnostika sistemnih autoimunih bolesti.

Ispitivana skupina u Studiji II sastoji se od bolesnika s AEKOPB-om te kontrolne skupine stabilnih KOPB bolesnika. Kontrolna skupina po spolu i dobi odgovara ispitnoj skupini. U ispitivanu skupinu je uključeno 84 ispitanika, dok je u kontrolnu skupinu je uključeno 42 ispitanika. Za izračun veličine uzorka koristili smo *Power/Sample Size Calculator* (uz zadanu graničnu p-vrijednost 5% i snagu istraživanja od 80%).

Kriteriji rapoređivanja ispitanika u određenu skupinu su sljedeći: medicinski dokumentirana dijagnoza KOPB-a tijekom posljednjih pet godina, prema GOLD (od *eng. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) smjernicama II. / IV. stupnja. U trenutku uključivanja bolesnici moraju imati akutnu egzacerbaciju KOPB-a, a dva tjedna prije egzacerbacije bolesti nisu smjeli uzimati antibiotsku terapiju, uz ograničenje dobi ispitanika od 18 do 80 godina.

U Studiju I za odabir i raspoređivanje ispitanika koristili smo Hrvatski registar bolesnika s idiopatskom plućnom bolesti, uz bolesnike pregledane na ambulantama ili poliklinici Klinike za plućne bolesti KBC-a Split s potvrđenom dijagnozom IPF-a. U Studiji II su u obzir uzeti ispitanici koji boluju od KOPB-a te im je u trenutku javljanja na Hitni pulmološki prijem Klinike za plućne bolesti KBC-a Split utvrđena akutna egzacerbacija bolesti. Kontrolna skupina stabilnih KOPB bolesnika bit će regrutirana prema dobi i spolu, indeksu tjelesne mase (BMI), pušačkom statusu te spirometrijskim parametrima plućne funkcije koji odgovaraju ispitivanoj skupini u stabilnoj fazi bolesti.

## 3.2. Postupci

### 3.2.1. Informirani pristanak

Sve protokole korištene u sklopu ove disertacije odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Predmetna istraživanja obavljena su u skladu s odredbama Etičkog kodeksa koji regulira istraživanja na ljudima u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu uz poštivanje etičkih načela Helsinške deklaracije. Osobno sam svim ispitanicima uključenim u obje studije iznijela planirani protokol, kao i moguće rizike i koristi sudjelovanja u istraživanju nakon čega je svaki ispitanik dao pisanu suglasnost prije uključanja u istraživanje.

### 3.2.2. Anamnestički podaci i klinički status

Svakom bolesniku uzeli smo podatke o povijesti bolesti te napravili klinički pregled. Izmjerali smo visinu pomoću visinomjera te tjelesnu težinu pomoću digitalne vage. Na temelju dobivenih podataka izračunali smo indeks tjelesne mase (BMI). U Studiji I ispitali smo bolesnike imaju li simptome kao što je žgaravica ili regurgitacija. U Studiji II ispitali smo pušački status svakog bolesnika.

### 3.2.3. Biokemijska analiza

U objema studijama korišten je uređaj koji služi za određivanje biokemijskih parametara seruma i drugih tjelesnih tekućina. U studijama su korišteni uzorci seruma i bronhoalveolarnog aspirata za analizu biokemijskih parametara (ALP, CRP, LDH i glukoza), uređaj Architect C-8000 Clinical Chemistry, Abbot (Abbot Park, IL, USA). Analiza se obavljala unutar jednog sata od uzimanja uzorka. U Studiji I TNF- $\alpha$  je određivan samo u bronhalnom aspiratu korištenjem uređaja Elisys Uno Human (Bender MedSystem, Vienna, Austria). LDH je citoplazmatski enzim prisutan u raznim tkivima. Povećana prisutnost LDH u serumu govori o staničnom oštećenju i upali. CRP je protein koji se ubraja u skupinu zvanu reaktanti akutne faze (RAF). Promjene nivoa RAF-a, kao i CRP-a su u velikoj mjeri rezultirane efektom citokina uključujući IL-6, IL-1 beta, TNF- $\alpha$  i interferon gamma. Ovi proteini utječu na produkciju akutnih faza proteina u hepatocitima sa IL-6 koji je glavni induktor APR-a. ALP je enzim koji ima ulogu u metabolizmu jetre i skeleta. ALP je nespecifični ubikvitarni serumski enzim. On je ekstracelularni membranski enzim prisutan u pet izoformi, a to su su koštana, jetrena, bubrežna, intestinalna i placentalna. U plućima je ALP vezan za membranu pneumocita tipa 2. To su stanice koje su



uključene u proces remodeliranja plućnog tkiva, tako da bi nivo ALP-a u bronhalnom aspiratu mogao korelirati s aktivnosti remodeliranja i fibroze plućnog tkiva.

#### 3.2.4. Spirometrija

U objema studijama ispitanicima je napravljena spirometrija. Ovim testom se određuje forsirani vitalni kapacitet (FVC), tj. maksimalni volumen zraka koji možemo izdahnuti nakon maksimalnog udaha. Ispitaniku se postavi štikaljka na nos te on diše preko usnika dok uređaj mjeri protok zraka. Potom ispitanik udahne maksimalan volumen zraka kako bi, nakon toga, maksimalno snažno i bez pauze, u trajanju od najmanje 6 sekundi, izdahnuo maksimalnu količinu zraka iz pluća. Osoba koja provodi mjerenje glasovno potiče ispitanika u svrhu dobivanja što boljih rezultata. Postupak se ponavlja 3 puta s razmakom od 90 sekundi, a kao rezultat je uzimana najbolja krivulja protok-volumen. Uz određivanje FVC-a, mjerio se i volumen zraka izdahnut tijekom prve sekunde, tzv. forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ). Kod zdravih ispitanika  $FEV_1/FVC$  omjer je veći od 80%. Ako postoji opstrukcija protoka, volumen izdahnutog zraka tijekom prve sekunde je smanjen, što će posljedično dovesti i do smanjenja  $FEV_1/FVC$  omjera ispod 70%. Američko torakološko i Europsko respiracijsko društvo objavilo je smjernice za izvođenje i pouzdanost ovog testa (26.). Svakodnevno je obavljena kalibracija uređaja. Sva mjerenja su napravljena pomoću pletizmografa uređaja Jager Masterlab (Wursburg, Germany).

#### 3.2.5. Difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid

Difuzijski kapacitet pluća za CO (DLCO) je test plućne funkcije kojim se mjeri difuzija plinova kroz alveolokapilarnu membranu, odnosno između udahnutog zraka i krvi u plućnim kapilarama. Prilikom provođenja ovog testa korišten je uređaj Quark b2 (Cosmed, Rim, Italija). Test se bazira na velikom kapacitetu vezivanja ugljičnog monoksida za hemoglobin (od 150 do 300 puta veći kapacitet u odnosu na kisik). Izvodi se tako što ispitanik u potpunosti izdahne do razine, tzv. rezidualnog plućnog volumena, potom maksimalno udahne smjesu koja sadrži 21% kisika, 0.3% ugljičnog monoksida, 0.5% neona, uz preostali udio dušika. Ispitanik nakon maksimalnog udaha ove smjese zadržava dah tijekom 8 sekundi te se potom smjesa koju izdiše analizira plinskim kromatografom. Na osnovi razlike koncentracije ugljičnog monoksida između početne udahnute smjese i mjerene koncentracije ugljičnog monoksida iz alveola, može se izračunati volumen plina koji je difuzijom prešao u krv. Volumen ugljičnog monoksida, koji difuzijom prijeđe u krv, standardiziran je prema vremenu zadržavanja daha, uključujući i vrijeme

potrebno za inspirij i ekspirij (40.). Dobivena vrijednost DLCO-a može se, također, normirati prema alveolarnom volumenu (VA, koji se mjeri tijekom maksimalnog udaha uz korekciju prema predviđenom „mrtvom prostoru“, koji se računa prema visini i spolu). DLCO, korigiran prema alveolarnom volumenu (DLCO/VA), služi kako bi se izbjegnule pogreške prilikom zaključivanja o izmjenom nižem DLCO-u kod osoba s manjim plućnim volumenima, koje imaju i manju alveolarnu površinu za izmjenu plinova.

### 3.2.6. Acidobazni status

Uzorci krvi za analizu prikupljeni su punktiranjem radijalne artrije pomoću šprice zapremnine 3 mL čiji je vršak popunjen heparinom (heparin sodium, 1.000 U/ml). Uzimani su uzorci arterijske krvi volumena 0.5 – 1 mL te su odmah nakon punkcije (uobičajno za < 30 s) premješteni u uložak za analizu u plinsko-elektrolitnom uređaju GEM Premier 300, modela 5700, Instrumentation Laboratory Lexington (Lexington, MA, SAD). Određivani su sljedeći standardni parametri: pH, PaO<sub>2</sub> i PaCO<sub>2</sub>.

### 3.2.7. Bronhoskopija

Bronhoskopija je endoskopska metoda koja vizualizira lumene i mukozu traheje, proksimalnih i distalnih dišnih puteva do 7. generacije grananja bronha optičkim instrumentom, a osim toga rutinski se primjenjuje u dijagnostici i terapiji bolesti traheobronhalnog sustava. Postoje tri vrste bronhoskopije: rigidna bronhoskopija, virtualna bronhoskopija i fleksibilna (standardna) bronhoskopija. Vrste dijagnostičkih postupaka koji se mogu izvoditi pomoću fleksibilnog bronhoskopa uključuju bronhalno četkanje, bronhoalveolarni lavat, bronhoaspiracija, endobronhalna biopsija, transbronhalna biopsija i aspiracija iglom. Svi ispitanici su dali suglasnost za bronhoskopski pregled dišnih puteva. Pretraga je izvođena pomoću fleksibilnog bronhoskopa, fleksibilne cijevi dužine sedamdesetak centimetara i promjera do šest milimetara. Bronhoskop sadrži optička vlakna s malom kamerom na distalnom kraju za prijenos slike, radni kanal i izvor svjetla, koji zajedno omogućavaju operateru vizualizaciju endobronhalnog stabla. Za razliku od rigidnog bronhoskopa, fleksibilni bronhoskop ima mehanizam za savijanje prednjeg ili stražnjeg distalnog kraja, koji olakšava plasiranje aparata kroz zakrivljene dišne putove i povećava sposobnost da se aparatom dosegnu distalni dišni putevi. Iskusni pulmolog izvodi postupak dok je bolesnik u ležećem položaju. Prije toga se sluznica dišnog sustava anestetizira lokalnim anestetikom (2% lidokainom). Materijal će se za daljnju analizu u ovom radu uzimati pomoću kateter aspiracije i bronhoalveolarne lavaže.

Dobiveni materijal će se uputiti na daljnju mikrobiološku, citološku i biokemijsku obradu. U ovom je radu cilj odrediti biljege upale i biljege tkivnog oštećenja u aspiratu bronha, kao i bronhoalveolarni pH. Navedeni će postupci biti detaljno opisani u protokolu rada. Koristit će se uređaj *Olympus BF 1T160* (Tokyo, Japan).

### 3.2.8 Određivanje bronhalnog pH i uzorkovanje aspirata

Kiselost u distalnim dijelovima bronha mjerena je polukvantitativno pomoću test traka (Multistix 10 SG, Bayer AG, Leverkusen) koje se inače koriste za određivanje pH u drugim tekućinama (urin, cerebrospinalna tekućina i pleuralni izljev) unutar raspona pH 4.5-8.0. Za vrijeme bronhoskopije mali komad test trake postavljen je u biopsijska kliješta. Kliješta se zadrže u segmentu donjeg desnog režnja 15 – 20 sekundi, nakon čega se semikvantitativno odredi pH vrijednost u plućima. Zatim se kliješta izvuku iz radnog kanala bronhoskopa te se pH odmah očita. Aspirat iz perifernih grana desnog bronha (DB9 ili DB10) dobiven je kateter aspiracijom koristeći kateter dugačak 18 cm i širok 2 mm. Kada se lumen katetera ispuni aspiratom kateter se ispire sa 1.5 mL destilirane vode.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Studija I

##### Antropometrijski podatci, ezofagogastrični nalaz, plućna funkcija i acidobazni status (ABS)

Antropometrijski podaci, ezofagogastrični nalaz, plućna funkcija i acidobazni status su prikazani u Tablici 1. Kontrolna GERB grupa imala je rezultate FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC, DL<sub>CO</sub>, KCO, PaO<sub>2</sub> i PaCO<sub>2</sub> unutar referentnog raspona, a IPF grupa je imala značajno smanjene sve statistički mjerene parametre plućne funkcije.

**Tablica 1. Antropometrijski podatci, ezofagogastrični nalaz, plućna funkcija i acidobazni status**

	IPF (n = 30)	GERB (n = 31)	P
Dob (Godine)	63.33 ± 6.86	60.94 ± 5.09	0.13
Spol muški N (%)	17 (56.67)	17 (54.84)	
Gastroezofagealni refluks N(%)	24 (80)	31(100)	
Hijatalna hernija N (%)	18 (60)	11 (35.48)	
Gastritis	22 (73.33)	24 (77.41)	
Želučani ulkus N (%)	4 (13.33)	7 (22.58)	
FVC (%)	66.91 ± 8.98	102.45 ± 8.84	< 0.001
FEV <sub>1</sub> /FVC	71.63 ± 10.36	105.5 ± 9.11	< 0.001
DL <sub>CO</sub> (%)	52.71 ± 9.80	101.36 ± 9.92	< 0.001
KCO (%)	53.32 ± 11.5	88.55 ± 9.98	< 0.001
PaO <sub>2</sub> (kPa)	8.25 ± 0.76	12.12 ± 0.5	< 0.001
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	4.69 ± 0.47	4.98 ± 0.3	0.005

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija i broj u postocima (u zagradama). IPF, bolesnici s novodijagnosticiranom idiopatskom plućnom fibrozom; GERB, bolesnici s novodijagnosticiranom gastroezofagealnom refluksnom bolešću; P, Studentov t-test; FVC, forsirani vitalni kapacitet; FEV<sub>1</sub>, forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; DL<sub>CO</sub>, difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid; KCO, transfer koeficijent pluća; PaO<sub>2</sub>, parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi; PaCO<sub>2</sub>, parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi.

Svi ispitanici s dijagnosticiranim IPF-om imali su barem jedan makroskopski patološki nalaz na sluznici jednjaka ili želuca. Iz medicinske dokumentacije vidljivo je da je 17 (56.7%) IPF ispitanika otprije imalo dijagnosticiran GERB. Prilikom gastrokopije obavljena je biopsija sluznice želuca radi detekcije *Helicobacter pylori*. Bakterija je detektirana kod 23 (76.6%) od svih IPF ispitanika te kod 11 (35.48%) GERB bolesnika. Kod bolesnika koji su imali pozitivan nalaz *Helicobacter pylori* iz gastrične biopsije, prilikom bronhoskopije uzeta je transbronhalna biopsija radi utvrđivanja *Helicobacter pylori* statusa u plućima. Prvih 8 uzoraka PHD analize pluća bilo je negativno na *Helicobacter pylori* tako da se nije pristupilo daljnjem uzimanju uzoraka plućnog tkiva.

**Tablica 2. Razine parametara staničnog oštećenja u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu u IPF i GERB ispitanika i pH pluća**

	<b>IPF (n = 30)</b>	<b>GERB (n = 31)</b>	<b>P</b>
pH	5.32 ± 0.44	6.27 ± 0.31	< 0.001
BA-LDH (U/L)	679.98 ± 175.38	122.32 ± 49.47	< 0.001
S-LDH (U/L)	239.6 ± 67.15	194.74 ± 66.72	0.01
BA-CRP (mg/l)	0.18 ± 0.32	0.02 ± 0.04	0.007
S-CRP (mg/l)	16.53 ± 10.51	5.03 ± 3.35	< 0.001
BA-ALP (U/L)	70.03 ± 36.19	39.42 ± 22.35	< 0.001
S-ALP (U/L)	91.93 ± 15.32	84.48 ± 11.27	0.034
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	21.99 ± 7.09	5.36 ± 3.23	< 0.001

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (u zagradama).

IPF, bolesnici s novodijagnosticiranom idiopatskom plućnom fibrozom; GERB, bolesnici s novodijagnosticiranom gastroezofagealnom refluksnom bolešću; P, Studentov t-test; LDH, laktatna dehidrogenaza; CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora  $\alpha$ .

Srednji nalaz pH pluća u perifernim ograncima bronha kod IPF bolesnika izmjeren je u vrijednosti 5.32 ± 0.44, dok je u kontrolnoj skupini GERB bolesnika izmjeren u vrijednosti 6.27 ± 0.31 (aritmetička sredina ± SD). Razlika u pH pluća između ove dvije grupe je bila statistički signifikantna (P < 0.001). Biljezi akutne upale i oštećenja LDH, CRP i ALP u bronhoalveolarnom aspiratu i serumu su signifikantno viši kod IPF bolesnika (Tablica 2.) TNF- $\alpha$  mjereno samo u bronhoalveolarnom aspiratu je također signifikantno viši kod IPF pacijenata.

**Tablica 3. Razine parametara staničnog oštećenja u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu u GERB ispitanika**

	<b>Bronhoalveolarni aspirat (n = 31)</b>	<b>Serum (n = 31)</b>	<b>P</b>
LDH (U/L)	122.32 ± 49.47	194.74 ± 66.72	< 0.001
ALP (U/L)	39.42 ± 22.35	84.48 ± 11.27	< 0.001
CRP (mg/l)	0.02 ± 0.04	5.03 ± 3.35	< 0.001

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (u zagradama). P, Studentov t-test; LDH, laktatna dehidrogenaza; CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora  $\alpha$ .

**Tablica 4. Razine parametara staničnog oštećenja u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu u IPF ispitanika**

	<b>Bronhoalveolarni aspirat (n = 30)</b>	<b>Serum (n = 30)</b>	<b>P</b>
LDH (U/L)	679.98 ± 175.38	239.6 ± 67.15	< 0.001
ALP (U/L)	70.03 ± 36.19	91.93 ± 15.32	0.003
CRP (mg/l)	0.18 ± 0.32	16.53 ± 10.51	< 0.001

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (u zagradama). P, Studentov t-test; LDH, laktatna dehidrogenaza; CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora  $\alpha$ .

Prosječne vrijednosti LDH-a, ALP-a i CRP-a u bronhoalveolarnom aspiratu i serumu su uspoređene kod IPF i GERB bolesnika (Tablica 3. i Tablica 4.). Razlike među grupama su bile statistički značajne.

**Tablica 5. Razine parametara upale i staničnog oštećenja u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu u IPF ispitanika sa GER simptomima i IPF bolesnika bez GER simptoma**

	<b>IPF/GER poz. (n = 18)</b>	<b>IPF/GER neg. (n = 12)</b>	<b>P</b>
Dob (Godine)	64.06 ± 6.67	62.25 ± 7.29	0.49
pH	5.36 ± 0.41	5.25 ± 0.5	0.51
BA-LDH	667.64 ± 199.04	698.48 ± 138.7	0.65
S-LDH	248 ± 84.32	227 ± 24.74	0.41
BA-CRP	0.17 ± 0.31	0.2 ± 0.35	0.79
S-CRP	18.29 ± 11.52	13.89 ± 8.56	0.27
BA-ALP	64.11 ± 19.91	78.92 ± 51.93	0.28
S-ALP	90.44 ± 14.97	94.17 ± 12.83	0.52
TNF- $\alpha$	21.72 ± 7.19	22.37 ± 7.22	0.81

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (u zagradama). IPF/GER poz., IPF bolesnici s pozitivnim simptomima gastroezofagealnog refluksa; IPF/GER neg., IPF bolesnici bez simptoma gastroezofagealnog refluksa; P, Studentov t-test; LDH, laktatna dehidrogenaza; CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora  $\alpha$ .

Također smo usporedili pH pluća iz perifernih bronha IPF bolesnika s pozitivnim simptomima gastroezofagealnog refluksa s IPF bolesnicima bez simptoma gastroezofagealnog refluksa i nije pronađena statistički značajna razlika između dvije grupe (Tablica 5.). Koristili smo upitnik refluks simptom indeks, koji se sastoji od 9 simptoma refluksa, koji pacijenti trebaju ocijeniti ocjenom od 0 (bez simptoma) do 5 (značajni simptomi) sa maksimalnim zbrojem ocjena od 45. Ukupni ubroj veći od 13 je smatran pozitivnim na gastroezofagijalni refluks. Usporedbom među upalnim biljezima i biljezima tkivnog oštećenja iz bronhoalveolarnog

aspirata i iz seruma u analiziranim grupama nije pronađena statistički značajna razlika (Tablica 5.).

#### **4.2. Studija II**

Antropometrijski podaci su prezentirani u Tablici 1. FEV<sub>1</sub> je signifikatno niži kod pacijenata s AEKOPB za razliku od stabilnih KOPB bolesnika ( $p = 0.014$ , Tablica 6.). Parcijalni tlak kisika ( $p = 0.06$ ) je signifikatno niži kod bolesnika s AEKOPB-om, dok je parcijalni tlak ugljičnog dioksida ( $p = 0.019$ ) viši nego kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om (Tablica 6.). Srednji pH pluća kod bolesnika s AEKOPB-om bio je  $6.89 \pm 0.83$  što je signifikantno više nego kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om ( $6.21 \pm 0.37$ ,  $p < 0.001$ ). Srednji pH pluća kod bolesnika bez izoliranog bakterijskog patogena u bronhoalveolarnom aspiratu bio je signifikatno niži nego kod bolesnika s izoliranim bakterijskim patogenom u bronhoalveolarnom aspiratu u grupi AEKOPB bolesnika ( $p < 0.05$ , Tablica 6.). Nije pronađena signifikatna razlika između plućnog pH kod AEKOPB bolesnika prema pušačkom statusu (bivši pušači vs. pušači:  $6.67 \pm 0.67$ ,  $6.99 \pm 0.63$ ,  $p = 0.238$ ).

Razine BALDH-a, SLDH-a i SCRP-a su bile signifikantno niže kod bolesnika bez izoliranog bakterijskog patogena u BA-u za razliku od onih s izoliranom bakterijom kod AEKOPB bolesnika ( $p < 0.05$ ,  $p = 0.042$ ,  $p = 0.028$ , Tablica 6.). Razina BA-Glu-a je bila signifikantno viša kod bolesnika bez izolirane bakterije u BA-u, nego kod onih bolesnika, u AEKOPB grupi pacijenata, kod kojih je izolirana bakterija u BA-u ( $p = 0.014$ ). Nije pronađena signifikatna razlika u BA-CRP i S-Glu razinama između AEKOPB grupa (Tablica 6.). Grupa AEKOPB bolesnika je imala više razine BA-LDH-a i S-CRP-a za razliku od bolesnika sa stabilnim KOPB-om. Ova je razlika izražena i više ako je bakterijski patogen izoliran u BA-u ( $p < 0.05$  za sve varijable, Tablica 6.). Signifikantna razlika plućnog pH, S-LDH, BA-Glu i S-Glu razina ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.012$ ,  $p = 0.032$ , Tablica 6.) su pronađene samo kod AEKOPB bolesnika s izoliranom bakterijom u BA-u u odnosu na stabilne KOPB bolesnike.



**Tablica 6. Antropometrijski podatci, pušački status, parametri plućne funkcije i acidobazni status**

	<b>AEKOPB (n = 84)</b>	<b>stabilni KOPB (n = 42)</b>	<b>P</b>
Dob (godine)	61.9 ± 8.1	62.4 ± 11.6	0.545
Spol, muški N (%)	58 (69)	16 (64)	0.637
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.4 ± 5.2	24.7 ± 3.7	0.604
Trenutno pušači N (%)	30 (35.7)	14 (33.3)	0.625
Godine pušenja (trenutni pušači)	38.6 ± 21.4	35.2 ± 18.9	0.593
Bivši pušači N (%)	45 (53.6)	23 (54.8)	0.609
Godine pušenja (bivši pušači)	34.1 ± 23.1	32.8 ± 20.4	0.534
Nepušači N (%)	9 (10.7)	5 (11.9)	0.612
FVC (L)	2.37 ± 0.73	3.14 ± 0.96	0.331
FVC (% predviđeni)	60.1 ± 15.9	85.7 ± 13.9	0.104
FEV1 (L)	1.27 ± 0.41	2.07 ± 0.68	0.156
FEV1 (%predviđeni)	41.02 ± 11.5	79.4 ± 11.2	0.014
FEV1/FVC (%)	53.58 ± 14.4	66.52 ± 4.92	0.215
PaO <sub>2</sub> (kPa)	8.6 ± 1.5	12.1 ± 0.61	0.006
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	5.7 ± 0.9	4.52 ± 0.39	0.019
pH arterijske krvi	7.29 ± 0.3	7.47 ± 0.4	0.052

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija ili broj u postocima (u zagradama). AEKOPB, akutna egzacerbacija kronične opstruktivne plućne bolesti; KOPB, kronična opstruktivna plućna bolest; BMI, indeks tjelesne težine; FVC, forsirani vitalni kapacitet; FEV1, forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; PaO<sub>2</sub>, parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi; PaCO<sub>2</sub>, parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi. Za statističku signifikantnost za usporedbu grupa korišten je Studentov t-test.

**Tablica 7. Bronhoalveolarni pH, usporedba parametara mjerenih u bronhoalveolarnom aspiratu i serumu kod AEKOPB i stabilnih KOPB bolesnika**

	Izoliran bakterijski patogen iz BA		Stabilni KOPB (n = 42)
	Ne (n = 24)	Da (n = 60)	
Lung pH	6.31 ± 0.55	7.13 ± 0.52*	6.21 ± 0.37‡
BA-LDH (U/L)	361 ± 250	1381 ± 1621*	124 ± 50†,‡
S-LDH (U/L)	173 ± 36	188 ± 24*	160 ± 25‡
BA-CRP (mg/L)	0.17 ± 0.34	0.14 ± 0.26	0.12 ± 0.11
S-CRP (mg/L)	16.8 ± 11.6	29.4 ± 11.2*	4.3 ± 2.6†,‡
BA-Glu (mmol/L)	1.6 ± 0.7	0.9 ± 0.7*	1.6 ± 0.6‡
S-Glu (mmol/L)	5.8 ± 0.7	6.1 ± 1.4	5.6 ± 1.2‡

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. AEKOPB, akutna egzacerbacija kronične plućne bolesti; KOPB, kronična opstruktivna plućna bolest; BA-LDH, bronhoalveolarna laktat dehidrogenaza; S-LDH, serumska laktat dehidrogenaza; BA-CRP, bronhoalveolarni C-reaktivni protein; S-CRP, serumski C-reaktivni protein; BA-Glu, bronhoalveolarna razina glukoze; S-Glu, serumska razina glukoze; \*p < 0.05 bakterijski patogen nije izoliran vs bakterijski patogen je izoliran; †p < 0.05, bakterijski patogen nije izoliran vs stabilni KOPB; ‡p < 0.05, bakterijski patogen je izoliran vs stabilni KOPB.

Sljedeće bakterije su izolirane kod 60 (71%) od 84 bolesnika: Haemophilus influenzae (n = 15, 25%), Streptococcus pneumoniae (n = 11, 18%), Moraxella catarrhalis (n = 8, 13%), Pseudomonas aeruginosa (n = 6, 10%), Escherichia coli (n = 4, 7%), Klebsiella pneumoniae, Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, i anaerobne bakterije (n = 3, 5%), Enterobacter cloacae i Serratia marcescens (n = 2, 3%).

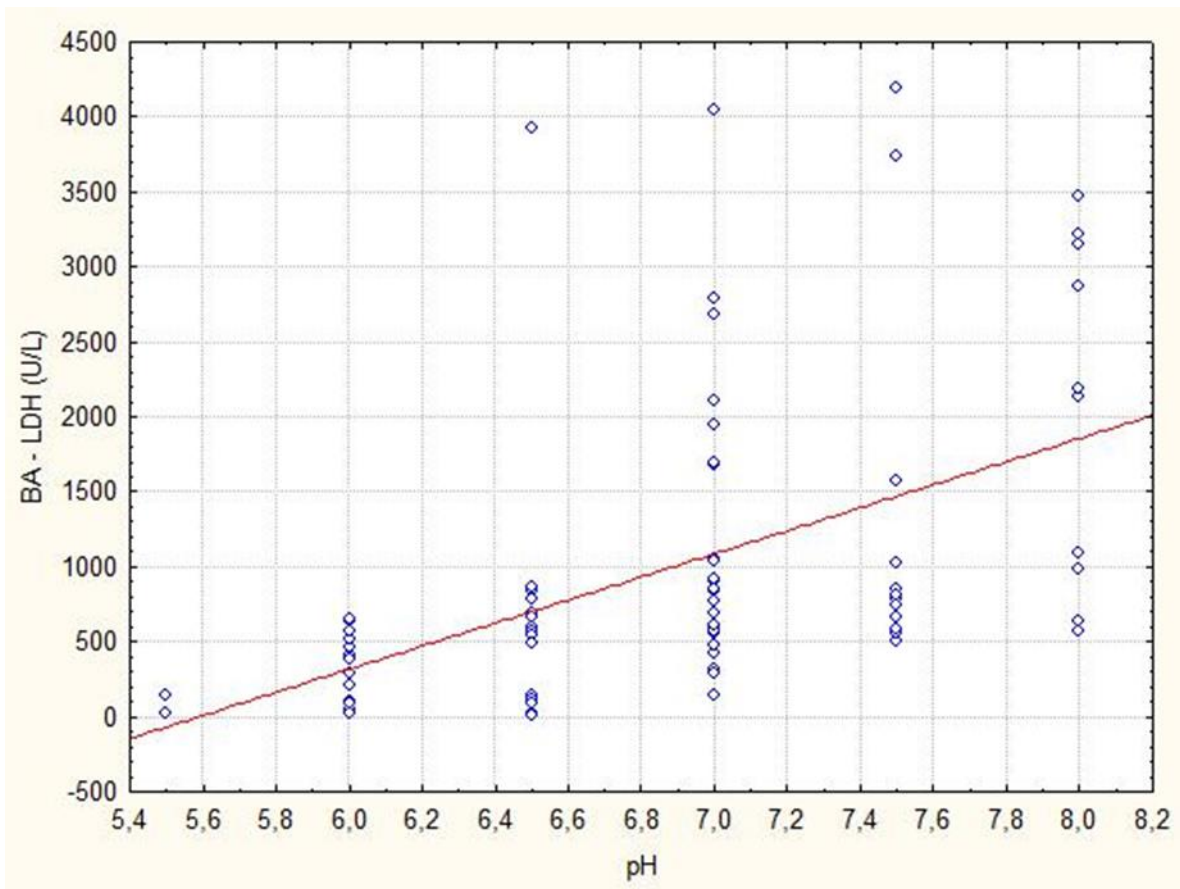
Vrijednost plućnog pH i razina bronhoalveolarnih i serumskih parametara za pet najčešćih izoliranih bakterijskih patogena prikazani su u Tablici 8.

**Tablica 8. pH pluća i razine bronhoalveolarnih i serumskih parametara za pet najčešće izoliranih bakterijskih patogena**

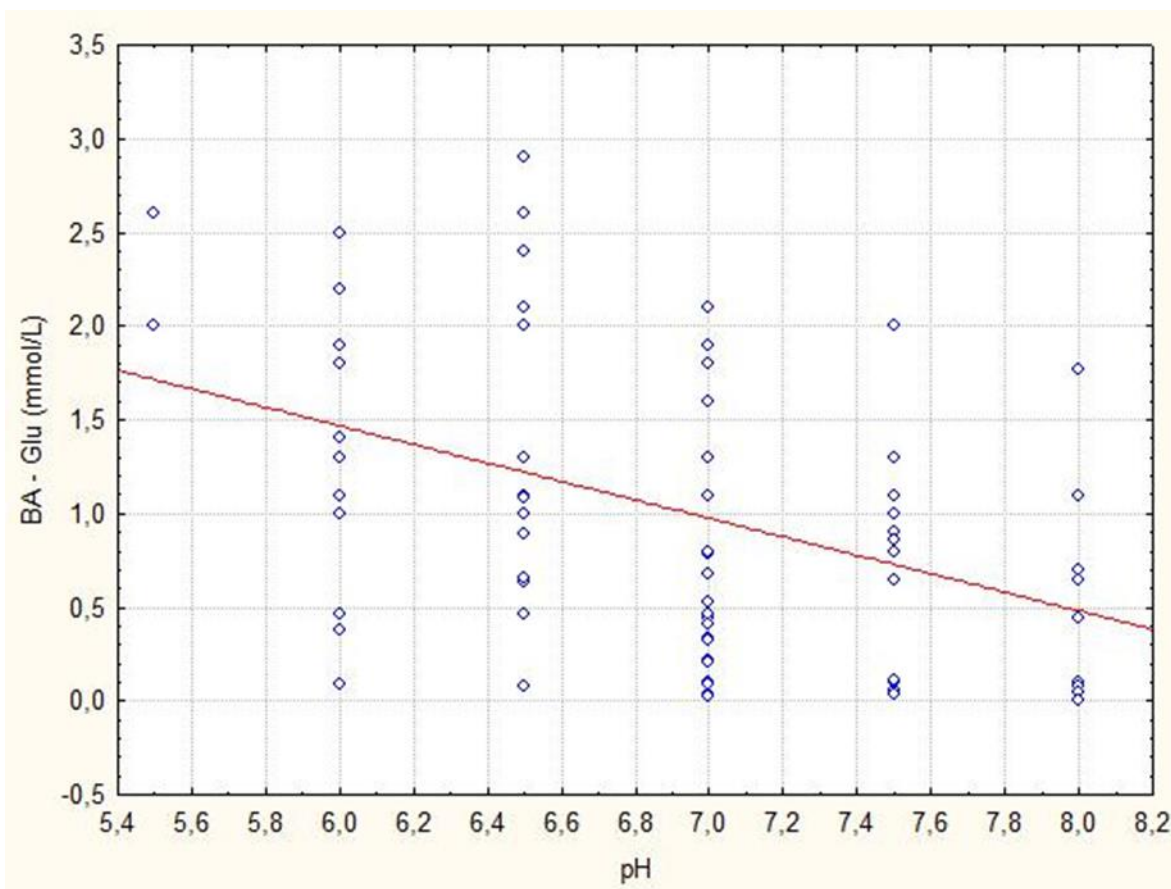
	pH pluća	BA-LDH	S-LDH	BA-CRP	S-CRP	BA-Glu	S-Glu
H. influenzae (n = 15)	7.37 ± 0.64	2912 ± 2505	186 ± 19	0.03 ± 0.06	27.3 ± 13.5	0.9 ± 0.7	6.3±1.4
S. pneumoniae (n =11)	7.14 ± 0.56	959 ± 829	197 ± 28	0.21 ± 0.33	17.8 ± 8.7	1.1 ± 0.6	6±1.4
M. catarrhalis (n = 8)	7.25 ± 0.27	859 ± 133	186 ± 26	0.12 ± 0.20	15.1 ± 8.6	0.8 ± 0.7	5.8±1.2
P. aeruginosa (n = 6)	7.01 ± 0.45	1457 ± 1256	198 ± 21	0.09 ± 0.19	18.7 ± 9.8	0.8 ± 0.3	6.1±1
E. coli (n= 4)	6.75 ± 0.29	673 ± 121	186 ± 38	0.23 ± 0.37	27.1 ± 14.7	1.1 ± 1.3	6.2±0.9

Podaci su prezentirani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. BA-LDH, bronhoalveolarna laktat dehidrogenaza; S-LDH, serumska laktat dehidrogenaza; BA-CRP, bronhoalveolarni C-reaktivni protein; S-CRP, serumski C-reaktivni protein; BA-Glu, bronhoalveolarna razina glukoze; S-Glu, serumska razina glukoze.

**Slika 1. Odnos između razine bronhoalveolarne laktat dehidrogenaze (BA-LDH) i pH pluća u akutnoj egzacerbaciji kronične opstruktivne plućne bolesti**



**Slika 2. Odnos između razine bronhoalveolarne glukoze (BA-Glu) i pH pluća u akutnoj egzacerbaciji kronične opstruktivne plućne bolesti**



Vrijednosti plućnog pH su signifikantno korelirale s BA-LDH razinama ( $r = 0.629$ ,  $p < 0.001$ ) i BA-Glu razinama ( $r = 0.573$ ,  $p < 0.001$ ) (Slika 1., 2.). Vrijednost plućnog pH nije korelirala s FEV<sub>1</sub> u AEKOPB grupi bolesnika ( $r = -0.198$ ,  $p = 0.070$ ). Također vrijednost plućnog pH nije korelirala s FEV<sub>1</sub> u grupi stabilnih KOPB bolesnika ( $r = -0.093$ ,  $p = 0.402$ ).



## 5.1. Studija I

Najvažniji nalaz iz ove studije je veća kiselost u perifernim granama bronha kod novodijagnosticiranih bolesnika s IPF-om, u usporedbi s novodijagnosticiranim pacijentima s GERB-om. Allaix i suradnici su utvrdili da je aspiracija želučane tekućine u dišne puteve i plućni parenhim u IPF-u bolesnika češća, u usporedbi s pacijentima s GERB-om, i to zbog učestalijeg proksimalnog ezofagealnog refluksa i refluksa popraćenog sa sporijim odstranjivanjem (klirensom) kiseline u ležećem položaju kod bolesnika s IPF-om (28). Međutim, kada su bolesnici s IPF-om koji imaju simptome GER-a, uspoređeni s IPF bolesnicima bez simptoma GER-a, utvrđeno je da nema razlike u kiselosti u perifernim granama bronha (Tablica 5.). Moguće objašnjenje je da kronična upala u plućima kod IPF bolesnika sama po sebi dovodi do lokalnog kiselog okruženja koje čini stanice ozljede, apoptoza i nekroza, za koje je poznato da povećavaju razinu vodikovih iona i laktatne kiseline. Nizak pH na alveolarno-kapilarnoj membrani uzrokuje oštećenja i gubitak surfaktanta, a kao posljedica toga nastaje kolaps alveola i razvoj mikroatelektaza, čime se pridonosi razvoju i/ili napredovanju IPF-a (29). Prethodno smo dokazali da se pH uglavnom kretao između 6 i 8 kod zdravih ispitanika, što je mjereno u kondenzatu izdaha (30. – 33.). U svim dosadašnjim istraživanjima koja su uspoređivala navedeno, IPF i GERB pacijenti su bili podvrgnuti invazivnom 24-satnom intraesofagealnom pH praćenju, s uočenim pH uglavnom ispod 4 (15., 33.). Tobin i suradnici sugeriraju da su bolesnici s IPF-om pod povećanim rizikom za razvoj gastroezofagealnog refluksa zbog povećanih gradijenata tlakova na dijafragmu i promjenama u plućnim parametrima ventilacije (15.). Najviše naših novodijagnosticiranih pacijenata s IPF-om imalo je jasne simptome GER-a u vrijeme postavljanja dijagnoze ili su imali prethodno dijagnosticiran GERB prije nego li je dijagnosticiran IPF, što je slično nedavnim nalazima (34., 35.). Kod naših pacijenata s IPF-om utvrđen je visok postotak hijatus hernije (60%), za razliku od nalaza u općoj populaciji (~ 20%) (36.) i nalaza u našoj kontrolnoj skupini (35,48%).

Studija I nije napravljena kako bi istražila uzročnu povezanost između aspiracije želučane kiseline i IPF-a. Međutim, studije na životinjama dovode do zaključka da sadržaj želučane kiseline u plućima može doprinijeti upali i razvoju kronične plućne bolesti (37. – 40.). Ipak vrlo malo pacijenata s GERB-om razvija IPF, s obzirom na to da je prevalencija GERB-a u općoj populaciji mnogo veća (41., 42.) nego prevalencija IPF-a (43., 44.). Ostali čimbenici rizika kao što su pušenje, prašina, lijekovi i zračenje te genetska podloga, mogu biti uključeni u razvoj IPF-a. Do danas imamo limitirani učinak terapije IPF-a, koji dovodi do sporije progresije upale i fibroze u podlozi IPF-a. Nije jasno utječe li antirefluksna terapija na funkciju pluća ili respiratorne simptome u IPF-u (45., 7.) iako je rad Raghua i suradnika pokazao stabilizaciju i poboljšanje funkcije pluća, mjerene pomoću FVC i/ili DLco, nakon terapije inhibitorom protonske pumpe (46.).

Posebno zanimljiv nalaz u ovoj studiji je taj da je 76,6% ispitanika s novodijagnosticiranim IPF-om bilo *H. pylori* pozitivno u usporedbi s 35,48% kod novodijagnosticiranih pacijenata s GERB-om. Nedavno je publicirano da *H. pylori*, ne samo GERB po sebi, može biti u vezi s razvojem IPF-a (47.).

Razina LDH, pokazatelja stanične ozljede i nekroze, bio je 2.84 puta veći u bronhoalveolarnom aspiratu nego u serumu IPF pacijenata. Bronhoalveolarni nivo LDH bio je 5.56 puta veći kod IPF bolesnika nego kod GERB bolesnika. Viši nivo LDH pronađen u bronhoalveolarnom aspiratu IPF bolesnika, za razliku od GERB bolesnika, sugerira lokalnu upalu ozljedu stanica, nekrozu i aktivnu bolest. Također utvrđene su više razine upalnog biljega TNF- $\alpha$  u bronhoalveolarnom aspiratu kod IPF bolesnika što je uspoređeno s GERB bolesnicima. TNF- $\alpha$  stimulira fibroblaste i pospješuje produkciju kolagena te je jedan od citokina zaslužnih za patogenezu plućne fibroze. ALP biljeg oštećenja tkiva, povećan prilikom proliferacije i oštećenja pneumocita II, također je imao povećan nivo u bronhoalveolarnom aspiratu IPF bolesnika. Na temelju rezultata ovog istraživanja ne predlažemo mjerenje CRP-a u bronhoalveolarnom aspiratu. Nivo CRP-a je jedva detektiran u uzorcima bronhoalveolarnog aspirata. Serumske razine upalnog biljega CRP-a te biljega tkivnog oštećenja LDH-a i ALP-a bile su značajno veće kod IPF ispitanika prilikom usporedbe s kontrolama što upućuje na sustavnu upalu i oštećenje.

Općenito, uloga upale u IPF-u je još uvijek kontroverzna. Neke od prevladavajućih hipoteza koje su razmatrale može li upalni proces ili neovisni epitelni/fibroblastni poremećaj dovesti do napretka bolesti, trebaju biti bolje objašnjene u daljnjim istraživanjima (48. – 52).

U Studiji I, nekoliko je čimbenika moglo utjecati na rezultate. Istraživanje je provedeno na malom broju ispitanika i rezultate stoga treba promatrati s oprezom. Potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem pacijenata kako bi se objasnila uloga aspiracije želučane tekućine u patogenezi IPF-a. Pokušali smo izbjeći pristranost odabira nudeći prijavu za istraživanje svim pacijentima koji su primljeni u našu bolnicu, a diagnosticirani su im IPF i GERB. Dakle pacijenti nisu odabrani prema prisutnosti GER simptoma.

Nismo mjerili broj stanica u bronhoalveolarnom aspiratu. Međutim, poznato je da je u ranom aspektu bolesti prisutna visoka celularnost s infiltrirajućim alveolarnim infiltratima. Bili smo usredotočeni na manje poznato mjerenje pH i razine LDH-a, ALP-a, CRP-a i TNF-a u bronhoalveolarnom aspiratu.



## 5.2. Studija II

Ova je studija dokazala je da je bronhoalveolarni pH kod bolesnika s AECOPD-om više alkalniji nego onaj kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om. Osim toga, srednja vrijednost pH pluća kod bolesnika s izoliranom bakterijom bila je viša od one kod bolesnika bez izoliranih bakterija u AEKOPB skupini ispitanika. Navedeni su nalazi potvrdili našu hipotezu. Kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om, srednji bronhoalveolarni pH je bio  $6,21 \pm 0,37$ , dok je kod pacijenata s AECOPD-om bio  $6,89 \pm 0,53$ , a pH je bio još alkalniji u prisutnosti bakterije. Pretpostavljamo da su povećanju pH pridonijeli upalni procesi popraćeni bakterijskim metabolitima. Prethodne studije su pokazale da je sputum kod bolesnika s kroničnim bronhitisom alkalniji (7.6 i 7.8) (53.) i da je kod pacijenata sa cističnom fibrozom sluz donjih dišnih puteva također alkalna (54.). Plućni pH kod bolesnika s upalom pluća je približno 7.3 (55.), a bolesnici s rinitisom imaju pH u nosnoj sluznici vrijednosti u rasponu od 7.2 do 8.3 (56., 57.). Navedena istraživanja pokazuju da postoji povezanost između alkalnog plućnog pH i upaljenog tkiva distalne bronhoalveolarne sluznice. Naši nalazi pH arterijske krvi pokazali su 3% niži pH arterijske krvi kod bolesnika s AEKOPB u usporedbi s onima sa stabilnim KOPB-om, što je u skladu s nalazima Grumellija i suradnika (58., 15.). Alkalnost u plućima doprinosi lokalnom oštećenju tkiva promicanjem staničnih ozljeda, apoptoza, nekroza i upala (53.). U našem istraživanju, više alkalne vrijednosti bronhoalveolarnog pH bile su značajno povezane s višim vrijednostima BA-LDH, što ukazuje na veći intenzitet oštećenja tkiva. Viša razina vrijednosti plućnog pH u egzacerbaciji doprinosi strukturnim promjenama surfaktanta, što može dovesti do ventilacijskih problema (mikroatelektaza). To bi moglo objasniti fluktuacije u stanju bolesnika (54.). Do danas, u istraživanjima se plućni pH najčešće utvrđivao u kondenzatu izdahnutog zraka (KIZ), koji predstavlja neinvazivnu metodu uzorkovanja volatilnih čestica zraka donjeg respiratornog trakta (55.). Nekoliko je studija pokazalo da je pH mjeren u KIZ-u više kiseo kod bolesnika s AEKOPB-om i KOPB-om, nego kod zdrave populacije (56., 57.) Međutim, postoje poteškoće u uzorkovanju i analizi KIB-a. Otkrivanje i kvantifikacija biljega u KIB-u, uključujući citokine, dušikov oksid i pH, otežani su mnogim čimbenicima. Ti čimbenici uključuju tip kondenzatora, pušenje, temperaturu okoline, kontaminaciju slinom, vlažnost zraka, unos tekućine, kontaminante iz usne šupljine i izdahnuti ugljični dioksid. Svi navedeni čimbenici mogu dovesti do pogrešaka u mjerenju ranije navedenih biljega, pogotovo kod bolesnika s akutnom ili kroničnom hiperkapničnom respiratornom insuficijencijom, koja je često prisutna u AEKOPB-u, pa i čak u stabilnom KOPB-u (58., 59. – 63.).

KIB je do sada korišten samo u eksperimentalnim uvjetima i nije potvrđen za uporabu u kliničkoj praksi. Na temelju ovih nalaza, smatramo da izravno uzorkovanje bronhoalveolarne tekućine nudi točniju procjenu lokalnog plućnog pH, upalnih biljega i biljega tkivnog oštećenja u

usporedbi s onima koji su uzrokovani KIB-om. Uzorkovanje bronhoalveolarne tekućine stoga nudi točnije podatke za procjenu lokalnog oštećenja i upale plućnog tkiva.

Moglo bi biti korisno definirati različite fenotipove KOPB-a i procijeniti terapijski odgovor, biljege upale i tkivnog oštećenja respiratornog trakta, kao i oksidativni stres. Mjerenja razine LDH-a i CRP-a iz seruma nisu valjani lokalni plućni indikatori upale i oštećenja tkiva. Uzorkovanje tih biljega iz bronhoalveolarnog aspirata može predstavljati precizniju alternativu.

LDH je citoplazmatski enzim koji se nalazi u većini tjelesnih stanica, uključujući pluća. Detekcija vrijednosti LDH-a koje su izvan normalnog raspona se koristi za identifikaciju staničnog oštećenja ili smrti (64.). Najveće vrijednosti BA-LDH-a u Studiji II pronađene su kod bolesnika s izoliranim *Haemophilus influenzae* i *Pseudomonas aeruginosa*, što je bio indikator najveće lokalne upale, ozljede stanica i nekroza kada je najviše patogenih bakterija bilo prisutno. Ako je bakterijski patogen bio izoliran, 7.4 puta veće vrijednosti LDH-a su pronađene u bronhoalveolarnom aspiratu u usporedbi sa serumom, dok je u slučajevima kada bakterijski patogen nije bio izoliran taj omjer bio samo 2.1. Kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om, prosječne vrijednosti razine S-LDH-a i BA-LDH-a bile su  $160 \pm 25$  odnosno  $124 \pm 50$  UL. U odnosu prema tim vrijednostima, S-LDH i BA-LDH kod bolesnika s neizoliranim bakterijskim patogenom u AEKOPB skupini pacijenata bili su 1.1 odnosno 2.9 puta viši. U slučajevima kada je bakterijski patogen izoliran ovaj omjer je iznosio 1.2 odnosno 11.2. Više razine BA-LDH-a u bronhoalveolarnom aspiratu kod bolesnika s AEKOPB-om, a osobito u slučajevima kada je bakterijski patogen izoliran, u usporedbi s bolesnicima sa stabilnim KOPB-om sugeriraju prisutnost lokalne upale, stanične ozljede, nekroze i aktivnosti bolesti. Naš nalaz pokazuje da je BA-LDH relevantan biljeg oštećenja plućnog tkiva i može se pouzdano koristiti za procjenu bakterijske infekcije kod AEKOPB bolesnika. Međutim, samo 9% bolesnika imalo je S-LDH vrijednosti  $> 220$  U/L (iznad referentnog raspona). Ovaj nalaz ukazuje na to da su kod bolesnika s AEKOPB-om, razine S-LDH bile relativno normalne, što upućuje na slab sustavni upalni odgovor.

CRP je biljeg upale i razine CRP-a se povećavaju tijekom razdoblja upalnog stanja (65.). Neka su istraživanja pokazala povezanost više sistemske razine CRP-a i drugih upalnih biljega kod bolesnika s KOPB-om za razliku od zdrave skupine (66.– 68.). Bircan i suradnici (69.) pokazali su da su povećane vrijednosti CRP-a u serumu pokazatelj egzacerbacije KOPB-a uzrokovane respiratornom infekcijom. U Studiji II su utvrđene neznatne, ali statistički značajno veće razine S-CRP-a kod bolesnika s AEKOPB-om što je uspoređeno s bolesnicima sa stabilnim KOPB-om te su navedene razine bile još i veće u slučaju ako je izoliran bakterijski patogen. Nedavno su Peng i suradnici (70.) iznijeli to da je za identifikaciju bakterijskog podrijetla kod AEKOPB bolesnika,

granična vrijednost CRP-a bila 19.65 mg/L. Čini se da je S-CRP bolji pokazatelj sistemske upale kod bolesnika s AEKOPB-om, nego što je to S-LDH. Međutim, razine BA-CRP-a bile su niske u našem istraživanju. Naši nalazi upućuju na to da BA-CRP razine ne treba mjeriti jer su bile niske ili čak teško uočljive, bez izražene razlike u izmjenjenim razinama među skupinama.

Dok razine glukoze u krvi nisu povezane sa smrtnošću, trajanjem bolničkog boravka ili rehospitalizacijom kod bolesnika s AEKOPB-om (71.), otkrivanje glukoze u bronhoalveolarnom aspiratu je povezano s prisustvom patogenih bakterija (72.,73.). U Studiji II, u slučajevima kada je bakterija izolirana kod bolesnika s AEKOPB, BA-Glu razina je bila 1.8 puta niža od razine kod bolesnika bez izolirane bakterije, dok razlika u razinama S-Glu-a nije pronađena. Stoga rezultati za razine BA-Glu-a mogu također poslužiti kao dobar indikator prisutnosti bakterija.

Istraživali smo i bakterijske patogene kako bismo procijenili razine upale i pH vrijednosti u odnosu na bakterijske patogene. Ovo se istraživanje temelji na identifikaciji bakterijske etiologije izravno iz bronhoalveolarnog aspirata, a ne iz sputuma, kao što je provedeno u prethodnim istraživanjima (74., 75.). Bakterijska etiologija prevladava kao izvor upale kod AEKOPB bolesnika. U ovoj studiji, bakterijski patogeni su pronađeni kod 71% bolesnika, za razliku od 24% koja iznose Boixede i suradnici u svom istraživanju (76.). Vjerujemo da je razlog za razliku rezultata istraživanja izravna analiza bronhoalveolarne tekućine umjesto uzoraka sputuma, jer su uzorci sputuma više osjetljivi na pogreške uzorkovanja. Izdvojili smo 42 (70%) Gram-negativne bakterije i 18 (30%) Gram-pozitivnih bakterija i mikrobiološki uzorci su bili slični kao što su prikazali i Siddiqi i suradnici (77.).

Postoje dva moguća ograničenja ovog istraživanja. Prvo je to da je naša studija provedena na relativno malom broju ispitanika i stoga se rezultati moraju uzeti s oprezom. Drugo je to da je polukvantitativna tehnika (pH test trake) korištena za izravno mjerenje pH u plućima, a u idealnom slučaju, točnija metoda za određivanje pH bi bila primjerenija. Međutim, vjerujemo da je tehnika koju smo koristili prihvatljiva zamjena. U je vrijeme puno puta dokazano da je ova tehnika učinkovita u istraživanjima koje je provodila naša istraživačka skupina (55., 56.).

Naposljetku, možemo zaključiti kako ovo istraživanje pokazuje jaki patološki proces u plućima KOPB pacijenata tijekom AEKOPB-a. Ovaj patološki proces je prisutan, čak i u slučajevima sa slabim kliničkim simptomima pogoršanja ili nedostatnim patološkim nalazima u perifernoj krvi, kao što su razine CRP-a i LDH-a, a posebno u prisustvu bakterijskog patogena. Više alkalne vrijednosti bronhoalveolarnog pH su jasan pokazatelj intenzivnijeg oštećenja tkiva. Nema korelacije između bronhoalveolarnog pH i FEV<sub>1</sub> kod bolesnika s AEKOPB-om i onih sa stabilnim

KOPB-om. Mjerenje FEV<sub>1</sub>-a ne izražava na odgovarajući način učinak KOPB-a na kvalitetu bolesnikova života. Stoga, mjerenje lokalnog bronhoalveolarnog pH i predloženih upalnih medijatora u bronhoalveolarnoj tekućini kod nekih bolesnika mogu biti korisni kao dodatni test za dijagnosticiranje težine AEKOPB-a. Iako pomalo invazivna, analiza plućnog pH i upalnih bronhoalveolarnih i serumskih biljega, kao i biljega tkivnog oštećenja, predstavlja izvedivu i jednostavnu metodu za opetovanu procjenu sistemskih i lokalnih upala kod AEKOPB bolesnika. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se u potpunosti utvrdila važnost i utjecaj bakterijskih kultura, bronhoalveolarnog pH i upalnih biljega, kao i biljega tkivnog oštećenja u vezi s kliničkim intervencijama i njegom bolesnika s AEKOPB-om.

## **6. ZAKLJUČCI**

## **6.1. Studija I**

Prema našim saznanjima na temelju dosadašnjih istraživanja ovo je prvi put da su pH, LDH, ALP i CRP mjereni u bronhoalveolarnom aspiratu pacijenata s IPF-om.

U usporedbi s novodijagnosticiranim pacijentima s GERB-om, istraživanje izneseno u ovom radu je otkrilo kiseliu okolinu u perifernim granama bronha kod novodijagnosticiranih bolesnika s IPF-om.

Nema razlike u kiselosti u perifernim granama bronha kod bolesnika s IPF-om sa stvarnim simptomima GER-a te kod bolesnika s IPF-om bez stvarnih simptoma GER-a, što sugerira da niski pH u perifernim granama bronha može biti povezan sa samom patofiziologijom IPF-a, ali ne i s aspiracijom želučane tekućine.

Ova studija, između ostaloga, potvrđuje i to da su bolesnici s IPF-om podložniji nastanku gastroezofagealnog refluksa, GERB-a, hijatalne kile i gastritisa za razliku od opće populacije.

Možemo zaključiti kako su daljnja istraživanja uloge aspiracije želučane tekućine u patogenezi IPF-a obvezna, kao i pojašnjenje povezanosti između GER-a i drugih intersticijskih bolesti pluća.

Svi izmjereni upalni biljezi u ovom istraživanju bili su veći u bronhoalveolarnom aspiratu, kao i u serumu kod bolesnika s IPF-om, ako ih uspoređujemo s pacijentima s GERB-om.

Naši preliminarni radovi identificirali su, kao potencijalno važne indikatore u patološkom procesu IPF-a, upalne biljege CRP-a i TNF- $\alpha$  te biljege tkivnog oštećenja LDH-a i ALP-a.

## **6.2. Studija II**

Prilikom istraživanja došli smo do zaključka kako je srednji pH bronhoalveolarne tekućine bio značajno viši kod bolesnika s AEKOPB-om, nego kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om.

Osim navedenoga, analizama smo zaključili kako su srednja vrijednost pH pluća, vrijednosti bronhoalveolarnog i serumskog LDH-a i serumske razine CRP-a kod bolesnika s izoliranim bakterijama bile veće od onih kod bolesnika bez izoliranih bakterija u skupini pacijenata s AEKOPB-om.

Što se tiče pH vrijednosti pluća kod bolesnika s AEKOPB-om, iz rezultata je vidljivo da značajno korelira s razinama bronhoalveolarnog LDH-a i glukoze.

Naposljetku, ovim je istraživanjem dokazno je kako je AEKOPB posebno povezan s lokalnim ozljedama stanica i tkiva u plućima u prisutnosti bakterijskih patogena, što je popraćeno niskim sistemskim upalnim odgovorom.

## **7. LITERATURA**



1. Lozano R., Naghavi M., Foreman K. i sur. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380.: 2095. – 2128.
2. Wallace M., Pleil J., Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods and instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols. *Anal Chim Acta*. 2018 Sep 18;1024:18-38.
3. Aldakheel FM., Thomas PS., Bourke JE. i sur. Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: a systematic review. *Allergy*. 2016 Jun;71(6):741-57.
4. Murata K., Fujimoto K., Kitaguchi J. i sur. Hydrogen peroxide content and pH of expired breath condensate from patients with asthma and COPD. *COPD*. 2014 Feb; 11(1):81-7.
5. Koczulla A. R., Noeske S., Herr C. i sur. Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology* 2010; 15.: 155. – 159.
6. Konstantinidi EM., Lappas AS., Tzortzi AS. i sur. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:435160.
7. Mise K., Capkun V., Jurcev-Savicevic A., Sundov Z., Bradaric A., Mladinov S. The influence of gastroesophageal reflux in the lung: a case-control study. *Respirology* 2010; 15.: 837 – 842.
8. Daccord C., Maher TM. Recent advances in understanding idiopathic pulmonaryfibrosis. *F1000Res*. 2016; 5
9. Martinez FJ., Lederer DJ. Focus on Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Advancing Approaches to Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Chest*. 2018 Oct; 154(4):978-979.
10. Delaney B. C. Review article: prevalence and epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004; 20. (Suppl. 8.): 2. – 4.
11. Salvioli B., Belmonte G., Stanghellini V. i sur. Gastro-oesophageal reflux and interstitial lung disease. *Dig Liver Dis*, 2006; 38.: 879. – 884.

12. Raghu G. The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med*, 2003; 115. (Suppl. 3A): 60S – 64S.
13. Raghu G.: GER And Pulmonary Fibrosis: Concepts In Pathogenesis And Implications For Prevention Of Lung Injury. Proceedings of American Thoracic Society International conference; 2010; New Orleans, USA; 2010.
14. Ghebre YT, Raghu G. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Novel Concepts of Proton Pump Inhibitors as Antifibrotic Drugs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jun 15; 193(12):1345-52
15. Tobin R. W., Pope C. E. II, Pellegrini C. A. i sur. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158. (6): 1804. – 1808.
16. Mays E. E., Dubois J. J., Hamilton G. B. The pulmonary fibrosis associated with tracheobronchial aspiration. *Chest*, 1976; 69.: 512. – 515.
17. Rabe K. F., Hurd S., Anzueto A. i sur. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176.: 532. – 555.
18. Cosio M. G., Saetta M., Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360.: 2445. – 2454.
19. Agustí A. G. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am ThoracSoc* 2005; 2.: 367. – 370.
20. Dahl M., Vestbo J., Lange P., Bojesen S. E., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B. G.. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J RespirCrit Care Med* 2007; 175.: 250. – 255.
21. Hurst J. R., Donaldson G. C., Perera W. R. i sur. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J RespirCrit Care Med* 2006; 174.: 867. – 874.
22. Islam E. A., Limsuwat C., Nantsupawat T., Berdine G. G., Nugent K. M.. The association between glucose levels and hospital outcomes in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Thorac Med* 2015; 10.: 94. – 99.

23. Alsayed S., Marzouk S., Mousa E., Ragab A. Bronchial aspirates glucose level as indicator for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intubated mechanically ventilated patients. *J Egypt Soc Parasitol* 2014; 44.: 381. – 388.
24. Philips B. J., Redman J., Brennan A. i sur. Glucose in bronchial aspirates increases the risk of respiratory MRSA in intubated patients. *Thorax* 2005; 60.: 761. – 764.
25. Boixeda R., Rabella N., Sauca G. i sur. Microbiological study of patients hospitalized for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AE-COPD) and the usefulness of analytical and clinical parameters in its identification (VIRAE study). *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012; 7.: 327. – 335.
26. Miller M. R., Hankinson J., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Crapo R., Enright P., van der Grinten C. P. M., Gustafsson P., Jensen R., Johnson D. C., MacIntyre N., McKay R., Navajas D., Pedersen O. F., Pellegrino R., Viegi G., Wanger J., Force A. E. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*, 2005; 26.: 319. – 338.
27. Coker R. K., Laurent G. J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J*, 1998; 11.: 1218. – 1221.
28. Allaix M. E., Fisichella P. M., Noth I. i sur. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Gastroesophageal Reflux. Implications for treatment. *J Gastrointest Surg*, 2013.
29. Bonacin D., Fabijanić D., Radić M. i sur. Gastroesophageal reflux disease and pulmonary function: A potential role of the dead space extension. *Med Sci Monit*, 2012; 18. (5): CR 271. – 275.
30. Liang Y., Yeligar S.M., Brown L.A. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:217518
31. Vaughan J., Ngamtrakulpanit L., Pajewski T. N. i sur. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J*, 2003; 22.: 889. – 894.
32. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S. i sur. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:435160

33. Varnai V. M., Ljubicić A., Prester L., Macan J. Exhaled breath condensate pH in adult Croatian population without respiratory disorders: how healthy a population should be to provide normative data. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009; 60.: 87. – 97.
34. Sgalla G., Iovene B., Calvello M. i sur. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir Res*, 2018; 19.: 32.
35. Soares R.V., Forsythe A., Hogarth K. i sur. Interstitial lung disease and gastroesophageal reflux disease: key role of esophageal function tests in the diagnosis and treatment. *Arq Gastroenterol*. 2011 Apr-Jun; 48(2):91-7.
36. Yasuhara H., Miyake Y., Toyokawa T. i sur. Large waist circumference is a risk factor for reflux esophagitis in Japanese males. *Digestion*, 2010; 81.: 181. – 187.
37. Colombo J. L., Hallberg T. K. Airway reactivity following repeated milk aspiration in rabbits. *Pediatr Pulmonol*, 2000; 29.: 113. – 119.
38. Lopes F. D., Alvarenga G. S., Quiles R. i sur. Pulmonary responses to tracheal or esophageal acidification in guinea pigs with airway inflammation. *J Appl Physiol*, 2002; 93.: 842. – 847.
39. Tuchman D. N., Boyle J. T., Pack A. I. i sur. Comparison of airway responses following tracheal or esophageal acidification in the cat. *Gastroenterology*, 1984; 87.: 872. – 881.
40. Schanker L. S., Less M. J. Lung pH and pulmonary absorption of nonvolatile drugs in the rat. *Drug Metab Dispos*, 1977; 5.: 174. – 178.
41. Olson A.L., Gifford A.H., Inase N. i sur. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype. *Eur Respir Rev*. 2018 Dec 31; 27(150).
42. Nalysnyk L., Cid-Ruzafa J., Rotella P. i sur. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev*. 2012 Dec 1; 21(126):355-61.
43. Dent J., El-Serag H. B., Wallander M. A., Johansson S. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, 2005; 54.: 710. – 717.

44. El-Serag H.B., Sweet S., Winchester C.C. i sur. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 Jun; 63(6):871-80.
45. Raghu G., Freudenberger T. D., Yang S. i sur. High prevalence of abdominal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2006; 27.: 136. – 142.
46. Gnanapandithan K., Popkin J. H., Devadoss R. i sur. Gastroesophageal reflux and idiopathic pulmonary fibrosis: A long term relationship. *Respir Med Case Rep*, 2016; 17.: 40. – 43.
47. Bennett D., Bargagli E., Refini R.M. i sur. Helicobacter pylori seroprevalence in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2014 Feb; 43(2):635-8.
48. Kolahian S., Fernandez I. E., Eickelberg O. i sur. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016; 55. (3): 309. – 322.
49. Rydell-Tormanen K., Uller L., Erjefalt J. S. Direct evidence of secondary necrosis of neutrophils during intense lung inflammation. *Eur Respir J*, 2006; 28.: 268. – 274.
50. Parambil J. G., Myers J. L., Ryu J. H. Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest*, 2005; 128.: 3310. – 3315.
51. Wang X. M., Zhang Y., Kim H. P. i sur. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 2006; 203.: 2895. – 2906.
52. Ghebre Y. T., Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: Novel concepts of proton pump inhibitors s antifibrotic drugs. *Am J Respir Care Med*, 2016; 193. (12): 1345. – 1352.
53. Shah A.J., Donovan M.D. Rheological characterization of neutral and anionic polysaccharides with reduced mucociliary transport rates. *AAPS PharmSciTech*. 2007 Apr 20; 8(2):Article 32.
54. McShane D., Davies J. C., Davies M. G. i sur. Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003; 21.: 37. – 42.
55. Fischer H., Widdicombe J.H. Mechanisms of Acid and Base Secretion by the Airway Epithelium. *J Membr Biol*. 2006; 211(3): 139–150.

56. England R., Homer J., Knight L. i sur. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1999; 24.: 67. – 68.
57. Fischer H., Widdicombe J. H. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol* 2006; 211.: 139. – 150.
58. Grumelli S. Choline triggers exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in patients infected with *pseudomonas aeruginosa*. *Curr Respir Med Rev* 2016; 12.: 167. – 174.
59. Rosias P. Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis. *J Breath Res* 2012; 6.: 027102.
60. Hüttmann E. M., Greulich T., Hattesoehl A. i sur. Comparison of two devices and two breathing patterns for exhaled breath condensate sampling. *PLoS One* 2011; 6.: e27467.
61. Koczulla A. R., Noeske S., Herr C. i sur. Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology* 2010; 15.: 155. – 159.
62. Vyas A., Zhang Q., Gunaratne S. i sur. The effect of temperature on exhaled breath condensate collection. *J Breath Res* 2012; 6.: 036002.
63. Davis M.D., Hunt J. Exhaled breath condensate pH assays. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2012 Aug; 32(3):377-86.
64. Glick J. H. Jr. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme and total lactate dehydrogenase values in health and disease, and clinical evaluation of these tests by means of discriminant analysis. *Am J ClinPathol* 1969; 52.: 320. – 328.
65. Pepys M. B., Hirschfield G. M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111.: 1805. – 1812.
66. Biljak V. R., Pancirov D., Cepelak I. i sur. Platelet count, mean platelet volume and smoking status in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Platelets* 2011; 22.: 466. – 470.
67. Schols A. M., Buurman W. A., Staal van den Brekel A. J. i sur. Evidence for a 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.

68. Liu S.F., Wang C.C., Chin C.H. i sur. High value of combined serum C-reactive protein and BODE score for mortality prediction in patients with stable COPD. *Arch Bronconeumol.* 2011 Sep; 47(9):427-32.

69. Kawamatawong T., Apiwattanaporn A., Siricharoonwong W. Serum inflammatory biomarkers and clinical outcomes of COPD exacerbation caused by different pathogens. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017; 12.: 1625. – 1630.

70. Peng C., Tian C., Zhang Y. i sur. C-reactive protein levels predict bacterial exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med Sci* 2013; 345.: 190. – 194.

71. Islam E. A., Limsuwat C., Nantsupawat T. i sur. The association between glucose levels and hospital outcomes in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Thorac Med* 2015; 10.: 94. – 99.

72. Alsayed S., Marzouk S., Mousa E. i sur. Bronchial aspirates glucose level as indicator for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intubated mechanically ventilated patients. *J Egypt Soc Parasitol* 2014; 44.: 381. – 388.

73. Mallia P., Webber J., Gill S. K. i sur. Role of airway glucose in bacterial infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142.: 815. – 823. e6.

74. Gump D. W., Phillips C. A., Forsyth B. R. i sur. Role of infection in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113.: 465. – 474.

75. Lambert H. P., Stern H. Infective factors in exacerbations of bronchitis and asthma. *Br Med J* 1972; 3.: 323. – 327.

76. Boixeda R., Rabella N., Sauca G. i sur. Microbiological study of patients hospitalized for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AE-COPD) and the usefulness of analytical and clinical parameters in its identification (VIRAE study). *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012; 7.: 327. – 335.

77. Siddiqi A., Sethi S. Optimizing antibiotic selection in treating COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008; 3.: 31. – 44.
78. Raghu G., Collard H. R., Egan J. J. i sur. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183.: 788.
79. Nalysnyk L., Cid-Ruzafa J., Rotella P., Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev* 2012; 21.: 355.
80. Hutchinson J., Fogarty A., Hubbard R., McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J* 2015; 46.: 795.
81. Hershcovici T., Jha L. K., Johnson T. i sur. Systematic review: the relationship between interstitial lung diseases and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34.: 1295.
82. Sweet M. P., Patti M. G., Leard L. E. i sur. Gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis referred for lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133.: 1078.
83. Lee J. S., Collard H. R., Anstrom K. J. i sur. Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2013; 1.: 369.
84. Fidler L., Sitzer N., Shapera S., Shah P. S. Treatment of Gastroesophageal Reflux in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest* 2018; 153.: 1405.
85. Vedel-Krogh S., Nielsen S. F., Lange P. i sur. Blood Eosinophils and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193.: 965.
86. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: 2019 Report.



87. Barnes P. J. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*, vol. 35, no. 1, pp. 71. – 86. 2014.
88. Choudhury G., Rabinovich R., MacNee W. Comorbidities and systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*, vol. 35, no. 1, pp. 101. – 130. 2014.
89. Aaron S. D., Vandemheen K. L., Ramsay T. i sur. Multi analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Respiratory Research*. 2010; 11.
90. Bade G., Khan M. A., Srivastava A. K. i sur. Serum cytokine profiling and enrichment analysis reveal the involvement of immunological and inflammatory pathways in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2014; 9.: 759. – 773.
91. Pinto-Plata V., Toso J., Lee K. i sur. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax*. 2007; 62. (7): 595. – 601.
92. Röpcke S., Holz O., Lauer G. i sur. Repeatability of and relationship between potential COPD biomarkers in bronchoalveolar lavage, bronchial biopsies, serum, and induced sputum. *PLoS ONE*. 2012; 7. (10)
93. Agustí A., Edwards L. D., Rennard S. I. i sur. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in copd: a novel phenotype. *PLoS ONE*. 2012; 7.
94. de Moraes M. R., da Costa A. C., Corrêa K. D. S., Junqueira-Kipnis A. P., Rabahi M. F. Interleukin-6 and interleukin-8 blood levels' poor association with the severity and clinical profile of ex-smokers with COPD. *International Journal of COPD*. 2014; 9.: 735. – 743.
95. Eagan T. M. L., Ueland T., Wagner P. D. i sur. Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *European Respiratory Journal*. 2010; 35. (3): 540. – 548.
96. Garcia-Rio F., Miravittles M., Soriano J. B. i sur. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respiratory Research*. 2010; 11.

97. Higashimoto Y., Iwata T., Okada M., Satoh H., Fukuda K., Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*. 2009; 103. (8): 1231. – 1238.
98. Pinto-Plata V., Casanova C., Müllerova H. i sur. Inflammatory and repair serum biomarker pattern: association to clinical outcomes in COPD. *Respiratory Research*. 2012; 13.
99. Sethi S., Murphy T. F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359.: 2355.
100. Mohan A., Chandra S., Agarwal D. i sur. Prevalence of viral infection detected by PCR and RT-PCR in patients with acute exacerbation of COPD: a systematic review. *Respirology* 2010; 15.: 536.

## **8. SAŽETAK**

Bolesti pluća i dišnog sustava spadaju u najčešće uzroke smrti u svijetu. Dišni sustav ima veliku površinu izloženu krvi i vanjskoj okolini, čime je podložan prodoru infektivnih i neinfektivnih čimbenika poput duhanskog dima, ispušnih plinova te inhalacijskih alergena. Moguće je analizirati upalne medijatore iz plazme i urina, ali ti podaci prije reflektiraju sistemsku upalu nego upalu lociranu u dišnim putevima. Zbog prelijevanja medijatora iz drugih organskih sustava i tako nastalog pozadinskog šuma umanjena je osjetljivost i specifičnost dobivenih podataka. Jedna od metoda za procjenu upale lokalno u plućima je analiza kondenzata izdahnutog zraka (KIZ). KIZ pruža uvid u redukcijsko-oksidacijske reakcije unutar pluća, acidobazni status te stupanj i tip upale u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti, idiopatskoj plućnoj fibrozi i drugim bolestima respiratornog sustava. Nedostaci metode KIZ su nedovoljna standardizacija uzimanja uzorka kao i nedostatak dokaza o podrijetlu čestica aerosola. Manje je poznata korist analize biljega koji nisu vezani za oksidativni stres, o čemu je općenito mali broj studija. KIZ se koristi u istraživačke svrhe te nije dostupan u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Za preciznije informacije o dišnom sustavu potrebno je primijeniti metode poput induciranja sputuma ili metode poput bronhoskopije s bronhoalveolarnim lavatom (BAL) i biopsije. Upravo zbog navedenih nedostataka svih metoda javila se potreba za razvijanjem novih načina proučavanja lokalnog patološkog procesa u dišnim putovima, poput analize lokalnog pH u plućima kao mogućeg pouzdanog biljega.

Idiopatska pulmonarna fibroza (IPF) / uzorka uobičajene intersticijske pneumonije (UIP), prethodno poznate kao kriptogeni fibrozirajući alveolitis (CFA) je bolest nepoznatog uzroka. To je najčešći tip idiopatske intersticijske pneumonije (IIP). IIP-ovi su spontano nastale (tj. idiopatske) difuzne parenhimske bolesti pluća. Američka torakalna zajednica (ATS) izrazila je konsenzus u definiranju IPF-a kao spontanog (idiopatskog) specifičnog oblika kronične fibrozne intersticijske pneumonije ograničene na pluća i povezane s UIP-om na kompjutoriziranoj tomografiji visoke razlučivosti ili histološkom pojavljivanju na kirurškoj (torakoskopska ili otvorena) biopsiji pluća. Patogeneza idiopatske plućne fibroze (IPF) / uobičajene intersticijske pneumonije (UIP) je složena i vjerojatno uključuje cikluse ozljeda epitelnih stanica i neregulirane popravke.

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je četvrti uzrok smrtnosti u svijetu te se smatra velikim javno zdravstvenim izazovom. Bolest je preventibilna, a kada se ipak razvije, zahtjeva kronično liječenje. KOPB se smatra bolešću specifičnom za organ, a karakterizirana je kroničnom upalom dišnih puteva uz sistemske manifestacije kao što su neuhranjenost, bolesti srca i krvnih žila te slabljenje imunološkog sustava s učestalim respiratornim infekcijama. Tipična karakteristika bolesti su epizode pogoršanja tj. egzacerbacije. Akutna egzacerbacija KOPB-a (AEKOPB) je karakterizirana pogoršanjem zaduhe, kašlja i produkcije sputuma u odnosu na standardne dnevne varijacije što dovodi do potrebe za dodatnim liječenjem i/ili hospitalizacijom.

### *Studija I*

Nekoliko je studija sugeriralo da je idiopatska pulmonarna fibroza (IPF) povezana s ponovljenom aspiracijom želučanog sadržaja tijekom dugog vremenskog razdoblja. Cilj nam je bio istražiti razlike između izravno izmjerenih pH vrijednosti u plućima, i biljega akutne upale i tkivnog oštećenja u bolesnika s novodijagnosticiranim IPF-om i u bolesnika s novodijagnosticiranim GERB-om. Svi ispitanici (N=61) podvrgnuti su fizikalnom pregledu, testiranju plućne funkcije, bronhoskopiji, gastroduodenoskopiji, analizi plinova arterijske krvi i mjerenju biokemijskih parametara. Prethodno dijagnosticiran GERB pronađen je u 56.7%, tipični simptomi refluksa u 80%, te *Helicobacter pylori* u uzorcima želučane biopsije u 76.6% slučajeva. pH u perifernim granama bronha u slučajevima bio je  $5.32 \pm 0.44$  te  $6.27 \pm 0.31$  ( $p < 0,001$ ) u kontrolnoj skupini. Prosječne vrijednosti LDH, ALP i CRP u bronhoalveolarnom aspiratu i serum, kao i TNF- $\alpha$  u bronhoalveolarnom aspiratu, bili su značajno viši u bolesnika s IPF-om. Kiselija okolina u bronhoalveolarnom aspiratu ispitanika s IPF-om mogla bi doprinijeti razvoju ili napredovanju bolesti, moguće putem promjena u lokalnom metabolizmu ili oštećenjem lokalnih stanica i tkiva. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem pacijenata kako bi se pojasnila uloga aspiracije želučane tekućine u patogenezi IPF-a. Naši preliminarni radovi identificirali su upalne biljege i biljege tkivnog oštećenja LDH, ALP i TNF- $\alpha$  kao potencijalno važne u patološkim procesima IPF-a. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredila njihova važnost u kliničkoj praksi i skrbi pacijenata.

### *Studija II*

Cilj ovog istraživanja bio je izravno mjeriti pH u plućima, odrediti LDH, CRP i razinu glukoze u serumu i bronhoalveolarnom aspiratu, te identificirati bakterijske patogene iz bronhoalveolarne tekućine tijekom AEKOPB-a. Napravili smo opservacijsku studiju u koju smo uključili 84 bolesnika s AEKOPB-om i 42 s stabilnim KOPB-om. Sudionicima je učinjena spirometrija, plinski test arterijske krvi, bronhoskopija, analiza bakterijske kulture bronhoalveolarnog lavata i mjerenje biokemijskih parametara. Srednji pH bronhoalveolarne tekućine bio je značajno viši u bolesnika s AEKOPB-om nego u bolesnika sa stabilnim KOPB-om. Srednja vrijednost pH pluća, razina bronhoalveolarnog i serumskog LDH te serumska razina CRP-a u bolesnika s izoliranim bakterijama bile su veće od onih u bolesnika bez izoliranih bakterija u skupini bolesnika s AEKOPB-om. pH vrijednosti pluća kod bolesnika s AEKOPB-om je značajno korelirala s razinom bronhoalveolarnog LDH i glukoze. Zaključak studije jest da je AEKOPB povezan s lokalnim oštećenjem stanica i tkiva u plućima, osobito u prisutnosti bakterijskih patogena, što je praćeno niskim sistemskim upalnim odgovorom.

## **9. SUMMARY**

Respiratory diseases are the most common cause of death in the world. The respiratory system has a large surface area exposed to blood and the surrounding environment, which is susceptible to the penetration of infectious and non-infectious factors such as tobacco smoke, exhaust gases, and inhalational allergens. It is possible to analyze inflammatory mediators of plasma and urine, but these data reflect systemic inflammation rather than inflammation located in the respiratory tract. Because of the inflow of mediators from other organic systems and the resulting background noise, the sensitivity and specificity of the data obtained is reduced. One of the methods for assessing inflammation locally in the lungs is an analysis of condensate of exhausted air (EBC). EBC provides insight into the reduction-oxidation reactions within the lung, the acid status, and the degree and type of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis, and other respiratory disease. The disadvantages of the EBC method are insufficient standardization of sampling as well as lack of evidence on the origin of the aerosol particles. There is little known benefit of markers not related to oxidative stress, which is generally a small number of studies. EBC is used for research purposes and is not available in everyday clinical practice. For more precise information on the respiratory system, methods such as sputum induction or methods such as bronchoalveolar lavage (BAL) and biopsy should be applied. Precisely due to the above mentioned drawbacks of all methods there was a need to develop new ways of studying the local pathological process in the airways, such as local pH analysis in the lungs as a possible reliable marker.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), previously known as cryptogenic fibrous alveolitis (CFA), is a disease of unknown cause. This is the most common type of idiopathic interstitial pneumonia (IIP). IIPs are spontaneous (i.e., idiopathic) diffuse parenchymal lung diseases. The American Thoracic Association (ATS) has expressed consensus in defining IPF as a spontaneous (idiopathic) specific form of chronic fibrotic interstitial pneumonia restricted to the lungs and associated with UIP in computerized high resolution tomography or histologic appearance on the surgical (thoroscopic or open) biopsies of the lungs. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) / common interstitial pneumonia (UIP) is complex and probably involves cell injury and unregulated repair cycles.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth cause of mortality in the world and is considered a major public health challenge. The disease is preventable, and when it develops, it requires chronic healing. COPD is considered organ-specific disease and is characterized by chronic inflammation of the respiratory tract with systemic manifestations such as malnutrition, cardiovascular diseases, and weakening of the immune system with frequent respiratory infections. Typical characteristics of the disease are episodes of exacerbation. COPD acute exacerbation

(AECOPD) is characterized by worsening of sputum, cough and sputum production compared to daytime variation, which leads to the need for additional treatment and / or hospitalization.

### ***Study I***

Several studies have suggested that idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) may be related to repeated aspiration of gastric contents over long periods of time. We aimed to investigate differences between pH measured directly in the lung, and biomarkers of acute inflammation in patients with newly diagnosed IPF and in patients with newly diagnosed GERD. All subjects (N=61) underwent collection of medical history, physical examination, pulmonary function testing, bronchoscopy, endoscopy, arterial blood gas analyses, and biochemical testing. Previously diagnosed GERD was found in 56.7%, typical symptoms of reflux in 80%, and *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens in 76.6% of the cases. pH in peripheral branches of bronchi in the cases was  $5.32\pm 0.44$  and was  $6.27\pm 0.31$  ( $p<0.001$ ) in the control group. The average values of LDH, ALP, and CRP in bronchoalveolar aspirate and in serum, as well as TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar aspirate, were significantly higher in IPF patients. The more acidic environment in the bronchoalveolar aspirate of the IPF subjects could contribute to the development or progression of IPF, possibly via changes in local metabolism or by damaging local cells and tissue. However, further studies with larger numbers of patients are required to clarify the role of gastric fluid aspiration in IPF pathogenesis. Our preliminary work has identified inflammatory biomarkers LDH, ALP, and TNF- $\alpha$  as potentially important in the pathologic processes in IPF. Further research is needed to determine their importance in clinical intervention and patient care.

### ***Study II***

This study aimed to directly measure pH in the lungs, determine lactate dehydrogenase (LDH), C-reactive protein (CRP), and glucose levels in serum and bronchoalveolar aspirate, and identify bacterial pathogens from bronchoalveolar fluid during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). We performed an observational, analytical case-control study from February 2015 to March 2017. We included 84 patients with AECOPD and 42 with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). All participants underwent detailed medical anamnesis, a clinical examination, chest radiography, spirometry, an arterial blood gas test, bronchoscopy, bacterial culture, and serum/bronchiolar aspirate laboratory testing. The mean pH of bronchoalveolar fluid was significantly higher in patients with AECOPD than in patients with stable COPD. The mean lung pH value, bronchoalveolar and serum LDH levels, and serum CRP levels in patients with isolated bacteria were higher than those in patients without isolated bacteria in the AECOPD patient group. Lung pH values in patients with AECOPD were significantly correlated



with bronchoalveolar LDH and glucose levels. AECOPD is associated with local cell and tissue injury in the lungs, especially in the presence of bacterial pathogens, which is accompanied by a low systemic inflammatory response.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

**Ime i prezime autora:** Emilija Lozo Vukovac,

Specijalist interne medicine, subspecijalist pulmolog, KBC Split, Klinika za plućne bolesti, Spinčićeva 21000, Split, RH

**Elektronička pošta:** emilija.lozo@gmail.com

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum i mjesto rođenja:** 22. 8. 1983., Imotski, RH

## **OBRAZOVANJE**

**1990. – 1998.** Pohađala Osnovnu školu „Dobri“ Split

**1998. – 2002.** Pohađala IV. Opću gimnaziju "Marko Marulić" u Splitu, sve godine položila s odličnim uspjehom te oslobođena mature.

**2002. – 2008.** Upisala i završila studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, smjer: doktor medicine; diplomirala u svibnju 2008. godine s prosjekom 4.34. Za vrijeme studija radila kao asistent na katedrama anatomije, histologije i biologije.

**2008. – 2009.** Odradila jednogodišnji staž u KBC-u Split te položila državni stručni ispit u studenom 2009. godine.

**2010.** Zaposlena u domu zdravlja Split. Upisala poslijediplomski doktorski studij "Medicina utemeljena na dokazima" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. U studenom zaposlena kao specijalizant interne medicine na Klinici za plućne bolesti KBC Split. Sudjelujem u znanstvenoj djelatnosti klinike kao i u nastavnoj aktivnosti u sklopu predmeta Interna medicina.

**2016.** U ožujku polažem specijalistički ispit iz interne medicine te nastavljam svoj rad kao specijalist na Klinici za plućne bolesti KBC Split.

**2017.** U rujnu sam izabrana za suradničko zvanje naslovnog asistenta za područje biomedicine i zdravstva polje kliničke medicinske znanosti, grana Interna medicina na Katedri za internu medicinu.

**2019.** U lipnju polažem subspecijalistički ispit iz pulmologije i nastavljam svoj rad kao subspecijalist na Klinici za plućne bolesti KBC Split.

## OSTALE AKTIVNOSTI

Aktivno sudjelujem na domaćim i stranim stručnim pulmološkim kongresima konstantno se trudeći kako bih poboljšala svoja znanja i napredovala u svim području rada. Osim navedenoga, sudjelujem i kao ispitivač u kliničkim istraživanjima BI 1222.13, BI 205.442 i NO. PO6241/PO2 te kao glavni istraživač u Kliničkoj studiji ANAM-17-21

## PUBLIKACIJE

(1) **Lozo Vukovac E.**, Miše K., Gudelj I., Perić I., Duplančić D., Vuković I., Vučinović Z., Lozo M.

Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Int Med Res.* 2018 29:300060518811560. doi: 10.1177/0300060518811560.

(2) Peric I., Paladin I., **Lozo Vukovac E.**, Vela Ljubic J., Gudelj I., Lozo M. Tracheomalatia, to stent or not to stent. *Respir Med Case Rep.* 2015 Oct 2; 16.: 137. – 139.

(3) Lozo M., **Lozo Vukovac E.**, Ivancevic Z., Pletikosic I. Phantom tumor of the lung: localized interlobar effusion in congestive heart failure. *Case Rep Cardiol.* 2014; 2014.: 207294.

(4) **Lozo Vukovac E.**, Lozo M., Miše K., Gudelj I., Puljiz Z., Jurcev-Savicevic A., Bradaric A., Kokeza J., Miše J. Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in newly diagnosed IPF and GERD patients: a case-control study. *Med Sci Monit.* 2014 Feb 15; 20.: 255. – 256.