

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Tomasz Piorunek

**Kompleksowa ocena zaawansowania  
zmian w układzie oddechowym u dorosłych  
chorych na mukowiscydozę na podstawie  
badań klinicznych, mikrobiologicznych  
i histopatologicznych**

Poznań 2013

Tytuł angielski

*Comprehensive assessment of the severity of respiratory system changes in adult cystic fibrosis patients based on clinical, microbiological and histopathological evaluations*

Recenzent

*prof. dr hab n. med. Witold Młynarczyk*

Skład i łamanie

*Mirosława Zajączkowska*

Redakcja techniczna

*Grażyna Dromirecka*

Projekt okładki

*Bartłomiej Wąsiel*

ISBN 978-83-7597-209-2

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
Poznań 2013

© Copyright by Tomasz Piorunek, Poznań 2013

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO

IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

60-812 Poznań, ul. Bukowska 70

[www.wydawnictwo.ump.edu.pl](http://www.wydawnictwo.ump.edu.pl)

Ark. wyd. 5,7. Ark. druk. 9,6.

Format B5. Zam. nr 110/13.

Druk ukończono w maju 2013 r.

## Spis treści

Objaśnienia skrótów . . . . .	5
1. WSTĘP . . . . .	7
2. CELE PRACY . . . . .	20
3. MATERIAL I METODY BADAŃ . . . . .	21
3.1. Materiał kliniczny . . . . .	21
3.2. Metody potwierdzające rozpoznanie mukowiscydozy . . . . .	21
3.2.1. Test potowy . . . . .	21
3.2.2. Identyfikacja mutacji genu CFTR . . . . .	21
3.3. Metody oceny klinicznej . . . . .	22
3.3.1. Kryteria oceny klinicznej według Shwachmana i Kulczyckiego . . . . .	22
3.3.2. Wskaźnik masy ciała . . . . .	22
3.4. Badania radiologiczne . . . . .	25
3.5. Badanie spirometryczne . . . . .	26
3.6. Bronchofiberoskopia . . . . .	26
3.7. Płukanie oskrzelowe i oskrzelowo-pęcherzykowe . . . . .	27
3.8. Badanie histopatologiczne w mikroskopie świetlnym . . . . .	27
3.9. Mikroskopia elektronowa . . . . .	28
3.10. Badania mikrobiologiczne . . . . .	28
3.11. Analiza statystyczna . . . . .	31
4. WYNIKI BADAŃ . . . . .	32
4.1. Analiza materiału klinicznego . . . . .	32
4.2. Wyniki badań molekularnych . . . . .	34
4.3. Wyniki badań radiologicznych . . . . .	34
4.4. Ocena spirometryczna . . . . .	36
4.5. Wyniki badań bronchofiberoskopowych . . . . .	36
4.6. Badanie materiału biopsyjnego w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym . . . . .	40
4.7. Ocena mikrobiologiczna materiału uzyskanego z płukania oskrzelowego . . . . .	45
4.8. Korelacja wybranych parametrów określających stan kliniczny chorych i zmian histopatologicznych w błonie śluzowej oskrzeli . . . . .	48
4.9. Podsumowanie wyników badań . . . . .	59
5. DYSKUSJA . . . . .	63
6. WNIOSKI . . . . .	77

7. STRESZCZENIE . . . . .	78
8. SUMMARY . . . . .	81
9. PIŚMIENNICTWO . . . . .	84
10. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA . . . . .	96



## Objaśnienia skrótów

ABPA	– <i>allergic bronchopulmonary aspergillosis</i> (alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna)
BAL	– <i>bronchoalveolar lavage</i> (płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe)
BMI	– <i>body mass index</i> (wskaźnik masy ciała)
CF	– <i>cystic fibrosis</i> (zwłóknienie torbielowate)
CFTR	– <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (gen przeznaczonego regulatora przepuszczalności w zwłóknieniu torbielowatym)
CFRD	– <i>cystic fibrosis related diabetes</i> (cukrzyca związana z mukowiscydozą)
ERS	– <i>European Respiratory Society</i> (Europejskie Towarzystwo Oddechowe)
ATS	– <i>American Thoracic Society</i> (Amerykańskie Towarzystwo Klatki Piersiowej)
FEV <sub>1</sub>	– <i>forced expiratory volume in 1 second</i> (natężona objętość wydechu pierwszosekundowa)
FVC	– <i>forced vital capacity</i> (natężona pojemność życiowa)
HRCT	– <i>high resolution computed tomography</i> (tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości)
MEF	– <i>maximal expiratory flow</i> (maksymalny przepływ wydechowy)
MOTT	– <i>mycobacterium other than tuberculosis</i> (mikobakterie inne niż gruźlicze)
PCR	– <i>polymerase chain reaction</i> (polimerazowa reakcja łańcuchowa)
PEF	– <i>peak expiratory flow</i> (szczytowy przepływ wydechowy)
PEP	– <i>positive expiratory pressure</i> (podwyższone ciśnienie wydechowe)
PTChP	– Polskie Towarzystwo Chorób Płuc
RV	– <i>residual volume</i> (objętość zalegająca)
TK	– tomografia komputerowa
TLC	– <i>total lung capacity</i> (całkowita pojemność płuc)



# 1. WSTĘP

Mukowiscydoza – zwłóknienie torbielowate (ang. *cystic fibrosis* – CF) jest jedną z najczęściej występujących chorób uwarunkowanych genetycznie w populacji rasy kaukaskiej, wywołaną mutacją pojedynczego genu, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny i prowadzącą do przedwczesnej śmierci. Występuje z częstością 1:2500 żywo urodzonych noworodków, a częstość nosicielstwa określana jest na 1:25 [1, 2]. W Stanach Zjednoczonych wśród rasy kaukaskiej choroba występuje z częstością 1:3200 żywo urodzonych, jest mniej powszechna u Afroamerykanów (1:15000) i stosunkowo rzadka u amerykańskich Azjatów (1:31000). W populacji amerykańskiej 71% rozpoznań jest ustalanych w pierwszym roku życia, jednak w 8% przypadków rozpoznanie nie jest postawione w okresie do 10 lat i coraz częściej ustalone w wieku dorosłym [3]. R.L. Gibson i wsp. określają występowanie choroby w USA wśród rasy białej z częstością od 1:1900 do 1:3700, dla Latynosów 1:9000, Azjatów 1:32000 i Afroamerykanów 1:15000. Średni wiek przeżycia chorych w populacji rasy białej w Stanach Zjednoczonych w opracowaniu z 2001 roku wynosił 33,4 roku, a najnowsze dane szacują średnią przeżycia na 36,8 roku [4, 5]. Przyczyną choroby są mutacje genu zlokalizowanego na długim ramieniu 7 chromosomu kodującego białko CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), pełniące między innymi funkcję kanału chlorkowego zależnego od cAMP, usytuowanego na szczytowej powierzchni komórek nabłonkowych gruczołów wydzielania zewnętrznego. W konsekwencji dochodzi do nieprawidłowego przetransportowania jonów chlorkowych, prowadzącego do zaburzeń transportu sodu i wody. Konsekwencją są zaburzenia czynnościowe gruczołów wydzielania zewnętrznego wskutek gromadzenia się w ich przewodach wyprowadzających gęstej i lepkiej wydzieliny, przede wszystkim w układzie oddechowym i pokarmowym. Gen CFTR scharakteryzowano i sklonowano w 1989 roku [6, 7]. W roku 1994 znanych było ponad 500 mutacji genu CFTR, a do 2001 roku zidentyfikowano ich prawie 1000 [3, 8, 9]. Według najnowszych danych przedstawionych przez Cystic Fibrosis Mutation Database z dnia 21.05.2013 roku znanych jest 1939 mutacji genu CFTR [10].

Najpowszechniej występuje mutacja oznaczona symbolem  $\Delta F508$ , której częstość w Polsce określono na 53–73%. W populacji europejskiej mutacja  $\Delta F508$  występuje z częstością 75–88% [2]. Częstość kilku innych mutacji określana jest na 1–3%, inne rozpoznawane są jeszcze rzadziej. W różnych populacjach wykrywalność wynosi 50–90% [1]. W późniejszym opracowaniu Witt i wsp. stwierdzili dużą heterogenność mutacji w genie CFTR w populacji polskich chorych i przewagę mutacji ograniczonych do rodzin, w których zostały

wykryte [11]. Rosenstein i wsp. przedstawili częstości występowania 24 mutacji genu CFTR. Częstość mutacji  $\Delta F508$  określili na 66%, mutacji G542X na 2,4%, mutacji G551D na 1,6%, N1303K na 1,3% i W1282X na 1,2%. Częstość występowania pozostałych mutacji oscylowała od 0,1 do 0,7% [3]. Podobnie inni autorzy stwierdzają częstszą identyfikację jedynie 22 mutacji oraz częstsze występowanie niektórych mutacji w poszczególnych grupach etnicznych, takich jak Żydzi aszkenazyjscy (W1282X), francuskojęzyczni Kanadyjczycy (G551D) i śródziemnomorska populacja Afrykanów (3,120+1G→A). Pozostałe mutacje występują niezmiernie rzadko, często są ograniczone do jednego lub kilku osobników [12, 13, 14].

Rozpoznanie mukowiscydozy może niekiedy sprawiać trudności. Spośród 1091 nowo rozpoznanych przypadków w Stanach Zjednoczonych w 2001 roku, tylko niewielki odsetek chorych (9,1%) został zidentyfikowany na podstawie badań przesiewowych noworodków lub diagnostyki prenatalnej (3,9%). Przeprowadzono pomiary stężenia immunoreaktywnej trypsyny lub trypsynogenu w surowicy krwi noworodków i badania molekularne [15, 16]. Znacznie częściej wstępne rozpoznanie choroby zostało postawione w oparciu o stwierdzone objawy ze strony układu oddechowego (43,8%), zaburzenia wzrostu (29,3%), stolce tłuszczowe (24,4%) i niedrożność smółkową (18,5%) [17]. W Polsce od 2006 roku realizowany jest program badań przesiewowych noworodków oparty o dwukrotne oznaczanie immunoreaktywnej trypsyny (IRT) w 3–6 dobie życia (IRT I) oraz w 4 tygodniu życia (IRT II). W przypadku nieprawidłowego stężenia IRT uzyskanego podczas pierwszego badania wykonywana jest analiza molekularna genu CFTR [2].

Polskie Towarzystwo Mukowiscydozy podaje, że w 2011 roku w Polsce urodziło się około 391 tysięcy dzieci i w liczbie tej zarejestrowano 68 chorych na mukowiscydozę. Częstość występowania choroby wyniosła 1:5750 żywo urodzonych. Około 2 milionów Polaków symetrycznie równie często kobiet i mężczyzn jest nosicielami zmutowanego genu CFTR. Polski Rejestr Mukowiscydozy w 1998 roku zawierał informacje o 899 żyjących chorych [18]. W sierpniu 1997 roku European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF) zarejestrował 11749 pacjentów [19]. Według danych Polskiego Rejestru Mukowiscydozy z października 2012 roku w Polsce żyje ok. 1550 chorych na mukowiscydozę, z czego 34,5% stanowią osoby dorosłe (0,97% chorych powyżej 40 roku życia).

Wyodrębnia się mukowiscydozę z objawami ze strony układu oddechowego, z objawami z przewodu pokarmowego, z objawami ze strony innych narządów oraz mukowiscydozę nieokreśloną. Kryteria rozpoznania choroby zostały zawarte w Stanowisku Polskiej Grupy Roboczej Mukowiscydozy, Wydaniu II

z 2002 roku i następnie w Zaleceniach Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy opublikowanych w 2009 roku oraz wspólnym Raporcie WHO/ICF(M)A/ECFN opublikowanym w tym samym roku i wcześniejszych opracowaniach [2, 20, 21, 22] (Tabela I).

Tabela I. Najczęstsze stany i objawy kliniczne występujące u chorych na mukowiscydozę wg Zaleceń Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy (2009)

Okres płodowy i noworodkowy	Okres niemowlęcy i poniemowlęcy	Okres dzieciństwa i dorosłości
zwapnienia w jamie otrzewnowej płodu	niedobór masy ciała	przewlekły kaszel
poszerzenie jelita cienkiego płodu w badaniu USG	przewlekły kaszel	nawracające zapalenia płuc
niedrożność smółkowa	nawracające zapalenia płuc, oskrzelików	polipy nosa
przedłużająca się cholesta-za wewnątrzwątrobowa	astma wczesnodziecięca	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych
	przewlekłe zakażenie dróg oddechowych <i>P. aeruginosa</i> i/lub <i>S. aureus</i>	rozstrzenie oskrzeli
	zmiany w rtg płuc – nawracająca niedodma, rozdęcie	palce pałeczkowate
	bardzo słony pot	krwioplucie
	odwodnienie z hipokaliemią, hiponatremią i zasadowicą hipochloremiczną (rzekomy zespół Barttera)	marskość żółciowa wątroby
	zapaść podczas upałów	kamica żółciowa u dzieci
	cuchnące, tłuszczowe, obfite stolce	nadciśnienie wrotne, żyłaki przełyku, splenomegalia
	objawy zespołu złego wchłaniania (konieczność różnicowania z celiakią)	nawracające zapalenie trzustki
	wypadanie błony śluzowej odbytnicy	cukrzyca
	objawy niedoboru witamin rozpuszczalnych w tłuszczach	niedobór wysokości i masy ciała
	hipoprotrombinemia	nawracające obrzęki ślinianek przyusznych
	hipoproteinemia i obrzęki	opóźnione dojrzewanie płciowe
		niepłodność mężczyzn (azoospermia obstrukcyjna)

Według przyjętych kryteriów do rozpoznania upoważnia stwierdzenie:

1. Przynajmniej jednego objawu klinicznego występującego w chorobie (Tabela I).
2. Występowania mukowiscydozy u rodzeństwa i/lub rodziców.
3. Dodatniego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku mukowiscydozy, łącznie z nieprawidłowym wynikiem jednego z poniższych badań:
  - a) próby potowej – wykazanie za pomocą jontoforezy pilokarpinowej znamiennej wysokiej stężenia anionów chlorkowych w pocie
  - b) badania molekularnego – wykrycie mutacji w obu allelach genu CFTR
  - c) pomiaru potencjałów elektrycznych błony śluzowej nosa – typowe dla chorych są niższe wartości niż w grupie osób zdrowych, a znacząco istotne zmniejszenie różnicy potencjałów występuje po podaniu amiloridu [2].

Dodatni wynik testu potowego powinien być potwierdzony wynikiem badania molekularnego, a w sytuacjach wątpliwych oznaczeniem przeczłonkowej różnicy potencjałów. Stężenia jonów chlorkowych w pocie powyżej 60 mmol/l do wartości maksymalnej około 140 mmol/l stwierdza się u 98–99% ogółu chorych na mukowiscydozę [23, 24]. Dwukrotne stwierdzenie przeczłonkowej różnicy potencjałów w przewodach nosowych, przekraczające wartość 25–30 mV potwierdza rozpoznanie [25, 26].

W przebiegu mukowiscydozy mają miejsce zaostrzenia choroby oskrzelowo-płucnej wymagające zwykle dożyłnej antybiotykoterapii. Zaostrzenie definiowane jest wystąpieniem co najmniej 2 z następujących objawów: nasilenie kaszlu, zwiększenie ilości ropnej wydzieliny, duszność, świszczący oddech, nieproduktywny kaszel, dodatkowe zmiany osłuchowe, progresja istniejących lub nowe zmiany radiologiczne, obecność nowych patogenów, pogorszenie wskaźników spirometrycznych, nasilenie hipoksemii i/lub hiperkapnii, utrata łaknienia, obniżenie masy ciała, zmniejszenie tolerancji wysiłku, stany podgorączkowe lub gorączka, wzrost wartości wskaźników zapalenia [27].

Mukowiscydoza jest chorobą wielonarządową, której przebieg kliniczny uzależniony jest od wielu czynników, w tym również obecności chorób współistniejących. Decydujące znaczenie dla jakości i długości życia mają zmiany anatomiczne i zaburzenia czynnościowe w układzie oddechowym. Skorupa i wsp. podają, że kliniczne jawne objawy ze strony układu oddechowego charakteryzują się różnym okresem wystąpienia i stopniem zaawansowania [28]. Pojawiają się rzadko w okresie noworodkowym, aby później do 6 miesiąca życia manifestować się zwiększoną częstością oddychania, świstami, znacznym wysiłkiem oddechowym, nadmiernym rozdęciem płuc i kaszlem. Wymienione objawy mogą zostać zapoczątkowane lub ulegać zaostrzeniu wskutek wirusowych infekcji dróg oddechowych. Gromadzący się w drogach oddechowych gęsty,

lepki śluz zamyka oskrzeliki, powodując rozdęcie i odcinkową niedodmę tkanki płucnej. W konsekwencji dochodzi do stałej kolonizacji bakterii w drogach oddechowych, rozwoju przewlekłego, ropnego zakażenia i postępującego uszkodzenia układu oddechowego. Głównym patogenem u chorych w młodszym wieku jest *Staphylococcus aureus*, u chorych dorosłych śluzowy typ *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzany w 80–90% przypadków [29].

Najczęściej wykorzystywanym materiałem do wykrywania zakażeń dróg oddechowych jest wykrztuszana plwocina. Uzyskanie jej może być utrudnione u dzieci i chorych dorosłych nieodkrztuszających. W kilku badaniach porównujących przydatność plwociny i BAL do identyfikacji drobnoustrojów w hodowli wykazano czułość w stosunku do *P. aeruginosa* odpowiednio na poziomie 44 i 95% oraz dobrą swoistość wynoszącą 95 i 90–99%. Dotychczasowe obserwacje sugerują, że ujemny wynik hodowli wyklucza zakażenie *P. aeruginosa*, a wynik dodatni nie stanowi jego pewnego rozpoznania. W przypadku progresji choroby lub braku odpowiedzi na leczenie i u osób nie wykrztuszających wskazane jest zakładanie hodowli z materiału uzyskanego z BAL [30, 31].

Wczesna infekcja dróg oddechowych w mukowiscydozie jest najczęściej spowodowana przez *S. aureus* i *H. influenzae*, mikroorganizmy często są wykrywane u młodszych dzieci z chorobami przewlekłymi i u dorosłych z rozstrzeniami oskrzeli z przyczyn innych niż mukowiscydoza. *H. influenzae* jest powszechnie hodowaną bakterią z dolnych dróg oddechowych w pierwszym roku życia, a *S. aureus* nierzadko pierwszym patogenem u dzieci młodszych. Burns wykazał, że średnia wieku w okresie pierwszych trzech lat życia chorych, u których wykrywano przeciwciała przeciwko *P. aeruginosa* była zbliżona do 15 miesięcy, podczas gdy średnia wieku, w którym po raz pierwszy wyhodowano bakterię wynosiła 21 i 23 miesiące [32]. Czynniki ryzyka sprzyjającymi zakażeniu dróg oddechowych pałeczkami *P. aeruginosa*, stwierdzonymi przez Maselli podczas badań przesiewowych noworodków, okazały się płeć żeńska i genotyp homozygoty F508del [33]. Wykazano, że ponad 80% pacjentów z mukowiscydozą jest zakażonych tym patogenem [17]. Thomassen wskazał na fakt, że w okresie późniejszym w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę wykrywa się bakterie *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Achromobacter xylosoxidans* oraz grzyby *Aspergillus* i mikobakterie niegruźlicze. Spośród nich zakażenie *B. cepacia* jest najpoważniejsze, towarzyszyć może zespołowi *B. cepacia* prowadzącemu do wysokiej gorączki, szybko postępującej bakteriemii, zmian martwiczych i śmierci. Większość zakażeń ma przewlekły przebieg z pogorszeniem czynności płuc i wzrostem śmiertelności pacjentów. W zaawansowanej chorobie oskrzelowo-płucnej *S. maltophilia* i *A. xylosoxidans* występują częściej niż *B. cepacia*, lecz są na ogół mniej zjadliwe [34].

Gibson uważa, że kolonizacja dróg oddechowych grzybami u chorych na mukowiscydozę może być związana z progresją choroby oraz częstą antybiotykoterapią o szerokim spektrum. Kolonie *Candida spp.* izolowane, u co najmniej 50–75% pacjentów, traktowane są zwykle jako nieszkodliwe komensale. Obecność *Aspergillus spp.* i częstszego *Aspergillus fumigatus* stwierdza się u ponad 25% chorych. Uzyskanie dodatniej hodowli *Aspergillus* w nieobecności alergicznej aspergillozy oskrzelowo-płucnej (ABPA) nie jest wystarczającym powodem do powszechnego leczenia. Zakażenia inwazyjne spowodowane przez grzyby z gatunku *Aspergillus* są rzadkie w populacji chorych z prawidłową odpowiedzią immunologiczną, u których nie wykonywano przeszczepu płuc. Stwierdzono natomiast, że ABPA, rozpoznawana u 2–8% chorych na mukowiscydozę, stanowi może u części z nich istotny problem kliniczny. Pozostałe infekcje grzybicze dotyczą 8,6% pacjentów i obejmują *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium*, *Wangiella dermatitidis* i *Penicillium emersonii* [4].

Coraz częściej w materiale pochodzącym z dróg oddechowych osób chorych na mukowiscydozę stwierdza się mikobakterie niegruźlicze. W badaniach przeprowadzonych przez Olivier i wsp. obejmujących 21 ośrodków chorych leczonych na mukowiscydozę w Stanach Zjednoczonych, u 13% osobników wyhodowano mikobakterie niegruźlicze z płwociny. Najczęściej izolowane były *Mycobacterium avium complex* (72%) i *Mycobacterium abscessus* (16%). Wzrost mykobakterii niegruźliczych stwierdzano częściej u starszych chorych i zakażonych *S. aureus*, rzadziej w przypadku współistniejącego zakażenia *P. aeruginosa*. [35].

Żebrak potwierdza spostrzeżenia innych autorów dotyczące zmian w układzie oddechowym w przebiegu choroby, gdy kaszel z wykrztuszaniem ropnej płwociny jest dominującym objawem. W mukowiscydozie o łagodnym przebiegu produktywny kaszel występować może wyłącznie w okresie zaostrzeń choroby oskrzelowo-płucnej. Wraz z postępem zmian morfologicznych w układzie oddechowym dochodzi do pogorszenia komfortu życia, rozwoju serca płucnego i niewydolności oddechowej wymagającej przewlekłego leczenia tlenem. W okresie zaawansowania choroby obecność śladowych ilości krwi w płwocinie lub bardziej nasilone krwioplucie i odma opłucnowa nie są zjawiskami nadzwyczajnymi. Choroba oskrzelowo-płucna stanowi przyczynę śmierci ok. 80% chorych [36].

U większości dorosłych z mukowiscydozą współistnieje niewydolność zewnętrznydzielnicza trzustki [37], a u części zaburzona funkcja wewnętrznydzielnicza tego narządu. Cukrzyca związana z mukowiscydozą (CFRD – ang. cystic fibrosis related diabetes) ujawnia się u 15–25% dorosłych chorych. Stanowi marker zaawansowania choroby powiązany ze wzrostem śmiertelności. [38].



Podstawowymi badaniami stosowanymi w ocenie stanu czynnościowego płuc są spirometria i pletyzmografia. Okresowo wykonywane pomiary pozwalają określić wielkość strat rezerw wentylacyjnych płuc. Cooper wykazał, że jednym z parametrów ulegających zmianie we wczesnym okresie choroby jest wzrost objętości zalegającej – RV (residual volume) i wzrost wskaźnika objętości zalegającej do całkowitej pojemności płuc – RV/TLC (TLC – total lung capacity), świadczące o pułapce powietrznej [39]. Szczególne znaczenie w określeniu zaawansowania zaburzeń obturacyjnych, monitorowaniu zaostrzeń i odpowiedzi na leczenie ma natężona objętość wydechowa w czasie pierwszej sekundy – FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in 1 second). Obniżaniu wartości FEV<sub>1</sub> w przebiegu choroby towarzyszy obniżenie wartości natężonej pojemności życiowej – FVC (forced vital capacity), spowodowane m.in. włóknieniem płuc, pułapką powietrzną i zwiększeniem przestrzeni martwej. Emmerson podaje, że w populacji amerykańskich chorych na mukowiscydozę roczne obniżenie wartości FEV<sub>1</sub> wynosi 2%. Czynnikiem, które na to wpływają, są: stan odżywienia, cukrzyca, kolonizacja bakteriami *P. aeruginosa* i *B. cepacia* oraz częste zaostrzenia choroby. Niezaburzona czynność trzustki i obecność łagodnej mutacji genu CFTR powodują wolniejsze obniżanie wartości FEV<sub>1</sub> [40].

W oparciu o standardowe radiogramy klatki piersiowej i systemy punktowej oceny Chrispin-Norman z 1974 roku (Chrispin-Norman 1974) i Brasfield z 1979 roku (Brasfield 1979), można określić stopień progresji zmian w płucach w przebiegu choroby. Systemy te odznaczają się mniejszą czułością w ocenie zmian radiologicznych związanych z zaostrzeniami, wczesnym okresem i niewielkim zaawansowaniem choroby oskrzelowo-płucnej. Niejednorodne zmiany w różnych częściach płuc wynikają z obecności guzków, torbieli, pęcherzy rozedmowych, a także rozstrzeni oskrzeli, obszarów niedodmy i rozedmy oraz zągęszczeń zapalnych i włóknień. Rozdęcie płuc, spłaszczenie przepony oraz zwiększenie przestrzeni zamostkowej czy deformacje klatki piersiowej ze zwiększeniem wymiaru przednio-tylnego mogą pojawić się w dzieciństwie i pozostawać dominującymi zmianami w okresie całego życia chorych [41, 42, 43].

Alternatywnymi metodami wymagającymi specjalnego oprogramowania komputerowego są: system Wisconsin z 1993 roku, polecany do oceny zmian mało zaawansowanych (Weatherlea 1993), system Northern z 1994 roku, oparty o standardowe radiogramy w projekcji tylnoprzodniej (Conway 1994) oraz system Birmingham. S. Terheggen-Lagro i wsp. dokonali porównania wymienionych systemów oceny punktowej z systemem Shwachmana-Kulczyckiego i wybranymi parametrami klinicznymi. Stwierdzili niską zmienność uzyskanych wyników we wszystkich systemach, szczególnie w skali Chrispin-Norman oraz dobrą korelację z wartościami FEV<sub>1</sub> i liczbą zaostrzeń choroby [44, 45].

Gutierrez, Rosenberg i Cleceland potwierdzili wysoką zgodność najczęściej wykorzystywanych systemów Chrispin-Norman i Brasfield oraz ich dobrą korelację z wartościami parametrów czynnościowych, szczególnie FEV<sub>1</sub> i FVC. Wykazali zależności pomiędzy systemami oceny zmian radiologicznych a wiekiem chorych, płcią i wskaźnikiem masy ciała [46, 47, 48, 49].

Jarad i wsp. stwierdzili obniżone wartości FEV<sub>1</sub> u chorych z cukrzycą i kolonizacją dróg oddechowych przez *P. aeruginosa*, wymagających intensyfikacji leczenia, oraz u chorych z obniżonymi wartościami BMI [50]. Gurney wykazał zależność pomiędzy lokalizacją i intensywnością zmian radiologicznych w płucach a ich czynnością, stwierdzając, że mniej zaawansowanym zmianom w obrębie dolnych pól płucnych odpowiadają wyższe wartości parametrów spirometrycznych [51].

Dokładniejszą ocenę narządów klatki piersiowej, polecaną przez Linne oraz Brody umożliwia tomografia komputerowa oraz oparty o nią system punktowej oceny Bhalla z 1991 roku. Badanie pozwala rozpoznać i określić zaawansowanie rozstrzeni oskrzeli, pogrubienie ścian oskrzeli, czopy śluzu, ropnie płuc oraz pęcherze rozedmowe i zagęszczenia mięszu płuc. TK wysokiej rozdzielczości – HRCT (high resolution computed tomography) odznacza się większą czułością i swoistością w rozpoznawaniu zmian śródmiąższowych płuc, rozstrzeni oskrzeli oraz w ocenie grubości ścian oskrzeli i wielkości pułapki powietrznej, szczególnie we wczesnym okresie choroby. Wykorzystywana jest także do oceny odpowiedzi na antybiotykoterapię stosowaną w okresie zaostrzenia choroby. Badania przeprowadzone przez Brody na grupie 60 osób chorych na mukowiscydozę wykazały obecność rozstrzeni oskrzeli w 35% przypadków, czopów śluzu w 15% i objawów pułapki powietrznej u 63% chorych. Prawidłowy obraz radiologiczny stwierdzono u 25% chorych. W diagnostyce narządów jamy brzusznej stosowana jest ultrasonografia i w wybranych przypadkach TK [52, 53].

Jak podaje Konstan, bronchofiberoskopia stanowiąca element diagnostyki inwazyjnej układu oddechowego pozwala określić zmiany anatomiczne i zapalne w oskrzelach dostępnych badaniu, a także wykonać płukanie oskrzelowe i oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL – bronchoalveolar lavage) oraz pobrać wycinki błony śluzowej oskrzeli. Uzyskany materiał badawczy poddany może być ocenie mikrobiologicznej, cytologicznej i histopatologicznej [54].

Według Mazurczaka terapia chorych na mukowiscydozę powinna obejmować postępowanie wielospecjalistyczne zależne od ich stanu klinicznego i wieku. Zasadnicze znaczenie odgrywają zmodyfikowane metody żywienia, profilaktyka i leczenie choroby oskrzelowo-płucnej oraz chorób współistniejących i powikłań mukowiscydozy [55]. Wskazana jest dieta wysokoenergetyczna dostosowywana

do indywidualnych potrzeb chorego w taki sposób, by utrzymać prawidłowy stan odżywienia oraz zapobiegać niedożywieniu lub je leczyć. Zapotrzebowanie energetyczne chorych na mukowiscydozę stanowi 120–150% zapotrzebowania osób zdrowych w tym samym wieku. W prawidłowo skomponowanej diecie białka powinny dostarczać 15% energii, tłuszcze 35–45% a węglowodany 40–50%. Znaczne niedożywienie lub nieskuteczne leczenie wymaga rozważenia inwazyjnych metod żywienia przy użyciu zgłębników nosowo-żołądkowych, przezskórnej, endoskopowej gastrostomii (PEG) lub żywienia pozajelitowego. W przypadku zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki Sinaasappel wskazuje na konieczność stosowania stałej suplementacji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i preparatów enzymów trzustkowych. Wskazana jest zwiększona podaż NaCl. Leczenie nowych zakażeń i zaostrzeń choroby oskrzelowo-płucnej wymaga stosowania antybiotykoterapii celowanej, opartej o wynik lekowrażliwości, zwykle przez okres 14 dni. W przewlekłej kolonizacji dróg oddechowych przez bakterie *P. aeruginosa* zalecane jest stosowanie w trybie ciągłym lub sekwencyjnym antybiotyków w formie wziewnej. Ponadto stosuje się leki rozszerzające oskrzela, przeciwzapalne, mukolityki oraz fizjoterapię i leczenie tlenem [56]. Mukolityki mają za zadanie upłynnienie gęstej wydzieliny zalegającej w oskrzelach, a beta-2-mimetyki rozszerzenie oskrzeli. Leczenie przeciwzapalne oparte jest najczęściej na wieloletnim podawaniu glikokortykosteroidów systemowych, niesteroidowych leków przeciwzapalnych i antybiotyków makrolidowych. Przewlekła domowa tlenoterapia jest wskazana w przypadku niewydolności oddechowej chorych. Pacjentom chorym na mukowiscydozę zaleca się przeprowadzenie szczepień zgodnie z obowiązującym kalendarzem [57, 58].

Fizjoterapia z zastosowaniem technik drenażowych ma na celu przeciwdziałanie rozwojowi choroby oskrzelowo-płucnej poprzez regularną ewakuację nadmiernej ilości wydzieliny z dróg oddechowych. Metody fizjoterapii rekomendowane przez Physiotherapy Group for Cystic Fibrosis obejmują drenaż ułożeniowy, technikę natężonego wydechu, technikę aktywnego cyklu oddechowego i drenaż autogeniczny oraz stosowanie zmiennego ciśnienia oskrzelowego (Flutter, Acapella, Cornet) i podwyższonego ciśnienia wydechowego (system PEP). Wybór techniki drenażowej u dorosłych chorych oraz liczba i czas trwania pojedynczej sesji uzależnione są od ilości wydzieliny zalegającej w oskrzelach. Zwykle drenaż wykonywany jest 2–3 razy na dobę w czasie 15–20 minut, a przy znacznym zaawansowaniu choroby wykonuje się dwukrotnie [2, 59].

W zaawansowanym okresie choroby powinno się rozważyć obustronny przeszczep płuc w oparciu o ogólnie przyjęte zasady. Decyzja o wykonaniu przeszczepu u poszczególnych chorych może stwarzać trudności z uwagi na zmienny przebieg choroby i ryzyko powikłań [60, 61].

Transplantacja płuc stwarza szansę wydłużenia czasu przeżycia i poprawy jego jakości. Bech i wsp. uzyskali jednoroczny okres przeżycia chorych po przeszczepie w 89% przypadków. Przeżycia od 3 do 5 lat osiągnęło 80%, a 8 lat 70% chorych, przy śmiertelności okołooperacyjnej wynoszącej 3,5%. Przyczyną śmierci była niewydolność oddechowa, zarostowe zapalenie oskrzelików oraz zakażenia *Cytomegalovirus* i *Aspergillus fumigatus*. Wśród chorych zakwalifikowanych do przeszczepu śmiertelność w pierwszym roku oczekiwania wyniosła 28%, a w drugim 11%. Przeszczep płuc powoduje między innymi znaczną poprawę średniej wartości  $FEV_1$  z 20 % przed zabiegiem do 71% po przeszczepie [52, 63]. Nieco gorsze wyniki uzyskali Padilla oraz Atari stwierdzając przeżycie pierwszego roku po transplantacji odpowiednio u 83,7% i 74,5% chorych, okresu 2 do 3 lat po zabiegu u 77,3% i 62,9% oraz przeżycia pięcioletnie u 66,9% i 54,1% chorych. Atari uzyskał okres dziesięcioletniego przeżycia u 43,4% pacjentów. Śmiertelność okołooperacyjna wynosiła wg tych autorów odpowiednio 8,7% i 16,4% i była skutkiem powikłań związanych z zabiegiem, znieczuleniem oraz uogólnionym zakażeniem i zapaleniem mięśnia sercowego [64, 65].

Badania Aignera dowiodły, że największe korzyści z przeszczepu płuc odnoszą pacjenci z prawdopodobieństwem pięcioletniego przeżycia wynoszącym mniej niż 50%. Nieco gorsze przy prawdopodobieństwie 30% i w zakresie 30–50% [66].

Nową perspektywę leczenia zapoczątkowały podjęte w latach dziewięćdziesiątych doświadczenia w zakresie terapii genowej. Nośnikami genów w większości badań przedklinicznych i klinicznych były rekombinowane adenowirusy, wirusy towarzyszące adenowirusom, kationowe liposomy lub kationowe polimery. Wyniki dotychczasowych prac nie przyniosły jednak spodziewanych rezultatów. Aktualne działania zmierzają do optymalizacji technologii pozyskiwania nośników oraz zrozumienia i wyeliminowania immunologicznych oraz mechanicznych barier uzyskania pożądanego genu [67, 68].

Udoskonalenie metod diagnostyki i leczenia spowodowało poprawę jakości i wydłużenie życia chorych na mukowiscydozę, lecz wyniki są nadal niezadowalające.

Greenwood i Holland w 1975 roku, a później inni autorzy, podali opis ultrastruktury błony śluzowej oskrzeli. Powierzchnię pokrywa walcowaty nabłonek wielorzędowy, urzęsiony i położony na błonie podstawnej. Tworzą go komórki urzęsione, kubkowe, komórki podstawne pluripotencjalne, szczoteczkowe produkujące bufor zawierający niewiele białek o rzadkich wiązaniach molekularnych, neurodokryne związane z odbieraniem bodźców i szczoteczkowe niedojrzałe. Błazka właściwa błony śluzowej, zbudowana z tkanki łącznej wiotkiej, zawiera włókna sprężyste, limfocyty, pojedyncze komórki tuczne, makrofagi

oraz niedużą liczbę gruczołów surowiczno-śluzowych. Blaszką sprężystą położoną u podstawy blaszki właściwej w tchawicy i oskrzelach głównych tworzy ciągłą strukturę oddzielającą blaszkę właściwą błony śluzowej od błony podśluzowej. Od poziomu oskrzeli płatowych nie obejmuje całego obwodu, występując u podstawy blaszki właściwej w bezpośrednim sąsiedztwie warstwy mięśniowej w formie równoległych pasm, zbudowanych z włókien sprężystych, zwanych pasmami sprężystymi. Pasma te biegną nieprzerwanie aż do końca oskrzelików, rozdzielając się w miejscach rozgałęzień drzewa oskrzelowego. Warstwa mięśni gładkich (pęczek skrzyżowanych komórek mięśniowych gładkich) położona na granicy błony podśluzowej i blaszki właściwej błony śluzowej, począwszy od oskrzeli płatowych obejmuje cały obwód oskrzeli. W błonie podśluzowej zbudowanej z tkanki łącznej wiotkiej znajdują się chrząstki (oskrzela główne) lub płytki chrzęstne (oskrzela płatowe i dalsze do 12 podziałów dychotomicznych) zbudowane z chrząstki szklistej. W tkance łącznej błony podśluzowej występują włókna kolagenowe wnikające w ochręstną i spajające chrząstki. Przy wewnętrznej stronie chrząstek znajdują się gruczoły oskrzelowe, wytwarzające wydzielinę śluzowo-surowiczą [69, 70].

Prawidłowy nabłonek dróg oddechowych jest nabłonkiem walcowatym wielorzędowym urzęsionym, w którym dominują komórki urzęsione. Niezależnie od poziomu dróg oddechowych struktura komórek urzęsionych jest prawie identyczna. Na powierzchni komórki urzęsionej znajdują się gęsto ułożone obok siebie rzęski i nieliczne mikrokosmki. W nabłonku urzęsionym dróg oddechowych człowieka w warunkach fizjologicznych na jedną komórkę przypada ok. 200 rzęsek, a sam nabłonek urzęsiony w dolnych drogach oddechowych zajmuje powierzchnię ok. 5000 cm<sup>2</sup> [71, 72].

Geremek, Witt oraz Seget przedstawiają rzęski jako ruchome organelle komórek urzęsionych pokryte wypustkami błony cytoplazmatycznej. Zasadniczą część rzęski stanowi otoczona cytoplazmą podstawową aksonema, będąca swoistym aparatem ruchowym rzęski. Aksonema przebiegająca przez całą długość rzęski zbudowana jest z 9 dubletów mikrotubul obwodowych ułożonych w pierścień oraz 2 pojedynczych mikrotubul centralnych. Taki układ mikrotubul został określony wzorem 9+2. Mikrotubule utworzone są z białka tubuliny. Pojedyncza cząsteczka tubuliny jest dimerem zbudowanym z tubuliny  $\alpha$  i tubuliny  $\beta$ . Dimery tubuliny na skutek polimeryzacji ulegają połączeniu w sznury określane protofilamentami. Z kolei protofilamenty, łącząc się bokami, tworzą układ rurkowatych mikrotubul. Pojedyncza para mikrotubul złożona jest z 2 podjednostek. Podjednostka A zbudowana z 13 protofilamentów tubulinowych znajduje się bliżej osi rzęski, natomiast podjednostka B umieszczona bardziej zewnątrz złożona jest z 11 protofilamentów własnych i 2 wspólnych z mikrotubulą A, do której przyle-

ga. Pomiedzy dubletami mikrotubule A i B połączone są ze sobą zewnętrznymi i wewnętrznymi ramionami dyneiny. Sąsiadujące ze sobą mikrotubule obwodowe dodatkowo połączone są za pomocą wiązań nekсынowych. Położone na obwodzie pary mikrotub połączone są promieniami łączącymi z dwiema mikrotubulami centralnymi otoczonymi otoczką centralną. Aksonema, tworząca rdzeń rzęski, poniżej poziomu powierzchni komórki przechodzi w kinetosom (ciałko podstawne). Zmianie ulega układ mikrotubul, tworzą się tryplety i zanikają mikrotubule centralne. Położona poniżej ciała podstawnego sieć graniczna zbudowana z mikrofilamentów mocuje aksonemę z siecią włókienek szkieletowych komórki [73, 74]. Wyizolowane z ramienia dyneinowego białko dyneina wykazuje aktywność ATP-azy zależnej od  $Ca^{+2}$  i  $Mg^{+2}$  i odgrywa zasadniczą rolę w mechanizmie ruchu rzęski. Prawidłowo funkcjonujące rzęski w drzewie oskrzelowym mają podstawowe znaczenie w sprawnym przemieszczaniu wydzieliny pokrywającej nabłonek tchawicy i oskrzeli. Zaburzenia wewnętrznej struktury rzęsek stanowią przyczynę nieefektywnego lub nieprawidłowego ich ruchu, a w konsekwencji gromadzenia śluzu i kolonizacji bakterii w drogach oddechowych [75].

Przewlekłe zakażenie i stan zapalny dróg oddechowych w przebiegu mukowiscydozy powodują powstanie różnorodnych zmian morfologicznych w układzie oddechowym. Jakościowa i ilościowa analiza tych zaburzeń przeprowadzona przez Doveya ujawniła liczne, jednak nieswoiste dla mukowiscydozy zaburzenia. Wykorzystanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej w ocenie dużych oskrzeli pozwoliło na stwierdzenie zmniejszonej liczby komórek urzęsionych i rzęsek oraz zwiększenie liczby mikrokosmków na powierzchni komórek urzęsionych o 17% w porównaniu z chorymi z przewlekłym zapaleniem oskrzeli i o 37% w odniesieniu do osób zdrowych. Dovey zwrócił uwagę na występowanie obrzmiałych komórek nabłonka i poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych. Stwierdził pogrubienie błony podstawnej oraz jej uwypuklenia do regionów połączenia błony podstawnej z elementami fibrylarnymi blaszki właściwej. Obrzmiała cytoplazma komórkowa zawierała poszerzone retikulum endoplazmatyczne, obrzmiałe mitochondria oraz zwiększoną liczbę lizosomów i cytolizosomów. Przestrzenie międzykomórkowe wypełnione były wysiękiem z fragmentami zdegenerowanego nabłonka i zawierały limfocyty. Ponadto Dovey zwrócił uwagę na grubą warstwę śluzu pokrywającego nabłonek, zwiększenie liczby komórek kubkowych i liczne komórki pozbawione rzęsek, a także poszerzone przewody wyprowadzające gruczołów. Nieprawidłowości budowy rzęsek obejmowały: brak mikrotubul centralnych, zmianę położenia dubletów mikrotubul obwodowych, pojedyncze mikrotubule zamiast dubletów, brak błony komórkowej pokrywającej rzęski, nadmiar macierzy cytoplazmatycznej i rzę-



ski olbrzymie zawierające nadmierną liczbę układów aksonemy pod wspólną błoną komórkową. Natomiast struktura ramion dyneiny, mostków neksynowych i promieni łączących była prawidłowa, co ma istotne znaczenie w rozumieniu funkcji rzęsek. Zmiany o podobnym charakterze obserwowano w oskrzelikach. W pęcherzykach płucnych wykazano cechy uszkodzenia i regeneracji pneumocytów oraz zmniejszenie liczby mikrokosmków na wolnej powierzchni pneumocytów II typu. Do innych zmian należały: nadmierna wakuolizacja cytoplazmy, ubytki błony komórkowej oraz martwica i odczyny regeneracyjne komórek. Nabłonki regenerujące zostały opisane jako zjawisko stale obecne w oskrzelach i w oskrzelikach po nawrotach odczynów zapalnych. Podobne spostrzeżenia poczynili Wunderlich w 1986 oraz Kondradova, Daniel i Leigh [76, 77].

Dovey w swych pracach wykazał występowanie metaplazji płaskonabłonkowej w błonach śluzowych oskrzeli chorych na mukowiscydozę. Wielonarządowy charakter zmian, a w szczególności postępujące zaburzenia morfologiczne i czynnościowe układu oddechowego w przebiegu mukowiscydozy prowadzą nieuchronnie do przedwczesnej śmierci chorych. Progresja zmian oskrzelowo-płucnych uwarunkowana jest obecnością procesów zapalnych obejmujących wszystkie struktury płuc. Etapowość przebiegu zmian zapalnych nabłonka oskrzeli i ich wielokrotne nawroty mogą prowadzić do metaplazji płaskonabłonkowej oraz dysplazji, co stanowi czynnik ryzyka rozwoju raka [76].

## 2. CELE PRACY

Postęp w opiece pediatrycznej nad chorymi z mukowiscydozą wpływa na czas przeżycia chorych i coraz więcej osób dożywa wieku dorosłego. Ten okres trwania choroby jest znacznie gorzej opisany aniżeli mukowiscydoza w wieku dziecięcym. Z tego powodu podjęto szczegółową analizę grupy chorych dorosłych na mukowiscydozę leczonych w Katedrze i Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej w Poznaniu.

Cel główny:

Celem pracy jest pierwsza w Polsce, kompleksowa analiza kliniczno-patomorfologiczna dotycząca grupy dorosłych chorych na mukowiscydozę w kontekście wpływu czasu trwania i zaostrzeń choroby na zmiany strukturalno-czynnościowe układu oddechowego oraz na stan kliniczny chorych.

Cele cząstkowe:

1. Określenie stopnia klinicznego zaawansowania mukowiscydozy w grupie dorosłych chorych.
2. Makroskopowa ocena nasilenia zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym przy wykorzystaniu bronchofiberoskopu i skali Thompsona w modyfikacji własnej.
3. Identyfikacja flory bakteryjnej i grzybiczej występującej w drzewie oskrzelowym u dorosłych chorych na mukowiscydozę.
4. Określenie zmian radiologicznych w badanej grupie chorych.
5. Ocena zmian histopatologicznych w nabłonku i błonie śluzowej właściwej oskrzeli na podstawie badań w mikroskopie świetlnym i elektronowym.
6. Poszukiwanie w nabłonku oskrzelowym przekształceń o charakterze przednowotworowym.
7. Wykazanie korelacji między wybranymi czynnikami określającymi zaawansowanie choroby.



## **3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

### **3.1. Materiał kliniczny**

Badania przeprowadzono na grupie 33 dorosłych chorych na mukowiscydozę, którzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badaniami objęto 17 kobiet i 18 mężczyzn w wieku od 18 do 38 lat (średnia wieku 23,6), hospitalizowanych w Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej w Poznaniu z powodu choroby oskrzelowo-płucnej. W okresie 2 lat prowadzenia badań pod opieką kliniki było 40 dorosłych chorych na mukowiscydozę. Siedmioro spośród nich z uwagi na łagodny przebieg choroby, dobry stan kliniczny i brak zaostrzeń nie zostało włączonych do badań. Pacjenci ci wymagali jedynie okresowej kontroli pulmonologicznej w Poradni Mukowiscydozy.

### **3.2. Metody potwierdzające rozpoznanie mukowiscydozy**

#### **3.2.1. Test potowy**

Oznaczenia stężenia jonów chlorkowych w pocie przeprowadzано metodą jontoforezy pilokarpinowej w co najmniej dwóch odrębnie wykonanych badaniach. Stężenie anionów chlorkowych  $> 60$  mmol/L stanowiło wartość wysoce znamiennej. Analizie chemicznej poddawano próbki zawierające co najmniej 100 mg potu. Rozpatrywano przyczyny mogące powodować wyniki fałszywie dodatnie, takie jak wyparowanie wody z bibuły, zanieczyszczenie próbek, nerkowpochodna moczówka prosta, zapalenie skóry, choroba Addisona, dysplazja entodermalna, glikogenoza I typu, nieleczona choroba trzewna i niedoczynność tarczycy. Wykluczono przyczyny wpływające na uzyskanie wyników fałszywie ujemnych, obejmujące złe rozcieńczenie próbki, znaczne niedożywienie i obrzęki. Test potowy wykonywano wyłącznie u pacjentów wcześniej niezdiagnozowanych. [2].

#### **3.2.2. Identyfikacja mutacji genu CFTR**

Materiał diagnostyczny stanowiło 10 ml krwi pobranej od pacjenta na werseńian dwusodowy (EDTA), po uprzednim uzyskaniu zgody na badanie. Identyfikację mutacji genu CFTR przeprowadzono przy użyciu testów INNO-LiPA. Zastosowano zestaw Innogenetics PCR INNO-LiPA CFTR 17+Th Update (17 mutacji oraz polimorfizm) i INNO-LiPA CFTR 19 (19 mutacji). W wybranych przypadkach wykorzystywano reakcję trawienia enzymami restrykcyjnymi

RELP zgodnie z zaleceniami producenta testów – Innogenetics. Testy genetyczne przeprowadzono u dotychczas niezdiagnozowanych chorych w Zakładzie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu (kier. prof. dr hab. Michał Witt).

### 3.3. Metody oceny klinicznej

#### 3.3.1. Kryteria oceny klinicznej według Shwachmana i Kulczyckiego

Do oceny klinicznego zaawansowania mukowiscydozy wykorzystano skalę punktową Shwachmana i Kulczyckiego umożliwiającą określenie nasilenia zaburzeń w zakresie aktywności fizycznej, kaszlu i duszności, dźwięków oddechowych, rytmu serca oraz wzrastania, odżywienia, dojrzewania płciowego i zmian radiologicznych klatki piersiowej. Uzyskane wartości 86–100 punktów określały stan kliniczny jako bardzo dobry, 71–85 jako dobry, 56–70 dość dobry, 41–55 umiarkowany i poniżej 40 jako ciężki (Tabela III).

#### 3.3.2. Wskaźnik masy ciała

Podczas hospitalizacji chorych określano wartość wskaźnika masy ciała (BMI – body mass index), definiowanego jako [masa ciała w (kg)]/[wzrost (m<sup>2</sup>)]. Zakresy wartości BMI wyznaczające stany odżywienia, przyjęte przez Raport Światowej Organizacji Zdrowia w 2000 r., przedstawiono w tabeli II. [78]. Niedobór masy ciała określony został przez wartość BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup> [79, 80, 81, 82].

Tabela II. Klasyfikacja stanu odżywienia wg WHO z 2000 roku

Wartość BMI	Stan odżywienia
< 18,50 < 16,00 16,00–16,99 17,00–18,49	<b>niedobór masy ciała</b> ciężkie wychudzenie umiarkowane wychudzenie łagodne wychudzenie
<b>18,50–24,99</b>	<b>prawidłowa masa ciała</b>
≥ 25,00	<b>nadwaga</b>
25,00–29,00	przedotyłość
≥ 30,00 30,00–34,99 35,00–39,99 ≥ 40,00	<b>otyłość</b> otyłość I stopnia otyłość II stopnia otyłość III stopnia (ekstremalna)

Tabela III. Kryteria oceny klinicznej chorych na mukowiscydozę wg Shwachmana i Kulczyckiego [94]

Liczba punktów	Dane wywiadu	Zmiany w płucach stwierdzane badaniem fizykalnym	Wzrastanie i odżywienie	Zmiany radiologiczne w płucach
25	pełna aktywność fizyczna, dobra tolerancja wysiłku, prawidłowy rozwój motoryczny, systematyczna nauka w szkole	brak kaszlu, oddech i tętno w granicach prawidłowych, płuca osłuchowo i opukowo bez zmian, prawidłowa postawa, nie stwierdza się palców pateczkowatych	masa ciała i wysokość > 25 centyla, prawidłowa masa i napięcie mięśni, prawidłowa podściółka tłuszczowa, dojrzalszość płciowa odpowiednia do wieku, dobry apetyt, stolce prawidłowo sformowane	pola płucne bez zmian
20	gorsza tolerancja wysiłku, szybkie męczenie się, zmęczenie pod koniec dnia, okresowo rozdrażnienie lub bierność, systematyczne uczęszczanie do szkoły	spordyczny kaszel, częstość oddechów i tętno w granicach normy, okresowo słyszalny szorstki szmer pęcherzykowy, fureczenia, wydłużona faza wydechowa, dobra postawa, minimalnie zaznaczona pateczkowatość palców	wysokość i masa ciała pomiędzy 25 a 10 centylem, dobre napięcie mięśniowe, nieco mniejszy fałd skórno-mięśniowy, nieznacznie opóźnione dojrzewanie płciowe, prawidłowe łaknienie, stolce częste, okresami nieprawidłowe	dyskretnie zaznaczony rysunek oskrzelowo-naczyniowy, nieznaczne rozdęcie płuc
15	konieczność odpoczynku w czasie dnia, szybkie męczenie się po wysiłku, uczęszczanie do szkoły	okresowo kaszel, szczególnie ranny, po wysiłku, oddech i tętno nieco przyspieszone, powiększenie wymiaru przednio-tylnego klatki piersiowej i obniżenie przepony, osłuchowo słyszalne rzężenia i fureczenia przodopochylenie barków, wyraźna pateczkowatość palców (1-2+)	wysokość i masa ciała na poziomie 3 centyla, niedobór masy ciała w stosunku do wysokości, zmniejszona masa i napięcie mięśni, średni niedobór tkanki podskórnej i tłuszczowej, wzdęcie brzucha, opóźnione dojrzewanie płciowe, upośledzone łaknienie, stolce zwykle nieprawidłowo obfite, okresami sformowane	powiększenie przednio-tylnego wymiaru klatki piersiowej, obniżenie przepony, wzmożony rysunek oskrzelowo-naczyniowy, obszary niedodmy, okresowo zmiany zapalne, rozredma średniego stopnia

	<p>ograniczona aktywność fizyczna i obniżona tolerancja wysiłku, duszność powysiłkowa, długotrwałe odpoczynki, nauka w domu</p>	<p>uporczywy, częsty kaszel z odkrztuszeniem, tętno i oddechy niemiernie przyspieszone, deformacja klatki piersiowej, rzężenia, furczenia i świsty stale obecne i często rozsiane, nieprawidłowa postawa (przodopochylenie barków), palce pałeczkowate (2-3+), często sinica</p>	<p>wysokość i masa ciała poniżej 3 centyla, niedobór masy ciała względem wysokości, hipotonia mięśniowa, skąpa tkanka podskórna tłuszczowa, brak skoku pokwitaniowego, brak łaknienia, stolce nieprawidłowe, tłuszczowate, bardzo obfite, z dużą ilością części niestrawionych</p>	<p>znaczne zwiększenie wymiaru przednio-tylnego klatki piersiowej, wyraźne spłaszczenie przepony, zmiany okołoskrzelowe, segmentarna lub płatowa niedodma, nadmierne upowietrzenie, trwałe ogniska zapalne, umiejscowione zmiany torbielowate</p>
<p>10</p>	<p>wybitnie upośledzona aktywność fizyczna, stała duszność, stałe pozostawanie w łóżku lub fotelu</p>	<p>uporczywy, często napadowy kaszel, czasami z wymiotami, krwiopluciem, częsty oddech tachykardia, beczkowata klatka piersiowa, rozsiane stale rzężenia, furczenia i świsty, nieprawidłowa postawa, wybitna pałeczkowatość palców (3-4+), sinica</p>	<p>wyniszczenie, zahamowanie wzrastania, podskórna tkanka tłuszczowa w zaniku, powiększony brzuch, obfite, częste, tłuszczowate stolce, wypadanie odbytu</p>	<p>płatowe lub rozległe zmiany niedomowe i zapalne, rozległe zmiany torbielowate, wybitne cechy rozdęcia płuc (rozędmy), rozstrzenie, ropnie płuc</p>
	<p>5</p>			

### 3.4. Badania radiologiczne

U wszystkich chorych przeprowadzono badanie radiologiczne klatki piersiowej w projekcji tylnoprzodnej i bocznej oraz tomografię komputerową. Zaawansowanie zmian radiologicznych stwierdzane na standardowych radiogramach oceniano wg punktacji w skali Brasfield (Tabela IV).

Tabela IV. Skala oceny zmian radiologicznych wg punktacji Brasfield [43]

Pułapka powietrzna	Uogólnione nadmierne „rozdęcie” płuc wyrażone wygięciem mostka, nisko położoną przeponą i/lub pogłębioną kyfozą	0 - zmiany nieobecne 1-4 - kolejne stopnie zaawansowania zmian
Cienie linijne	Cienie ścian oskrzeli jako linie równoległe i rozgałęziające się, a także przekroje poprzeczne oskrzeli	0 - zmiany nieobecne 1-4 - kolejne stopnie zaawansowania zmian
Cienie guzkowe i/lub cystyczne	Liczne, niewielkie, okrągławe zagęszczenia o śr. ok. 0,5 cm lub większe z zacienioną lub przejaśnioną częścią centralną	0 - zmiany nieobecne 1-4 - kolejne stopnie zaawansowania zmian
Duże zmiany	Niedodma segmentowa lub płatowa, nacieczenie, w tym także zmiany o charakterze zapalnym	0 - zmiany nieobecne 1-4 - kolejne stopnie zaawansowania zmian
Ogólna ocena zaawansowania zmian		0 - zmiany nieobecne 1-4 - kolejne stopnie zaawansowania zmian

W zakresie od 0 do 4 punktów określano wielkość pułapki powietrznej, nasilenie zacienień linijnych, guzkowych i/lub torbielowatych, a także niedodmy i nacieczeń mięszu oraz ogólną ocenę zaawansowania zmian radiologicznych. Uzyskaną sumę punktów odejmowano od 25. Wyliczona w ten sposób wyższa wartość punktowa określała mniej nasilone zmiany oskrzelowo-płucne, niższa wskazywała na ich większą progresję.

### 3.5. Badanie spirometryczne

Badanie spirometryczne wykonywano przy użyciu aparatu Flowscreen firmy Jaeger, w warunkach standardowych. Oceniano wartości natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej – FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in 1 second) i natężonej pojemności życiowej – FVC (forced vital capacity) oraz stosunku FEV<sub>1</sub>/FVC. Wyniki badań odnoszono do wartości należnych. Przyjęto kryteria oceny zaburzeń spirometrycznych wg wytycznych ERS/ATS z 2005 roku [83].

### 3.6. Bronchofiberoskopia

Bronchofiberoskopię z pobraniem wycinków do badania histopatologicznego i płukaniem oskrzelowym oraz oskrzelowo-pęcherzykowym (BAL – bronchoalveolar lavage) przeprowadzano w Pracowni Diagnostyki Inwazyjnej Katedry i Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej UM w Poznaniu przy wykorzystaniu toru wizyjnego firmy Pentax. Badanie wykonywano w pozycji leżącej, na wznak, po uprzedniej dożylniej premedykacji pacjenta z użyciem fentanylu (0,002 mg/kg), midazolanu (0,04–0,1 mg/kg) i atropiny (0,005–0,01 mg/kg). Błonę śluzową oskrzeli znieczulano 2% roztworem lignokainy.

Przeprowadzono ocenę wzrokową cech zapalenia błony śluzowej oraz wydzieliny w drzewie oskrzelowym. Obejmowała ona drogi oddechowe do poziomu oskrzeli subsegmentarnych lub dalszych, dostępnych badaniu. Zwracano uwagę na nieprawidłowy przebieg oskrzeli, zmiany kształtu ostróg podziałowych i występujące przewężenia. Do określenia intensywności zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym posłużyła przedstawiona przez Pirożyńskiego [84] i zmodyfikowana dla potrzeb badania skala punktowa Thompsona [85] (Tabela V). Uwzględnia ona nasilenie przekrwienia, obrzęku i kruchości błony śluzowej oskrzeli oraz ilość i charakter wydzieliny w odniesieniu do lokalizacji w poszczególnych oskrzelach płatowych płuc. Z uwagi na podobne zaawansowanie zmian zapalnych w całym drzewie oskrzelowym dostępnym bronchofiberoskopii w grupie dorosłych chorych na mukowiscydozę, dokonano modyfikacji skali. Modyfikacja własna polegała na ogólnej, a nie odnoszonej do oskrzeli płatowych ocenie intensywności zmian zapalnych w drogach oddechowych w skali od 0 do 3 punktów i określaniu ilości wydzieliny oskrzelowej. Charakter wydzieliny oceniany był odrębnie.

Następnie wykonywano płukanie oskrzelowe i oskrzelowo-pęcherzykowe, a w dalszej kolejności za pomocą kleszczyków pobierano wycinki błony śluzowej oskrzeli segmentarnych do badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

Tabela V. Zmodyfikowana skala punktowa Thompsona określająca intensywność zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym

Zmiany błony śluzowej	Liczba punktów			
	0	1	2	3
przekrwienie	prawidłowe ukrwienie	lekkie	umiarkowane	silne
obrzęk	brak	zaokrąglenie ostróg	utrata zarysu chrząstek	zwężenie oskrzela
kruchość	prawidłowa	punkcikowate wybroczyny przy dotykaniu fiberskopem	znaczne, prążkowe wybroczyny przy dotykaniu fiberskopem	krwawienie z błony śluzowej
wydzielina	brak	ilość mierna	ilość umiarkowana	oskrzela wypełnione wydzieliną

### 3.7. Płukanie oskrzelowe i oskrzelowo-pęcherzykowe

Płukanie oskrzelowe przeprowadzano w celu uzyskania popłuczyn do rutynowej oceny mikrobiologicznej i cytologicznej. Następnie w obszarze największych zmian oskrzelowo-płucnych, po zaklinowaniu bronchofiberoskopu w oskrzeli segmentarnym lub subsegmentarnym wykonywano BAL i określano skład komórkowy płynu w mikroskopie świetlnym. Wartości referencyjne rekomendowane przez PTChP, ERS i ATS [86, 87]:

- liczba komórek  $< 10 \times 10^6$
- makrofagi  $> 80\%$
- limfocyty  $< 15\%$
- granulocyty obojętnochłonne  $< 3\%$
- granulocyty kwasochłonne  $< 0,5\%$ .

### 3.8. Badanie histopatologiczne w mikroskopie świetlnym

Ocenę histopatologiczną materiału biopsyjnego przy zastosowaniu mikroskopii świetlnej przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu (kier. prof. dr hab. med. Przemysław Majewski). Materiał przeznaczony do oceny w mikroskopie świetlnym utrwalano w formalinie buforowanej, następnie płukano w bieżącej wodzie i odwadniano w kolejno wzrastających

stężeniach etanolu: 20%, 60%, 80% i 100%. Następnie materiał przenoszono do ksylenu, a z niego do płynnej, ogrzanej do 60°C parafiny. Po przepojeniu parafiną i zestaleniu jej w temperaturze pokojowej, formowano bloczek parafinowy z zatopionym fragmentem tkanki. Skrawki parafinowe grubości 6–10  $\mu\text{m}$  uzyskane przez skrawanie na mikrotomie, prostowano na powierzchni wody, i przenoszono z niej na szkiełka podstawowe i na nich suszono. Następnie w ksylenie usuwano ze skrawków parafinę i nawadniano je przeprowadzając przez etanol w stężeniach 100% i 60% i w dalszej kolejności do wody. Skrawki zabarwiano w hematoksylinie, płukano w wodzie, podbarwiano eozyną i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

### **3.9. Mikroskopia elektronowa**

Badania ultrastruktury błony śluzowej oskrzeli przeprowadzono w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu (kier. prof. dr hab. med. Wiesława Biczysko). Wycinki błony śluzowej oskrzeli przeznaczone do oceny przy użyciu rutynowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej utrwalano w utrwalaczu Karnowskiego o pH 7,34 i temperaturze 4°C przez 24 godziny. Następnego dnia skrawki o wymiarach 1×0,5×1 mm umieszczano w 0,1M buforze kakodylowym na następne 24 godziny. Kolejnego dnia materiał osmowano w 1% OsO<sub>4</sub> metodą Milloniga i odwadniano, przeprowadzając przez szereg alkoholowo-acetonowy, po czym zatapiano skrawki w mieszaninie aceton:epon kolejno w stosunku 1:1 na 60 minut, w stosunku 1:3 na 60 minut, a na koniec w czystej żywicy epoksydowej Epon 812. Materiał zatopiony w żywicy umieszczano w cieplarni w temperaturze 40°C na 24 godziny, a następnie w temperaturze 60°C na dwa tygodnie. Z bloczków eponowych sporządzano skrawki półcienkie grubości 0,5–0,1  $\mu\text{m}$ , które po dobarwieniu 0,5% błękitem toluidyny w 1% boraksie oceniono w mikroskopie świetlnym. Skrawki ultracienkie grubości 60–80 nm kontrastowano 9% roztworem octanu uranylu przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przepłukiwano wodą bidestylowaną i dobarwiano 0,625% cytrynianem ołowiu przez 10 minut w temperaturze pokojowej i ponownie przemywano wodą bidestylowaną. Materiał oceniano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Zeiss EM 900.

### **3.10. Badania mikrobiologiczne**

Ocenę mikrobiologiczną materiałów pobranych z dróg oddechowych pacjentów z mukowiscydozą prowadzono zgodnie z procedurami opracowanymi na pod-



stawie międzynarodowych rekomendacji: *Cystis fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants* z 2003 roku oraz *UK Cystis Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group* z 2010 roku. Materiał do badań stanowiła płwocina oraz BAL. Do Laboratorium Mikrobiologii próbki transportowane były w temperaturze pokojowej w możliwie najkrótszym czasie. Maksymalny czas transportu wynosił 4 godziny. Przed posiewem materiał upłynniano przy pomocy preparatu mukolitycznego bromheksyna (Aflegan). W celu oceny jakości pobranego materiału dla wszystkich próbek wykonano preparat barwiony metodą Grama. Badanie płwociny wykonywano metodą półilościową, a BAL-u metodą ilościową. Dobór podłoży mikrobiologicznych służących do posiewu oraz warunki i czas inkubacji umożliwiały wykrycie większości drobnoustrojów istotnych w mukowiscydozie: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* (różne fenotypy), *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia spp.*, *Pandoraea spp.*, *Candida spp.* oraz *Aspergillus spp.* Zastosowano podłoża firmy bioMerieux i Becton Dickinson.

Identyfikacja drobnoustrojów prowadzona była przy pomocy manualnych i automatycznych testów biochemicznych oraz testów lateksowych firmy bioMerieux. Lekowrażliwość określano metodą dyfuzyjno-krażkową wg Kirby-Bauer, automatyczną w analizatorze Vitek2 Compact firmy bioMerieux oraz określając MIC przy pomocy pasków z gradientem stężenia leków – E-test®. Interpretację lekowrażliwości opierano zawsze na aktualnych rekomendacjach amerykańskich CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*).

Identyfikację *Chlamydophila pneumoniae* w bioptacie błony śluzowej oskrzela wykonywano metodą PCR (polymerase chain reaction). Z bioptatu błony śluzowej oskrzela segmentarnego płuca izolowano całkowite DNA metodą kolumnkową przy użyciu zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Jakość uzyskanej matrycy oceniano stosując elektroforezę w 2% żelu agarozowym przy natężeniu 200 mA w buforze TAE. Tak przygotowane DNA stanowiło matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy. Do momentu wykonania analizy roztwór DNA przechowywano w temperaturze -70°C. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) pozwala na amplifikację *in vitro* wybranej sekwencji genomowego DNA przy użyciu syntetycznej pary oligonukleotydów (starterów). W celu potwierdzenia obecności DNA genomowego zastosowano zestaw diagnostyczny PCR – *Chlamydophila pneumoniae* (DNA-Gdańsk). Amplifikowanie fragmentu genu *ompA* (outer membrane protein) *Chlamydophila pneumoniae* w układzie nested-PCR. Nested PCR polega na przeprowadzeniu dwóch kolejnych reakcji PCR. W pierwszej reakcji wykorzystywana jest jedna para primerów. Powstały

produkt o wielkości 424 par zasad stanowi matrycę w następnej reakcji, w której stosowana jest druga para primerów komplementarnych do miejsc wewnątrz produktu 424 par zasad. Końcowy produkt reakcji nested-PCR ma wielkość 147 par zasad (bp) widoczny na 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydydyny. W celu potwierdzenia obecności DNA genomowego zastosowano parę starterów dla  $\beta$ -globiny (TIB MolBiol, Poznań).

Tabela VI. Startery użyte w metodzie

Nazwa startera	Region amplifikowany	Sekwencja 5'-3'	Wielkość produktu
BGPOC3 BGPOC6	gen $\beta$ -globiny	ACACAACGTGTTCCTACTAGC CATCAGGAGTGGACAGATCC	326 bp

Jednorazowo reakcję nastawiano dla kilku prób badanych oraz dla kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej, którą stanowiła mieszanina reakcyjna z dodatkiem 5  $\mu$ l jałowej wody w miejsce DNA.

Produkty reakcji PCR analizowano jakościowo za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym (1,5% z dodatkiem 10  $\mu$ l bromku etydydyny) w 1% buforze TBE (8,8 g Tris, 5,5 g kwasu borowego, 5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,3 w 1000 ml H<sub>2</sub>O) przy natężeniu prądu 60 mA przez 1 godzinę. Na żel nakładano próby badane, kontrolę pozytywną i negatywną oraz marker wielkości cząsteczki DNA (PCR Marker; Sigma). Wynik odczytywano na podstawie prążków widocznych na żelu w świetle UV. Prążek o długości 147 obecny na żelu w kontroli pozytywnej i próbie badanej oraz brak prążka w próbie negatywnej świadczą o obecności DNA *Ch. pneumoniae* w próbie badanej. Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu (kier. prof. dr hab. med. Andrzej Szkaradkiewicz).

Wykrywanie prątków kwasoopornych przeprowadzono metodą automatyczną, z wykorzystaniem kolorymetrycznego systemu MB/bacT. Do zamkniętej szczelnie butelki hodowlanej zawierającej podłoże Middlebrook 7H9 i mieszaninę gazów (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) wprowadzano strzykawką homogenizowany materiał uzyskany z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. W celu wyeliminowania zanieczyszczeń bakteriami towarzyszącymi, do butelki dodawano zestaw pięciu antybiotyków pod nazwą PANTA (polimyksyna B, amfoterycyna B, kwas naldyksowy, trimetoprim, azlocylina). Następnie butelkę inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C. Namnażające się prątki wydzielają CO<sub>2</sub>, którego wzrost stężenia w butelce powoduje zmianę zabarwienia wskaźnika kolorymetrycznego.

Intensywność wzrostu prątków rejestrowana jest automatycznie i przedstawiana w sposób graficzny. Czas obserwacji wzrostu prątków wynosił 10 tygodni.

### **3.11. Analiza statystyczna**

W analizie statystycznej zastosowano testy parametryczne i nieparametryczne. Dla danych ciągłych spełniających założenia wykorzystano jednoczynnikową analizę wariacji ANOVA, a dla danych niespełniających założeń test Kruskala-Wallisa. W przypadku danych skategoryzowanych posłużono się testem chi-kwadrat ( $\chi^2$ ) dla tablic wielodzielczych i dwudzielczych oraz dokładnym testem Fischera. Dla oceny współzmienności cech wykorzystano korelację porządku rang Spearmana. Obliczeń dokonano w programie statystycznym STATISTICA (wersja 6.0). Różnice przyjmowano jako statystycznie znamienne, gdy poziom istotności  $p < 0,05$ .

## 4. WYNIKI BADAŃ

### 4.1. Analiza materiału klinicznego

Badania przeprowadzono na grupie 33 dorosłych w wieku od 18 do 38 lat (średnia wieku 23,6) chorujących na mukowiscydozę, w tym 17 kobiet i 18 mężczyzn. Rozpoznanie ustalono wcześniej u 27 chorych, nowe zostało postawione u 6 pacjentów. U wszystkich chorych wykazano, co najmniej dwukrotnie, dodatni wynik testu potowego. Uzyskane wartości zawierały się w przedziale od 63 do 119 mmol/L. Nie stwierdzono zależności pomiędzy klinicznym zaawansowaniem mukowiscydozy i wartościami stężenia anionów chlorkowych w pocie.

Rozpoznanie mukowiscydozy w pierwszym roku po urodzeniu zostało ustalone u 12 chorych, w wieku pomiędzy 2 i 10 rokiem życia u kolejnych 10 i w okresie do 35 roku życia u 11 pozostałych. Potwierdzenie rozpoznania w późniejszym wieku wynikało z utrzymującego się przez dłuższy czas dobrego stanu klinicznego, rzadziej występujących zaostrzeń oraz w 2 przypadkach z błędnie postawionej wcześniejszej diagnozy.

Zastosowanie kryteriów oceny klinicznej wg Shwachmana i Kulczyckiego umożliwiło w dużej mierze określenie zaawansowania choroby. Stan kliniczny określono jako bardzo dobry u 13 chorych (39,4%), jako dobry, dość dobry, umiarkowany i ciężki odpowiednio w grupach po 5 chorych (po 15,2%).

W badanej grupie dorosłych zaostrzenia choroby wyrażone liczbą pobytów w szpitalu wahały się w szerokim zakresie od 1 do ponad 50. Średnia liczba pobytów w szpitalu wynosiła 29.

Wartości BMI były zróżnicowane w przedziale od 14,8 do 27,2, ze średnią wartością 19,75. W 22 przypadkach (66,7%) stwierdzono prawidłową masę ciała, niedobór masy wykazano w 9 (27,3%), a nadwagę w 2 przypadkach (6,1%).

Zewnątrzwydzielniczą niewydolność trzustki rozpoznano u 25, a cukrzycę u 15 chorych.

W okresie 5-letniej obserwacji 33 chorych miało miejsce 5 zgonów spowodowanych powikłaniami w przebiegu choroby oskrzelowo-płucnej. Stopień klinicznego zaawansowania choroby w trzech przypadkach określono jako ciężki już w momencie włączenia do badania. Zmarli chorzy przeżyli dużą liczbę zaostrzeń, chorowali na cukrzycę i zewnątrzwydzielniczą niewydolność trzustki (Tabela VII).

Tabela VII. Charakterystyka ogólna dorosłych chorych na mukowiscydozę

Lp.	Wiek (l)	Płeć	Wiek chorego w chwili rozpoznania (l)	Liczba zastrzeń	Liczba punktów w skali Shwachmana-Kulczyckiego	Wartość BMI	Liczba zgonów w okresie obserwacji	Niewydolność trzustki	Cukrzyca
1	21	K	3	>50	15	16,4	1	1	1
2	21	M	<1	10	90	21,8	0	1	0
3	22	M	3	13	90	20,5	0	0	0
4	20	K	<1	40	55	20,8	0	1	1
5	31	K	30	5	90	21,3	0	0	0
6	20	K	<1	40	90	19,8	0	1	0
7	32	M	24	12	75	21,9	0	1	0
8	21	M	<1	23	55	17,6	0	1	0
9	22	M	21	25	25	15,6	1	1	1
10	18	K	<1	9	90	21,3	0	1	1
11	32	M	32	4	100	20,5	0	0	0
12	22	K	8	50	85	20,0	0	1	1
13	23	K	17	8	90	19,9	0	1	0
14	33	M	33	1	90	21,6	1	0	0
15	20	K	9	>50	25	14,8	0	1	1
16	27	K	27	3	85	19,3	0	0	0
17	20	K	15	13	90	18,6	0	0	0
18	18	K	<1	10	85	18,6	0	1	0
19	29	K	10	34	70	18,2	0	1	1
20	19	K	5	30	20	15,0	1	1	1
21	27	M	<1	34	70	20,7	0	1	1
22	19	M	3	27	25	19,1	0	1	1
23	20	K	<1	38	55	19,6	0	1	1
24	25	M	6	5	95	24,2	0	1	0
25	20	K	<1	>50	50	19,1	0	1	1
26	24	M	<1	10	100	25,4	0	0	0
27	23	M	23	1	80	21,5	0	1	0
28	23	M	15	23	30	20,1	1	1	0
29	19	M	<1	31	40	17,6	0	1	1
30	38	M	35	1	95	27,2	0	0	0
31	20	K	7	28	60	16,6	0	1	0
32	23	K	5	>50	45	19,3	0	1	1
33	28	M	<1	19	90	17,9	0	1	1

0 – brak, 1 – obecna

## 4.2. Wyniki badań molekularnych

Badania molekularne umożliwiły identyfikację mutacji na obu allelach genu CFTR u 12 dorosłych chorych (36,36%). Mutację F508del/F508del i F508del/CFTRdel21kb rozpoznano odpowiednio u 4 (12,1%) i 2 (6,1%) chorych. W 7 innych przypadkach stwierdzono różne mutacje na obu allelach genu CFTR. Mutację F508del wykryto na co najmniej jednym allelu w 18 przypadkach, z czego w 8 stanowiła ona jedyną rozpoznaną mutację genu CFTR. Zastosowanie zestawu Innogenetics PCR INNO-LiPA CFTR 17+Th Update (17 mutacji + polimorfizm) oraz INNO-LiPA CFTR 19 (19 mutacji) nie pozwoliło na identyfikację mutacji na żadnym z obu alleli u 12 chorych (36,36%) (Tabela VIII). Rozpoznanie w tej grupie chorych zostało postawione w oparciu o obraz kliniczny i co najmniej dwukrotnie dodatni wynik testu potowego. Nie wykazano zależności pomiędzy typem mutacji genu CFTR a stanem klinicznym chorych i zaawansowaniem zmian histopatologicznych w drzewie oskrzelowym.

Tabela VIII. Częstość występowania mutacji w grupie 33 dorosłych chorych na mukowiscydozę

Typ mutacji	n	%
M/M	12	36,36
F508del/M	8	24,24
F508del/F508del	4	12,12
F508del/CFTRdel21kb	2	6,06
F508del/2183AA>A	1	3,03
F508del/3849+10kbCT	1	3,03
621+1G>T/621+1G>T	1	3,03
622-1G>A2143delT	1	3,03
F508del/2143delT	1	3,03
M/CFTRdel21kb	1	3,03
F508del/G542X	1	3,03

## 4.3. Wyniki badań radiologicznych

Zdjęcia radiologiczne klatki piersiowej wykazały zróżnicowanie zaawansowania zmian oskrzelowo-płucnych w badanej grupie chorych (Tabela IX).

Tabela IX. Skala punktowej oceny zmian radiologicznych wg Brasfield

Lp.	Zmiany radiologiczne					Suma punktów	Wartość punktowa
	Pulapka powietrzna	Cienie linijne	Zmiany guzkowo-torbielowe	Duże zmiany	Ogólna ocena		
1	3	3	2	0	3	11	14
2	1	2	1	0	2	6	19
3	0	1	1	0	1	3	22
4	3	3	3	3	3	15	10
5	0	1	1	0	1	3	22
6	0	3	1	0	2	6	19
7	1	2	1	0	2	6	19
8	3	3	4	0	4	14	11
9	1	3	3	4	4	15	10
10	2	3	3	0	2	10	15
11	0	1	1	0	1	3	22
12	2	2	1	0	2	7	18
13	1	1	1	0	1	4	21
14	3	3	4	0	3	13	12
15	2	3	2	0	2	9	16
16	2	3	3	0	2	10	15
17	2	3	2	0	2	9	16
18	2	2	2	0	2	8	17
19	3	4	2	0	4	13	12
20	3	3	4	0	4	14	11
21	1	3	3	0	3	10	15
22	3	3	3	0	4	13	12
23	3	3	3	0	3	12	13
24	3	3	1	0	2	9	16
25	1	3	2	0	3	9	16
26	2	1	0	0	1	4	21
27	3	3	3	0	2	11	14
28	3	3	3	0	4	13	12
29	3	3	2	4	3	15	10
30	1	1	0	0	1	3	22
31	2	3	1	0	3	9	16
32	1	2	4	2	3	12	13
33	2	1	0	0	1	4	21

W zebranych materiale nie było ani jednego chorego z prawidłowym obrazem radiologicznym klatki piersiowej. W przypadku 7 chorych wartość punktowa w skali Brasfield była większa od 20. Stwierdzone nieprawidłowości były mało zaawansowane i przedstawiały się głównie w postaci zmian guzkowo-torbielowych, liniowych zacięń i niedużego rozdęcia płuc. Większe nasilenie zmian oskrzelowo-płucnych, szczególnie liniowych zacięń, zaobserwowano u 13 chorych (wartość punktowa  $\geq 15$ ). Znaczne zaawansowanie zmian guzkowo-torbielowych, liniowych zacięń i wyraźne cechy pułapki powietrznej potwierdzono w pozostałych 13 przypadkach. Nieprawidłowości w obrazie radiologicznym dotyczyły przede wszystkim górnych i środkowych pól płucnych. Przedziały wartości punktowych zostały wyznaczone umownie. (Fot. 1A, B, C).

#### **4.4. Ocena spirometryczna**

Badanie spirometryczne wykazało w 13 przypadkach wynik prawidłowy. U pozostałych chorych stwierdzono ograniczenie rezerw wentylacyjnych płuc o typie obturacji. Obturację łagodną stwierdzono w 1 przypadku, umiarkowaną w 3, średniociężką w 6, ciężką w 3 przypadkach i w pozostałych 7 bardzo ciężką. Wyniki próby rozkurczowej były ujemne (Tabela X).

#### **4.5. Wyniki badań bronchofiberoskopowych**

Intensywność zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym określano podczas bronchofiberoskopii wg zmodyfikowanej na potrzeby badania skali punktowej Thompsona, w zakresie od 2 do 12. Maksymalna liczba 12 punktów została uzyskana przez 8 chorych i oznaczała silne przekrwienie błony śluzowej z wyraźnym zwężeniem światła oskrzeli, krwawienie z powierzchni błony śluzowej oraz nagromadzenie dużej ilości śluzowo-ropnej i ropnej wydzieliny w oskrzelach (Fot. 2).

W 12 przypadkach nasilenie zmian zapalnych oceniono w zakresie 10–11 punktów, a niewielkie różnice w tej grupie chorych wynikały ze stopnia obrzęku i przekrwienia błony śluzowej lub stwierdzonego krwawienia. U pozostałych chorych stwierdzono lekkie przekrwienie śluzówki, mieli zaokrąglenie ostróg podziałowych i mierną lub umiarkowaną ilość śluzowej lub śluzowo-ropnej wydzieliny w świetle oskrzeli. Obecność zaawansowanych zmian zapalnych oskrzeli związana była z występowaniem dużej ilości ropnej lub śluzowo-ropnej wydzieliny. W ocenie makroskopowej treść ropną stwierdzono u 64% chorych, śluzowo-ropną u 24% i śluzową u pozostałych 12% chorych (Tabela XI).



Tabela X. Wartości wybranych parametrów spirometrycznych

Lp.	FEV <sub>1</sub> %VC	FVC%	FEV <sub>1</sub> %
1	64,6	56,6	39,4
2	86,6	95,1	84,4
3	75,4	76,6	76
4	65,8	58,8	55,8
5	90,6	87,8	85,3
6	61,4	64,3	56,1
7	67,4	65,3	65,2
8	81,5	63,4	55,2
9	56,9	44,9	57,7
10	98,4	103	113
11	101	84,2	93
12	63,7	67,2	45,8
13	90,7	78	91,5
14	68,0	76,7	62,7
15	57,9	30,6	21,7
16	87,2	92	81,3
17	103	95	121
18	98,7	69,7	81,6
19	44,8	64,3	27,3
20	52,7	39,3	33,2
21	91,8	91,6	94,9
22	67,3	64,8	63,5
23	62,2	64,5	56,8
24	57,1	30	28,9
25	91,1	91	94,6
26	63,2	34,9	21,5
27	63,3	52	38,1
28	64,1	33,5	34,9
29	53,7	44,4	39,2
30	87,6	87,5	93,5
31	109	84,6	93,5
32	45,8	33,7	15,1
33	77	90,4	97,9

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe wykonywane podczas bronchofibero-skopii umożliwiło określenie składu komórkowego w pobranym materiale. Neutrofile występowały w przewodzie u 24 chorych (72,7%), a makrofagi u pozostałych 9 (27,3%). W 1 przypadku u chorej ze współistniejącą astmą oskrzelową stwierdzono 15% udział eozynofili (Tabela XII).

Tabela XI. Intensywność zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym wg zmodyfikowanej skali punktowej Thompsona

Lp.	Punktowa ocena zmian zapalnych				Liczba punktów	Rodzaj wydzielin
	przekrwienie	obrzęk	kruchość	wydzielina		
1	3	2	3	3	11	ropna
2	3	2	2	3	10	śluzowo-ropna
3	2	1	2	2	7	śluzowo-ropna
4	3	3	3	3	12	ropna
5	1	1	1	2	5	ropna
6	3	2	2	3	10	śluzowo-ropna
7	3	3	3	3	12	śluzowo-ropna
8	3	2	3	3	11	ropna
9	3	3	3	3	12	ropna
10	3	3	3	3	12	ropna
11	2	1	1	1	5	śluzowa
12	2	1	1	1	5	śluzowo-ropna
13	2	1	1	2	6	śluzowo-ropna
14	2	3	3	3	11	ropna
15	3	3	3	3	12	ropna
16	2	2	2	2	8	ropna
17	1	1	1	2	5	śluzowo-ropna
18	2	2	2	3	9	ropna
19	3	3	2	3	11	ropna
20	3	3	3	3	12	ropna
21	2	3	2	3	10	ropna
22	2	2	2	3	9	ropna
23	3	3	2	3	11	ropna
24	1	1	1	2	5	ropna
25	3	3	3	3	12	ropna
26	0	0	1	1	2	śluzowa
27	3	2	2	3	10	śluzowo-ropna
28	2	3	2	3	10	ropna
29	2	3	3	3	11	ropna
30	1	0	1	1	3	śluzowa
31	3	3	2	2	10	ropna
32	3	3	3	3	12	ropna
33	2	1	1	1	5	śluzowa

Tabela XII. Odsetkowy udział komórek zapalenia w materiale uzyskanym z BAL

Lp.	Makrofagi	Neutrofile	Limfocyty	Eozynofile
1	10	90	0	0
2	70	30	0	0
3	95	3	2	0
4	5	95	0	0
5	5	95	0	0
6	98	2	0	0
7	10	90	0	0
8	5	95	0	0
9	5	95	0	0
10	5	95	0	0
11	100	0	0	0
12	60	40	0	0
13	20	65	0	15
14	10	90	0	0
15	5	95	0	0
16	4	95	1	0
17	0	0	0	0
18	10	90	0	0
19	5	95	0	0
20	5	95	0	0
21	10	90	0	0
22	0	100	0	0
23	10	90	0	0
24	5	95	0	0
25	1	99	0	0
26	95	0	5	0
27	10	90	0	0
28	5	95	0	0
29	5	95	0	0
30	90	10	0	0
31	5	95	0	0
32	5	95	0	0
33	5	0	0	0

## 4.6. Badanie materiału biopsyjnego w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym

Badania wycinków błony śluzowej oskrzeli w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym przeprowadzono u 33 dorosłych chorych. Powierzchnia błony śluzowej oskrzeli na całej długości pokryta była nabłonkiem walcowatym wielorzędowym urzęsionym w materiale pochodzącym od 16 chorych. W tej liczbie w 9 przypadkach stwierdzono nabłonek urzęsiony na większości powierzchni błon śluzowych. Posiadał on strukturę nabłonka wielorzędowego walcowatego (4 przypadki), jednorzędowego walcowatego (3 przypadki) lub jednowarstwowego sześciennego (2 przypadki). Ogniskowo występujący nabłonek walcowaty wielorzędowy urzęsiony stwierdzono w wycinkach pochodzących od 12 chorych. W tej grupie u 5 chorych znajdowano ogniska nabłonka wielowarstwowego płaskiego, u innych dwóch chorych nabłonek wielorzędowy był jedno-, dwu- lub trójwarstwowy. Zupełny brak nabłonka wielorzędowego urzęsionego wykazano w materiale pochodzącym od 5 chorych. W tych przypadkach obecny był nabłonek wielowarstwowy płaski (3 chorych) i sześcienny (2 chorych). U części pacjentów widoczne były fragmenty nabłonka oskrzelowego oderwanego od błony podstawnej i należącego do nabłoneków walcowatych urzęsionych z przewagą komórek kubkowych. Oderwanym nabłonkom towarzyszyły komórki odczynu zapalnego.

Zmiany w nabłonku urzęsionym obejmowały nieregularne umieszczenie rzęsek na wolnej powierzchni komórek, spadek liczby rzęsek i/lub ich skrócenie oraz rzęski ugięte w różnych kierunkach. Komórki kubkowe w nabłonku oskrzelowym rozmieszczone były w proporcjach prawidłowych lub było ich więcej niż komórek urzęsionych, nierzadko występowały w zespółach po kilka (Fot. 3).

W poszerzonych przestrzeniach międzykomórkowych nabłonka oskrzelowego znajdowano ogniska neutrofilii, monocytów, limfocytów i komórek plazmatycznych. Obecność komórek zapalenia stwierdzano także w świetle naczyń włosowatych oraz w zrębie błony śluzowej właściwej (pojedyncze, w grupach lub rozproszone). Między komórkami nabłonka występowały ogniskowo dość liczne erytrocyty, pochodzące z uszkodzonych naczyń włosowatych błony śluzowej właściwej, przechodzące przez miejsca uszkodzeń (przerwy w ciągłości ściany włosniczek) (Fot. 4, 10).

W nabłonku stwierdzano również miernie poszerzone przestrzenie międzykomórkowe i złącza międzykomórkowe łączące między sobą komórki nabłonka (Fot. 18). Między komórkami nabłonka gruczołowego znajdowano złącza typu przylegania. Na powierzchni części komórek pozbawionych rzęsek lub pomiędzy pojedynczymi, nierównomiernie rozmieszczonymi rzęskami występowały

mikrokosmki, w części rozgałęziające się. Niektóre komórki urzęsione posiadały wypustki cytoplazmy z zespołami aksonemy, w innych wypustki cytoplazmy pozbawione były układu ruchowego rzęsek (aksonemy) (Fot. 5).

W materiale pochodzącym od 14 chorych w badaniach ultrastrukturalnych stwierdzono w większości rzęsek brak ramion wewnętrznych dyneiny, przy czym część rzęsek pozbawiona była obu ramion tego białka (Fot. 6). Znalaziono rzęski z nieprawidłowymi liczbami dubletów mikrotubul lub z przesunięciem mikrotubul obwodowych w kierunku dubletu centralnego (Fot. 6). Wykazano obecność pojedynczych mikrotubul obwodowych zamiast dubletu oraz dodatkowych pojedynczych mikrotubul położonych na obwodzie rzęski. Warto także zwrócić uwagę na występowanie rzęsek pozbawionych dubletu centralnego oraz posiadających 3 mikrotubule centralne przy prawidłowej liczbie dubletów obwodowych. W licznych mikrotubulach obserwowano odwarstwienie błony aksonemalnej od zespołów filamentów cytoplazmy (Fot. 6). Stwierdzono występowanie rzęsek, w których pod wspólną błoną komórkową występowały zespoły układów aksonemy w liczbie większej niż przypadająca na jedną rzęsę, wynosiły one od 2 do 20 zespołów aksonemy – rzęski olbrzymie (Fot. 7).

W części komórek sieć graniczna była poprzerywana i nieregularnie, głęboko osadzona w cytoplazmie (Fot. 5), niekiedy sięgała obszaru okołojądrowego lub bocznej powierzchni komórek. W części materiału stwierdzono na wolnej powierzchni komórek nabłonka obszary pozbawione rzęsek (Fot. 3).

W nielicznych przypadkach pomiędzy komórkami nabłonka urzęsionego występowały pojedynczo lub po kilka komórki neuroendokryne. W części fragmentów błony śluzowej, której powierzchnia pozbawiona była nabłonka, obecne były ogniskowo komórki pluripotencjalne przytwierdzone do błony podstawnej (Fot. 8, 9), między komórkami nie występowały złącza międzykomórkowe, a część komórek była znacznie zwakuolizowana. Poza opisanymi zmianami komórek urzęsionych w części materiału na powierzchniach błony podstawnej występowały komórki pluripotencjalne w grupach lub pojedynczo (samotne) (Fot. 9). W innych odcinkach tworzyły grupy zasiedlające błony podstawne w sposób ciągły z zachowaniem poszerzonych przestrzeni międzykomórkowych (Fot. 12).

W 14 przypadkach stwierdzono znaczne pogrubienie położonej pod nabłonkiem oskrzelowym błony podstawnej. W 15 innych była pogrubiona umiarkowanie (Fot. 9) lub w niewielkim stopniu, a w pozostałych 4 prawidłowa. Materiał do oceny morfologicznej pobierany był u części chorych w okresie remisji zmian ostrych, a u części także w trakcie trwania ostrej fazy kolejnego nawrotu. Wykładniki przewlekłego zapalenia oskrzeli obserwowano u 17 chorych, zapalenia przewlekłego z nawrotem fazy ostrej w 12 przypadkach i zapalenia ostrego w 4. W naczyniach włosowatych błony śluzowej obserwowano formowanie błon okienkowych przez komórki śródbłonka (Fot. 10).

W wielu włósniczkach błony śluzowej i podśluzowej u większości chorych występowały cechy uszkodzenia. Stwierdzano poszerzenie ich światła i głębsze położenie naczyń względem powierzchni nabłonka. W materiale badanym od chorych, u których wykazano wykładniki ostrej fazy zapalenia (Fot. 4), w części naczyń włosowatych stwierdzono zakrzepicę lub zakrzepicę z cechami organizacji. W niektórych przypadkach światło naczyń było zwężone, a liczba naczyń była niewielka. Obrzękowi błony śluzowej w części przypadków towarzyszyło rozdęcie gruczołów śluzowych leżących w błonie podśluzowej, ich zlewanie się oraz wpuklanie w obszar błony śluzowej właściwej. W błonie śluzowej właściwej widoczne były cechy kolagenizacji zrębu z obecnością dość licznych fibroblastów i fibrocytów oraz komórki zapalenia (Fot. 4, 10). Znacznie nasilone procesy kolagenizacji stwierdzono w materiale badawczym pochodzącym od 21 chorych. W 8 przypadkach w obrębie zrębu blaszki właściwej kolagenizacja przestrzeni pozakomórkowej była niewielka (Tabele XIII i XIV).

W zebranym materiale – tak w wycinkach, w których znajdowano nieprawidłowe nabłonki gruczołowe, jak i w wycinkach, w których występowały nabłonki wielowarstwowe – obecne były fragmenty odnowy nabłonka. Komórki nabłonka odnawiającego się leżały na błonie podstawnej i nie można było określić ich poziomu różnicowania i dojrzewania pozwalającego na określenie kierunku różnicowania (Fot. 8, 9, 11). W niektórych fragmentach błony śluzowej oskrzeli ogniskowo znaczną część obszaru komórek nabłonka sześciennego zajmowały jądra, które miały duże zespoły heterochromatyny i posiadały pojedyncze jąderka o cechach aktywacji. Cytoplazma tych komórek zawierała miernie liczne pęczki włókienek cytokeratyn, mitochondria, pojedyncze kanały szorstkie siateczki śródplazmatycznej i liczne zespoły wolnych polirybosomów (Fot. 11).

W kilku badaniach można było rozpoznać metaplastję płaskonabłonkową (Fot. 12, 13, 15) lub metaplastję płaskonabłonkową z cechami dysplazji (Fot. 14, 16, 17, 18, 19). Na błonach podstawnych leżały komórki tworzące dwie lub kilka warstw komórkowych. Na powierzchni takich nabłonków występowały komórki spłaszczone i zachowujące cechy komórek koleczystych (Fot. 13, 15). Cechą charakterystyczną tych komórek były: kształt typowy dla komórek koleczystych, formowanie licznych mostków cytoplazmatycznych łączących komórki połączeniami desmosomopodobnymi, pęczki cytokeratyn nieliczne lub dość liczne w cytoplazmie. Często między mostkami znajdowały się mikrokosmki (Fot. 15). Cechą istotną opisywanych komórek były duże, wrębiaste, nieregularne jądra komórkowe, zajmujące znaczną część obszaru komórek (Fot. 13, 14, 17). Na podstawie oceny morfologicznej można je było zaliczyć do nabłonka wielowarstwowego płaskiego nierogowaciejącego, co w odniesieniu do miejsca występowania należy zaliczyć do metaplastji płaskonabłonkowej (Fot. 13, 15).

Tabela XIII. Charakterystyka zmian histopatologicznych w błonie śluzowej oskrzeli

Lp.	Stopień pogrubienia błony podstawnej	Stopień skolagenizowania blaszki właściwej	Występowanie nabłonka urzęsionego
1	+	prawidłowa	ogniskowo
2	+	+++	ogniskowo
3	+	prawidłowa	przeważające
4	+++	+++	przeważające
5	cienka, równa	prawidłowa	ogniskowo
6	+++	+++	ogniskowo
7	+++	+++	na całej długości
8	cienka, równa	++	na całej długości
9	cienka, równa	+++	przeważające
10	+++	+++	brak
11	++	+++	brak
12	++	+++	na całej długości
13	+++	++	na całej długości
14	++	+++	ogniskowo
15	+++	+++	na całej długości
16	+++	+++	przeważające
17	+++	+++	ogniskowo
18	++	+++	na całej długości
19	++	+++	ogniskowo
20	++	prawidłowa	na całej długości
21	+	prawidłowa	ogniskowo
22	cienka, równa	prawidłowa	ogniskowo
23	+	+	przeważające
24	+	+++	przeważające
25	+++	+++	brak
26	+	+++	przeważające
27	+	prawidłowa	przeważające
28	+++	+++	ogniskowo
29	cienka, równa	+++	przeważające
30	+++	+++	brak
31	+++	+	ogniskowo
32	+++	prawidłowa	ogniskowo
33	+++	+++	brak

+ cecha nieznacznie nasilona

++ cecha średnio nasilona

+++ cecha znacznie nasilona

Tabela XIV. Charakterystyka zmian histopatologicznych w błonie śluzowej oskrzeli

Lp.	Typ zapalenia	Obecność metaplazji/dysplazji
1	przewlekłe + ostre	metaplazja
2	przewlekłe + ostre	metaplazja
3	przewlekłe	-
4	ostre	metaplazja
5	przewlekłe + ostre	-
6	przewlekłe	metaplazja
7	przewlekłe	-
8	przewlekłe + ostre	-
9	przewlekłe	-
10	przewlekłe + ostre	metaplazja
11	przewlekłe	-
12	przewlekłe	-
13	przewlekłe + ostre	-
14	przewlekłe	dysplazja
15	przewlekłe + ostre	metaplazja
16	przewlekłe	dysplazja
17	ostre	metaplazja
18	przewlekłe	-
19	przewlekłe + ostre	-
20	przewlekłe + ostre	-
21	przewlekłe	-
22	przewlekłe + ostre	metaplazja
23	przewlekłe + ostre	-
24	przewlekłe	-
25	ostre	dysplazja
26	przewlekłe	dysplazja
27	przewlekłe	-
28	przewlekłe	-
29	przewlekłe	-
30	przewlekłe	metaplazja
31	przewlekłe	-
32	przewlekłe + ostre	-
33	przewlekłe	-



W części tych komórek występowały duże nieregularności budowy otoczki jądrowej, nie tylko formowanie jąder wrębiastych, ale także braki fragmentów otoczki jądrowej – niekiedy rozległe. W komórkach pozbawionych dużych obszarów otoczki jądrowej chromatyna „wysypywała” się do cytoplazmy (Fot. 8).

Część biopsji stanowiących materiał badawczy pokrywał nabłonek wielowarstwowy płaski z obecnymi figurami podziału w warstwach środkowych. Jądra w komórkach tego nabłonka były powiększone, wielokształtne, niektóre z wielkimi lub mnogimi jąderkami (Fot. 14, 16, 18, 19). W wielu komórkach należących do nabłonka wielowarstwowego płaskiego znajdowano jądra o bardzo zmienionych kształtach, pozbawione na długich odcinkach otoczki jądrowej; zespoły chromatyny leżały między strukturami cytoplazmy (Fot. 18, 19). Obraz może odpowiadać brakowi lamin jądrowych.

Ogniskowo znajdowano komórki dwujądrowe, jedno z jąder było otoczone otoczką, a drugie całkowicie otoczki pozbawione (Fot. 14, 16). W ocenianym materiale widoczne były pojedyncze nieprawidłowe mitozy, co razem z komórkami w podziale powyżej warstwy podstawnej oraz licznymi komórkami o powiększonych jądrach z ubytkami otoczki jądrowej i materiałem chromatyny w cytoplazmie świadczyć może o dysplazji.

#### **4.7. Ocena mikrobiologiczna materiału uzyskanego z płukania oskrzelowego**

W badaniach mikrobiologicznych materiału uzyskanego z BAL wyhodowano drobnoustroje należące do 13 różnych gatunków. Stwierdzono obecność *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* MSSA (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*), odpowiednio u 12 i 11 chorych. *Staphylococcus aureus* MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) i *Streptococcus viridans* wykazano u 9 pacjentów. W 7 przypadkach stwierdzono występowanie *Neisseria* spp., w 3 *Haemophilus influenzae* oraz po 2 przypadki *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia* i *Candida albicans*. U nielicznych chorych wykazano obecność *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella lacunata*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Candida sake*. W analizowanym materiale u żadnego pacjenta nie potwierdzono obecności prątków kwasoopornych (Tabela XV).

Tabela XV. Częstości występowania bakterii i grzybów w materiale z płukania oskrzelowego chorych na mukowiscydozę

Rodzaj bakterii	Częstość występowania	
	n	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	36,36
<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	11	33,33
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	9	27,27
<i>Streptococcus viridans</i>	9	27,27
<i>Neisseria spp.</i>	7	21,21
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	9,09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	6,06
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	6,06
<i>Candida albicans</i>	2	6,06
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	3,03
<i>Moraxella lacunata</i>	1	3,03
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	3,03
<i>Candida sake</i>	1	3,03
Prątki gruźlicy	0	0,00
MOTT	0	0,00

Występowanie jednocześnie 4 gatunków bakterii i grzybów wykazano u 2 chorych, 3 różne patogeny obecne były w 7 przypadkach i w takiej samej grupie stwierdzono pojedyncze gatunki. U 7 chorych kolonizacji drzewa oskrzelowego przez *Pseudomonas aeruginosa* towarzyszyło zakażenie *Staphylococcus aureus*, w tym u 5 chorych był to typ *MRSA* (Tabela XIV).

Tabela XVI. Występowanie bakterii i grzybów w materiale z płukania oskrzelowego u dorosłych chorych na mukowiscydozę

Lp.	P. ae.	S.a MS	S.a MR	St. v.	N. sp.	H. in.	K. pn.	B. ce.	C. al.	C. p.	S. pn.	M. la.	S. ma.	C. sa.
1	+													
2	+			+						+				
3				+	+					+				
4		+												
5				+	+	+								
6		+		+	+									+
7			+	+										
8			+				+			+			+	
9	+	+												
10	+		+			+								
11				+	+									
12				+						+				
13	+													
14							+							
15		+						+						
16		+									+			
17				+	+									
18	+		+		+									
19									+					
20	+		+											
21	+	+												
22			+	+	+									
23		+												
24		+												
25	+		+											
26		+						+						
27		+				+				+				
28												+		
29	+	+							+					
30			+											
31	+													
32	+		+							+				
33										+				

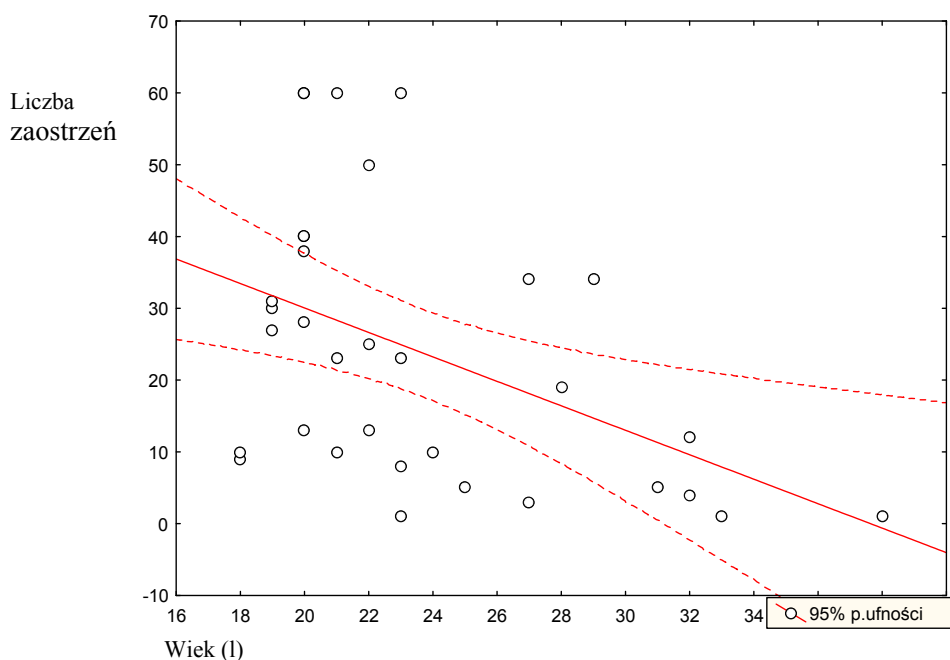
P. ae. – *Pseudomonas aeruginosa*, S.a. MS – *Staphylococcus aureus* MSSA, S.a. MR – *Staphylococcus aureus* MRSA, St. V. – *Streptococcus viridans*, N. sp. – *Neisseria spp.*, H. in. – *Haemophilus influenzae*, K. pn. – *Klebsiella pneumoniae*, B. ce. – *Burkholderia cepacia*, C. al. – *Candida albicans*, S. pn. – *Streptococcus pneumoniae*, M. la. – *Moraxella lacunata*, S. ma. – *Stenotrophomonas maltophilia*, C. sa. – *Candida sake*

Zastosowanie metody PCR w grupie 22 chorych na mukowiscydozę pozwoliło na stwierdzenie obecności DNA *Chlamydomydia pneumoniae* w biopłatach błony śluzowej oskrzeli u 7 z nich.

#### 4.8. Korelacja wybranych parametrów określających stan kliniczny chorych i zmian histopatologicznych w błonie śluzowej oskrzeli

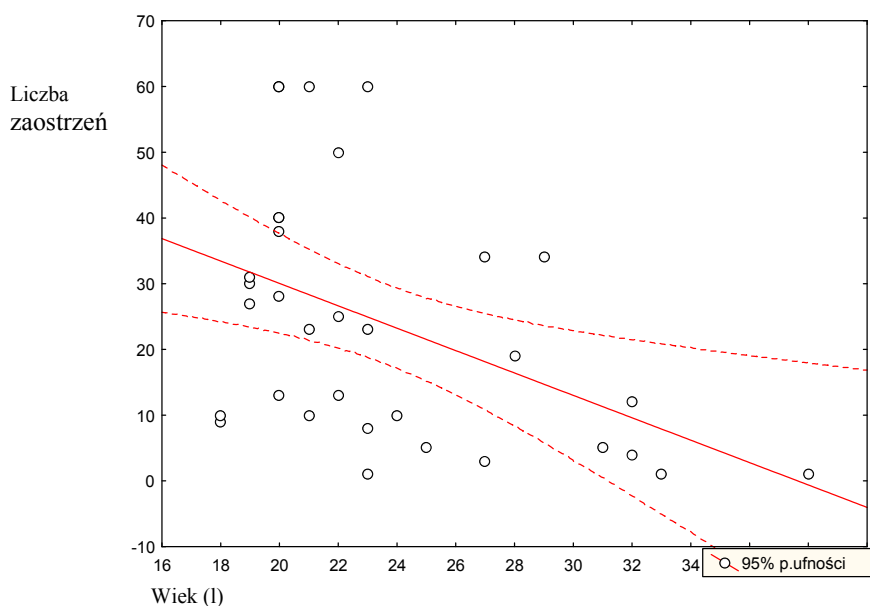
Parametry wybrane w celu oceny stanu klinicznego chorych zostały poddane korelacji wg porządku rang Spearmana we wszystkich kombinacjach ( $p < 0,05$ ). Analizie poddano stopnie klinicznego zaawansowania choroby wg Shwachmana i Kulczyckiego, wiek chorych, wiek postawienia rozpoznania, wartości BMI i FEV<sub>1</sub>, makroskopowo stwierdzone zmiany zapalne i zaawansowanie zmian radiologicznych płuc, a także obecność cukrzycy i zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki. Parametry opisujące stan kliniczny zostały skorelowane ze zmianami histopatologicznymi w nabłonku i błonie śluzowej właściwej, takimi jak rodzaj zapalenia, stan nabłonka urzęsionego, stopień skolagenizowania blaszki właściwej i pogrubienia błony podstawnej oraz metaplasja i dysplazja.

Stwierdzono, że u młodszych dorosłych zaostżenia choroby oskrzelowo-płucnej wymagające hospitalizacji występowały częściej, a u chorych w starszym wieku ich liczba była mniejsza (Rycina 1).



Rycina 1. Zależność liczby zaostżeń w przebiegu mukowiscydozy i wieku chorych. Korelacja:  $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ .

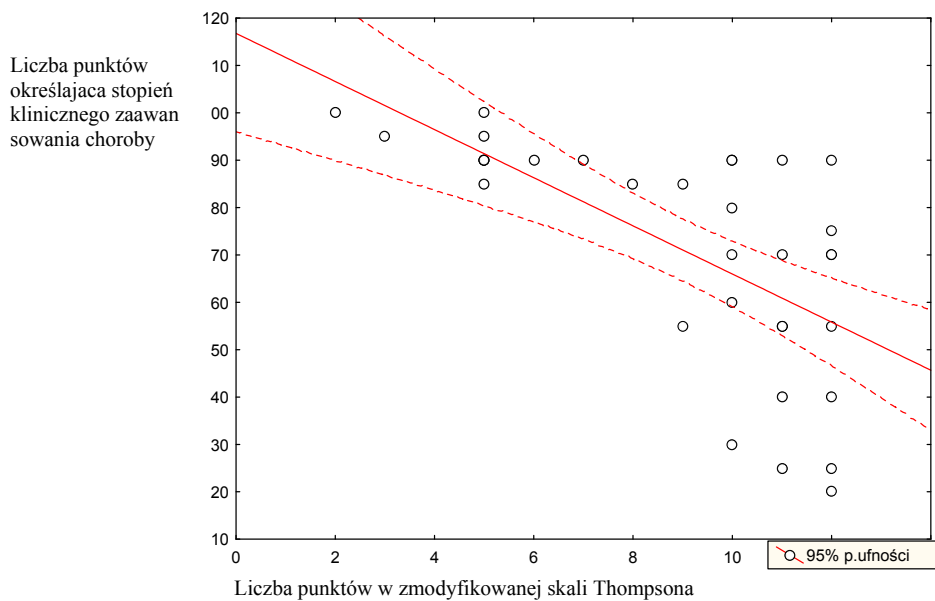
Liczba zaostrzeń choroby oskrzelowo-płucnej korelowała w sposób istotny z wiekiem chorego, w którym rozpoznano mukowiscydozę. U chorych, u których choroba została stwierdzona w 1 roku życia oraz do 10 roku życia, wykazano największą liczbę zaostrzeń. Chorzy, u których rozpoznanie zostało postawione w późniejszym okresie życia, charakteryzowali się rzadziej występującymi zaostrzeniami (Rycina 2).



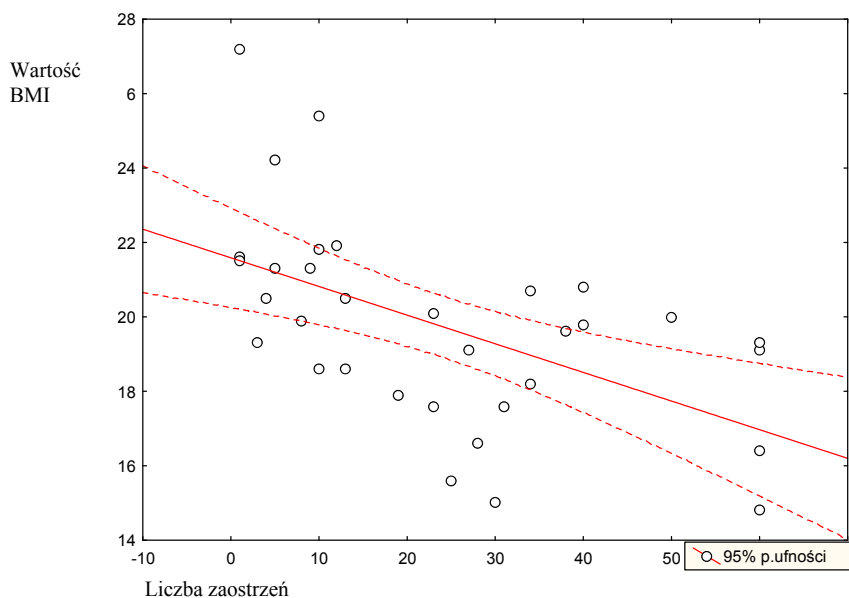
Rycina 2. Zależność liczby zaostrzeń w przebiegu mukowiscydozy i wieku chorych, w którym potwierdzono rozpoznanie. Korelacja:  $r = -0,53$ ,  $p < 0,05$ .

Stwierdzono, że u chorych w gorszym stanie klinicznym, określonym na podstawie kryteriów Shwachmana i Kulczyckiego zmiany zapalne oskrzeli w ocenie makroskopowej były bardziej nasilone (Rycina 3).

Wykazano również, że większa liczba przebytych zaostrzeń choroby korelowała z niższymi wartościami BMI, które u większości chorych wskazywały na prawidłową masę ciała i tylko w 9 przypadkach na niedożywienie (Rycina 4).

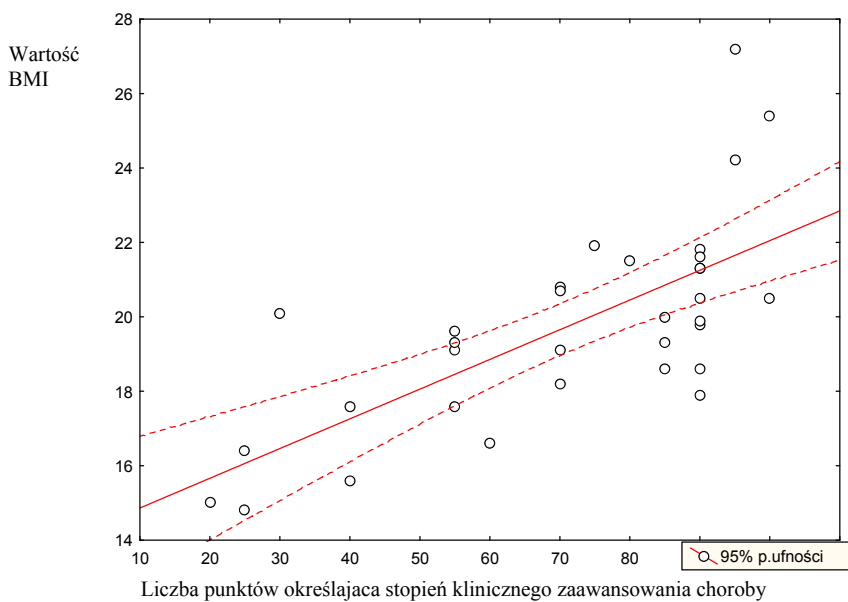


Rycina 3. Zależność liczby punktów określających zaawansowanie zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym w zmodyfikowanej skali Thompsona i stopień klinicznego zaawansowania choroby wg kryteriów Shwachmana i Kulczyckiego.



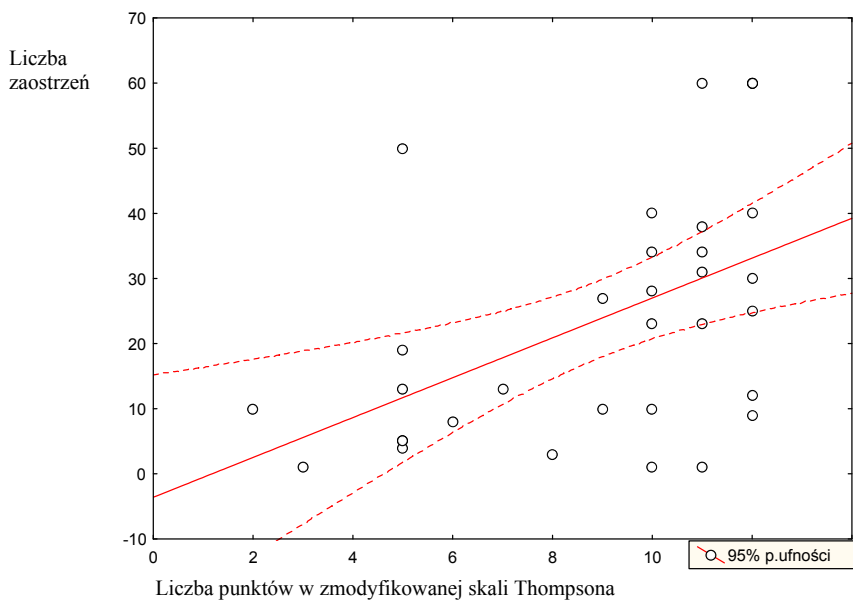
Rycina 4. Zależność liczby zaostrzeń w przebiegu mukowiscydozy i wartości BMI. Korelacja:  $r = -0,54$ ,  $p < 0,05$ .

Stwierdzono, że gorszy stan kliniczny chorych określony wg przyjętych kryteriów Shwachmana i Kulczyckiego pozostawał w związku z niższymi wartościami BMI, w tym ze stanem niedożywienia chorych (Rycina 5).



Rycina 5. Zależność liczby punktów określających stopień zaawansowania klinicznego choroby wg Shwachmana i Kulczyckiego i wartości BMI. Korelacja:  $r = 0,71$ ,  $p < 0,05$ .

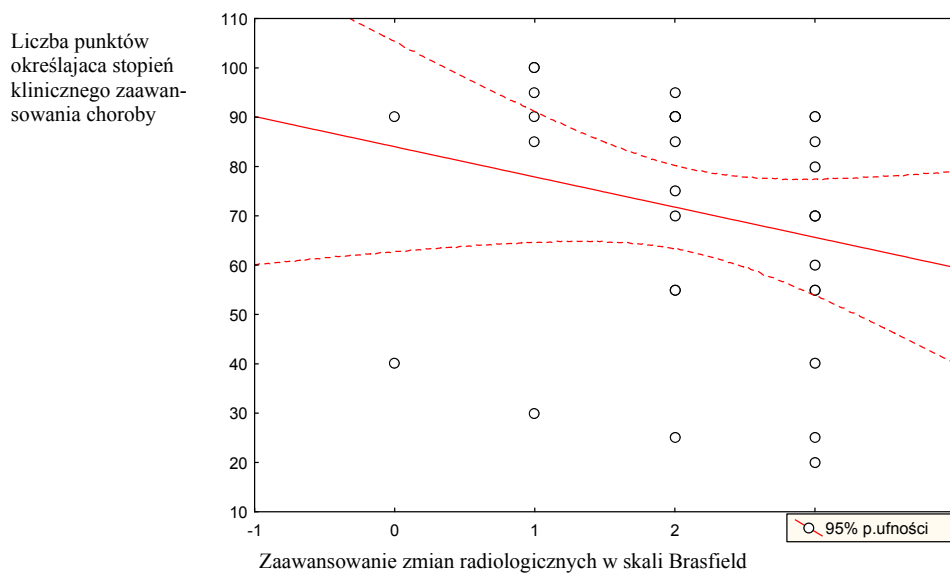
Wykazano związek pomiędzy większą liczbą przebytych zaostrzeń choroby i bardziej zaawansowanymi w ocenie bronchoskopowej zmianami zapalnymi w oskrzelach (Rycina 6).



Rycina 6. Zależność liczby punktów określających zaawansowanie zmian zapalnych błony śluzowej w zmodyfikowanej skali Thompsona i liczby zaostrzeń choroby. Korelacja:  $r = -0,49$ ,  $p < 0,05$ .

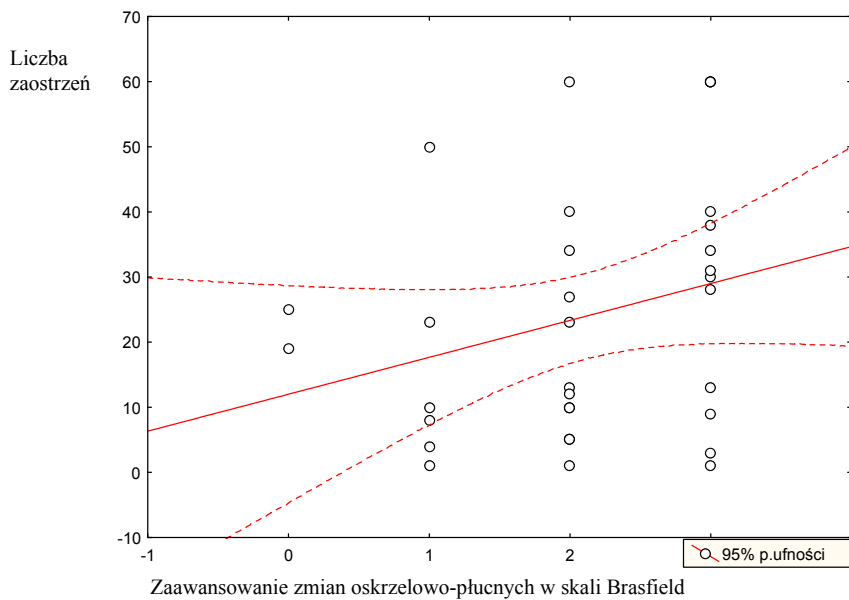


Wykazano, że bardziej zaawansowanym zmianom oskrzelowo-płucnym stwierdzanym badaniem radiologicznym klatki piersiowej odpowiadał gorszy stan kliniczny chorych, jednak zależność ta nie była istotna (Rycina 7).



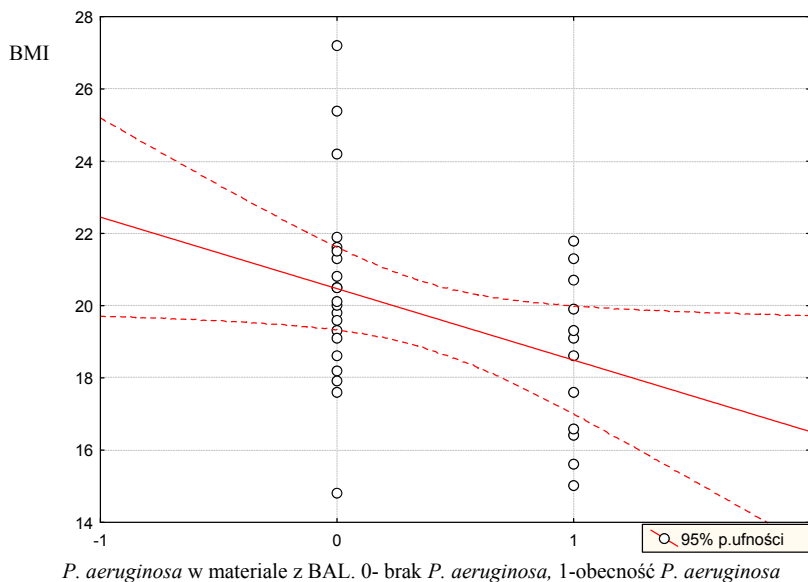
Rycina 7. Zależność określająca zaawansowanie zmian radiologicznych w skali Brasfield i stopień klinicznego zaawansowania choroby wg kryteriów Shwachmana i Kulczyckiego. Korelacja:  $r = -0,23$ ,  $p > 0,05$ .

Standardowe radiogramy klatki piersiowej ujawniły bardziej zaawansowane zmiany płucno-opłucnowe u chorych z większą liczbą przebytych zaostrzeń choroby oskrzelowo-płucnej (Rycina 8).

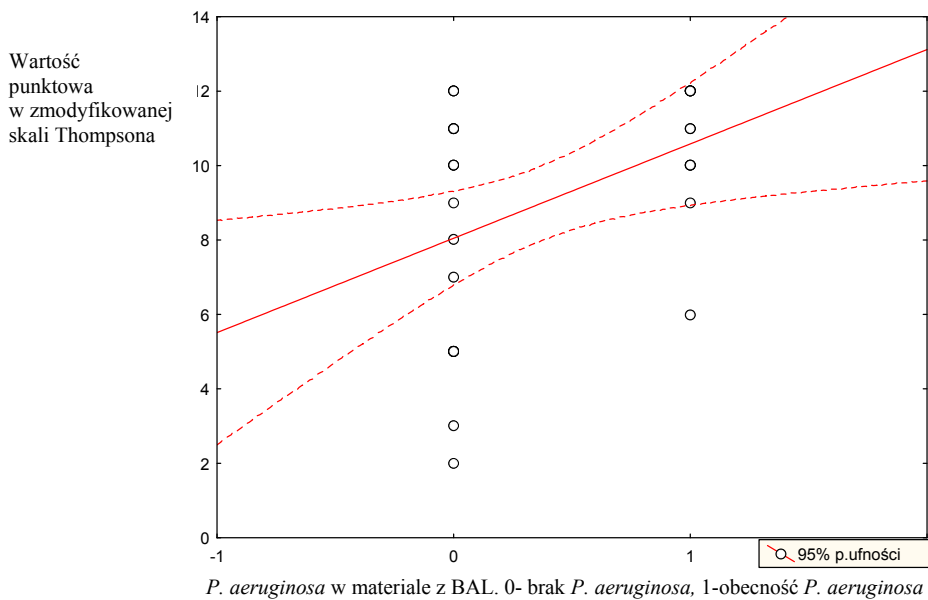


Rycina 8. Zależność liczby punktów określających zaawansowanie zmian radiologicznych w skali Brasfield i liczby zaostrzeń. Korelacja:  $r = -0,27$ ,  $p > 0,05$ .

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy skolonizowaniem drzewa oskrzelowego przez bakterie *P. aeruginosa* i niższymi wartościami BMI (Rycina 9) oraz kolonizacją tymi patogenami i większym zaawansowaniem procesów zapalnych oskrzeli (Rycina 10).

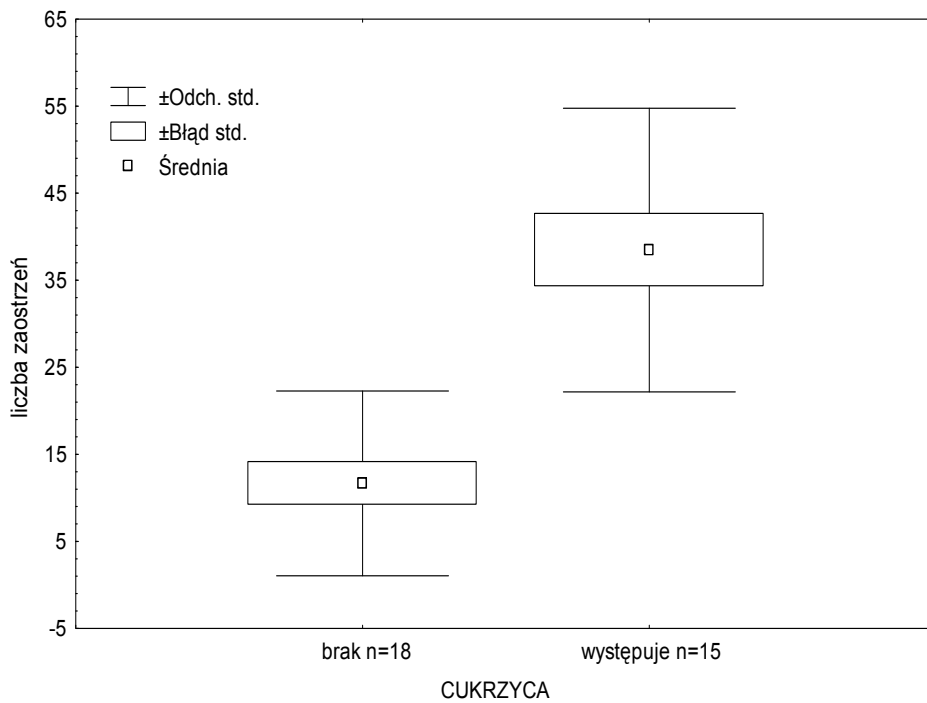


Rycina 9. Zależność pomiędzy kolonizacją dróg oddechowych przez *Pseudomonas aeruginosa* i wartościami BMI. Korelacja:  $r = -0,36$ ,  $p < 0,05$ .

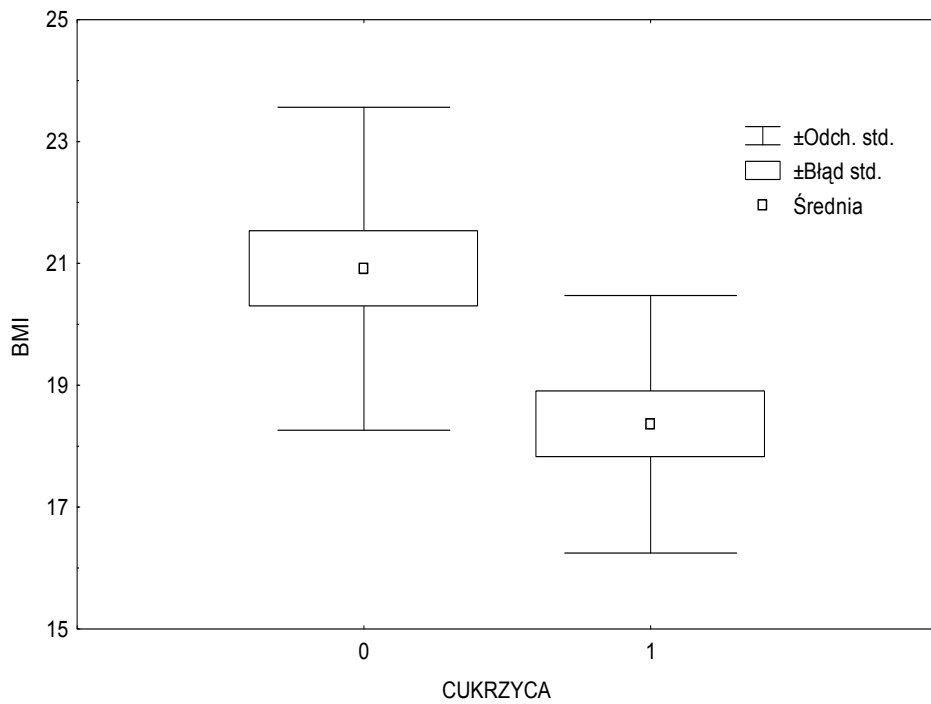


Rycina 10. Zależność pomiędzy kolonizacją dróg oddechowych przez *Pseudomonas aeruginosa* i wartością punktową w zmodyfikowanej skali Thompsona określającą zaawansowanie zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym. Korelacja:  $r = -0,41$ ,  $p < 0,05$ .

Występowanie cukrzycy u dorosłych chorych korelowało w sposób istotny z większą liczbą zaostrzeń choroby (Rycina 11) i gorszym stanem odżywienia (Rycina 12).

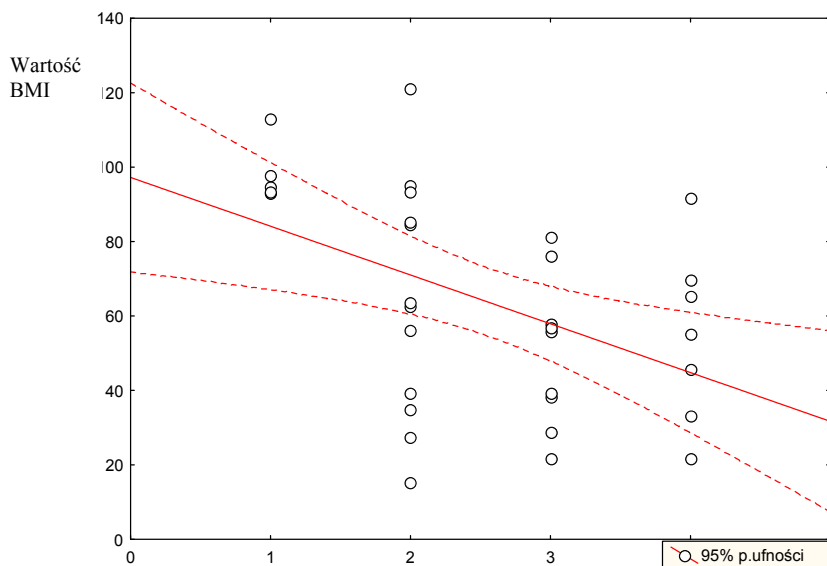


Rycina 11. Występowanie cukrzycy a liczba zaostrzeń choroby,  $p < 0,05$ .



Rycina 12. Występowanie cukrzycy a wartość BMI,  $p < 0,05$ .

Porównanie zmian histopatologicznych w nabłonku i błonie śluzowej właściwej z kryteriami określającymi stan kliniczny chorych wykazało istotną zależność pomiędzy wartościami BMI i stanem nabłonka urzęsionego. Stwierdzono, że z obniżaniem wartości BMI związane jest postępujące uszkodzenie nabłonka urzęsionego, jego ubytki i zmiany histologicznego typu nabłonka (Rycina 13).



Rycina 13. Zależność pomiędzy stanem nabłonka urzęsionego i wartością BMI,  $p < 0,05$ . Korelacja:  $r = -0,46$ ,  $p < 0,05$ .

## 4.9. Podsumowanie wyników badań

Dokonując podsumowania wyników przeprowadzonych badań, należy zwrócić uwagę przede wszystkim na skutki, jakie w układzie oddechowym spowodował wieloletni czas trwania choroby. Interesujące jest spostrzeżenie faktu, że choroba uwarunkowana genetycznie, powodująca od narodzin rozwój zaburzeń w wielu narządach i układach, została rozpoznana w różnych, często późnych okresach życia. W przypadku siedmiu chorych z nawracającymi infekcjami dróg oddechowych rozpoznanie mukowiscydozy zostało ustalone w wieku dorosłym. Potwierdzenie choroby w późniejszym wieku wynikało z utrzymującego się przez dłuższy czas dobrego samopoczucia i stanu klinicznego chorych, rzadkiego

występowania, poważniejszych zaostżeń lub z błędnie postawionego rozpoznania. Pozostali chorzy przebyli od kilku do kilkudziesięciu epizodów zaostżenia i byli z tego powodu wielokrotnie hospitalizowani. Mimo to większość chorych w okresach pomiędzy zaostżeniami choroby czuła się dość dobrze, kontynuując naukę lub pracę i przestrzegając zasady właściwego leczenia w warunkach domowych.

Badania bronchofiberoskopowe wykazały, że chorzy w gorszym stanie klinicznym mieli znacznie bardziej nasilone zmiany zapalne w drzewie oskrzelowym i liczne nieprawidłowości w obrazie radiologicznym płuc. W tej grupie chorych obserwowano silne przekrwienie i obrzęk błony śluzowej powodujący zwężenie światła oskrzeli oraz krwawienie z powierzchni błony śluzowej podczas endoskopowania dróg oddechowych. W świetle oskrzeli zalegała duża ilość ropnej lub śluzowo-ropnej wydzieliny. Standardowe radiogramy klatki piersiowej i tomografia komputerowa wykazały obecność licznych nieprawidłowości w postaci rozstrzeni oskrzeli i rozdęcia płuc oraz rozległe obszary zwłóknień, pęcherzy rozedmowych i zagęszczeń zapalnych w miąższu płucnym. Chorzy w gorszym stanie klinicznym mieli niedobór masy ciała.

Badania przeprowadzone na materiale pobranym od chorych na mukowiscydozę przedstawiają szerokie spektrum zmian w nabłonku oskrzeli. Chorzy, których wycinki badano, przedstawiają także szerokie spektrum wieku: od 18 do 38 lat. Podstawowym problemem klinicznym całej grupy chorych jest nieprawidłowy skład śluzu, co wywołuje niesprawność układu transportu śluzowo-rzęskowego. Skutkiem tych zmian jest stały nawrotowy odczyn zapalny w drzewie oskrzelowym. Przeprowadzone badania morfologiczne doskonale uzupełniają badania kliniczne, w tym szczególnie zestaw badań mikrobiologicznych uwzględniający szeroko patogeny występujące u chorych w drogach oddechowych. Wieloletni przebieg odzwierciedlają badania morfologiczne. Znalezione i opisane w pracy różnice w strukturze nabłoneków i błony śluzowej oskrzeli obejmują przede wszystkim zmiany w komórkach urzęsionych, kubkowych i pluripotencjalnych dróg oddechowych, zmianę charakteru nabłonka z gruczołowego na wielowarstwowy płaski i u kilkorga chorych dysplazję w nabłonku wielowarstwowym płaskim.

Zmiany komórek urzęsionych dotyczą w głównej mierze rzęsek. Najczęstszą zmianą jest brak ramion wewnętrznych dyneiny, ale – co ważne u tych chorych – pojedyncze rzęski mają braki obu ramion dyneiny. Zmiana nie jest częsta i dotyczy tych samych komórek, w których występuje brak ramion wewnętrznych tego białka. Inne wady budowy rzęsek to zmiany liczby rozkładu mikrotubul w aksonemie; bywają tubule obwodowe pojedyncze lub potrójne lub braki tubul centralnych. Rzęski są mniej liczne lub nieliczne, olbrzymie lub niejednokierun-



kowo ugięte. Inną zmianą są liczne mikrokosmki występujące na wolnych powierzchniach komórek urzęsionych zamiast rzęsek. Porównując opisane zmiany aparatu rzęskowego do licznych opisów z piśmiennictwa, można podsumować, iż wszystkie należą do zespołów dyskinezy rzęsek i nie są pierwotnym powodem zmian charakterystycznych dla mukowiscydozy. Istnieje także liczne piśmiennictwo, w którym przedstawiono dowody, iż chorzy z powodu mukowiscydozy nie mają genetycznie uwarunkowanej patologii rzęsek. Można wobec tego uznać, iż zmiany w strukturze, a co więcej w funkcji rzęsek mogą być zmianą nabytą. W oparciu o przeprowadzone badania morfologiczne cechy dyskinezy rzęsek stwierdzono u wielu zgromadzonych w tym badaniu chorych. Inną cechą układającą się w podobnych schematach myślenia o przyczynach i skutkach przewlekłych lub nawrotowych zapaleń dróg oddechowych są zmiany liczby komórek kubkowych: jest ich więcej w porównaniu z normą. W sumie zdarzeń dotyczących błony śluzowej oskrzeli ma to istotne znaczenie w sile występowania czynników ryzyka dla kolonizacji bakterii.

Wielokrotne odnowy nabłonków dróg oddechowych niszczonych w procesach zapalenia stanowią istotny czynnik ryzyka dla zmian charakter wyściółki nabłonkowej z gruczołowej na płaskonabłonkową. W badanym materiale wielokrotnie obserwowano gołe błony podstawne lub początki odnowy, także odnowy nieprawidłowej, odnowy zaawansowanej z obecnością komórek nabłonka kolczystego i nabłonka kolczystego z dysplazją. Należy podkreślić, iż zastosowanie mikroskopii elektronowej do przeprowadzania badań umożliwiło bardzo szczegółową analizę aparatu rzęskowego, ale także bardzo istotne merytorycznie zmiany charakteru struktur jąder komórkowych w dysplazji. Przeprowadzone badania wykazały obecność pojedynczych, zmienionych jąder w komórkach, które stale mają zachowany charakter komórek kolczystych. Komórki dwujądrowe o znacznie powiększonych jądrach z głębokimi wrębami otoczki jądrowej lub na długich odcinkach pozbawionych otoczek jądrowych należą do charakterystyki jąder typowej dla komórek przekształcających się w komórki nowotworowe.

Badania mikrobiologiczne wykazały obecność 13 różnych patogenów kolonizujących drogi oddechowe. Stwierdzono współwystępowanie kilku gatunków bakterii u wielu chorych. W ponad 1/3 przypadków drogi oddechowe były skolonizowane przez *P. aeruginosa*, patogen odpowiedzialny w głównej mierze za postępujące zmiany strukturalne i czynnościowe w układzie oddechowym. Wykazano związek pomiędzy obecnością tej bakterii w drogach oddechowych a nasileniem zmian zapalnych w błonie śluzowej oskrzeli i gorszym stanem odżywienia chorych. Podobną zależność w odniesieniu do zmian zapalnych i stanu odżywienia wykazano u chorych dotkniętych cukrzycą.

Niewątpliwie długi czas trwania choroby, stała obecność śluzu i flory patogennej oraz stan zapalny oskrzeli i uszkodzenie nabłonka dróg oddechowych były przyczyną powstania u części chorych zmian przednowotworowych w postaci metaplazji płaskonabłonkowej i dysplazji, które stanowią czynnik ryzyka przekształcenia w raka inwazyjnego.

Mukowiscydoza jest chorobą o niepomyślnym rokowaniu, stwarzającą choremu problemy natury fizycznej, psychicznej, emocjonalnej, społecznej, zawodowej i edukacyjnej. Zaangażowanie ze strony pacjenta i współpraca osób wielu specjalności medycznych i pozamedycznych stwarzają jednak szansę na poprawę jakości i wydłużenie życia chorych.

## 5. DYSKUSJA

Udoskonalenie metod diagnostyki i leczenia spowodowało poprawę jakości życia i wydłużenie czasu przeżycia chorych na mukowiscydozę. W 1989 roku średnia wieku przeżycia dla mężczyzn w krajach europejskich wynosiła 32 lata, a dla kobiet 29 lat [88]. Podobna była w 2004 roku [57], aktualnie określana jest na 36,8 [5]. Obecnie ponad 30% chorujących to osoby dorosłe, coraz więcej spośród nich dożywa wieku 40 i więcej lat [6]. Chorzy w wieku 18–29 lat stanowią 64% dorosłych chorych. W przedziale wiekowym 30–39 lat znajduje się około 25%, pomiędzy 40 i 50 rokiem życia 10%. Pacjenci w wieku powyżej 50 roku życia to 2% osób z mukowiscydozą dorosłych [89]. Lai i wsp. wykazali, że rozpoznanie choroby w pierwszym miesiącu życia i podjęcie prawidłowego leczenia wydłuża przeżycie chorych w porównaniu do tych, u których chorobę wykryto w okresie późniejszym [90].

Pomimo dużego postępu w opiece holistycznej nad chorymi z mukowiscydozą, wraz z upływem czasu trwania choroby i zwiększającą się liczbą przebytych zaostrzeń dochodzi do powstania nieodwracalnych zmian strukturalnych i czynnościowych, przede wszystkim w układzie oddechowym, ale także w innych narządach. Fakty te były przesłanką, na podstawie której przeprowadzono po raz pierwszy w Polsce kompleksową analizę kliniczno-patomorfologiczną grupy dorosłych chorych na mukowiscydozę w kontekście skutków jakie powoduje wieloletni przebieg choroby. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono podobnej analizy.

W przebadanej przez mnie grupie chorych średni wiek mężczyzn (20,9) był wyższy niż kobiet. Rozpoznanie mukowiscydozy zostało ustalone w różnym okresie życia, lecz w przeważającej liczbie przypadków (66%) w dzieciństwie. Warto zwrócić uwagę na fakt, że w 11 przypadkach (33%) prawidłowe rozpoznanie choroby zostało postawione w okresie pomiędzy 15 a 35 rokiem życia. Zaawansowanie choroby podstawowej i współistniejące powikłania, głównie w postaci kolonizacji dróg oddechowych bakteriami patogennymi, takimi jak *P. aeruginosa* i *B. cepacia*, podtrzymującymi i nasilającymi przewlekły stan zapalny w drzewie oskrzelowym, prowadzą do przewlekłej niewydolności oddechowej wymagającej przewlekłej tlenoterapii. Także kacheksja i cukrzyca były zależne od czasu trwania choroby i liczby przebytych zaostrzeń. Zmiany ze strony układu pokarmowego występowały rzadziej aniżeli w grupie dzieci. Przedstawione wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów [91].

W badanej grupie stwierdzono, że większe nasilenie zmian zapalnych drzewa oskrzelowego i kolonizacja *P. aeruginosa* występowały częściej u osób młodszych. Ocena bronchofiberoskopowa i badania mikrobiologiczne wykazały

u nich częstszą kolonizację bakteriami *P. aeruginosa*. Wartości BMI u 66,7% chorych były prawidłowe. Wyższe wartości wskaźnika stwierdzono u mężczyzn. Pomimo stosunkowo niedużych różnic wieku chorych wykazano, że wraz z wiekiem wzrastała wartość BMI oraz że wyższym wartościom BMI towarzyszyła mniejsza liczba zaostrzeń choroby oskrzelowo-płucnej. Niższe wartości BMI związane były z większym zaawansowaniem zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym, większą progresją zmian radiologicznych w płucach i częstszymi zaostrzeniami.

Nir i inni autorzy przedstawili odmienne wyniki. Stwierdzili, że u 98% młodszych chorych wartości BMI były zbliżone do normy, a w dalszym okresie choroby ulegały stopniowemu obniżeniu u 90% dorosłych mężczyzn oraz 83% kobiet i wyraźnie korelowały z wartościami parametrów czynnościowych płuc [88, 92]. Takiej zależności nie wykazano w opracowanym materiale badawczym.

Rozpoznanie mukowiscydozy w analizowanej grupie chorych zostało potwierdzone w każdym przypadku dodatnim wynikiem testu potowego. Uzyskane wyniki badań stężenia jonów chlorkowych w pocie były zróżnicowane i nie wykazano związku ze stopniem klinicznego zaawansowania choroby.

Badania molekularne przeprowadzone przy użyciu zestawu INNO-LiPA umożliwiły identyfikację mutacji na obu allelach genu CFTR u 36% chorych. Najczęściej rozpoznawano mutację F508del, której obecność na co najmniej jednym allelu stwierdzono u 54,5% chorych. Częstość występowania mutacji F508del w populacji chorych na mukowiscydozę w Polsce jest podobna i według różnych autorów wynosi od 53 do 73% [1, 2]. W przypadku 36% pacjentów nie udało się określić mutacji na żadnym z obu alleli genu CFTR. W badanej przeze mnie grupie chorych nie stwierdziłem istotnej zależności pomiędzy typem mutacji genu CFTR, a stanem klinicznym chorych i nasileniem procesów zapalnych w drzewie oskrzelowym.

Przeprowadzone przeze mnie badania spirometryczne mające podstawowe znaczenie w rozpoznawaniu i określaniu stopnia zaawansowania obturacji dały wynik prawidłowy u ponad 1/3 chorych. W pozostałych przypadkach stopień obturacji oskrzeli był różny, od umiarkowanego, poprzez ciężki do bardzo ciężkiego. Terhaggen i inni autorzy wskazali znaczną czułość  $FEV_1$  w monitorowaniu zaburzeń wentylacji u chorych na mukowiscydozę i zmienność wartości tego wskaźnika w przebiegu choroby. Wykazali istotną dodatnią korelację  $FEV_1$  z nasileniem zmian radiologicznych w płucach i stanem klinicznym chorych [44, 46, 50]. W badanej grupie chorych nie stwierdziłem zależności pomiędzy stopniem obturacji a innymi zmiennymi określającymi stan chorego. Stwierdziłem natomiast, że znacznemu zaawansowaniu klinicznemu mukowiscydozy towarzyszyły bardziej rozległe i różnorodnie zmiany w obrazie radiologicznym płuc.

Obejmowały one częściej górną połowę pól płucnych i przedstawiały obraz liniowych, guzkowo-torbielowatych lub obrączkowatych zacienień świadczących o obecności zwłóknień i rozstrzeni oskrzeli.

Santamaria i wsp. wykazali wysoką zgodność pomiędzy stopniem zaawansowania zmian obserwowanych na standardowych radiogramach i w HRCT. Autorzy sugerują, że HRCT jest szczególnie przydatną metodą w rozpoznawaniu mało nasilonych zmian oskrzelowo-płucnych we wczesnym okresie choroby, natomiast do monitorowania zmian badaniem podstawowym pozostaje konwencjonalne zdjęcie rentgenowskie [93].

Brody i wsp. znaleźli dodatnią korelację wyniku punktowej oceny zmian płucnych w badaniu HRCT z wartościami FVC i FEV<sub>1</sub> [51]. W innym opracowaniu Helbich i wsp. stwierdzili związek pomiędzy nasileniem zmian śródmiąższowych płuc obserwowanych w HRCT i progresją zaburzeń czynnościowych oraz stopniem zaawansowania klinicznego w skali wg Shwachmana i Kulczyckiego. W okresie 18 miesięcy obserwacji ewolucja zmian oskrzelowo-płucnych nie była wyraźnie widoczna i wymagała większego odstępu czasu [94]. Podobne spostrzeżenia poczynili Asis [95], Kanaga [96] i Logan [97]. Moje badania nie były badaniami progresywnymi.

Z wydłużeniem czasu przeżycia chorych związane jest częstsze występowanie niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki oraz upośledzenie tolerancji glukozy i cukrzyca [89]. Loubieres określa odsetek zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki u dorosłych na 85-90% [98]. U chorych objętych badaniem niewydolność zewnątrzwydzielniczą trzustki stwierdziłem w 76%, a cukrzycę w 45% przypadków. Obecność cukrzycy była związana z większą liczbą przebytych zaostrzeń i gorszym stanem odżywienia chorych, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów [99]. Moran i wsp. wskazują na 6-krotnie wyższy współczynnik umieralności u chorych z cukrzycą w porównaniu z pozostałymi chorymi [100]. Zaburzenia stanu odżywienia u części chorych badanej grupy związane były także ze zwiększoną utratą energii spowodowaną znacznym wysiłkiem oddechowym i zaburzeniami wchłaniania z przewodu pokarmowego.

W celu makroskopowej oceny zaawansowania procesu zapalnego błony śluzowej oskrzeli przeprowadzanej podczas bronchofiberoskopii, zastosowałem zmodyfikowaną na potrzeby badania skalę punktową Thompsona. Skala została sporządzona i była wykorzystywana dotychczas do określania nasilenia przewlekłego zapalenia oskrzeli, lecz nie była stosowana u chorych na mukowiscydozę. Stąd, nie było możliwe odniesienie wyników badań własnych do uzyskanych przez innych autorów. Dokonane przeze mnie spostrzeżenia pozwalają na stwierdzenie przydatności metody do oceny stopnia progresji zapalenia w drzewie oskrzelowym także u chorych na mukowiscydozę. Autor opracował

przydatną klinicznie modyfikację oceny cech zapalenia błony śluzowej widocznych podczas bronchofiberoskopii.

Wykonywany w czasie bronchofiberoskopii BAL ujawnił przewagę granulocytów obojętnochłonnych u 2/3 chorych, w pozostałych przypadkach dominowały makrofagi. U chorych z większym udziałem makrofagów w BAL wykazano mniejszą progresję zmian w ocenie bronchoskopowej i radiologicznej oraz prawidłowe parametry spirometryczne.

Przewlekła kolonizacja dróg oddechowych, podtrzymująca procesy zapalne, prowadzi do rozwoju zmian strukturalnych w nabłonku oskrzelowym i błonie śluzowej właściwej. W piśmiennictwie znajdują się liczne opracowania dotyczące zaburzeń morfologicznych obserwowanych w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym.

Carlos [101] w nabłonku oskrzeli chorych na mukowiscydozę obserwował zmniejszenie liczby rzęsek, zmiany o typie metaplastji płaskonabłonkowej, złuszczenie nabłonka i odsłonięcie błony podstawnej, niekiedy z jej owrzodzeniem. W błonie śluzowej właściwej i podśluzowej stwierdził obecność zmian zapalnych w fazie ostrej lub przewlekłej, z przerostem gruczołów oskrzelowych i komórek śluzowych. Rozstrzenie oskrzeli rzadko były obecne przed 4 miesiącem życia, natomiast występowały częściej w starszych grupach wiekowych. Rozedmę płuc autor ten obserwował już w 3 roku życia chorych. Leight [78] przeprowadził badania histopatologiczne wycinków błony śluzowej od 3 do 5 podziału oskrzeli, uzyskanych od chorych na mukowiscydozę poddanych transplantacji płuc. Wyniki badań w odniesieniu do wszystkich struktur błony śluzowej nie odbiegały od spostrzeżeń opublikowanych przez Carlosa.

W innym opracowaniu Daniel [77] określił udział komórek rzęskowych, kubkowych, szczoteczkowych, neuroendokrynych, wydzielniczych, podstawnych i niezidentyfikowanych w budowie nabłonka oskrzelowego. Stwierdził w nim również zwiększoną liczbę komórek zapalenia, w tym neutrofilii, makrofagów, limfocytów i eozynofili. Uzyskane wyniki porównał do otrzymanych od osób zdrowych. Przyczyniło się to do zrozumienia procesów zachodzących w nabłonku w wyniku nawrotów zapalenia. Hubeau [102] stwierdził, że obecność komórek nacieku zapalnego w drogach oddechowych jest powodem zmniejszenia światła oskrzeli i pogrubienia ściany pęcherzyków płucnych.

Wyniki badań własnych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie dostarczyły danych wykazujących zróżnicowanie zmian morfologicznych w nabłonku oskrzelowym i błonie śluzowej właściwej u chorych na mukowiscydozę. Uszkodzenie nabłonka urzęsionego obserwowano u większości chorych w formie częściowych ubytków lub ogniskowego występowania zespołów komórek nabłonka w trakcie regeneracji oraz zupełnego braku komórek nabłonka. Zaburzenia ja-

kościowe dotyczyły współwystępowania nabłonka jednowarstwowego urzęsionego zbudowanego z komórek sześciennych i walcowatych z nabłonkiem wielowarstwowym płaskim lub przewagi obecności nabłonka wielowarstwowego płaskiego. W części przypadków stwierdzano oderwanie fragmentów nabłonka oskrzelowego od błony podstawnej. W komórkach nabłonka urzęsionego wykazano nieregularne występowanie rzęsek, spadek liczby rzęsek, ich skrócenie, nieprawidłowe aksonemy, rzęski olbrzymie i wielokierunkowo ugięte. W części komórek pozbawionych rzęsek występowały liczne, czasami rozgałęzione mikrokosmki.

W materiale własnym stwierdzono ponadto odwrotną korelację pomiędzy zaawansowaniem zapalenia i liczbą komórek urzęsionych nabłonka oskrzelowego, w której większemu nasileniu zapalenia odpowiadało zmniejszenie liczby komórek urzęsionych. Wykazano także w większości przypadków zwiększenie liczby komórek kubkowych i rozdęte, wypełnione śluzem gruczoły śluzowe, prawidłowo umieszczone w błonie podśluzowej, zlewające się i wpuklające w obręb błony śluzowej właściwej. Stwierdzono obrzęk błony śluzowej i w większości przypadków znaczną kolagenizację zrębu oraz blaszki właściwej.

Badania wykonane w transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykorzystane przez Gilljama w 1987 roku do oceny nabłonka dużych oskrzeli u chorych na mukowiscydozę wykazały, że zmiany ultrastrukturalne w nabłonku tchawiczo-oskrzelowym nie były typowe dla mukowiscydozy. Do podobnych spostrzeżeń doszli inni badacze cytowani przez tego autora (Kondradova 1979, Katz i Holclaw 1980, Sturges 1981, Cornilie i Lauweryns 1984, Wunderlich 1986) [103].

Kondradova, Bedrossian i Katz stwierdzili u chorych w dobrym stanie klinicznym obecność nabłonka oskrzelowego, podobnego do występującego u osób zdrowych lub z przewlekłym zapaleniem oskrzeli. Jediną morfologicznie istotną różnicą była liczba mikrokosmków przypadająca na komórkę rzęskową u chorych na mukowiscydozę. Liczba ta była o 17% mniejsza niż u pacjentów z przewlekłym zapaleniem oskrzeli i 34% mniejsza niż u osób zdrowych [104, 105]. Mikroskopia elektronowa przeprowadzona przez tych autorów wykazała istotne, patologiczne różnice w wyglądzie nabłonka oskrzeli pomiędzy osobami z łagodnym i ciężkim przebiegiem choroby. Stwierdzano obrzęk komórek rzęskowych, obrzmienie mitochondriów, poszerzenie siateczki śródplazmatycznej oraz zaburzenie organizacji brzegu rzęskowego (Wunderlich 1986). W obrębie rzęsek występowała nieprawidłowa liczba mikrotubul (różniąca się od prawidłowego wzoru „9+2”), utrata centralnych mikrotubul, przemieszczenie dubletów mikrotubul obwodowych aksonemy, utrata błony komórkowej rzęsek, nadmiar macierzy cytoplazmatycznej i rzęski olbrzymie. We wcześniej opublikowanych badaniach u chorych na mukowiscydozę nie wykazano zmian typowych dla ze-



społu nieruchomych rzęsek, w którym stwierdza się brak ramion dyneinowych oraz zaburzenia liczby i układu mikrotubul obwodowych aksonem. Opisanymi morfologicznymi odmianami tego zespołu były rzęski z wadliwymi promieniami łączącymi. Atypia rzęskowa u chorych na mukowiscydozę była charakterem i częstością występowania (2–7%) porównywalna do atypii u chorych z przewlekłym zapaleniem oskrzeli. Wyjątek stanowiły rzęski zdwojone i olbrzymie [106].

W moim materiale badawczym niektóre zaburzenia budowy komórek urzęsionych i rzęsek były podobne do przedstawionych przez cytowanych wcześniej autorów. Dodatkowo stwierdzono wypustki cytoplazmy z zespołami dubletów mikrotubul lub wypustki pozbawione układu ruchowego rzęsek. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Katz'a i Holclaw'a znaczna część rzęsek (42,4% chorych) nie posiadała ramion wewnętrznych dyneiny, a część pozbawiona była obu ramion. Wykazano obecność rzęsek z nieprawidłowymi liczbami dubletów mikrotubul i przesunięciem dubletów obwodowych w kierunku dubletu centralnego. Stwierdzono zespoły układów mikrotubul w liczbie większej niż przypadająca na jedną rzęskę, wynoszącą od 2 do 20, rzęski olbrzymie, a także dodatkowe, pojedyncze mikrotubule położone na obwodzie rzęsek. W licznych rzęskach stwierdzano odwarstwienie błony komórkowej od zespołów aksonemy i filamentów cytoplazmy. Brak ramion wewnętrznych dyneiny oraz zaburzona liczba i położenie mikrotubul lub ich zespołów wykazano głównie u chorych z zaawansowanymi zmianami stwierdzanymi w badaniach bronchoskopowych i radiologicznych klatki piersiowej. Zaburzenia dotyczące mikrotubul występowały zarówno u chorych z mukowiscydozą o łagodnym przebiegu, jak i w cięższej postaci choroby. Podobnie jak inni autorzy [76] stwierdziłem obecność ognisk metaplastji płaskonabłonkowej nabłonka oskrzelowego. Leżące w wielu warstwach komórki płaskonabłonkowe miały cechy typowe dla nabłonka wielowarstwowego płaskiego w postaci mostków cytoplazmatycznych, poszerzenia retikulum endoplazmatycznego, zmienionych mitochondriów, zwiększenia liczby lizosomów i cytolizosomów oraz miernie licznych pęczków cytokeratyn.

W badaniach własnych, w niektórych przypadkach wykazano zaburzone proporcje między obszarem zajęтым przez struktury jąder w stosunku do cytoplazmy. Obserwowano między innymi zajęcie znacznej części cytoplazmy komórek nabłonka sześciennego przez jądra komórkowe. Posiadały one duże zespoły euchromatyny oraz pojedyncze, powiększone jąderka o cechach aktywacji. Cytoplazma takich komórek zawierała dość liczne pęczki włókienek cytokeratyn, dość liczne mitochondria a także liczne zespoły wolnych poliribosomów oraz pojedyncze kanały szorstkie. Sieć graniczna była poprzerrywana i nieregularna, głęboko osadzona w cytoplazmie, niekiedy sięgała obszaru oko-



jądrowego. Opisane wyżej zmiany oraz zaburzenia struktury rzęsek mogą być wykładnią zaburzeń różnicowania, dojrzewania i manifestujących się zmianami części struktur cytoplazmy komórek.

Nabłonek oskrzelowy odgrywa istotną rolę w patogenezie zapalenia dróg oddechowych (ostrego, jak i przewlekłego) oraz pełni ważną funkcję obronną [107, 108]. Uszkodzenie funkcji oczyszczania śluzowo-rzęskowego uważane jest przez Houtmeyers`a za podstawowy czynnik rozwoju przewlekłych zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym [109, 110, 111].

W własnym materiale badawczym stwierdzono niszczenie komórek nabłonka lub zaburzenia jego struktury. Widoczne było zwiększenie liczby komórek kubkowych. Obserwowano ubytki komórek nabłonka lub ich degenerację, a także zwiększenie liczby komórek podstawnych. Stwierdzone zmiany mogły być wynikiem nieprawidłowego procesu różnicowania lub dojrzewania komórek. Konsekwencją zaburzeń różnicowania komórek była zwiększona aktywność proliferacyjna nabłonka oraz stany przejściowe. Ponadto wykazano obecność metaplazji płaskonabłonkowej i zanik nabłonka urzęsionego wskutek zmienionego procesu różnicowania będącego najprawdopodobniej skutkiem mutacji. Obserwowane w procesach regeneracji (w stanie przejściowym) komórki podstawne lub wyższe z szerszą cytoplazmą lub poligonalnym kształcie miały jądra euchromatynowe lub heterochromatynowe. Zawierały liczne tonofilamenty i/ lub ich pęczki w cytoplazmie. Może to stanowić argument dla myślenia o zmianach towarzyszących kolejnym etapom metaplazji płaskonabłonkowej. W oparciu o badania własne można podejrzewać, że obecność komórek poligonalnych w nabłonku oskrzelowym powinna być rozważana jako stan przejściowy pomiędzy strukturą rzekomo warstwową, a metaplazją płaskonabłonkową. Przemiana nabłonka oskrzelowego w kierunku metaplazji płaskonabłonkowej dokonywała się w okresie znacznego zaawansowania przewlekłego procesu zapalnego i była równoległa do nasilonego rozwoju włóknienia w błonie śluzowej oskrzeli. Badania Polosukhina sugerują podobny układ kolejnych etapów zmian nabłonka u chorych z przewlekłymi zapaleniami oskrzeli, wskazując na możliwość powstawania mutacji prowadzących w konsekwencji do dysplazji [111, 112].

W innym opracowaniu Polosukhin podał, że proliferacja komórek podstawnych stanowi element związany ze zmianami zapalnymi w nabłonku oskrzelowym. Dalszy rozwój zapalenia jest wynikiem poważnych zmian w komórkach nabłonka. W zaawansowanym okresie zapalenia obserwowany jest zwykle wysoki poziom odnowy komórek powierzchni nabłonka, często związany z ich niecałkowitym różnicowaniem [113]. Zbliżone wnioski przedstawił Kim, stwierdzając, że metaplazja płaskonabłonkowa i zmiany charakteru nabłonka

oskrzelowego są końcowymi etapami przebiegających w kolejności przekształceń nabłonka oskrzelowego i zaawansowanego procesu włóknienia [114].

Podobne do przedstawionych zmian, we własnym materiale badawczym wykazano obecność przekształceń strukturalnych nabłonka oskrzelowego i błony śluzowej właściwej oraz metaplazję płaskonabłonkową i dysplazję. Towarzyszyło im znaczne zaawansowanie procesów zapalnych i włóknienie. Breuer wykazał, że ciężka dysplazja, stwierdzona w wycinkach błony śluzowej oskrzeli może ulegać przemianie w raka *in situ* lub inwazyjnego raka płaskonabłonkowego. Ogniska dysplazji rzadziej są stabilne lub podlegają regresji. Wykorzystanie odpowiedniego zestawu biomarkerów ma określoną wartość diagnostyczną, jednak w opinii autora rozstrzygające znaczenie ma wynik badania histopatologicznego [115]. Wykładniki przewlekłego zapalenia w drzewie oskrzelowym i powodowane przez nie procesy przebudowy nabłonka, mogące doprowadzić do rozwoju raka płuca obserwowano w wielu innych zespołach chorobowych, takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc, włóknienie płuc i sarkoidoza [116, 117, 118, 119].

Verhaeghe zasugerował, że zwiększona angiogeneza w tkankach osób chorych na mukowiscydozę jest możliwym skutkiem procesów zapalnych, podobnie jak ma to miejsce w astmie i przewlekłym zapaleniu oskrzeli. Aktualnie prowadzone badania wskazują na istotny udział komórek nabłonka dróg oddechowych w procesach proangiogenezy u chorych na mukowiscydozę, a także w innych chorobach oskrzeli. Autorzy potwierdzili funkcję proangiogenetyczną komórek nabłonka oskrzeli. Komórki te wytwarzają VEGF-A, VEGF-C, bFGF i PLGF, na wyższym poziomie niż komórki kontrolne [120]. W badanym materiale krwionośne naczynia włosowate były dość liczne, niezależnie od tego, że oddzielone były od błony podstawnej nabłonka dość licznymi pęczkami włókien lub włókienek kolagenu. Odnowa naczyń krwionośnych po występujących w nich odczynach zakrzepowych jest typowa dla każdego procesu zapalenia, jest więc stałym elementem regeneracji.

Jeanmart oraz Miller obserwowali liczne zaburzenia genetyczne i molekularne w bardzo wczesnych stadiach przemian nabłonka, takich jak hyperplazja i metaplazja, a także w komórkach, w których nie znajdowano istotnych odchyleń od normy. W komórkach nabłonka oskrzelowego i pęcherzyków płucnych zaburzenia molekularne poprzedzały przekształcenia morfologiczne znane jako zmiany przedinwazyjne. Wiele zmian genetycznych zainicjowanych w małej ilości genów zdarza się niezależnie od typu histologicznego guza. Ich występowanie i czas do progresji choroby jest inny w rakach drobnokomórkowych płuca, rozwijających się w kierunku komórek nabłonkowych z cechami neuroendokrynnymi i inny w rakach niedrobnokomórkowych, które poprzez mutacje

odmiennych genów mogą ulec przemianie w kierunku raków płaskonabłonkowych lub gruczolowych. Zidentyfikowana została liczba genetycznych i pozagenetycznych różnic pomiędzy rakami płaskonabłonkowymi i gruczolowymi, które rozwijają się z komórek pluripotencjalnych nabłonka oskrzeli i oskrzelików i poprzez metaplastję płaskonabłonkową i dysplazję poprzedzają wystąpienie głównych postaci raków płuc [121, 122].

Ponticiello i wsp. oraz Brambilla i wsp. udowodnili, że nadmierna ekspresja białka p53 w zmianach dysplastycznych oskrzeli może być klinicznie przydatnym markerem w rozpoznawaniu raka płaskonabłonkowego, a także ułatwiać wykrycie raka utajonego [123, 124].

Inaktywujące mutacje w genie hamującym *TP53*, kodującym białko p53, które odgrywa złożoną rolę przeciwproliferacyjną, wykrywane są w ponad 50% raków niedrobnokomórkowych i w ponad 70% raków drobnokomórkowych. W obu typach nowotworów udowodniono, że mutacje mogą pojawiać się bardzo wcześnie oraz ich liczba stale wzrasta, począwszy od raków *in situ* do postaci bardziej zaawansowanych i guzów przerzutowych. Inną powszechnie występującą zmianą genetyczną jest inaktywacja ścieżki kontrolującej gen *RBI* (retinoblastoma gene), który jest genem kodującym białko Rb, które działa jak „bramkarz” dla przejścia fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Utrata ekspresji białka Rb wykrywana jest w 80–100% guzów neuroendokrynych. Trzecim częstym zaburzeniem genetycznym dotyczącym wszystkich typów raka płuca jest utrata heterozygotyczności części chromosomów wykrywana w ponad 80% raków niedrobnokomórkowych i drobnokomórkowych. Niektóre mutacje występują częściej w określonych typach histologicznych. Na przykład mutacje w kodonie 12 w *KRAS* wykrywane są w 30–40% gruczolakoraków i nadzwyczaj rzadko w innych typach raka niedrobnokomórkowego i rakach drobnokomórkowych. Mutacje *KRAS* są stwierdzane w atypowych hiperplazjach pęcherzykowych, wskazujących na zmiany potencjalnie przedinwazyjne gruczolakoraka. Amplifikacje *MYC* powszechne w przedinwazyjnych stadiach raka drobnokomórkowego płuca (30%), identyfikowane są jedynie w niewielu zaawansowanych rakach niedrobnokomórkowych płuca (< 10%). Podobnie LOH chromosomu 5q, częste we wczesnych stadiach drobnokomórkowego raka płuca, występują rzadko w rakach niedrobnokomórkowych. Kilkanaście uszkodzeń stwierdzanych jest także na poziomie ekspresji zmutowanego odcinka białka p63 kodowanego przez gen *TP63* zlokalizowany na chromosomie 3q. Wykazano wysoką ekspresję tego białka w raku drobnokomórkowym płuca, lecz nie w pozostałych typach histologicznych. Deregulacja ekspresji białka p63 może mieć podstawowe znaczenie w patogenezie metaplastji, która poprzedza rozwój drobnokomórkowego raka płuca [125].

Badania własne nie obejmowały oceny markerów procesów nowotworzenia nabłonka oskrzelowego. Stwierdzenie ich ma znaczenie pomocnicze w rozpoznawaniu i monitorowaniu tych zmian. Ci sami autorzy stwierdzili także, że badania uzupełniające dotyczące wymienionych wyżej mutacji genów w procesach nowotworzenia w układzie oddechowym nie mogą zastępować badania histopatologicznego, lecz mogą być jego cennym uzupełnieniem.

Zmiany przedinwazyjne są często wielorakie i mnogie. Odzwierciedlają fakt, że proces nowotworzenia może dotyczyć różnych miejsc w nabłonku oskrzelowym i rozwijać się w różnym czasie. Progresa określana jako przekształcenie dysplazji w raka *in situ* lub raka inwazyjnego może być oceniona poprzez porównanie materiału z biopsji oskrzela uzyskanego na początku obserwacji oraz kilkakrotnie w trakcie jej trwania. Takie postępowanie powinno odnosić się również do chorych na mukowiscydozę, stwarzając szansę rozpoznania procesu rozrostowego we wczesnym okresie rozwoju.

Rozpoznanie endoskopowe i histopatologiczne zmian przedinwazyjnych bywa trudne. Trudności sprawiać może także wykluczenie wczesnych zmian inwazyjnych, interpretowanych jako przedinwazyjne. Podejrzewano, lecz nigdy nie udowodniono, że liczne biopsje zmian przedinwazyjnych mogą zmieniać ich naturalny przebieg. Ten prawdopodobny skutek może być wyjaśniony przez mechaniczne usunięcie zmiany lub wtórnie indukowane zapalenie błony śluzowej. Wyniki ostatnich badań Moro-Sibilot pozwalają lepiej określać populację osób wysokiego ryzyka ze stwierdzonymi stanami przednowotworowymi, które wymagają ścisłej obserwacji [126].

Dowiedziano wielokrotnie, że zakażenia bakteryjne są najważniejszą przyczyną postępującego uszkodzenia układu oddechowego prowadzącą do przedwczesnej śmierci. Udział poszczególnych gatunków drobnoustrojów w kolonizacji dróg oddechowych u chorych na mukowiscydozę zmienia się z wiekiem. U niemowląt i młodszych dzieci najczęściej stwierdza się bakterie *Staphylococcus aureus* i *Haemophilus influenzae*. U dzieci w starszym wieku i dorosłych chorych następuje wzrost częstości kolonizacji bakteriami *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex oraz *Stenotrophomonas maltophilia*, stanowiącymi istotny czynnik zaburzający funkcję płuc. Znaczenia tego nie przypisano jednoznacznie w odniesieniu do przewlekłego zakażenia *Staphylococcus aureus* obejmującego 80–90% chorych powyżej 20 roku życia. Powodem trudności w ocenie jest współistnienie innych zakażeń [127, 128, 129].

Drugorzędną rolę w rozwoju zapalenia u chorych na mukowiscydozę przypisuje się wirusom RSV i grypy oraz grzybom z gatunku *Aspergillus fumigatus* i bakteriom *Haemophilus influenzae*. *Aspergillus fumigatus* częściej jest izolowany u starszych chorych oraz przyjmujących antybiotyki przewlekle w formie

nebulizacji. W ostatnich latach zaobserwowano wzrastającą częstość zakażeń *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* i mykobakteriami niegruźliczymi w porównaniu z kolonizacją *Burkholderia cepacia* complex; jednak ich wpływ na rozwój zmian oskrzelowo-płucnych nie został jasno określony. *Staphylococcus aureus* był pierwszym patogenem rozpoznanym u chorych na mukowiscydozę, występującym z częstością prawie 50% [130, 131].

Quintas i wsp. oraz Semczuk i wsp. w materiale uzyskanym z dróg oddechowych u dzieci stwierdzili występowanie *Staphylococcus aureus* z częstością 48%, *Haemophilus influenzae* 17% i *Pseudomonas aeruginosa* 13%. Około 6% przypadków stanowił *Staphylococcus aureus* MRSA. Zakażenie *Haemophilus influenzae* autorzy rozpoznawali częściej poniżej 10 roku życia, *Pseudomonas aeruginosa* u dzieci starszych, a *Staphylococcus aureus* z równą częstością we wszystkich grupach wiekowych [132, 133].

W innym opracowaniu Rajan i Saiman stwierdzili, że do zakażenia bakteriami *Staphylococcus aureus* i *Haemophilus influenzae* dochodzi zwykle w pierwszej dekadzie życia, a *Pseudomonas aeruginosa* może być pierwszym patogenem izolowanym u dzieci. W okresie do 18 roku życia zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* dotyczyło ok. 80%, a *Burkholderia cepacia* ok. 3,5% chorych. Autorzy podkreślają udział *Stenotrophomonas maltophilia* i *Alcaligenes xylosoxidans* oraz mykobakterii niegruźliczych w rozwoju zmian zapalnych [134].

Interesującego spostrzeżenia dokonali Rosenfeld i wsp., stwierdzając w materiale uzyskanym z płukania oskrzelowego obecność bakterii *P. aeruginosa* u 18% dzieci do 1 roku życia i niemal dwukrotny wzrost częstości kolonizacji tym patogenem w okresie kolejnych 2 lat do 33%. Autor wskazał tym samym na możliwość wczesnego udziału czynnika uszkadzającego strukturę i funkcję płuc [135].

Hauser i wsp. przedstawili znaczenie przewlekłej kolonizacji dróg oddechowych bakteriami *P. aeruginosa* w uruchomieniu cyklu zdarzeń prowadzących do rozwoju zapalenia i postępującego uszkodzenia wszystkich części układu oddechowego. Antygeny bakteryjne *P. aeruginosa*, takie jak pili, flagella, fragmenty błony bakteryjnej i QAM (quorumsensing autoinducer molecules) są rozpoznawane przez system odpornościowy gospodarza i powodują uwolnienie czynników prozapalnych, takich jak interleukina-8 (IL-8), czynnik martwicy guza alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, dopełniacz hemoatraktantu i leukotrien B<sub>4</sub>. Uwolnione cytokiny powodują wzmożoną rekrutację dużej liczby neutrofilów, które pobudzone uwalniają elastazę, kolagenozę, inne enzymy i rodniki tlenowe. W tym samym czasie poziom przeciwzapalnych cytokin IL-10 ulega zmniejszeniu. Następuje nasilenie procesu zapalnego i degradacja pozakomórkowej macierzy. Zaburzeniu ulega oczyszczanie śluzowo-rzęskowe, prowadząc do wzrostu liczby bak-

terii, powtarzających się zaostrzeń choroby i nieodwracalnych zmian strukturalno-czynnościowych układu oddechowego. Pozostaje niejasnym, czy inne mikroorganizmy kolonizujące drogi oddechowe u chorych na mukowiscydozę rozwijają taki sam mechanizm zapalenia i jaki jest ich udział w uszkodzeniach płuc [136].

Przystępując do omówienia wyników własnych należy podkreślić, że diagnostyka mikrobiologiczna materiału pochodzącego z płukania oskrzelowego wykazała obecność 12 różnych mikroorganizmów, w tym *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Burkholderia cepacia*. Kolonizacja dróg oddechowych przez *Pseudomonas aeruginosa* związana była z większymi zmianami zapalnymi obserwowanymi podczas bronchoskopii, niedożywieniem i młodszym wiekiem chorych. W 21% przypadków kolonizacji drzewa oskrzelowego przez *Pseudomonas aeruginosa* towarzyszyła obecność *Staphylococcus aureus*, w tym u 5 osób był to typ *MRSA*. Udział grzybów z rodzaju *Candida* w rozwoju zmian zapalnych stwierdzony został jedynie u 3 chorych. Zakażenie *Chlamydophila pneumoniae* towarzyszy nierzadko zaostrzeniom w przebiegu mukowiscydozy. Bezpośrednie wykrycie *Chlamydophila pneumoniae* w materiale uzyskanym z dolnych dróg oddechowych metodą hodowli lub PCR potwierdza rozpoznanie. Czulość hodowli jest jednak wciąż mniejsza niż 100% [137, 138, 139, 140, 141, 142]. We własnym materiale badawczym, który stanowiły wycinki błony śluzowej oskrzeli pochodzące od 22 chorych, występowanie *Chlamydophila pneumoniae* wykazano testem nested PCR u 31% spośród badanych.

Rogers i wsp. stosując metodę molekularną T-RELP (terminal restriction fragment length polymorphism) zidentyfikowali w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę średnio 13 różnych bakterii, co w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodami konwencjonalnymi stanowiło zdecydowanie większą liczbę i oznaczało, że przedstawiono znacznie dokładniejsze wyniki [143].

Pierre-Audigier i wsp. stwierdzili występowanie mykobakterii niegruźliczych w płwocinie pochodzącej od 33 (13,4%) spośród 385 chorych na mukowiscydozę w wieku 1–24 lat. *Mycobacterium abscessus* stanowiło 39,4%, *Mycobacterium avium* complex (MAC) 21,2%, *Mycobacterium gordonae* 18,2% i pozostałe 21,2%. Mykobakterie niegruźlicze u chorych poniżej 15 roku życia stwierdzano znacznie rzadziej [144]. Podobne spostrzeżenia poczynił D.L. Elbert [145]. W innym wieloośrodkowym badaniu, przeprowadzonym na grupie 1580 chorych, Roux i wsp. wykazali obecność mykobakterii niegruźliczych w płwocinie u 6,6% chorych na mukowiscydozę. *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC) i *Mycobacterium avium* complex (MAC) stanowiły ponad 95% mykobakterii niegruźliczych. MABSC stwierdzano u chorych w każdym wieku, podczas gdy MAC izolowano głównie po 25 roku życia. Około 40% MABSC



stanowiły *Mycobacterium bolletii* i *Mycobacterium massiliense* [146]. *M. avium* i *M. intracellulare* (należące do MAC) stwierdzano częściej wśród chorych ze Stanów Zjednoczonych, natomiast MABSC, do których należą *M. abscessus*, *M. bolletii* i *M. massiliense* przeważały pośród chorych z krajów Europy Zachodniej i Izraela [147, 148, 149].

Badania własne materiału pochodzącego z płukania oskrzelowego, przeprowadzone na obecność prątków kwasoopornych, nie potwierdziły ich występowania w żadnym przypadku.

Badania molekularne stanowiące standard diagnostyki mukowiscydozy pozwalają na identyfikację mutacji genu CFTR u 72,2% dorosłych chorych w Polsce, a u wszystkich chorych odsetek ten wynosi 71,4%. Wynik badania molekularnego powinien być interpretowany przez lekarza-genetyka i rozpatrywany włącznie z wynikami innych badań. Najczęściej rozpoznawaną mutacją jest F508del. Występuje w populacji polskich chorych z częstością 56,42%, a wśród dorosłych chorych z częstością 49,06%. Odsetek pozostałych typów mutacji w populacji chorych dorosłych wynosi 23,13%, a wśród wszystkich chorych stanowi 14,97%. Niepowodzenie w rozpoznawaniu mutacji sięga 27,83%. Wykazano związek mutacji F508del/F508del ze zwiększoną tendencją do kolonizacji drzewa oskrzelowego pałeczkami *Pseudomonas* i gorszym przebiegiem klinicznym choroby, w przeciwieństwie do mutacji F508del/3849+10kbCT warunkującej dłuższy okres przeżycia. Wyniki uzyskano w oparciu o przeprowadzone badania molekularne u 106 dorosłych chorych [6].

Różnorodność mutacji i objawów klinicznych w mukowiscydozie stała się przedmiotem poszukiwań wpływu określonych mutacji genu CFTR na różne czynniki określające stan kliniczny chorych. Dotychczasowe wyniki badań pozwalają na stwierdzenie, że wśród heterozygot złożonych mutacji F508del/M dominujący jest allel M. Może on być odpowiedzialny zarówno za łagodny, jak i ciężki przebieg choroby. Stwierdzono występowanie kolonizacji *Pseudomonas* u 56% homozygot F508del i związek częstości kolonizacji *Pseudomonas* z zaburzoną czynnością trzustki i starszym wiekiem chorych. Największą częstość kolonizacji *Pseudomonas* wynoszącą 82% stwierdzono dla mutacji W1282X/F508del. Ciężki przebieg choroby u homozygot F508del charakteryzował się wyższym stężeniem jonów chlorkowych w pocie, młodszym wiekiem rozpoznania choroby, częstszym występowaniem niewydolności trzustki oraz obniżeniem FVC [150].

W materiale własnym u części chorych z mutacjami F508del/M i M/M stwierdzono występowanie zakażeń bakteriami *P. aeruginosa* i *S. aureus* oraz niedobór masy ciała, gorszy stan kliniczny i niewydolność zewnątrzwydzielniczą trzustki. Mutacje F508del/M i M/M wiązały się także z bardziej zaawanso-

wanymi zmianami zapalnymi w drzewie oskrzelowym, dużą liczbą przebytych zaostreżeń i częstszym występowaniem zmian przednowotworowych – dysplazji oraz metaplazji płaskonabłonkowej. Nie były to jednak zależności istotne statystycznie.

Zależność pomiędzy genem CFTR i ryzykiem rozwoju raka była w przeszłości badana. Neglia i wsp. stwierdzili zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory układu trawiennego, w szczególności raka trzustki w populacji chorych na mukowiscydozę Ameryki Północnej i Europy [151]. Wykazano także, że obecność mutacji genu CFTR związana jest z rzadszym występowaniem czerniaka, raka piersi, raka jelita grubego i raka prostaty [152, 153, 154, 155].

Li i wsp. wysunęli hipotezę, że obecność mutacji genu CFTR może stanowić czynnik ryzyka rozwoju raka płuca. Autorzy przeanalizowali grupę 574 chorych (46,3% z gruczolakorakiem i 20% z rakiem płaskonabłonkowym) stwierdzając, że nosicielstwo delekcji  $\Delta F508$  i genotypu rs213950 (GA i AA) oraz rs10487372 (TC) wiąże się z niższym ryzykiem powstania raka płuca w porównaniu z osobami, u których ta mutacja nie występuje. Wykazali ponadto, że obniżone ryzyko nowotworzenia wśród nosicieli mutacji  $\Delta F508$  dodatkowo dotyczy kobiet, osób nigdy niepalących papierosów i utkania płaskonabłonkowego raka [156].

Podsumowując, można powiedzieć, że mukowiscydoza jest chorobą, w której wzajemne oddziaływanie wielu czynników warunkuje różny stopień zaawansowania zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym, prowadząc do postępujących zaburzeń czynnościowych i strukturalnych w układzie oddechowym. Przekształcenia strukturalne nabłonka oskrzelowego obserwowane u chorych dorosłych prowadzące do metaplazji płaskonabłonkowej i dysplazji stanowią czynnik ryzyka rozwoju raka płuca. Wynika stąd potrzeba odpowiedniego monitorowania przemian nabłonka oskrzelowego u tych chorych oraz poszukiwania czułych markerów zapalenia i stanów przednowotworowych.



## 6. WNIOSKI

1. Potwierdzono przydatność skali punktowej Shwachmana i Kulczyckiego do oceny klinicznego zaawansowania mukowiscydozy.
2. Zmodyfikowana skala punktowa Thompsona może być stosowana do oceny nasilenia zmian zapalnych w błonie śluzowej oskrzeli u dorosłych chorych na mukowiscydozę.
3. Obecność mikroorganizmów dróg oddechowych jest zróżnicowana, istotną rolę odgrywa *P. aeruginosa*, bakteria odpowiedzialna w głównej mierze za progresję choroby oskrzelowo-płucnej.
4. Skala punktowa wg Brasfield stanowi dobrą metodę do określania zaawansowania zmian w obrazie radiologicznym klatki piersiowej u dorosłych chorych.
5. Uszkodzenia nabłonka oskrzelowego spowodowane przez procesy zapalne manifestują się zaburzeniami struktury i funkcji komórek, a jednym z wykładników procesu są zmiany morfologii rzęsek i komórek pluripotencjalnych nabłonka dróg oddechowych. To może odzwierciedlać zmiany w genomie tych komórek.
6. Nawrotowe i utrzymujące się zapalenia wpływając wielokrotnie na procesy regeneracji nabłonka oskrzelowego mogą kolejno ujawniać postępujące zmiany charakteru komórek, aż po powstanie zmian przednowotworowych.
7. Liczne zaostrzenia choroby oskrzelowo-płucnej skutkują większym nasileniem zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym i znacznym pogorszeniem obrazu radiologicznego płuc oraz stanu klinicznego chorych.

## 7. STRESZCZENIE

Mukowiscydoza – zwłóknienie torbielowate (ang. cystic fibrosis-CF) jest jedną z najczęściej występujących chorób uwarunkowanych genetycznie w populacji rasy kaukaskiej, wywołaną mutacją pojedynczego genu, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny i prowadzącą do przedwczesnej śmierci.

Przyczyną choroby są mutacje genu zlokalizowanego na długim ramieniu 7 chromosomu kodującego białko CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), pełniące między innymi funkcję kanału chlorkowego, usytuowanego na szczytowej powierzchni komórek nabłonkowych gruczołów wydzielania zewnętrznego. W następstwie dochodzi do nieprawidłowego przeznabłonkowego transportu jonów chlorkowych, prowadzącego do zaburzeń transportu sodu i wody. Dalszym skutkiem są zaburzenia czynnościowe gruczołów wydzielania zewnętrznego spowodowane gromadzeniem się w ich przewodach wyprowadzających gęstej i lepkiej wydzieliny. W konsekwencji ma miejsce przewlekła kolonizacja dróg oddechowych florą bakteryjną i grzybiczą, podtrzymująca procesy zapalne w drzewie oskrzelowym, oraz postępujące uszkodzenie płuc.

Celem głównym pracy była pierwsza w Polsce, kompleksowa analiza kliniczno-patomorfologiczna dotycząca grupy dorosłych chorych na mukowiscydozę w kontekście wpływu czasu trwania i zaostrzeń choroby na zmiany strukturalno-czynnościowe układu oddechowego oraz na stan kliniczny chorych.

Cele cząstkowe dotyczyły: określenia stopnia klinicznego zaawansowania choroby, makroskopowej oceny nasilenia zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym, identyfikacji mikroorganizmów kolonizujących drogi oddechowe, określenia rodzaju i nasilenia zmian radiologicznych w płucach oraz szczegółowej analizy zmian histopatologicznych w błonie śluzowej oskrzeli z uwzględnieniem przekształceń o charakterze przednowotworowym i wykazania korelacji między wybranymi czynnikami określającymi zaawansowanie choroby.

Badania przeprowadzono na grupie 33 dorosłych chorych na mukowiscydozę, w tym 17 kobiet i 18 mężczyzn w wieku od 18 do 38 lat (średnia wieku 23,6), hospitalizowanych w Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej w Poznaniu z powodu choroby oskrzelowo-płucnej. W okresie 2 lat prowadzenia badań pod opieką kliniki było 40 dorosłych chorych. Siedmiu spośród nich z uwagi na dobry stan kliniczny i brak zaostrzeń nie zostało włączonych do badań.

Rozpoznanie choroby zostało ustalone w każdym przypadku w oparciu o kryteria zawarte w Zaleceniach Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy opublikowanych w 2009 roku oraz we wspólnym Raporcie WHO/ICF(M)A/ECFN. Obejmują one objawy kliniczne oraz wyniki testu potowego, badania molekularne.

larne i pomiar wartości potencjałów elektrycznych błony śluzowej nosa. Test potowy i oznaczanie mutacji genu CFTR wykonywano wyłącznie u pacjentów wcześniej niezdiagnozowanych.

W każdym przypadku określano: stopień klinicznego zaawansowania choroby przy zastosowaniu skali punktowej wg Shwachmana i Kulczyckiego, zdjęcia rentgenowskie klatki piersiowej z oceną zaawansowania zmian wg skali Brasfield, tomografię komputerową i bronchofiberoskopię. W celu określenia nasilenia zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym wykorzystano skalę Thompsona we własnej modyfikacji oraz pobierano materiał z dróg oddechowych do badań histopatologicznych, cytologicznych i mikrobiologicznych. Ponadto u chorych określano wartość BMI i wykonywano badania spirometryczne.

Przeprowadzone badania u dorosłych chorych na mukowiscydozę wykazały, że osoby w gorszym stanie klinicznym miały znacznie bardziej nasilone zmiany zapalne w drzewie oskrzelowym, liczne nieprawidłowości w obrazie radiologicznym klatki piersiowej i niedobór masy ciała.

Badania przeprowadzone na materiale pobranym od chorych na mukowiscydozę przedstawiały szerokie spektrum zmian w nabłonku oskrzeli spowodowane przez stały i nawrotowy odczyn zapalny w drzewie oskrzelowym. Wieloletni przebieg choroby odzwierciedlały wyniki badań morfologicznych. Znalezione i opisane w pracy różnice w strukturze nabłoneków i błony śluzowej oskrzeli obejmowały przede wszystkim zmiany w komórkach urzęsionych (w rzęskach brak ramion wewnętrznych dyneiny, zmiany liczby i rozkładu mikrotubul w aksonemie), kubkowych (gruby pokład śluzu na powierzchni) i pluripotencjalnych dróg oddechowych (nieprawidłowe nabłonki w procesach odnowy) i zmianę charakteru nabłonka z gruczołowego na wielowarstwowy płaski, a u kilkorga chorych dysplazję w nabłonku wielowarstwowym płaskim. Wielokrotne odnowy nabłoneków dróg oddechowych niszczonych w procesach zapalenia stanowiły istotny czynnik ryzyka dla zmian charakteru wyściółki nabłonkowej z gruczołowej na płaskonabłonkową. W badanym materiale obserwowano gołe błony podstawne, początki odnowy, także odnowy nieprawidłowej, odnowy zaawansowanej z obecnością komórek nabłonka kolczystego i nabłonka kolczystego z dysplazją. Mikroskopia elektronowa umożliwiła przeprowadzanie szczegółowej analizy aparatu rzęskowego i kolejnych etapów zmian prowadzących do metaplastji płaskonabłonkowej i dysplazji, które stanowią czynnik ryzyka przekształcenia zmian w nabłonku w raka inwazyjnego.

Badania mikrobiologiczne wykazały obecność kilkunastu różnych patogenów kolonizujących drogi oddechowe, w tym *P. aeruginosa*, bakterii odpowiedzialnej w głównej mierze za postępujące zmiany strukturalne i czynnościowe w układzie oddechowym. Występowanie jednocześnie kilku gatunków bakterii

i grzybów wykazano u większości chorych, rzadziej stwierdzano pojedyncze gatunki patogenów. Wykazano związek pomiędzy obecnością tej bakterii w drogach oddechowych a nasileniem zmian zapalnych w błonie śluzowej oskrzeli i gorszym stanem odżywienia chorych.

W pracy potwierdzono przydatność skali punktowej Shwachmana i Kulczyckiego do oceny klinicznego zaawansowania choroby oraz zmodyfikowanej skali Thompsona w określaniu nasilenia zmian zapalnych w błonie śluzowej oskrzeli i skali Brasfield w ocenie zmian radiologicznych klatki piersiowej.

Korelacja wybranych czynników pozwoliła na stwierdzenie, że liczne zaostrzenia choroby oskrzelowo-płucnej skutkują większym nasileniem zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym i znacznym pogorszeniem obrazu radiologicznego płuc oraz stanu klinicznego chorych.

## 8. SUMMARY

Cystic fibrosis (CF) is one of the most frequently occurring hereditary diseases with a high morbidity rate in the Caucasian population. It is caused by the mutation of a single gene, inherited through an autosomally recessive process, and it leads to premature death.

This disease is brought on by a gene mutation occurring on the long arm of chromosome 7 that codes for the protein CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); which, among other things, serves as a chloride ion transmission pathway, situated on the apical surfaces of the epithelial cells in the exocrine glands. The result of this mutation is a faulty intraepithelial transport of chloride ions that, in turn, disrupts the transport of sodium and water. And this disruption causes further disturbances in the function of the exocrine glands, due to a build-up of a thick and sticky secretion in the cystic ducts. And that leads to an ensuing chronic colonization of the airways with bacterial and fungal flora, thus causing inflammation of the bronchial tree and progressive damage to the lungs.

The main goal of this research was to complete the first-in-Poland, comprehensive, clinical and pathomorphological analysis of a group of patients with cystic fibrosis. It was conducted in the context of the impact of both the duration and the exacerbations of the disease on the changes in the structural and functional performance of the respiratory tract, as well as on the patients' clinical condition.

In order to demonstrate correlations between selected features that determine the rate of progress of the disease, the partial aims consisted of: (a) determination of the degree of clinical advancement of the disease; (b) macroscopic assessment of the inflammatory changes in the bronchial tree; (c) identification of the microorganisms colonizing the airways; (d) radiological assessment of the type and degree of changes in the lungs; and (e) detailed analysis of the histopathological changes in the bronchial mucous membrane, including pre-cancerous lesions.

This research was carried out with the participation of 33 adults who have CF, among them 17 females and 18 males within the ages 18 to 38 (with mean age of 23.6 yrs); all of whom, due to a pulmonary disease, were hospitalized at the Clinical Hospital for Pulmonology, Allergology and Pulmonological Oncology in Poznań. During this two-year research study, there were 40 adult CF patients admitted to this hospital. However, seven of them were not recruited for this research because of their good clinical condition and lack of exacerbations.

Patient diagnoses of the disease were determined in each case following the criteria defined in the Recommendations of the Polish Cystic Fibrosis Associa-

tion published in 2009, and those in the common report by WHO, ICF(M)A, and ECFN. They included: clinical symptoms and sweat test results, molecular examinations, and measurements of the levels of electrical potentials in the nasal mucous membrane. Sweat tests and marking of the CFTR gene mutations were performed exclusively for patients who were previously undiagnosed.

For each case the following data was established: clinical stage of the disease using the Shwachman and Kulczycki score scale; chest X-rays with assessment of the change status according to the Brasfield score scale; CT scan; bronchial fiberoscopy to determine the escalation of inflammatory changes in the bronchial tree using the Thompson score scale with my modifications; as well as collection of specimens for histopathological, cytological, and microbiological testing. Patients have also received spirometric and BMI evaluations.

The tests conducted on adult CF patients indicated that patients in worse clinical condition had: more severe inflammations in the bronchial tree, numerous abnormalities in the X-ray chest images, and low BMI. Examination of the specimens collected from the CF patients showed a broad range of changes in the bronchial epithelium due to chronic and recurring inflammatory reactions in the bronchial tree. For patients with long-term disease its effects were evident in the results of their morphological tests. The differences in the structures of epithelia and bronchial mucous membranes found and described in the research report included primarily changes in: (a) the ciliated cells — a lack inside the cilia of the dyneine inner arms, and abnormalities in the number and distribution of the axoneme microtubules; (b) the goblet-shaped cells — presence of a thick accumulation of mucus on their surface; (c) the pleuripotential breathing tracts — aberrant epithelia in the repair processes; (d) a transformation in the characteristics of the epithelium from secretory to a multilayered flat one, and in the case of several patients a dysplasia in the multilayered flat epithelium. Multiple epithelial regenerations of the airways destroyed by the inflammatory conditions posed a significant risk of changes in the characteristics of the epithelial lining cells from secretory to flattened. In the examined specimens the following was found: bare spinous cell mucous membranes; precursors of regeneration, also of an aberrant type; advanced regeneration with the spinous epithelial cells; and spinous epithelia with dysplasia. The use of electron microscopy provided a detailed analysis of the ciliary apparatus, and of the consecutive change stages leading to flat epithelium metaplasia and dysplasia, which constitute a risk of turning into invasive cancer.

Microbiological tests indicated the presence of over a dozen of various pathogens colonizing the airways, among them *P. aeruginosa*, a bacterium responsible primarily for the escalating structural and functional damage to the respiratory

system. The concurrence of several types of bacteria and fungi was confirmed in most patients, and only rarely of just a single one. The study has revealed a correlation between the presence of bacteria in the airways and the escalation of the inflammatory processes in the bronchial epithelium, and also with the patients' poor nutrition.

This research has confirmed the usefulness of the Shwachman and Kulczycki score for the clinical evaluation of the advancement of the disease; as well as of a modified Thompson score in defining the exacerbations of the inflammatory changes in the bronchial epithelium; and of the Brasfield score for the evaluation of the radiological changes in the chest.

The above correlation of selected factors has made it possible to establish that numerous exacerbations in pulmonary disease result in a higher rate of the inflammatory changes in the bronchial tree, which are also reflected in a significant decline of the radiological lung readings as well as in the patients' clinical condition.

## 9. PIŚMIENNICTWO

- [1] Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce i badań przesiewowych mukowiscydozy. Stanowisko Polskiej Grupy Roboczej Mukowiscydozy przy Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego (1993). *Pediatrics Polska*, 1994, 69, 5, 384-385.
- [2] Walkowiak J., Pogorzelski A., Sands D., Skorupa W., Milanowski A., Nowakowska A., Orlik T., Korzeniewska-Eksterowicz A., Lisowska A., Cofta Sz., Minarowska A., Piotrowski R., Popiel A., Rachel M., Sobczyńska-Tomaszewska A., Staszak-Kowalska R., Teisseyre M., Trawińska-Bartnicka M., Walicka-Serzysko K., Witt M., Woś H.: Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy 2009 Poznań – Warszawa - Rzeszów. Standardy Medyczne. *Pediatrics*, 2009, 6, 352-378.
- [3] Rosenstain B.J., Cutting G.R.: The diagnosis of cysticfibrosis: A consensus statement. *J. Pediatr.* 1998, 132, 589-595.
- [4] Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W.: Patophysiology and management of pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 168, 918-951.
- [5] Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry; <http://www.cff.org/home/>
- [6] Witt M., Pogorzelski A., Bal J., Rutkiewicz E., Majka L., Sobczyńska A.: Częstość występowania mutacji oraz genotypów genu CFTR u dorosłych chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1999, 67, 3-4, 137-141.
- [7] Morales M.M., Capella M.A.M., Lopes A.G.: Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999, 32(8), 1021-1028.
- [8] Majka L., Pogorzelski A., Młynarczyk W., Żebrak J., Rutkiewicz E., Nowicka A., Witt M.: Effect of genotype on selected clinical features of Polish cystic fibrosis adults. *J. Appl. Genet.* 2001, 42(3), 367-377.
- [9] Cystic Fibrosis Mutation Database. CFMDB statistics. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>. Revised: May 8, 2006.
- [10] <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
- [11] Witt M., Bal J., Maciejko D., Mazureczak T.: Częstość występowania mutacji genu CFTR u chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Pediatrics Polska*, 1997, LXXII, 8, 665-668.
- [12] Dork T., El-Harith E.H., Stuhmann M., Macek M. Jr, Egan M., Cutting G., Tzietis M., Kanavakis E., Carles S., Claustres M., et al. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+IG-A in diverse populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1998, 63, 656.



- [13] Kerem E., Kalman Y.M., Yahav Y., Shoshani T., Abeliovich D., Szeinberg A., Rivlin J., Blau H., Tal A., Ben-Tur L. et al: Highly variable incidence of cystic fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel. *Hum. Genet.* 1995, 96, 193-197.
- [14] Rozen R., Schwartz R.H., Hilman B.C., Stanislovitis P., Horn G.T., Klinger K., Daigneault J., De Braekeleer M., Kerem B., Tsui L.: Cystic fibrosis mutations in North American populations of French ancestry: analysis of Quebec French-Canadian and Louisiana Acadian families. *Am. J. Hum. Genet.* 1990, 47, 606-610.
- [15] Southern K.W.: Newborn screening for cystic fibrosis – the practical implications. *J. R. Soc. Med.* 2004; 97 (Suppl. 44): 57-69.
- [16] Kleven D.T., McCudden C.R., Wills M.S.: Cystic fibrosis: newborn screening in America. *MLO Med. Lab. Obs.* 2008, 40(7), 16-8, 22, 24-27.
- [17] Cystic Fibrosis Foundation Patent Registry. 2001 Annual Data Report to the Center Directors. Bethesda, MD: *Cystic Fibrosis Foundation*. 2002.
- [18] Mazurczak T., Bal J., Obersztyn E., Sobczyńska-Tomaszewska A., Wiszniewski W.: Zasady diagnostyki molekularnej mukowiscydozy. Identyfikacja mutacji i zmian polimorficznych w genie CFTR. Kryteria i zasady procedury diagnostycznej oraz systemu kontroli jakości badań. Warszawa 1999.
- [19] Koch C., Cuppens H., Rainsio M., Madessani U., Harms H., Hudson M., Mastella G., Navarro J., Strandvik B., McKenzie S.: Investigators of the ERCE. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCE): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr. Pulmonol.* 2001, 31(1), 1-12.
- [20] Milanowski A., Pogorzelski A., Orlik T., Piotrowski R., Walkowiak J., Skorupa W., Witt M., Latoś T., Żebrak J., Nowakowska A., Sands D., Mazurczak T., Majka L., Minarowska A., Socha J.: Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. *Stanowisko Polskiej Grupy Roboczej Mukowiscydozy*. Wydanie II. 2002.
- [21] Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report. of joint WHO/ICF(M)A/ECFTN meeting Stockholm 2000. *J. Cystic Fibrosis*, 2002, 1, 5-8.
- [22] Chinet T., Fajac I., Ferec C., Garcia Carmona T., Nguyen-Khoa T.: Diagnosis of cystic fibrosis in adults. *Rev. Mal. Respir.* 2000, 17(3), 739-748.
- [23] Green A., Dodds P., Pennock C.A.: study of sweat sodium and chloride; criteria for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem.* 1985, 22, 171-176.
- [24] Green A., Elborn S., Fahie-Wilson M.N.: Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. London: *Royal College of Pediatrics and Child Health* 2003, 11(1), 97.
- [25] Wilson D.C., Ellis L., Zielenski J., et al.: Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of in vivo nasal potential difference measurements. *J. Pediatr.* 1998, 132, 596-599.

- [26] Knowles M.R., Paradiso A.M., Boucher R.C.: In vivo nasal potential difference: technique and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum. Gene. Ther.* 1995, 6, 445-455.
- [27] Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2003 annual data report to the center directors. Bethesda, MD: *Cystic Fibrosis Foundation*, 2004
- [28] Skorupa W., Wierzbicka M., Kuś J.: Mukowiscydoza u dorosłych – obraz kliniczny. *Nowa Med.* 1997, 4, 10, 32-35.
- [29] Wang S.S., FitzSimmons S.C., O’Leary L.A. et al.: Early diagnosis of cystic fibrosis in the newborn period and risk of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition during the first 10 years of life: a registry-based longitudinal study. *Pediatrics.* 2001, 107, 274-279.
- [30] Gutierrez J.P., Grimwood K., Armstrong D.S., Carlin J.B., Carzino R., Olinsky A., Robertson C.F., Phelan P.D.: Interlobar differences in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2001, 17, 281-286.
- [31] Meyer K.C., Sharma A.: Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 156, 1536-1540.
- [32] Burns J.L., Gibbon R., McNamara S., Yim D., Emerson J., Rosenfeld M., Hiatt P., McCoy K., Castile R, Smith A., et al.: Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J. Infect Dis.* 2001, 183, 444, 452.
- [33] Maselli J.H., Sontag M.H., Norris J.M., MacKenze T., Wagener J.S., Accurso F.J.: Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2002, 34, 91-100.
- [34] Thomassen M.J., Demko C.A., Klinger J.D., Stern R.C.: *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985, 131, 791-796.
- [35] Olivier K.N., Weber D.J., Wallace R.J. Jr., Faiz A.R., Lee J.H., Zhang Y., Brown-Elliot B.A., Handler A., Wilson R.W., Schechter M.S., et al.: Nontuberculous mycobacteria. I multicenter prevalence study in cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 167, 828-834.
- [36] Żebrak J.: Choroba układu oddechowego w mukowiscydozie. *Mukowiscydoza*, 1997, 11, 10-20.
- [37] Cohn J.A., Friedman K.J., Noone P.G. et al.: Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339, 653-658.
- [38] Moran A.M.: Cystic fibrosis - related diabetes: an approach to diagnosis and management. *Pediatr Diabetes*, 2000, 1, 41-48.
- [39] Cooper C., Robertson C., Hudson I., Phelan P.: Variability of pulmonary function tests in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1990, 8, 16-22.

- [40] Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B., Gibson R.L.: Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2002, 34, 91-100.
- [41] Baden C., Wallis C., Owens C.M., Ridout D.A., Dinwiddie R.: The Chrispin-Norman score in cystic fibrosis: doing awal with lateral view. *Eur. Respir. J.* 2005, 25(5), 894-897.
- [42] Conway S.P., Pond M.N., Bowler I., Smith D.L., Simmonds E.J., Joanes D.N., Hambleton G., Hiller E.J., Stableforth D.E., Weller P. et al.: The chest radiograph incystic fibrosis: a new scoring system compared with Chrispin-Norman and Brasfield scores. *Thorax*, 1994, 49(9), 860-862.
- [43] Brasfield D., Hicks G., Soong S., Tiller R.E.: The chest roentgenogram in cystic fibrosis: a new scoring system. *Pediatrics.* 1979, 63(1), 24-29.
- [44] Terheggen-Lagro S., Truijens N., van Popiel N., Gulmans V., van der Lagg J., van der Ent C.: Correlation of six different cystic fibrosis chest radiograph scoring system with clinical parameters. *Pediatr. Pulmonol.* 2003, 35(6), 441-445.
- [45] O'Laoide R.M., Fahy J., Coffey M., Ward K., Malone D., Fitzgerald M.X., Masterson J.: A chest radiograph scoring system in adult cystic fibrosis: correlation with pulmonary function. *Clin Radiol.* 1991, 43(5), 308-310.
- [46] Gutierrez V., Olivera M.J., Girun R.M., Rodriguez-Salvanes F., Caballero P.: Cystic fibrosis in adults: intern- and intraobserver agreement for the Brasfield and Chrispin-Norman chest radiography scoring systems and correlation with clinical data and spirometry. *Arch. Bronconeumol.* 2005, 41, 553-559.
- [47] Grum C.M., Lynch J.P.: 3rd.: Chest radiographic findings in cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* 1992, 7(3), 193-209.
- [48] Rosenberg S.M., Howatt W.F., Grum C.M.: Spirometry and chust roentgenographic appearance in adults with cystic fibrosis. *Chest*, 1992, 101(4), 961-964),
- [49] Cleceland R.H., Nesh A.S., Zurakowski D., Nichols D.P., Wohl M.E., Colin A.A.: Cystic fibrosis: a system for assessing and predicting progression. *AJM Am. J. Roentgenol.* 1998, 170(4), 1067-1072.
- [50] Jarad N.A., Higgs S., Jeffcote T., Giles K.: Factors associated with raduced FEV<sub>1</sub> in adults patients with cystic fibrosis in a relatively affluent area. *Chron. Respir. Dis.*, 2005, 2(3), 133-137.
- [51] Gurney J.W., Habbe T.G., Hicklin J.: Distribution of disease in cystic fibrosis: correlation with pulmonary function. *Chest*, 1997, 112(2), 357-362.
- [52] Linnane B., Robinson P., Ranganathan S., Stick S., Murray C.: Role of high-resolution computed tomography in the detection of early cystic fibrosis lung disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2008, 9(3), 168-174.

- [53] Brody A.S., Klein J.S., Molina P.L., Quan J., Bean J.A., Wilmott R.W.: High-resolution computed tomography in young patients with cystic fibrosis: distribution of abnormalities and correlation with pulmonary function tests. *J. Pediatr.* 2004, 145(1), 32-38.
- [54] Konstan M.W., Hilliard K.A., Norvell T.M., Berger M.: Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994, 150(2), 448-454.
- [55] Mazurczak T. [red.]: Mukowiscydoza. Dziedziczenie, etiopatogeneza, diagnostyka, leczenie. Praca Zbiorowa. Warszawa 2006.
- [56] Sinaasappel M., Stern M., Littlwood J., Wolfe S., Steinkamp G., Heijerman H.G.M., Robberecht E., Döring G.: Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J. Cystic Fibrosis*, 2002, 1, 51-75.
- [57] Yankaskas J.R.: Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest*, 2004, 125, 1-39.
- [58] Conway S.P., Brownlee K.G., Denton M., Packham D.G.: Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Med.* 2003, 2(4), 321-332.
- [59] Orlik T., Limanowski A., Skorupa W., Kluba L., Korzeniewska A., Majka L., Minarowska A., Piotrowski R., Sands D., Trawiska-Bartnicka M., Wierzbicka M., Zmysłowska K.: Długofalowy model postępowania fizjoterapeutycznego w mukowiscydozie. *Standardy medyczne* 2003, 10(48), 5, 1306-1309.
- [60] Kanaan R.: Indications and contraindications to lung transplant: patient selection. *Rev. Pneumol. Clin.* 2010, 67(1), 5-14.
- [61] Remiszewski P., Orłowski T.M., Roszkowska-Śliż B., Szturmowicz M., Szociński J., Roszkowski-Śliż K.: Kwalifikacja chorych do przeszczepu płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004, 72, 439-466.
- [62] Bech B., Pressler T., Iversen M., Carlsen J., Milman N., Eliasen K., Perko M., Arendrup H.: Long-term outcome of lung transplantation for cystic fibrosis – Danish results. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2004, 26(6), 1180-1186.
- [63] Quattrucci S., Rolla M., Cimino G., Bartesi S., Cingolani S., Scalercio F., Venuta F., Midulla F.: Lung transplantation for cystic fibrosis: 6 year follow-up. *J. Cyst. Fibros.* 2005, 4(2), 107-114.
- [64] Pedilla J., Calvo V., Jorda C., Escriva J., Ceron J., Penalver J.C., Garcia-Zarza A., Pastor J., Blanco E.: Lung transplantation in cystic fibrosis: perioperative mortality. *Arch. Bronconeumol.* 2005, 41(9), 473-474.
- [65] Artari M.T., Venuta F., De Giacomo T., Rendina E.A., Anile M., Diso D., Francioni F., Quattrucci S., Rolla M., Pugliese F., Liparulo V., Di Stasio M., Ricella C.,

- Tsakkaropoulos S., Ferretti G., Coloni G.F.: Lung transplantation for cystic fibrosis: ten years of experience. *Transplant. Proc.* 2008, 40(6), 2001-2002.
- [66] Aigner C., Jaksch P., Seebacher G., Mazhar S., Wisser W., Klepetko W.: Cystic fibrosis and lung transplantation – determination of the survival benefit. *Wien Klin. Wochenschr.* 2004, 116(9-10), 318-321.
- [67] Davies J.C., Alton E.W.: Airway gene therapy. *Adv. Genet.* 2005, 54, 291-314.
- [68] Mueller C., Flotte T.R.: Gene therapy for cystic fibrosis. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* 2008, 35(3), 164-178.
- [69] Greenwood M.F., Holland P.: Scanning electron microscopic observations of the human respiratory tract. *Am. J. Dis. Child.* 1975, 129, 289-294.
- [70] Wanner A., Salathe M., Oriordan T.G.: Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 154, 1868-1902.
- [71] Laitinen A., Laitinen L.A.: Airway morphology: epithelium/ basement membrane. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994, 150, 14-17.
- [72] Mills P.R., Davies R.J., Devilla J.L.: Airway epithelial cells, cytokines and pollutants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160, 38-43.
- [73] Geremek M., Witt M.: Primary ciliary dyskinesia: Genesis, candidate genes and chromosomal regions. *J. Appl. Genet.* 2004, 45, 347-361.
- [74] Seget M.: Ocena zmian błony śluzowej oskrzeli u chorych z klinicznym podejrzeniem zespołu dyskinezy rzęsek. Rozprawa doktorska. 2007. Pracownia Mikroskopii Elektronowej UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
- [75] Witt M.: O pierwotnej dyskinezy rzęsek oraz identyfikacji genów warunkujących to schorzenie. *Na pograniczu chemii i biologii.* Wydawnictwo Naukowe UAM, tom IV, 1997, 309-321.
- [76] Dovey M.: Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1989, 21, (3), 521-534.
- [77] Daniel C., Erzurum S.C., McElvaney N.G., Crystal R.G.: Quantitative assessment of the epithelial and inflammatory cell populations in large airways of normal and individuals with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 153, 362-368.
- [78] Leight M.W., Kylander J.E., Yankaskas J.R., Boucher R.C.: Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995, 12, 605-612.
- [79] WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.
- [80] WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.

- [81] Report of a WHO Consultation of Obesity. Preventing and Managing the Global Epidemic. Division of noncommunicable Diseases. World Health Organization. Geneva 3-5 June 1997. WHO/NUT/NCD 1998.
- [82] Jamek W.P., Ferro-Luzzi A., Waterloo J.C.: Definition of chronic energy deficiency in adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1988, 42(12), 969-981.
- [83] 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.: Standardisation of spirometry. Series "ATS/ERS task force: Standardisation of lung function testing". Edited by Brusasco V., Crapo R. and Viegi G. *Eur. Respir. J.* 2005, 26, 319-338.
- [84] Pirożyński M.: Podstawy diagnostyki bronchoskopowej. Bronchofiberoskopia, [red. Pirożyński M.] *α-medica press* 1999.
- [85] Thompson A.B., Daughton B., Robbins R.A., Ghafouri M.A., Oehlerking M., Rennard S.I.: Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140, 1527-1537.
- [86] Chciałowski A., Chorostowska-Wynimko J., Fal A., Pawłowicz R., Domagała-Kulawik J.: Wskazówki Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące metod pozyskiwania, opracowywania oraz oceny płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL). *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2011, 79, 2, 75-89.
- [87] Klech H., Hutter C., Costabel U.: Clinical guidelines and indication for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Europ. Respir. J.* 1992, 8, 47-127.
- [88] Nir M., Lannag S., Johansen H.K., Koch C.: Long-term survival and nutritional data in patients with cystic fibrosis treated in Danish centre. *Thorax*, 1996, 51(10), 1023-1027.
- [89] Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2000 Annual Data Report. Bethesda, MD: *Cystic Fibrosis Foundation*, 2001.
- [90] Lai H.J., Cheng Y., Farell P.M.: The survival advantage patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States Cystic Fibrosis Foundation registry. *J. Pediatr.* 2005, 147(3 suppl), 57-63.
- [91] The European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Ed. Hodson ME, 1998.
- [92] Steinkamp G., Wiedemann B.: Relationship between nutritional status and lung function in cystic fibrosis: cross sectional and longitudinal analyses from the German CF quality assurance (CFQA) project. *Thorax*, 2002, 57, 596-601.
- [93] Santamaria F., Grillo G., Guidi G., Rotundo A., Raia C., de Ritis G., Sarnelli P., Caterino M., Greco L.: Cystic fibrosis: when should high-resolution computed tomography of the chest be obtained? *Pediatrics*, 1998, 101(5), 908-913.

- [94] Helbich T.H., Heinz-Peer G., Fleischmann D., Wojnarowski C., Wundrebaldinger P., Huber S., Eichler I., Herold C.J.: Evolution of CT findings in patients with cystic fibrosis. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1999, 173(1), 81-88.
- [95] Assis I., Camargos P.A., Reis F.J., Sulmonett N., Carneiro A.P.: Assessing correlations between spirometry and Shwachman-Kulczycki score in children and adolescents. *Pediatr. Pulmonol.* 2003, 36(4), 305-309.
- [96] Kanaga J., Kuhn R., Craigmyle L., Haverstock D., Church D.: Cystic fibrosis clinical score: a new scoring system to evaluate acute pulmonary exacerbation. *Clin. Ther.* 1999, 21(8), 1343-1356.
- [97] Logan P.M., O'Laoide R.M., Mulherin D., O'Mahony S., Fitzgerald M.X., Masterson J.B.: High resolution computed tomography in cystic fibrosis: correlation with pulmonary function and assessment of prognostic value. *Ir. J. Med. Sci.* 1996, 165(1), 27-31.
- [98] Loubieres Y., Grenet D., Simon-Bouy B., Landais P., Ferec C., Stern M.: Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*, 2002, 121, 73-80.
- [99] Finkelstein S.M., Weilinski C.L., Elliott G.R., et al.: Diabetes mellitus associated with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 1998, 112, 373-377.
- [100] Moran A., Hardin D., Rodman D., Allen H.F. et al.: Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: a consensus conference report. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1999, 45(1), 61-73.
- [101] Carlos W.M.: The lung in cystic fibrosis. *Human Pathol.* 1976, 7, 2, 195-204.
- [102] Hubeau C., Lorenzato M., Couetil P., Hubert D., Dusser D., Puchelle E., Gaillard D.: Quantitative analysis of inflammatory cell infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin. Exp. Immunol.* 2001, 124, 69-76.
- [103] Gilljam H., Motakefi A.M., Robertson B., Strandvik B.: Ultrastructure of bronchial epithelium in adult patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 1987, 71(3), 187-194.
- [104] Konradova V., Vavrova V., Tomanek A., Houstek J.: Ultrastructure of the bronchial epithelium in children with cystic fibrosis. *Monogr. Pediatr.* 1979, 10, 46-49.
- [105] Bedrossian C.W.M., Greenberg S.D., Singer D.B., Hansen J.J., Rosenberg H.S.: The lung in cystic fibrosis. *Human Pathol.* 1976, 7, 2, 195-204.
- [106] Katz S.M., Holsclaw D.S.: Ultrastructural features of respiratory cilia in cystic fibrosis. *A.J.C.P.* 1980, 73, 5, 682-685.
- [107] Cohn L.A., Adler K.B.: Interactions between airway epithelium and mediators of inflammation. *Exp. Lung Res.* 1992, 18, 299-322.
- [108] Takizawa H.: Airway epithelial cells as regulator of airway inflammation (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1998, 1, 367-378.



- [109] Houtmeyers E., Gosselink R., Gayan-Ramirez G., Decramer M.: Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur. Respir. J.* 1999, 13, 1177-1188.
- [110] Postma D.S., Timens W.: Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asymptomatic smokers. *Respir. Research.* 2005, 6, 38, 1-10.
- [111] Polosukhin V.V.: Ultrastructure of the bronchial epithelium in chronic inflammation. *Ultrastructural Pathol.* 2001, 25, 119-128.
- [112] Carson J.L., Collier A.M., Gambling T.M., Knowles M.R., Boucher R.C.: Ultrastructure of airway epithelial cell membranes among patients with cystic fibrosis. *Human Pathol.* 1990, 21, 6, 640-647.
- [113] Polosukhin V.V.: Regeneration of bronchial epithelium on chronic inflammatory changes under laser treatment. *Path. Res. Pract.* 1996, 192, 909-918.
- [114] Kim W.D.: Lung mucus: a clinician's view. *Eur. Respir. J.* 1997, 10, 1914-1917.
- [115] Breuer R.H., Pasic A., Smit E.I., van Vhet E., Risse E.J., Sutedja T.G.: The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 537-543.
- [116] Artinian V., Kvale P.A.: Cancer and interstitial lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2004, 10, 425-434
- [117] Papi A., Casoni G., Caramori G., Cuzzinati I., Boschetto P., Ravenna F., Calia N., Petruzzelli S., Corbetta L., Cavalleco G. at al.: COPD increases the risc of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax*, 2004, 59, 679-681.
- [118] Venmans B.J., van Boxem T.J., Smit E.F., Postmus P.E., Sutedja T.G.: Outcome of bronchial carcinoma *in situ*. *Chest*, 2000, 117, 1672-1576.
- [119] Bota S., Auliac J.B., Paris C. et al.: Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma *in situ* using fluorescence endoscopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, 164, 1688-1693.
- [120] Verhaeghe C., Tabruyn S.P., Ourt C., Burs B., Griffioen A.W.: Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2007, 11, 356(3), 745-749.
- [121] Jeanmart M., Lantuejoul S., Fievet F., Moro D., Sturm N., Brambilla C., Brambilla E.: Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin. Cancer [Research.* 2003, 9, 2195-2203.
- [122] Miller Y.E.: Pathogenesis of lung cancer. 100 year report, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005, 33, 216-223.
- [123] Ponticciello A., Barra E., Giani U., Bocchino M., Sanduzzi A.: p53 immuno histochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: cancer prospective study. *Eur. Respir. J.* 2000, 15, 547-552.

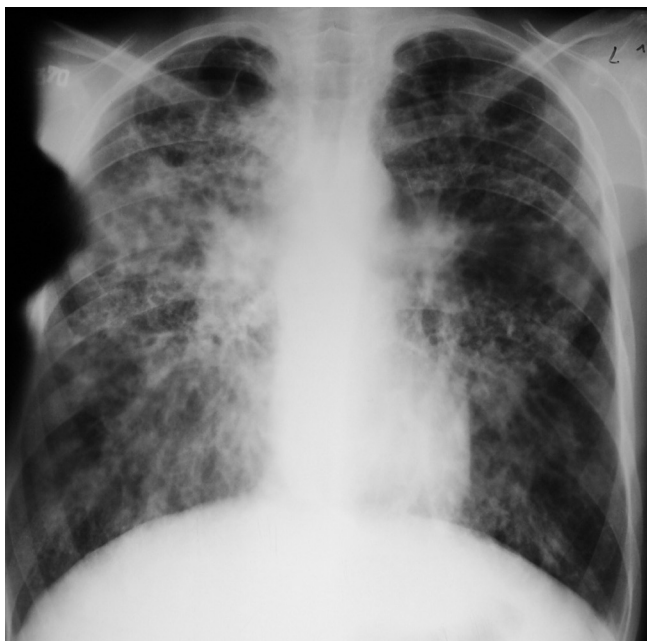


- [124] Brambilla E., Gazzeri S., Lantuejoul S. et al.: p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 1988, 4, 1609-1618.
- [125] Bartsch H., Haugen A., Risch A., Shields P., Vineis P.: Genetic susceptibility. *Tumours of the lung.* 2010.
- [126] Moro-Sibilot D., Fivet F., Jeanmart M., Lantuejoul S., Arbib F., Laverriere M.H., Brambilla E., Brambilla C.: Clinical prognostic indicators of high-grade pre-invasive bronchial lesions. *Eur. Respir. J.* 2004, 24, 24-29.
- [127] Beringer P.M., Appleman M.D.: Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000, 6(6), 545-550.
- [128] O'Carroll M.R., Syrmis M.W., Wainwright C.E., Greer R.M., Mitchell P., Coulter C., Sloots T.P., Nissen M.D., Bell S.C.: Clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* in paediatric and adult cystic fibrosis units. *Eur. Respir. J.* 2004, 24(1), 101-106.
- [129] Saiman L., Siegel J.: Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17(1), 57-71.
- [130] Miller M.B., Gilligan P.H.: Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 9, 4009-4015.
- [131] **Beringer P.M., Appleman M.D.: Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features.** *Cur. Opin. Pulm. Med.* 2000, 6, 545-550.
- [132] Quintas S., Pereira L., Lito L., Barreto C.: Epidemiological survey of bacteria isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Rev. Port. Pneumol.* 2003, IX (5 suppl. 1), 35-36.
- [133] Semczuk K., Dmeńska H., Dzierżanowska D., Kołodziejczyk M., Gabińska E., Zaręba H.: Analiza drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych chorych na mukowiscydozę leczonych w IP-CZD w latach 1999-2002. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005, 73(1), 41-47.
- [134] Rajan S., Saiman L.: Pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* 2002, 17(1), 47-56.
- [135] Rosenfeld M.R.L., Gibson S., McNamara J., Emerson J., Burnas R., Casile P., Hiat K., McCoy C.B., Wilson A., Inglis A., Smith A., Martin T.R., Ramsey B.W.: Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cistic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2001, 32, 356-366.
- [136] Hauser A.R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S.: Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinic. Microb. Rev.* 2011, 24, 29-70.
- [137] Emre U., Bernius M., Roblin P.M., Gaerlan P.F., Summersgill J.T., Steiner P., Schachter J., Hammerschlag M.R.: *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 22(5), 819-823.

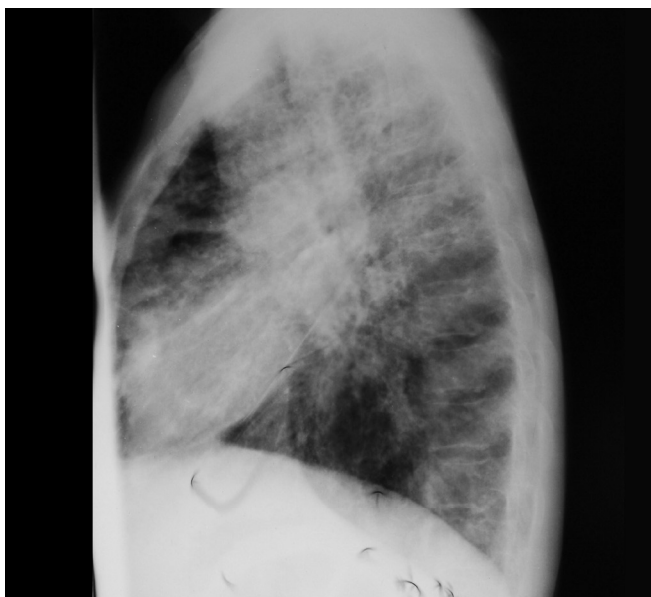
- [138] Dalhoff K., Maass M.: *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. Clinical Characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest*, 110, 2, 351-356.
- [139] Gaydos A.C., Eiden J.J., Oldach D., Mundy L.M., Auwaerter P., Warner M.L., Vance E., Burton A.A., Quinn T.C.: Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with community-acquired pneumonia by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*. 1994, 19, 157-160.
- [140] Black C.M., Fields P.L., Messmer T.O., Berdal B.P.: Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994, 13, 752-756.
- [141] Boman J., Allard A., Persson K., Lundborg M., Juto P., Wadell G.: Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 1523-1526.
- [142] Ewig S., Torres A.: Is *Chlamydia pneumoniae* an important pathogen in patients with community-acquired pneumonia? *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 741-742.
- [143] Rogers G.B., Carrol M.P., Serisier D.J., Hockey P.M., Jones G., Bruce K.D.: Characterization of bacterial community diversity of cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42(11), 5176-5183.
- [144] Pierre-Audigier C., Ferroni A., Sermet-Gaidelus I., Le Boureois M., Offredo C., Vu-Thien H., Fauroux B., Mariani P., Munck A., Bingen E., Guillemont D., Quesne G., Vincent V., Gaillard J.L.: Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43(7), 3467-3470.
- [145] Elbert D.L. i Olivier K.N.: Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2002, 16(1), 221-233.
- [146] Roux A.L., Catherinot E., Ripoll F., Soismier N. at al.: **Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France.** *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47, 4124-4128.
- [147] Olivier K.N., Weber D.J., Wallace R.J., Raiz A.R., Lee J.H., Zhang Y., Brown-Eliot B.A., Handler A., Wilson R.W., Schechter M.S., Edwards L.J., Chakraborti S., Knowles M.R.: Nontuberculous mycobacteria. I multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 167, 828-834.
- [148] Jonsson B.E., Gilljam M., Linblad A., Ridell M., Wold A.E., Welinder-Olsson C.: Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 1497-1504.
- [149] Levy I., Grisaru-Soen G., Lerner-Geva L., Kerem E., Blau H., Bentur L., Aviram M., Rivlin J., Picard E., Lavy A., Yahav Y., Rahav G.: Multiventer cross-sectional

- study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients. *Israel. Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 378-384.
- [150] Witt. M.: Genetyka wybranych chorób układu oddechowego. *Terapia*, 1996, 5, 11-15.
- [151] Neglia J.P., Fitz-Simmons S.C., Maisonneuve P., Schöni M.H., Schöni-Affolter F., Corey M., Lowenfels A.B.: The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 494-499.
- [152] Warren N., Holmes J.A., al-Jader L., West R.R., Lewis D.C., Padua R.A.: Frequency of carries of cystic fibrosis gene among patients with myeloid malignancy and melanoma. *BMJ*, 1991, 302, 760-761.
- [153] Padua R.A., Warren N., Grimshaw D., Smith M., Lewis C., Whittaker J. et al.: The cystic fibrosis delta F508 gene mutation and cancer. *Hum. Mutat.* 1997, 10, 45-48.
- [154] Suthey M.C., Batten L., Andersen C.R., McCredie M.R., Giles G.G. et al.: CFTR delta F508 carrier status, risk of breast cancer before the age of 40 and histological grading in a population-based case-control study. *Int. J. Cancer*, 1998, 79, 478-489.
- [155] Abraham E.H., Vos P., Kahn J., Grunman S.A., Jefferson D.M., Ding I. et al.: Cystic fibrosis hetero- and homozygosity is associated with inhibition of breast cancer growth. *Nat. Med.* 1996, 2, 593-596.
- [156] Li Y., Sun Z., Wu Y., Babovic-Vuksanowic D., Li Y., Cunningham J.M., Pankratz V.S., Yang P.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation and lung cancer risk. *Lung Cancer*, 2010, 70(1), 14-21.

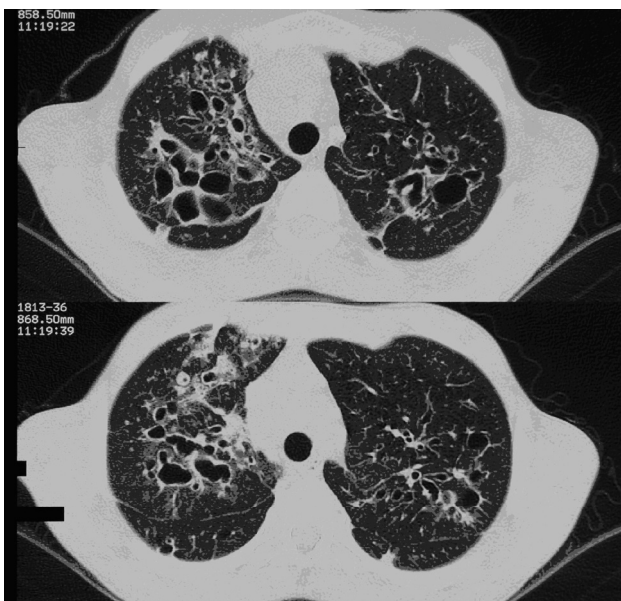
## 10. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA



Fotografia 1 A.

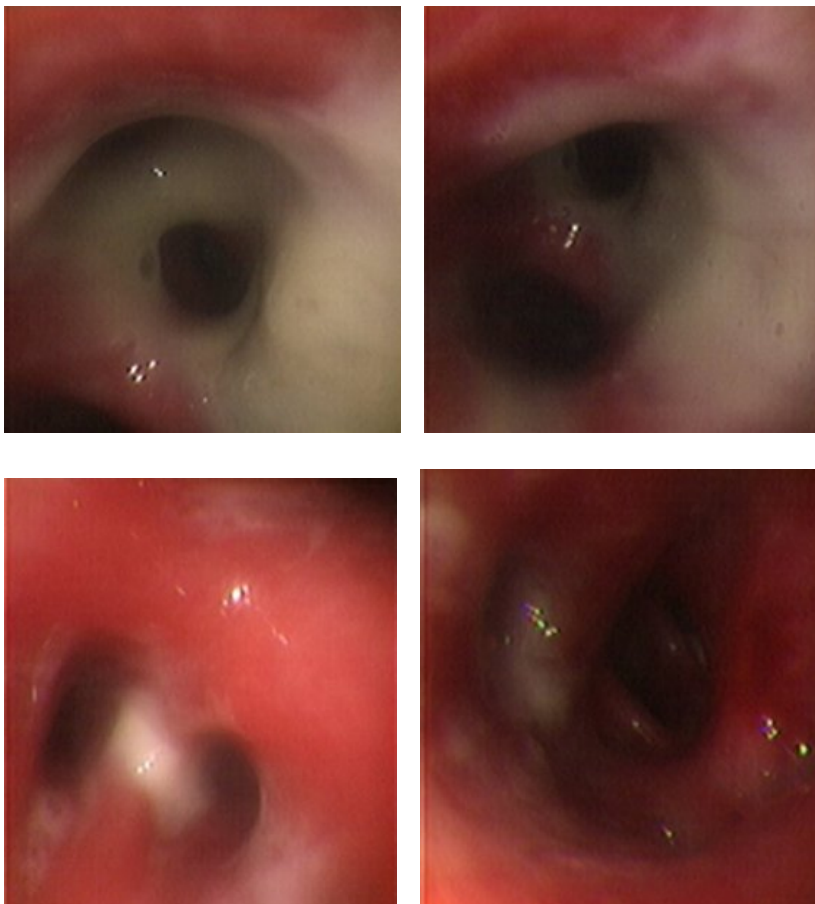


Fotografia 1 B.

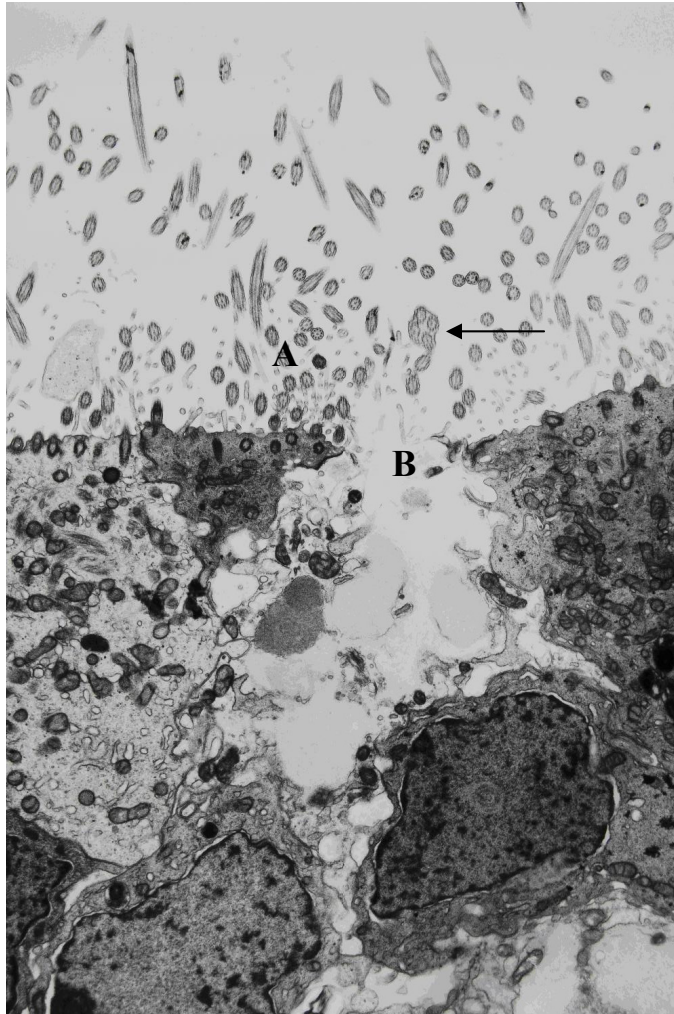


Fotografia 1 C.

Fotografia 1 A, B, C. Chora M.K. lat 20. W obu płucach widoczny bogaty rysunek oskrzelowy, liczne cienie obrączkowate i pojedyncze, różnej wielkości cienie plamiste. Zmiany są liczniejsze w prawym płucu, zwłaszcza w części środkowej. Cienie obrączkowate to zarówno zmiany rozstrzeniowe oskrzeli, jak i pęcherze rozedmowe. Szerokie wnęki płucne, zwłaszcza prawa. Szeroka, nieostro ograniczona prawa dolna okolica przytchawicza. Cechy nadmiernego upowietrzenia płuc z dużym wymiarem strzałkowym klatki piersiowej i nisko położoną przeponą.

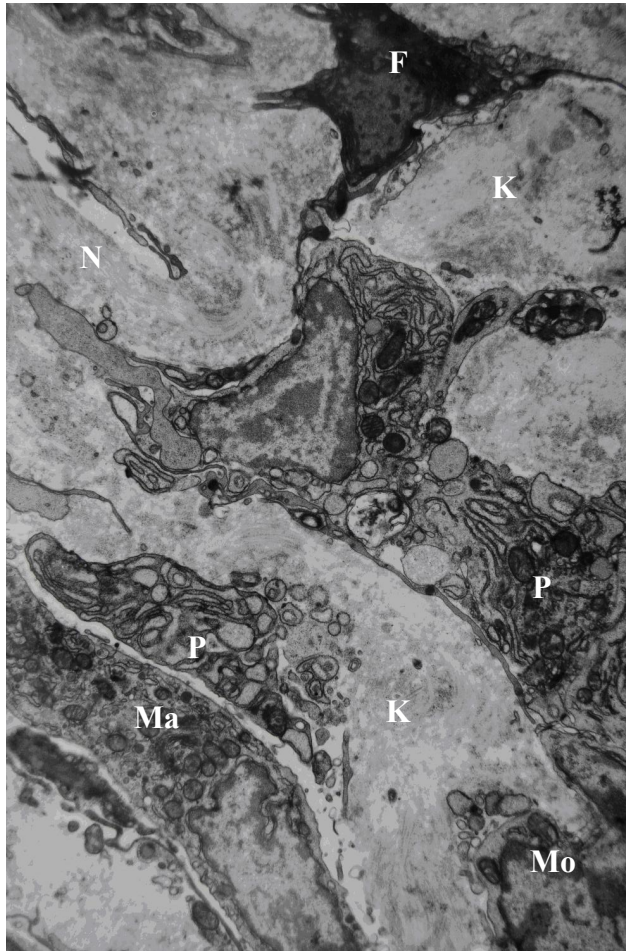


Fotografia 2. Chora M.K. lat 20. Obrzęk i przekrwienie błony śluzowej oskrzeli z zatarciem zarysu chrząstek i koncentrycznym zwężeniem oskrzeli. Nagromadzenie dużej ilości ropnej wydzieliny w świetle oskrzeli.



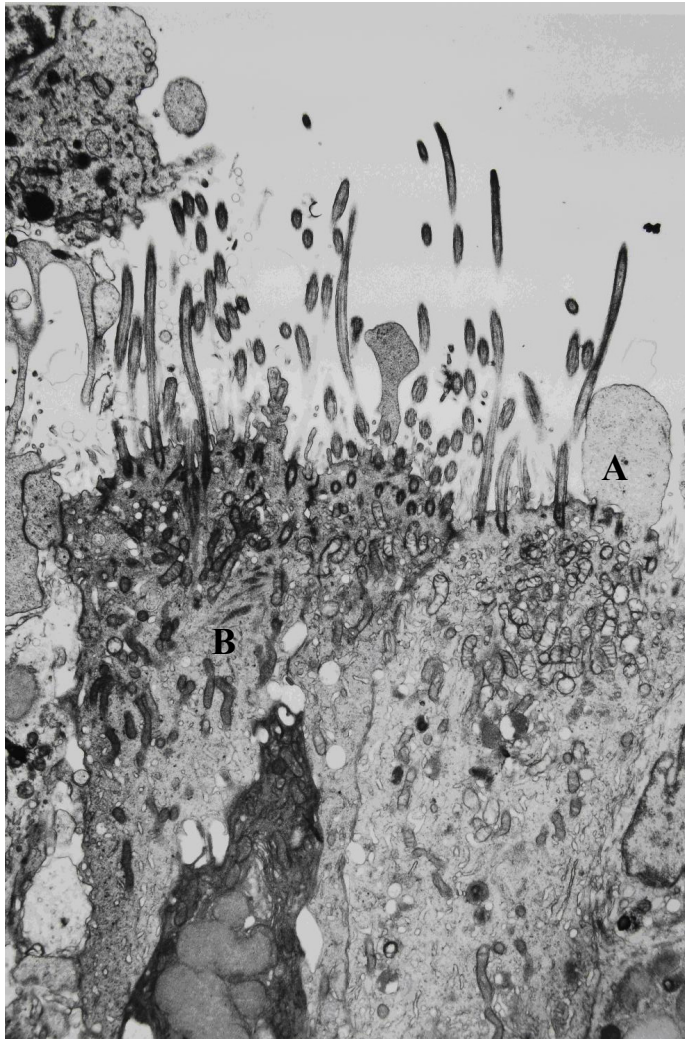
Fotografia 3. El-mi; pow. 14000x. Wolna powierzchnia nabłonka urzęsionego. W komórkach rzęskowych nieliczne, różnej wysokości rzęski, pomiędzy nimi obecne mikroosmki (A). Widoczny zespół kilku układów mikrotubul pod wspólną błoną komórkową (↓) i komórka opróżniająca się ze śluzu (B).



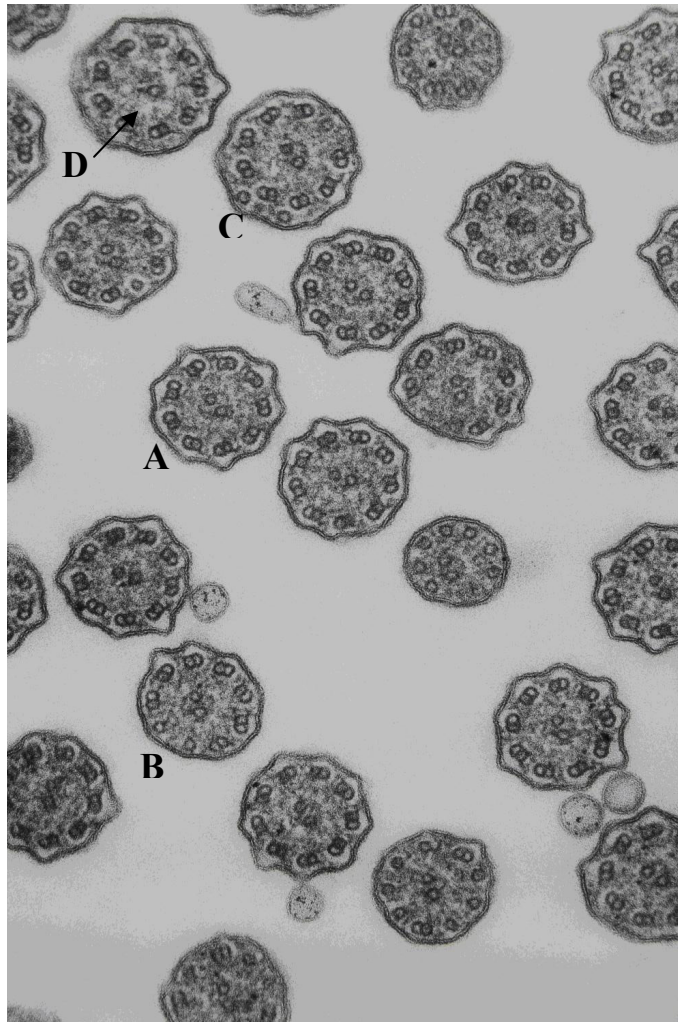


Fotografia 4. El-mi; pow. 15400x. Zapalenie przewlekłe z nawrotem fazy ostrej. W blaszce właściwej błony śluzowej oskrzela pomiędzy pęczkami kolagenu (K) widoczne komórki odczynu zapalnego: monocyty (Mo), makrofagi (Ma), komórki plazmatyczne (P), fibrocyty (F) i uszkodzone naczynie włosowate (N).

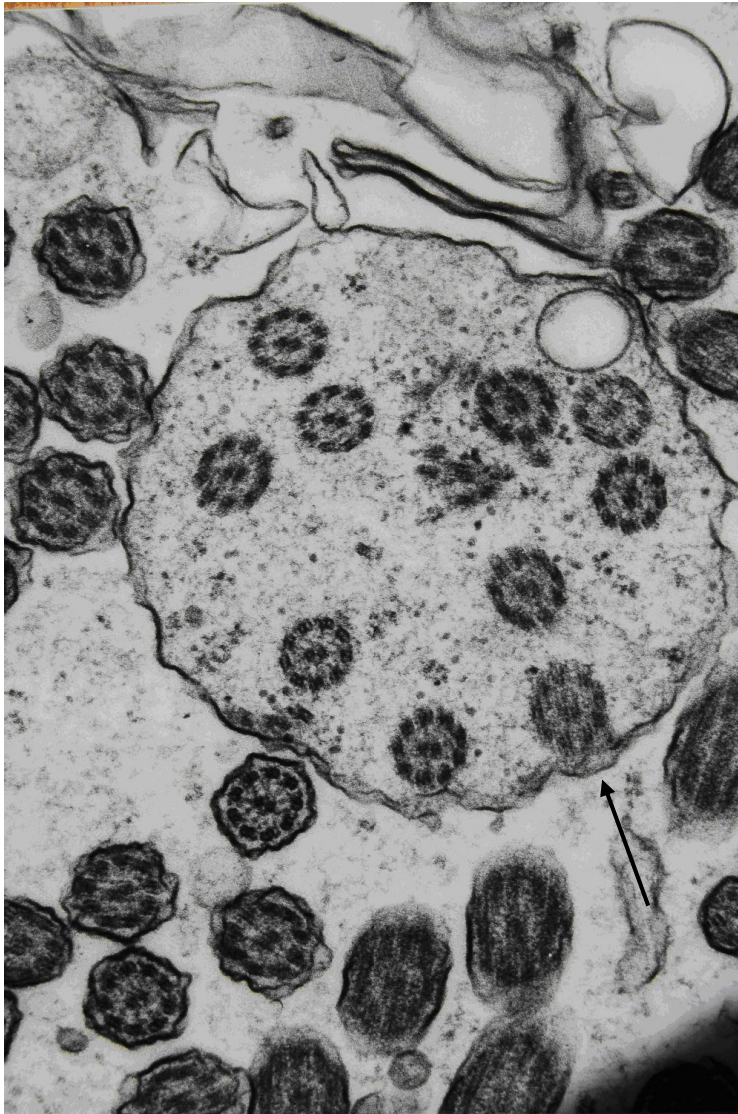




Fotografia 5. El-mi; pow. 14000x. Urozmaicona wolna powierzchnia nabłonka urzęsionego. Nieliczne rzęski rozmieszczone są nierytmicznie, pomiędzy nimi obecne mikrokosmki. Widoczne wypustki cytoplazmy bez aksonemy (A). Włókienka w sieci granicznej (B) rozmieszczone niepravidłowo.

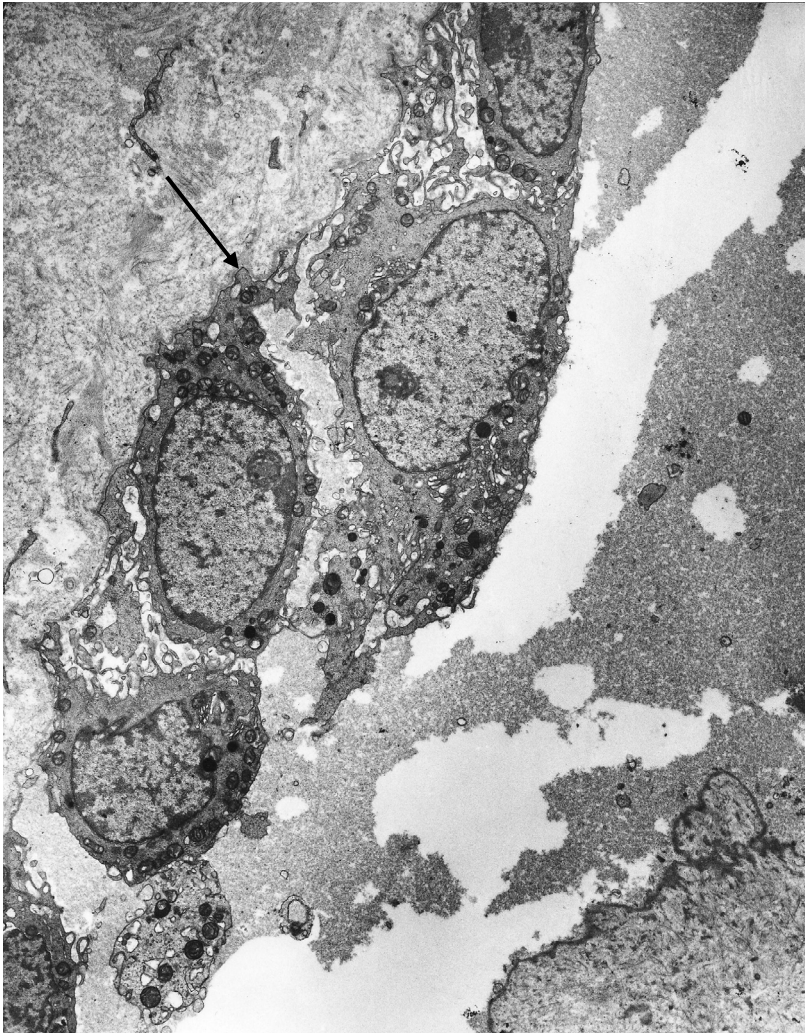


Fotografia 6. El-mi; pow. 15400x. Przekroje poprzeczne rzęsek. Brak ramion wewnętrznych dyneiny (A). Pojedyncze mikrotubule obwodowe (B), dodatkowe mikrotubule pod błoną komórkową (C) i pojedyncze mikrotubule centralne (D).

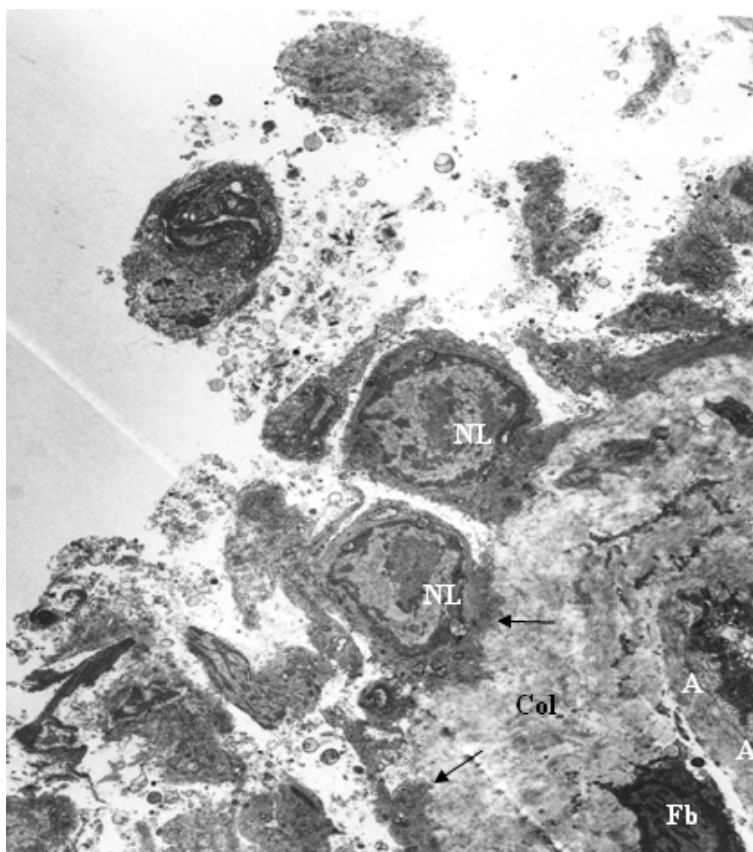


Fotografia 7. El-mi; pow. 15400x. Przekroje poprzeczne rzęsek. Wiele układów mikrotubul pod wspólną błoną komórkową (↓).

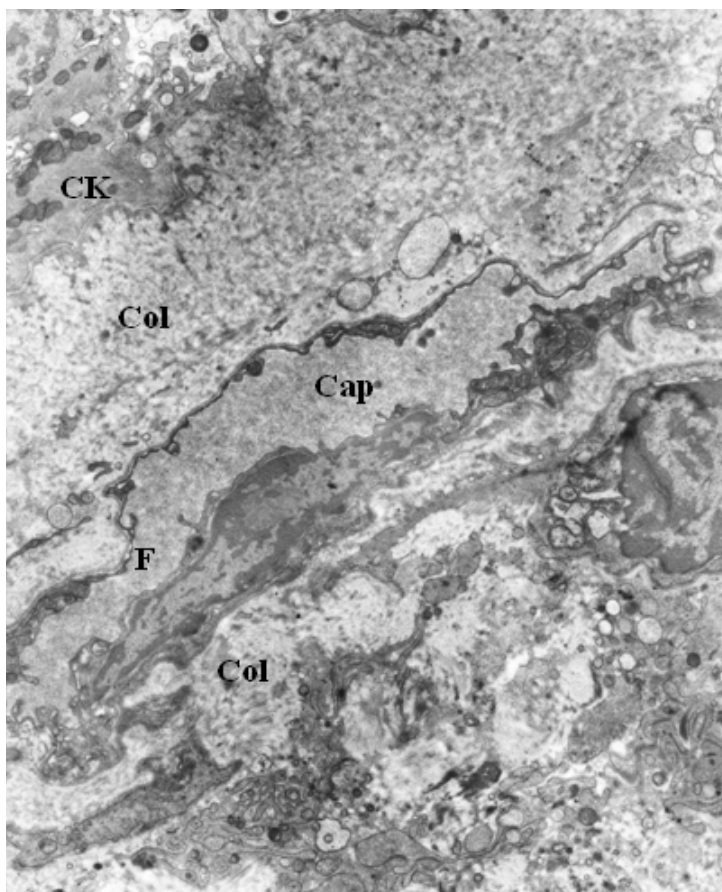




Fotografia 8. El-mi; pow. 8750x. Na znacznie skolagenizowanej blaszce właściwej leży nabłonek regenerujący. Jego błona podstawna jest ogniskowo nieznacznie pogrubiała (↓). Komórki nabłonka nie pokrywają w całości błony podstawnej. Ich struktura nie ujawnia kierunku różnicowania. Jedna z komórek posiada większy obszar cytoplazmy z dość licznymi mitochondriami i kanalikami ER, pozostałe są małe, mają nieregularne jądra i prawidłowe jąderka. Ich obraz odpowiadać może komórkom nabłonka regenerującego.

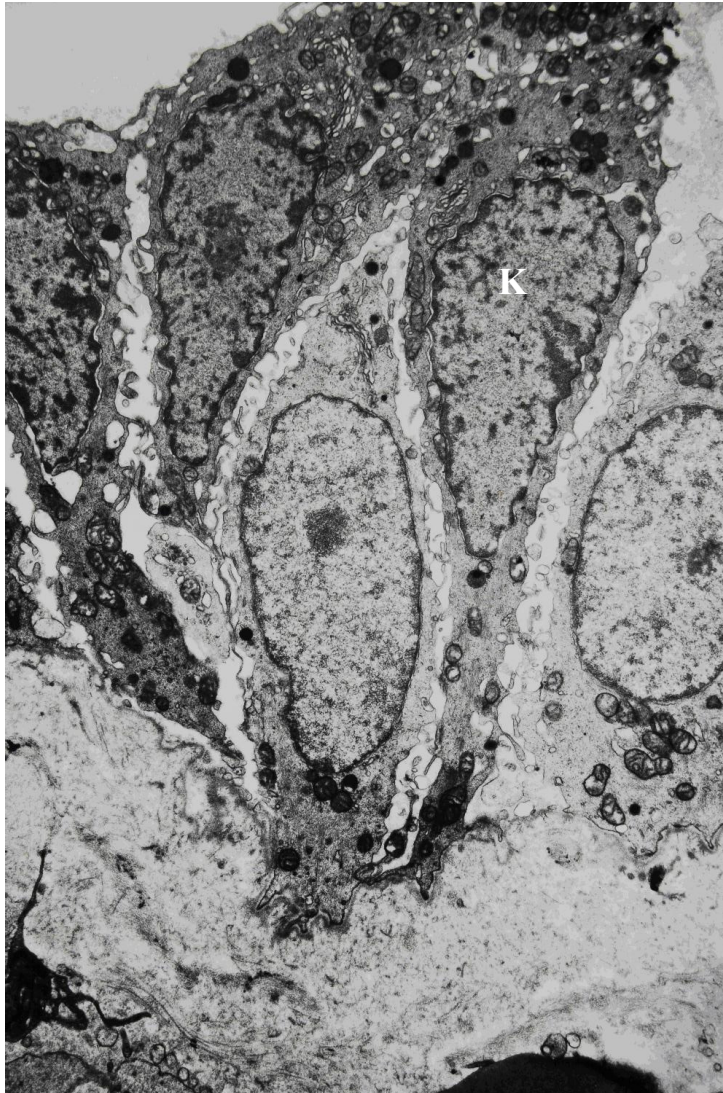


Fotografia 9. El-mi; pow. 7000x. Fragment śluzówki oskrzela pochodzi z badania, w którym rozpoznano metaplastę płaskonabłonkową i nieprawidłowy odczyn regeneracyjny nabłonka. Błona podstawna nabłonka jest ogniskowo pogrubiała (↓), od strony blaszki właściwej przylegają do niej liczne pęczki kolagenu (Col). W blaszce właściwej znajdują się także fibrocyty (Fb) oraz fragment naczynia włosowatego. Leży ono głęboko w blaszce właściwej, ma wąskie nieregularne światło, lity śródbłonek, a pod błoną podstawną śródbłonek występują liczne, beładnie ułożone fragmenty materiałów błony podstawnej (A). Regenerujący nabłonek ma duże jądra z powiększonymi, aktywnymi jąderkami (NL) z gęstą chromatyną rozłożoną nieregularnie w nukleoplazmie i podotoczkowo. Cytoplazma stanowi wąski rąbek wokół jądra i jest całkowicie wypełniona włóknkami cytokeratyn. Poza cytokeratynami w cytoplazmie znajdują się nieliczne mitochondria. Nabłonek nie stanowi litego obrzeża błony śluzowej. Poza opisanymi wcześniej dwiema komórkami pozostałe są oderwane od nabłonka, ich fragmenty leżą w świetle oskrzela.

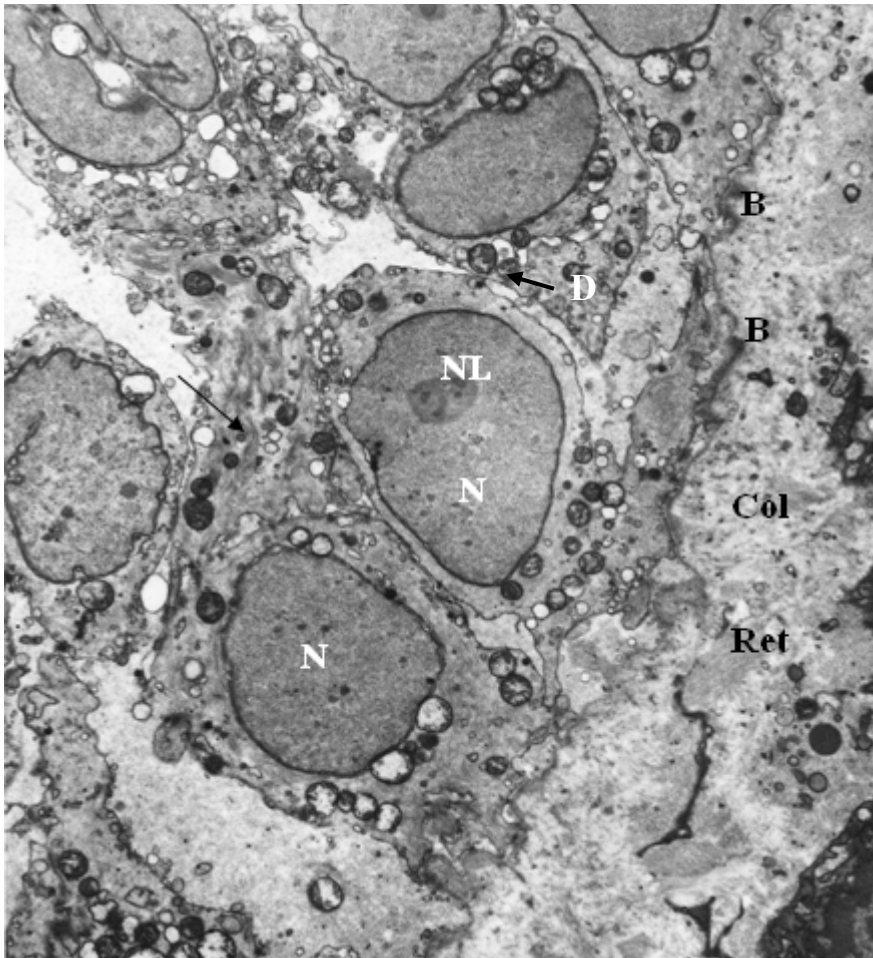


Fotografia 10. El-mi; pow. 14000x. Fragment blaszki właściwej błony śluzowej zawiera bardzo liczne pęczki kolagenu (Col), aż po rąbek granicy z nabłonkiem. Między pęczkami kolagenu leży naczynie włosowate o nieprawidłowej strukturze (Cap). Śródbłonek naczyniowy na długich odcinkach tworzy błony okienkowe (F). Błona podstawna na długich odcinkach jest cienka. Światło wypełnia osocze. Blisko marginesu fotografii widoczny jest fragment cytoplazmy komórki nabłonkowej, w której występują liczne włókienka cytokeratyn (CK).



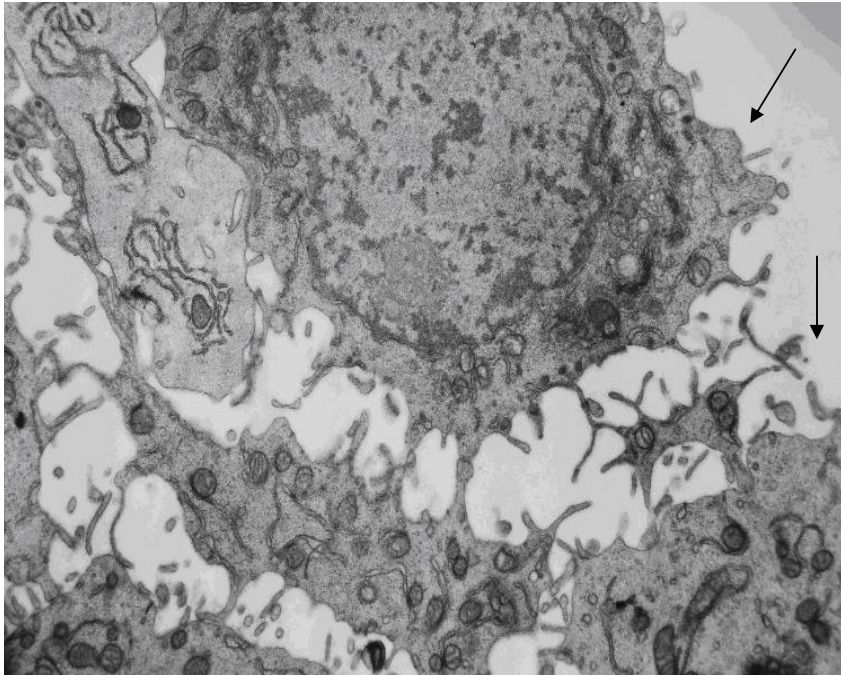


Fotografia 11. El-mi; pow. 15400x. Wolna powierzchnia nabłonka oskrzelowego nie posiadająca specjalizacji typowej dla nabłonka oskrzelowego. Komórki bez cech dojrzewania, walcowate, wysokie, nie posiadające mikrosmków i rzęsek (K).

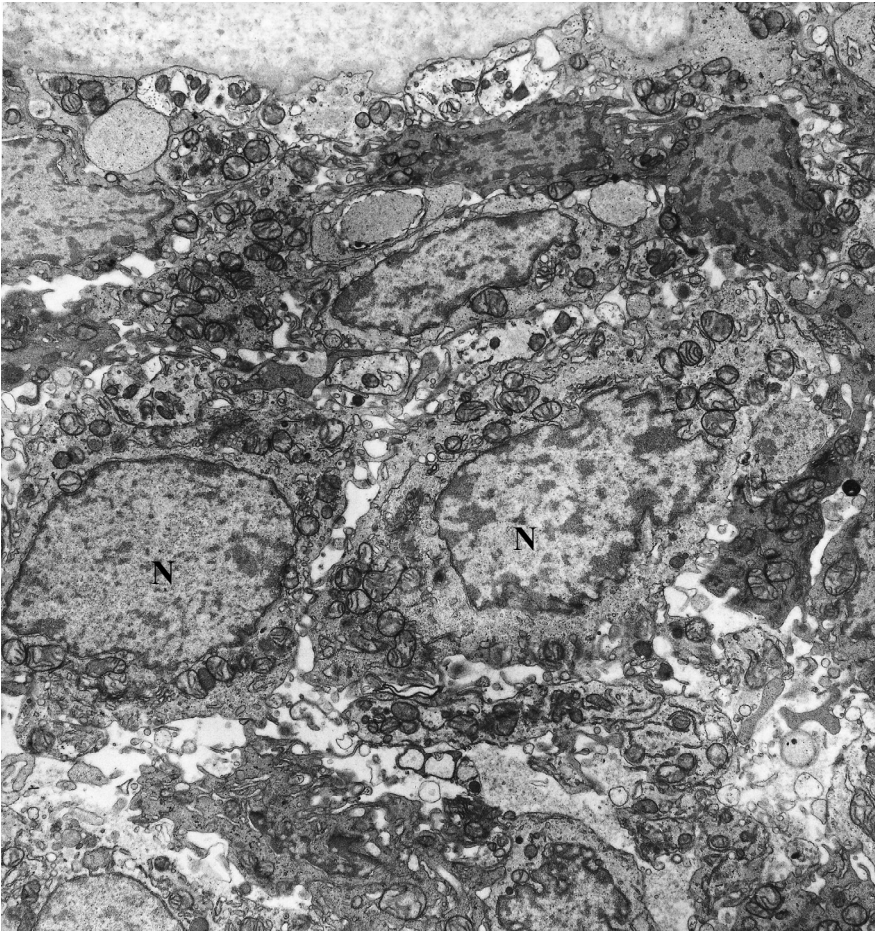


Fotografia 12. El-mi; pow. 10500x. Fragment biopsji oskrzela z rozpoznaniem metaplazji płasko-nabłonkowej. Do błony podstawnej, ogniskowo pogrubiałej (B), od strony blaszki właściwej przylegają włókna kolagenowe (Col). Między nimi występują włókna retikulino- we (Ret), między nimi znajdują się fragmenty wypustek fibrocytów. Komórki nabłonka niecałkowicie przylegają do błony podstawnej. Jądra komórkowe warstwy podstawnej są duże (N), euchromatynowe. Jedno z nich ma powiększone, aktywne jąderko (NL). Cytoplazma komórki stanowi dość wąski obszar. W cytoplazmie widoczne są liczne, ułożone typowo dla nabłonka wielowarstwowego płaskiego pęczki cytokeratyn (↓). Pomiedzy komórkami występują pojedyncze złącza desmosomopodobne (↓D).

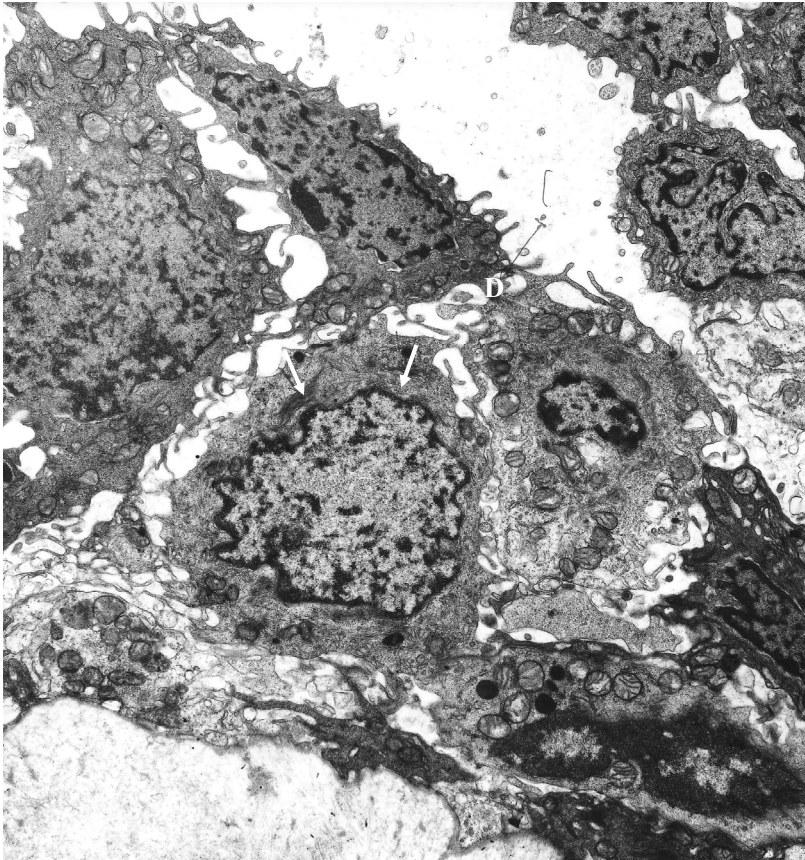




Fotografia 13. El-mi; pow. 15400x. Wolna powierzchnia nabłonka oskrzelowego. Komórki kolczyste na powierzchni nabłonka (↓).

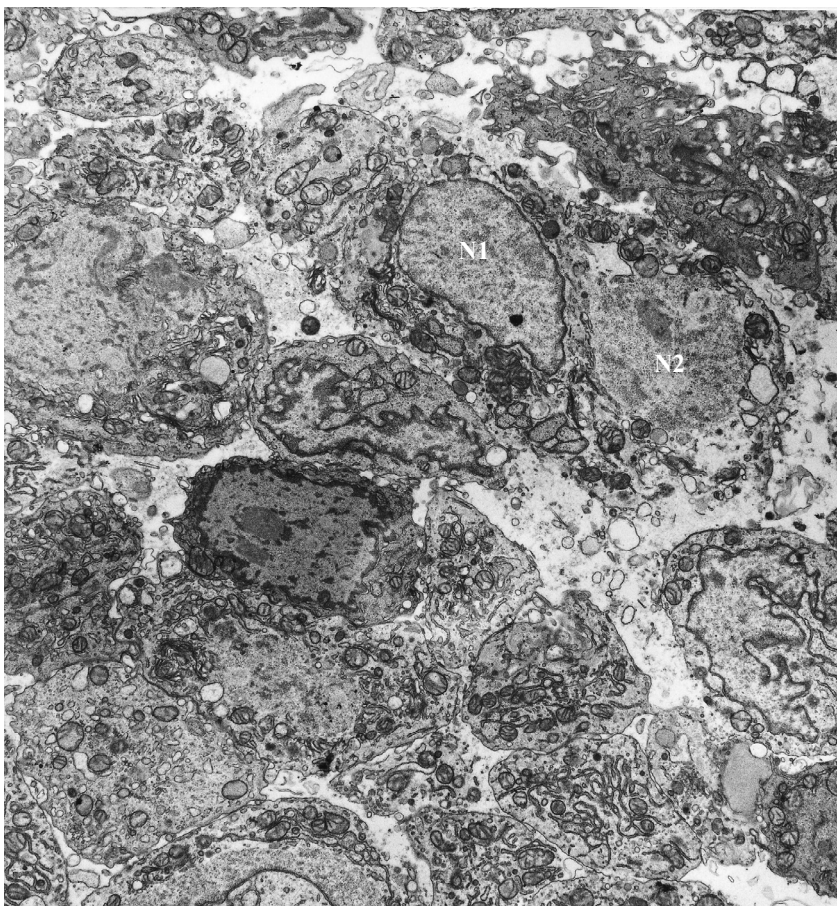


Fotografia 14. El-mi; pow. 10500x. Fragment nabłonka wielowarstwowego bez cech zróżnicowania. Komórki mają powiększone jądra (odniesienie do wielkości otaczającej je cytoplazmy pozwala określić je jako powiększone) (N). Jądra mają wrębiaste otoczki jądrowe, co odpowiadać może zmianom o charakterze dysplazji. Pozostałe struktury cytoplazmy komórek są typowe dla niezróżnicowanego nabłonka, mają bardzo liczne polirybosomy w cytozolu.

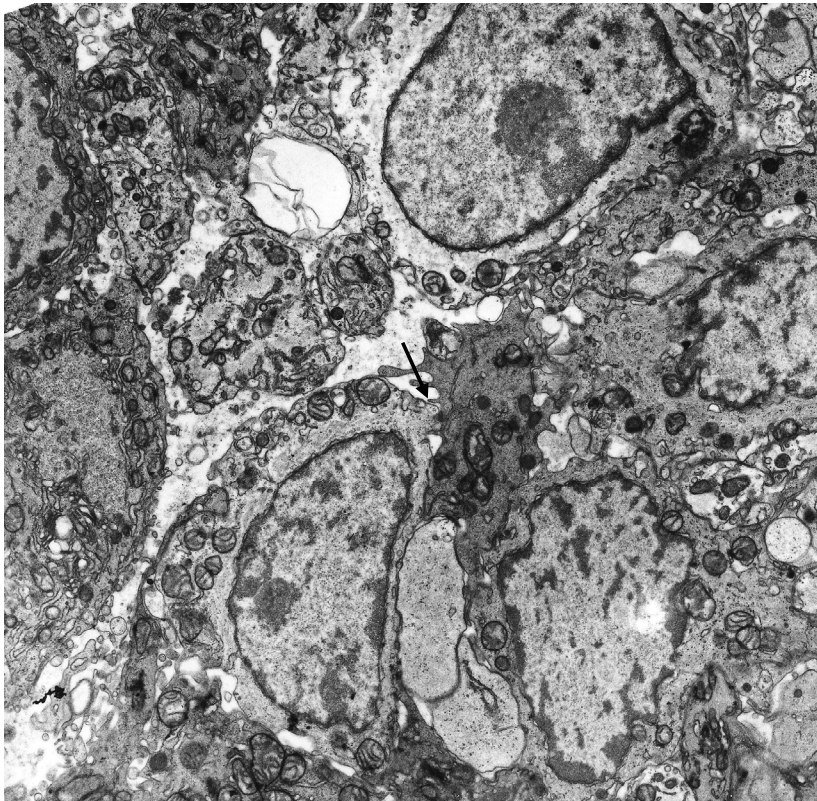


Fotografia 15. El-mi; pow.15400x. Fragment nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego śluzówkę oskrzela. Komórki tworzące nabłonek są kolczyste. W cytoplazmie mają liczne pęczki cytokeratyn (↓), między komórkami złącza typ desmosomalne (D)



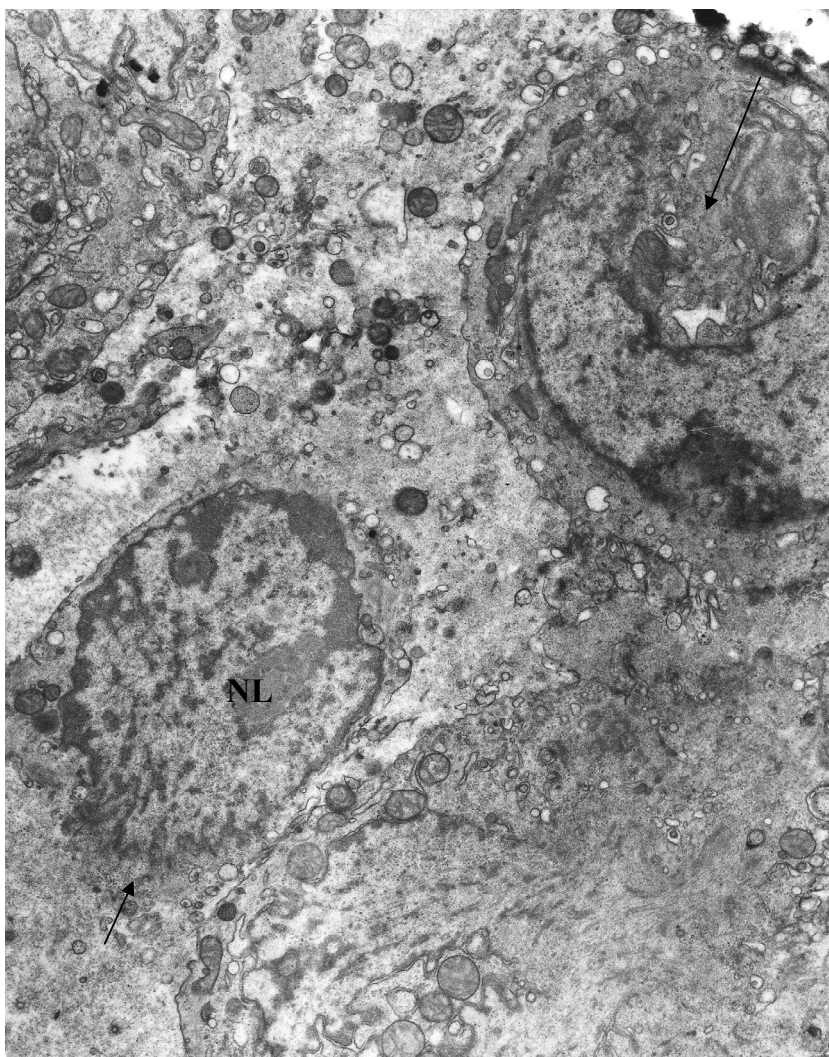


Fotografia 16. El-mi; pow. 10500x. Fragment nabłonka pokrywającego oskrzele. Wszystkie widoczne na fotografii komórki należą do nabłonka wielowarstwowego. W żadnej z tych komórek nie ma cech różnicowania w kierunku nabłonka gruczołowego. Komórki cechuje wyraźny polimorfizm jąder. Jedna z komórek posiada dwa jądra (N1, N2). Jądro N2 nie posiada otoczki jądrowej, a oba jądra w jednej komórce świadczą o endomitozie.

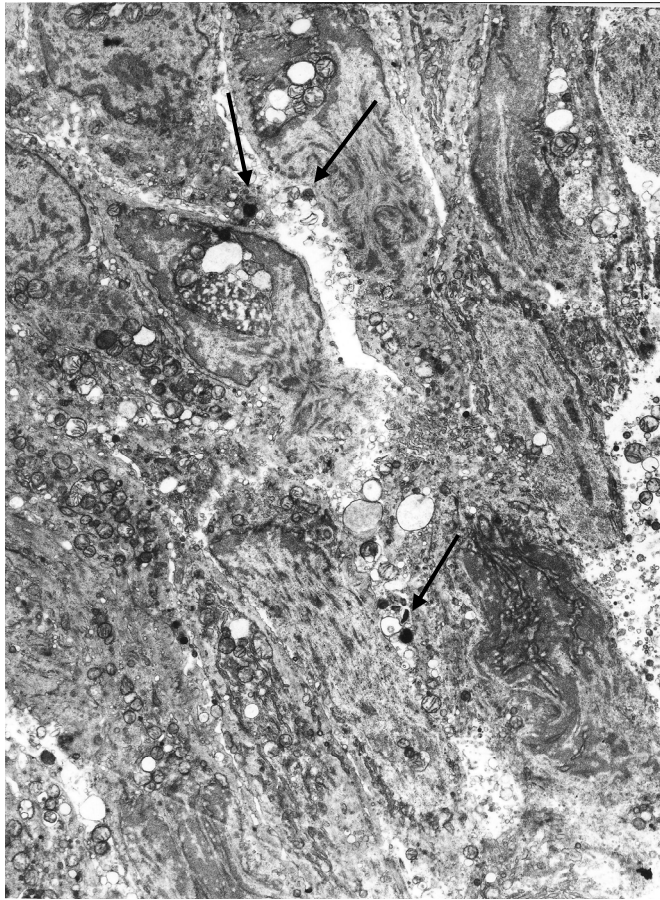


Fotografia 17. EL-mi; pow.14000x. Fragment nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Między komórkami złącza typu desmosomu (↓).





Fotografia 18. El-mi; pow. 14000x. Między komórkami nabłonka obecne są wyraźnie poszerzone przestrzenie międzykomórkowe. Jedna z komórek widocznych na zdjęciu ma rozległy ubytek otoczki jądrowej (↓) i nie jest to profaza. W sąsiedniej komórce występuje również brak otoczki jądrowej, a obecne jest jąderko (NL). Opisane cechy jądra należą do ultrastrukturalnych wykładników dysplazji.



Fotografia 19. El-mi; pow. 8750x. Fragment biopsji oskrzela, w którym rozpoznano metaplazję płaskonabłonkową z cechami dysplazji. Na zdjęciu widoczne są liczne komórki nabłonka, który w obrazie świetlnomikroskopowym odpowiadał postawionemu rozpoznaniu. Wszystkie widoczne na fotografii jądra komórek nabłonka mają wiele nieprawidłowości budowy, ich kształt jest bardzo nieregularny (norma: owalne z regularną chromatyną), na wielu odcinkach jąder brakuje otoczek jądrowych, tj. komórki nie tworzyły lamin (nieprawidłowość telofazy), chromatyna jądrowa leży luźno w cytoplazmie, uszkodzone są błony komórkowe. Materiał chromatynny jąder, który można przypisać do poszczególnych komórek, zajmuje dużą część badanego wycinka, co może ilustrować zaburzenia regulacji cyklu komórkowego; jest to widoczne w dwóch komórkach, w których materiał chromatynny leży między mikrotubulami, ale „jądro” na jednym odcinku posiada stale otoczkę jądrową. W pojedynczych fragmentach cytoplazmy obecne są małe ziarnistości neuroendokrynne (↓).

