

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Implicațiile markerilor inflamatori și ale polimorfismelor genice Il-6 -597 A/G și VEGF +936 C/T în profilul pacientului cu bronhopneumopatie cronică obstructivă

---

Doctorand **Rebrean Ana Florica (Chiș)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Pop Carmen Monica**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Bronhopneumopatia cronică obstructivă</b>	19
1.1. Definiție și istoric	19
1.2. Epidemiologie	20
1.3. Factori care determină dezvoltarea și progresia	21
1.4. Diagnostic	21
1.4.1. Diagnostic diferențial	22
1.4.2. Explorări funcționale	23
1.4.3. Chestionare	23
1.4.3.1. mMRC	23
1.4.3.2. CAT	23
1.4.3.3. BORG	23
1.4.3.4. Fagerström	23
1.5. Evaluarea capacității de efort fizic	24
1.6. Clasificare	25
1.7. Exacerbările infecțioase	25
<b>2. Markerii inflamatori în BPOC</b>	27
2.1. Inflamația sistemică	27
2.2. Inflamația locală	27
2.2.1. Celulele inflamatorii și celulele structurale pulmonare	27
2.2.1.1. Macrofagele	27
2.2.1.2. Neutrofilele	28
2.2.1.3. Limfocitele	28
2.2.1.4. Eozinofilele	28
2.2.1.5. Alte celule inflamatorii	28
2.2.2. Mediatorii inflamatori	28
2.2.2.1. Citokinele	29
2.2.2.2. Proteazele	30
2.2.2.3. Speciile reactive ale oxigenului	30
<b>3. Genetica în BPOC</b>	31
3.1. Introducere	31
3.2. Agregarea familială	31

---

3.3. Deficitul de $\alpha$ 1 antitripsină	32
3.4. Studii de asociere genomică	32
3.5. Polimorfisme genice	33
3.5.1. Polimorfisme genice IL6 în BPOC	33
3.5.2. Polimorfisme genice VEGF în BPOC	33
<b>4. Angiogeneza în BPOC</b>	<b>35</b>
4.1. Angiogeneza	35
4.1.1. Definiție și clasificare	35
4.1.2. Reglatori ai angiogenezei	35
4.1.3. Angiogeneza în BPOC	36
4.1.3.1. Componenta aeriană	36
4.1.3.2. Componenta alveolară	36
4.2. VEGF	37
4.2.1. Definiție	37
4.2.2. Rolul VEGF în BPOC	37
4.2.3. Implicații terapeutice	38
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	<b>41</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>45</b>
<b>3. Studiul 1 - Evaluarea capacității de efort fizic la pacienții cu BPOC</b>	<b>55</b>
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	55
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	63
<b>4. Studiul 2 - Inflamația în BPOC</b>	<b>65</b>
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	71
4.6. Concluzii	74
<b>5. Studiul 3 - IL6 și polimorfismul genic IL-6 -597 A/G în BPOC</b>	<b>77</b>
5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	79
5.3. Material și metodă	79
5.4. Rezultate	79

---

5.5. Discuții	85
5.6. Concluzii	87
<b>6. Studiul 4 - VEGF seric și polimorfismul genic VEGF +936 C/T în BPOC</b>	89
5.1. Introducere	89
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	90
5.3. Material și metodă	90
5.4. Rezultate	90
5.5. Discuții	95
5.6. Concluzii	97
<b>7. Concluzii generale</b>	99
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	101
<b>REFERINȚE</b>	102

**Cuvinte cheie:** BPOC, capacitate de efort, hipoxemie, inflamație, interleukine, angiogeneză, VEGF, polimorfisme genice uninucleotidice

---

## Stadiul actual al cunoașterii

Bronhopneumopatia cronică obstructivă (BPOC) reprezintă o problemă majoră de sănătate, cu mortalitate și morbiditate în continuă creștere, ajungând în acest moment pe locul al treilea în ceea ce privește cauzele de deces la nivel global. Începând cu anul 2001, un grup de experți în domeniul sănătății (pneumologie, epidemiologie, sănătate publică, socio-economie) au format ceea ce este cunoscut astăzi sub numele de Inițiativa Globală pentru Bronhopneumopatia cronică obstructivă – Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), un grup de lucru internațional având ca obiective principale creșterea conștientizării acestei patologii, stabilirea unor strategii consensuale de diagnostic, clasificare și management farmacologic și nonfarmacologic al BPOC. Ghidurile naționale și internaționale au stat și stau la baza întocmirii Strategiei Globale pentru Diagnosticul, Managementul și Prevenția BPOC, document care constituie, atât la nivel european cât și internațional, fundamentul protocoalelor implementate în unitățile sanitare implicate în această patologie. În ultimele două decenii, ghidul GOLD a suferit o serie de modificări, ca urmare a descoperirilor actuale în ceea ce privește etiopatogeneza, diagnosticul și tratamentul BPOC, în prezent actualizarea acestui ghid fiind făcută anual.

Inflamația sistemică în BPOC este definită ca prezența, în sângele periferic, a mediatorilor răspunsului imun și/sau inflamator la pacienții diagnosticați cu BPOC față de fumătorii fără BPOC. Această definiție rezultă din faptul că fumatul de țigarete reprezintă pe de o parte principalul factor de risc în apariția BPOC și pe de altă parte, un factor predispozant pentru inflamația sistemică. Celulele inflamatorii activate și citokinele proinflamatorii implicate în acest tip de inflamație sunt responsabile pentru manifestările extrapulmonare ale BPOC, precum ateroscleroza, osteoporoza, diabetul zaharat și afecțiunile cardiovasculare .

Inflamația locală, evidentă în special la nivelul peretelui bronșic al căilor aeriene mici, reprezintă rezultatul asocierii dintre imunitatea înăscută (macrofage, neutrofile, eozinofile, mastocite, celule natural-killer, celule dendritice) și cea adaptativă (limfocitele T- CD4 și CD8 și limfocite B). Celulele epiteliale, endoteliale și fibroblastele sunt de asemenea implicate în cascada inflamatorie a pacienților cu BPOC. IL-6 este denumită citokină endocrină, cu efecte la distanță de locul producerii. De-a lungul timpului a fost investigată concentrația serică a IL6 la pacienții cu BPOC, atât în faza stabilă, cât și în perioadele de exacerbare. În plus, au fost stabilite corelații ale nivelurilor serice cu nivelurile din sputa indusă sau LBA .

BPOC reprezintă a patologie multifactorială, în care cel mai citat factor de risc este reprezentat de fumatul de țigarete și expunerea la poluanți atmosferici. Cu toate acestea, cercetările ultimilor ani au încercat să identifice o anumită susceptibilitate pentru boală și să definească heterogenitatea BPOC,

---

profilul exacerbatorului frecvent, să explice predominanța emfizemului sau a bronșitei în cazuri diferite. Agregarea intrafamilială a bolii a reprezentat și reprezintă în continuare un subiect de mare interes. Polimorfismele genice reprezintă cea mai frecventă formă de variație genetică a genomului uman. Polimorfismele uninucleotidice (Single Nucleotide Polymorphism -SNP) apar atunci când o singură nucleotidă (A, T, C sau G) este înlocuită cu o alta pe o anumită secvență a ADN-ului, la doi indivizi diferiți dintr-o specie sau pe doi cromozomi omologi ai unui singur individ.

Angiogeneza reprezintă procesul de formare de vase sangvine noi din vase preexistente. Este un proces complex reglat de factori proangiogenetici și antinangiogenetici și survine în momentul apariției unui dezechilibru între acești reglatori. Acest echilibru apare în situații de hipoglicemie, acidoză, hipoxemie, stres mecanic, stimuli imunologici/inflamatori, tumori . Din punct de vedere al originii, celulele stem mezodermale dau naștere hemangioblastelor care se vor diviza în celule stem hematopietice, pe de o parte, și angioblaste, pe de altă parte. Celulele hematopietice se vor dezvolta din celulele stem hematopietice, iar celulele endoteliale își au originea în angioblaste. Există dovezi ale expresiei crescute ale VEGF la pacienții cu BPOC, atât în epiteliul bronșic și bronșioloalveolar, cât și în macrofagele bronșiolare și la nivelul musculaturii netede aeriene, însă, pe de altă parte, nivelul VEGF și al receptorului VEGF-R2 la pacienții diagnosticați doar cu emfizem pulmonar este scăzut . Modificările de la nivelul vascularizației bronșice apar încă din stadii precoce ale BPOC, precum și la persoanele fumătoare, asimptomatice, ceea ce subliniază rolul angiogenezei în lanțul patogenetic al BPOC.

## **Contribuția personală**

Au fost înrolați în studiu pacienți adulți (femei și bărbați), diagnosticați anterior cu BPOC (conform criteriilor GOLD 2016), urmăriți în cadrul Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie „Leon Daniello”, Cluj-Napoca, precum și martori (femei și bărbați), persoane sănătoase. Pacienții și martorii au fost comparabili din punct de vedere al sexului, vârstei, IMC-ului, expunerii la fumat, regiunea geografică de proveniență. Inițial, 356 de pacienți cu BPOC au fost înrolați în studiu, însă doar 60 dintre aceștia au fost eligibili, după aplicarea criteriilor de excludere și respectarea celor de includere.

Protocolul de cercetare a fost analizat și aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, pentru toate studiile cuprinse în această cercetare.

### **Studiul 1. Evaluarea capacității de efort fizic la pacienții cu BPOC**

**Introducere:** Calitatea vieții pacienților cu BPOC este afectată în primul rând gradul de dispnee, dată de declinul VEMS, însă acest lucru atrage după

---

sine consecințe cu implicații medicale și psiho-sociale extrem de importante. Testul de mers de 6 minute (6MWT) reprezintă un instrument noninvasiv, repetabil și util, de evaluare obiectivă a capacității de efort fizic la pacienții cu BPOC.

**Ipoteza de lucru:** Studiul își propune să evalueze dacă 6MWT ar putea fi utilizată ca și criteriu de stadializare la pacienții atent selecționați (fără comorbidități importante).

**Material și metodă:** Pacienții au fost caracterizați din punct de vedere al vârstei, IMC-ului, statusului de fumător, expunerii la noxe respiratorii (încălzirea locuinței prin arderea lemnului) clasificării BPOC conform criteriilor GOLD 2020 în stadii de severitate și clase de risc, gradul desaturării pe parcursul efectuării testului, distanța parcursă (în metri) procentul din distanța prezisă prin aplicarea formulelor de calcul. Pentru fiecare pacient în parte a fost completată Fișa de lucru pentru efectuarea testului de mers de șase minute. Evaluarea gradului de dispnee s-a făcut prin utilizarea scalei BORG, cu scor de la 0 la 10, atât înainte de efectuarea 6MWT, cât și la finalul testării de efort. Chestionarul Fagerström de dependență nicotinică a fost aplicat tuturor participanților.

**Rezultate:** Statusul nutrițional a fost evaluat prin calculul IMC, acesta având valoarea medie de  $29,4 \pm 6,3$  pentru lotul studiu, observându-se un procent de 38.3% de pacienți obezi din totalul celor incluși în studiu. În urma împărțirii pacienților pe stadii de severitate a BPOC, s-a constatat că pentru stadiul II distanța medie parcursă a fost de  $373.89 \pm 68.31$ , pentru stadiul III distanța a fost de  $311.54 \pm 79.6$ , iar pentru stadiul IV distanța a fost de  $303.92 \pm 97.77$ . Procentul de desaturare în timpul efectuării 6MWT crește odată cu agravarea disfuncției ventilatorii. Distanța parcursă la testul de mers a fost, în medie, de  $303,9 \pm 97,7$  metri, cu o valoare minimă de 70 metri și o valoare maximă de 450 metri. Distanța parcursă s-a corelat pozitiv cu procentul de desaturare. S-a constatat existența unei semnificații statistice pentru compararea gradului de severitate cu distanța parcursă și cu procentul de desaturare.

**Concluzii:** Rezultatele noastre indică faptul că, în cazul pacienților cu BPOC fără comorbidități majore, rezultatele 6MWT pot fi utilizate în stadializarea afecțiunii din punct de vedere al severității și al claselor de risc.

## Studiul 2. Inflamația în BPOC

**Introducere:** Pentru aprecierea gradului inflamației sistemice la pacienții cu patologie cronică au fost utilizate, timp îndelungat, markeri precum VSH, PCR sau procalcitonina. Cercetărilor ultimilor ani aduc în atenție raportul neutrofile/limfocite, concentrația serică a eozinofilelor în monitorizarea BPOC.

---

**Ipoteza de lucru:** studiul de față își propune să evalueze valoarea NLR și a eozinofilelor serice în lotul studiu, și să identifice potențiale asocieri și corelații cu parametri demografici, clinici și paraclinici studiați.

**Material și metodă:** Pentru toți pacienții au fost determinate: indicele BODE, rezultatele 6MWT, durata spitalizării, valorile NLR, Eo, VSH, PCR (din sânge venos) și PaO<sub>2</sub> (din sânge arterial).

**Rezultate:** Valoarea NLR se corelează pozitiv cu vârsta și nivelul Eo serice și negativ cu valorile PCR la pacienții cu BPOC. Foștii fumători cu BPOC au valori ale NLR mai scăzute și ale Eo serice mai mari față de fumătorii activi. Pacienții cu BPOC cu Eo serice  $\geq 300$  cel/ $\mu$ L, în procent de 15% din totalul pacienților au avut valori mai mari ale VSH și PCR decât cei cu Eo serice sub 300 cel/ $\mu$ L. Durata spitalizării în BPOC nu a fost influențată de valoarea NLR sau de nivelul Eo serice. În subgrupul fumătorilor cu BPOC, NLR se corelează pozitiv cu vârsta și nivelul Eo serice, iar Eo serice se corelează pozitiv cu indicele BODE. În subgrupul foștilor fumători diagnosticați cu BPOC, valoarea NLR se corelează pozitiv cu VSH și PCR.

**Concluzii:** Statusul de fumător influențează valorile NLR și Eo serice. Totodată studiu de față obiectivează relațiile existente între noii markeri de monitorizare și metodele clasice de definire a inflamației sistemice.

### **Studiul 3. IL6 și polimorfismul genic IL-6 -597 A/G în BPOC**

**Introducere:** Studiarea inflamației locale și sistemice în BPOC reprezintă o preocupare permanentă, în încercarea de a descoperi noi opțiuni terapeutice și stabilirea unor legături între patologia respiratorie și comorbidități (cardiace, metabolice).

**Ipoteza de lucru:** Studiul își propune atât să evalueze concentrațiile serice ale IL6 și corelațiile cu parametri studiați, cât și să identifice polimorfismul genic rs1800797 (IL6 -597G/A) în populația studiată.

**Material și metodă:** Pentru cele două loturi a fost determinată concentrația serică a IL6 prin metoda ELISA, și a fost stabilită prezența polimorfismul genic IL-6 -597 A/G (sau rs1800797) precum și frecvența și distribuția alelelor și genotipurilor.

**Rezultate:** Pacienții cu BPOC au avut concentrații serice ale IL6 mai mari decât persoanele sănătoase, aceste concentrații fiind corelate negativ cu Indicele Tiffeneau și pozitiv cu istoricul de fumat și valoarea PCR. Alela G a polimorfismului IL6 rs1800797 a fost identificată ca alela minoră pentru populația studiată, neexistând diferențe semnificative între genotipurile AA, AG și GG ale polimorfismului IL6 rs1800797 și prezența BPOC, distribuția urmată de alelele și genotipurile studiate fiind aceași, indiferent de vârstă, sex, status fumat, severitatea obstrucției căilor aeriene sau nivelul hipoxemiei. Concentrațiile serice ale IL6 sunt mai mari la pacienții cu BPOC față de persoanele sănătoase în cazul genotipului AG și GG, dar nu și în cazul genotipului AA al polimorfismului genic IL6 rs1800797.



---

**Concluzii:** Rezultatele acestui studiu indică prezența unor concentrații serice crescute la pacienții cu BPOC. Susceptibilitatea pentru BPOC nu este influențată de prezența alelei minore G sau de genotipurile AA, AG sau GG ale polimorfismului studiat.

#### **Studiul 4. VEGF seric și polimorfismul genic VEGF +936 C/T în BPOC**

**Introducere:** În BPOC, procesul de angiogeneză este explicat prin diferite ipoteze propuse: afluxul celulelor inflamatorii, producția de reglatori ai angiogenezei, efectele hipoxiei asupra VEGF sau remodelarea circulației pulmonare.

**Ipoteza de lucru:** Studiul își propune atât să evalueze concentrațiile serice ale VEGF și corelațiile cu parametri studiați, cât și să identifice polimorfismului genic VEGF rs3020539 (VEGF +936 C/T) în populația studiată.

**Material și metodă:** Pentru ambele loturi a fost determinat nivelul seric la VEGF, prin metoda ELISA și a fost investigat polimorfismul genic VEGF rs3025039, analizându-se totodată distribuția și frecvența alelelor și a genotipurilor în cele două loturi studiate.

**Rezultate:** Concentrațiile serice ale VEGF au fost mai mari în lotul pacienților cu BPOC față de persoanele sănătoase, iar concentrația serică a VEGF se corelează cu distanța parcursă la 6MWT. Alela T a fost identificată drept alela minoră a polimorfismului VEGF rs3020539, persoanele cu cel puțin o alelă T a polimorfismului genic VEGF rs3025039 având un risc de 2.368 mai mare de a dezvolta BPOC. Genotipul CC/CT/TT al VEGF rs3025039 nu influențează apariția BPOC și nu se asociază cu modificări ale parametrilor de urmărire/prognostic.

**Concluzii:** Valorile serice ale VEGF sunt mai mari în BPOC, fiind corelate cu parametri funcționali. Prezența alelei T a polimorfismului genic VEGF rs3025039 crește riscul de a dezvolta BPOC de 2.3 ori. Genotipurile CC/CT/TT nu influențează apariția sau stadializarea bolii.

---

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Implications of inflammatory markers and Il-6 -597 A / G and VEGF +936 C / T gene polymorphisms in the profile of chronic obstructive pulmonary disease patients

---

PhD Student **Rebrean Ana Florica (Chiș)**

PhD Supervisor Prof.dr. **Pop Carmen Monica**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>STATE OF THE ART</b>	
<b>1. Chronic obstructive pulmonary disease</b>	19
1.1. Definition and history	19
1.2. Epidemiology	20
1.3. Promoting factors	21
1.4. Diagnosis	21
1.4.1. Differential diagnosis	22
1.4.2. Functional lung tests	23
1.4.3. Questionnaires	23
1.4.3.1. mMRC	23
1.4.3.2. CAT	23
1.4.3.3. BORG	23
1.4.3.4. Fagerström	23
1.5. Evaluation of physical performance	24
1.6. Classification	25
1.7. Infectious exacerbations	25
<b>2. Inflammatory markers in COPD</b>	27
2.1. Systemic inflammation	27
2.2. Local inflammation	27
2.2.1. Inflammatory cells and structural cells	27
2.2.1.1. Macrophages	27
2.2.1.2. Neutrophils	28
2.2.1.3. Lymphocytes	28
2.2.1.4. Eosinophils	28
2.2.1.5. Other	28
2.2.2. Mediators of inflammation	28
2.2.2.1. Cytokines	29
2.2.2.2. Proteasis	30
2.2.2.3. Reactive species of oxygen	30
<b>3. Genetics in COPD</b>	31
3.1. Introduction	31
3.2. Family aggregation	31
3.3. $\alpha$ 1 antitrypsin deficiency	32
3.4. Wide genome association studies	32
3.5. Gene polymorphisms	33
3.5.1. IL6 Gene polymorphisms in COPD	33

3.5.2. VEGF Gene polymorphisms in COPD	33
<b>4. Angiogenesis in COPD</b>	35
4.1. Angiogenesis	35
4.1.1. Definition and classification	35
4.1.2. Angiogenesis mediators	35
4.1.3. Angiogenesis in COPD	36
4.1.3.1. Air component	36
4.1.3.2. Alveolar component	36
4.2. VEGF	37
4.2.1. Definition	37
4.2.2. Role of VEGF in COPD	37
4.2.3. Therapeutic implications	38
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Hypothesis/objectives</b>	41
<b>2. General methodology</b>	45
<b>3. Study 1 – Evaluation of effort capacity in COPD</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Hypothesis/objectives	55
3.3. Material and method	56
3.4. Results	56
3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	63
<b>4. Study 2 – Inflammation in COPD</b>	65
4.1. Introduction	65
4.2. Hypothesis/objectives	66
4.3. Material and method	66
4.4. Results	68
4.5. Discussions	71
4.6. Conclusions	74
<b>5. Study 3 -Serum IL6 and IL-6 -597 A/G SNP in COPD</b>	77
5.1. Introduction	77
5.2. Hypothesis/objectives	79
5.3. Material and method	79
5.4. Results	79
5.5. Discussions	85
5.6. Conclusions	87
<b>6. Study 4 – Serum VEGF and VEGF +936 C/T SNP in COPD</b>	89
5.1. Introduction	89
5.2. Hypothesis/objectives	90

---

5.3. Material and method	90
5.4. Results	90
5.5. Discussions	95
5.6. Conclusions	97
<b>7. General conclusions</b>	<b>99</b>
<b>8. originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>101</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>102</b>

**Keywords:** COPD, exercise capacity, hypoxemia, inflammation, interleukins, angiogenesis, VEGF, single nucleotide gene polymorphisms

### **State of the art**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major health problem, with mortality and morbidity rising steadily, currently ranking third in terms of causes of death globally. Since 2001, a group of health experts (pulmonology, epidemiology, public health, socio-economics) have formed what is now known as the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), an international working group with the main objectives of raising awareness of this pathology, establishing consensual strategies for diagnosis, classification and pharmacological and non-pharmacological management of COPD. National and international guidelines have been and are the basis for the elaboration of the Global Strategy for Diagnosis, Management and Prevention of COPD, a document that is, both at European and international level, the foundation of the protocols implemented in the health units involved in this pathology. In the last two decades, the GOLD guide has undergone a number of changes, as a result of current findings regarding the etiopathogenesis, diagnosis and treatment of COPD, and this guide is currently being updated annually.

Systemic inflammation in COPD is defined as the presence in the peripheral blood of mediators of the immune and / or inflammatory response in patients diagnosed with COPD compared to smokers without COPD. This definition results from the fact that cigarette smoking is on the one hand the main risk factor for COPD and on the other hand, a predisposing factor for systemic inflammation. Activated inflammatory cells and proinflammatory cytokines involved in this type of inflammation are responsible for the extrapulmonary manifestations of COPD, such as atherosclerosis, osteoporosis, diabetes, and cardiovascular disease.

---

Local inflammation, especially evident in the bronchial wall of the small airways, is the result of the association between innate immunity (macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells, natural-killer cells, dendritic cells) and adaptive (T-CD4 and CD8 lymphocytes and lymphocytes B). Epithelial, endothelial cells and fibroblasts are also involved in the inflammatory cascade of COPD patients. IL-6 is called an endocrine cytokine, with effects away from the site of production. Over time, serum IL6 levels in COPD patients have been investigated, both in the stable phase and during periods of exacerbation. In addition, correlations of serum levels with levels of induced sputum or LBA have been established.

COPD is a multifactorial pathology, in which the most cited risk factor is cigarette smoking and exposure to air pollutants. However, research in recent years has tried to identify a certain susceptibility to the disease and to define the heterogeneity of COPD, the profile of the frequent exacerbator, to explain the predominance of emphysema or bronchitis in different cases. Intrafamilial aggregation of the disease has been and continues to be a topic of great interest. Gene polymorphisms are the most common form of genetic variation in the human genome. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) occur when a single nucleotide (A, T, C, or G) is replaced by another on a particular DNA sequence in two different individuals in a species or on two chromosomes, counterparts of a single individual.

Angiogenesis is the process of forming new blood vessels from pre-existing vessels. It is a complex process regulated by proangiogenic and antiangiogenic factors and occurs at the time of an imbalance between these regulators. This balance occurs in situations of hypoglycemia, acidosis, hypoxemia, mechanical stress, immune / inflammatory stimuli, tumors. From the point of view of origin, mesodermal stem cells give rise to hemangioblasts that will divide into hematopoietic stem cells, on the one hand, and angioblasts, on the other. Hematopoietic cells will develop from hematopoietic stem cells, and endothelial cells originate in angioblasts. There is evidence of increased VEGF expression in patients with COPD, both in the bronchial and bronchioalveolar epithelium, and in the bronchiolar macrophages and smooth aerial musculature, but on the other hand, the level of VEGF and VEGF-R2 receptor in patients diagnosed only with pulmonary emphysema is low. Changes in bronchial vascularity occur in the early stages of COPD, as well as in smokers, asymptomatic, which emphasizes the role of angiogenesis in the pathogenetic chain of COPD.

### **Personal contribution**

Adult patients (women and men), previously diagnosed with COPD (according to GOLD 2016 criteria), followed in the Clinical Hospital of Pneumophthisiology "Leon Daniello", Cluj-Napoca, as well as healthy controls,

---

were enrolled in the study. Patients and controls were comparable in terms of sex, age, BMI, exposure to smoking, geographical area of origin. Initially, 356 COPD patients were enrolled in the study, but only 60 of them were eligible, after applying the exclusion criteria and meeting the inclusion criteria.

The research protocol was analyzed and approved by the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", for all studies included in this research.

## **Study 1. Assessment of exercise capacity in COPD patients**

**Introduction:** The quality of life of COPD patients is primarily affected by the degree of dyspnea, given by the decline of FEV1, but this has consequences with extremely important medical and psychosocial implications. The 6-minute walk test (6MWT) is a non-invasive, repeatable and useful tool for objectively assessing exercise capacity in COPD patients.

**Hypothesis:** The study aims to assess whether 6MWT could be used as a staging criteria in carefully selected patients (without significant comorbidities).

**Material and method:** Patients were characterized in terms of age, BMI, smoking status, respiratory exposure (home heating by burning wood) classification of COPD according to GOLD 2020 criteria in stages of severity and risk classes, degree desaturation during the test, the distance traveled (in meters) the percentage of the distance predicted by applying the calculation formulas. The six-minute walking test worksheet for each patient was completed. The assessment of the degree of dyspnea was done by using the BORG scale, with a score from 0 to 10, both before performing 6MWT and at the end of the exercise test. The Fagerström nicotine addiction questionnaire was applied to all participants.

**Results:** The nutritional status was assessed by BMI calculation, which had an average value of  $29.4 \pm 6.3$  for the study group, observing a percentage of 38.3% of obese patients out of the total included in the study. Following the division of patients by COPD severity stages, it was found that for stage II the average distance traveled was  $373.89 \pm 68.31$ , for stage III the distance was  $311.54 \pm 79.6$ , and for stage IV the distance was  $303.92 \pm 97.77$ . The percentage of desaturation during 6MWT increases with the aggravation of ventilatory dysfunction. The distance covered in the walking test was, on average,  $303.9 \pm 97.7$  meters, with a minimum value of 70 meters and a maximum value of 450 meters. The distance traveled was positively correlated with the percentage of desaturation. It was found that there was a statistical significance for comparing the degree of severity with the distance traveled and the percentage of desaturation.

**Conclusions:** Our results indicate that, in patients with COPD without major comorbidities, 6MWT results can be used in staging the condition in terms of severity and risk classes.

---

## Study 2. Inflammation in COPD

**Introduction:** Markers such as ESR, PCR or procalcitonin have been used for a long time to assess the degree of systemic inflammation in patients with chronic pathology. Research in recent years draws attention to the neutrophil / lymphocyte ratio, the serum concentration of eosinophils in COPD monitoring.

**Hypothesis:** the present study aims to evaluate the value of NLR and serum eosinophils in the study group, and to identify potential associations and correlations with demographic, clinical and paraclinical parameters studied.

**Material and method:** For all patients were determined: BODE index, 6MWT results, length of hospital stay, NLR, Eo, ESR, PCR (venous blood) and PaO<sub>2</sub> (arterial blood).

**Results:** The NLR value correlates positively with age and serum Eo level and negatively correlates with PCR values in COPD patients. Former smokers with COPD have lower NLR and higher serum Eo values than active smokers. Patients with COPD with serum Eo  $\geq 300$  cel /  $\mu$ L, in 15% of all patients had higher ESR and PCR values than those with serum Eo below 300 cel /  $\mu$ L. The duration of hospitalization in COPD was not influenced by NLR or serum Eo levels. In the subgroup of smokers with COPD, NLR correlates positively with age and Eo level, and serum Eo correlates positively with the BODE index. In the subgroup of former smokers diagnosed with COPD, the NLR value correlates positively with ESR and PCR.

**Conclusions:** Smoker status influences serum NLR and Eo values. At the same time, this study objectifies the existing relationships between the new monitoring markers and the classical methods of defining systemic inflammation.

## Study 3. IL6 and IL-6 -597 A / G gene polymorphism in COPD

**Introduction:** The study of local and systemic inflammation in COPD is a permanent concern, in an attempt to discover new therapeutic options and to establish links between respiratory pathology and comorbidities (cardiac, metabolic).

**Hypothesis:** The study aims both to evaluate the serum concentrations of IL6 and the correlations with the studied parameters, and to identify the gene polymorphism rs1800797 (IL6 -597G / A) in the studied population.

**Material and method:** For the two groups, the serum concentration of IL6 was determined by ELISA method, and the presence of the IL-6 -597 A / G gene polymorphism (or rs1800797) was established, as well as the frequency and distribution of alleles and genotypes.



---

**Results:** COPD patients had higher serum IL6 concentrations than healthy individuals, which were negatively correlated with the Tiffeneau Index and positively correlated with smoking history and PCR. The G allele of the IL6 rs1800797 polymorphism was identified as a minor allele for the studied population, there were no significant differences between the AA, AG and GG genotypes of the IL6 rs1800797 polymorphism and the presence of COPD, the distribution followed by the alleles and genotypes being the same, regardless of age, sex smoking status, severity of airway obstruction or level of hypoxemia. Serum IL6 concentrations are higher in COPD patients than in healthy individuals in the AG and GG genotype, but not in the AA genotype of the IL6 rs1800797 gene polymorphism.

**Conclusions:** The results of this study indicate the presence of elevated serum concentrations in patients with COPD. Susceptibility to COPD is not influenced by the presence of the minor G allele or by the AA, AG or GG genotypes of the polymorphism studied.

#### **Study 4. Serum VEGF and VEGF +936 C / T gene polymorphism in COPD**

**Introduction:** In COPD, the process of angiogenesis is explained by various proposed hypotheses: the influx of inflammatory cells, the production of angiogenesis regulators, the effects of hypoxia on VEGF or remodeling of the pulmonary circulation.

**Hypothesis:** The study aims both to evaluate the serum concentrations of VEGF and the correlations with the studied parameters, and to identify the VEGF gene polymorphism rs3020539 (VEGF +936 C / T) in the studied population.

**Material and method:** For both groups, the serum level at VEGF was determined by ELISA method and the VEGF gene polymorphism rs3025039 was investigated, while analyzing the distribution and frequency of alleles and genotypes in the two groups studied.

**Results:** Serum VEGF concentrations were higher in the group of patients with COPD compared to healthy individuals, and serum VEGF concentration correlated with the distance traveled at 6MWT. The T allele was identified as the minor allele of the VEGF rs3020539 polymorphism, with people with at least one T allele of the VEGF rs3025039 gene polymorphism having a 2,368 higher risk of developing COPD. The CC / CT / TT genotype of VEGF rs3025039 does not influence the occurrence of COPD and is not associated with changes in follow-up / prognosis parameters.

**Conclusions:** Serum VEGF values are higher in COPD, being correlated with functional parameters. The presence of the T allele of the VEGF rs3025039 gene polymorphism increases the risk of developing COPD 2.3 times. CC / CT / TT genotypes do not influence the onset or staging of the disease.