

610
T2A 7
2001 2nd

356

PLANTING THE SEEDS OF

THE FUTURE
OF THE NATION
IS THE RESPONSIBILITY
OF EVERY CITIZEN

THE FUTURE OF THE NATION

IS THE RESPONSIBILITY

OF EVERY CITIZEN

AND THE FUTURE OF THE NATION







ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ ΣΤΙΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ
ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΚΑΡΔΙΟΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΝΟΣΟ

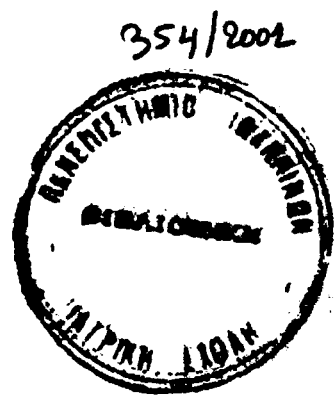
Ηρακλή Μ. Τσαγκάρη
Πνευμονολόγου

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα
2001



11



‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.’

(Νόμος 5343//32, άρθρο 202, παράγραφος 2)



11

... ..
... ..
... ..



Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων:

Σταύρος Κωνσταντόπουλος, Καθηγητής Πνευμονολογίας

Μέλη:

Γιωτάνα Δαλαβάγκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-

Εμβρυολογίας

Μαριλένα Λέκκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Χημικού Τμήματος



11

UNIVERSITY OF TORONTO

1964

THE UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

1964

THE UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

1964

THE UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY



Επταμελής Επιτροπή

Σταύρος Κωνσταντόπουλος, Καθηγητής Πνευμονολογίας

Κωνσταντίνος Μπουραντάς, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιοχημείας

Μωυσής Ελισσάφ, Καθηγητής Παθολογίας

Λάμπρος Μιχάλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας

Γιωτάνα Δαλαβάγκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας

Μαριλένα Λέκκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Χημικού Τμήματος



11

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΕΚΔΟΣΗΡΙΟ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΝ

ΜΑΘΗΤΙΚΟ ΕΚΔΟΣΗΡΙΟ

ΕΚΔΟΣΗΡΙΟ ΜΑΘΗΤΙΚΟ

ΕΚΔΟΣΗΡΙΟ ΜΑΘΗΤΙΚΟ

ΕΚΔΟΣΗΡΙΟ ΜΑΘΗΤΙΚΟ



11



Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στο κλινικό της μέρος και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο εργαστηριακό της μέρος, στο διάστημα 1995-2000.

Η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να γίνει χωρίς την αμέριστη υποστήριξη του Διευθυντή της ΜΕΘ Γιώργου Νάκου. Του χρωστώ θερμές ευχαριστίες για την καθοριστικότητα συμμετοχή του στο σχεδιασμό, την οργάνωση και την εκτέλεση του πρωτοκόλλου, αλλά κυρίως για τη διαρκή υποστήριξη ενός κλίματος ομαδικής έρευνας και συνεχούς εκπαίδευσης, αλλά και για την αμέριστη προσωπική του ενθάρρυνση.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Επίκουρη Καθηγήτρια Μαριλένα Λέκκα για τη δύσκολη προσπάθειά της να με εισάγει στον άγνωστο και γοητευτικό κόσμο της Χημείας και για τη γνώση και την εργαστηριακή εμπειρία που αποκόμισα. Η εξαιρετικά υψηλού επιπέδου ομάδα της, με τη μεγάλη εμπειρία και αφοσίωση στην έρευνα, αποτέλεσε ίσως το σημαντικότερο παράγοντα πραγματοποίησης της μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Καθηγητή Σταύρο Κωσταντόπουλο και Επίκουρη Καθηγήτρια Γιωτάννα Δαλαβάγκα, για τη συνεχή υποστήριξη και τη μεγάλη βοήθειά τους στο σχεδιασμό της μελέτης, όπως επίσης και τις παρατηρήσεις τους κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στη φίλη χημικό Ειρήνη Κητσιούλη για τη βοήθειά της στον εργαστηριακό πάγκο και για την πολύτιμη συμβολή της στο χειρισμό των δειγμάτων, καθώς και για την βοήθειά της στη συγγραφή. Ευχαριστίες οφείλω επίσης στους φίλους χημικούς Κώστα Τέλλη και τους νεώτερους Άκη Λιοκάτη και Γεωργία Καράγιωργα για τη βοήθειά τους.

Τέλος πολλές ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη του φυσιοθεραπευτικού τμήματος της ΜΕΘ Δήμητρα Καστάνη για τη συνεχή και αγόγγυστη υποστήριξη των δεκάδων βρογχοσκοπήσεων που απαιτήθηκαν, όπως επίσης και τους φίλους γιατρούς και νοσηλευτές της ΜΕΘ για τη συνολική βοήθειά τους.



Иногда в литературе встречается мнение, что в древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.

Следовательно, это мнение не имеет никаких оснований.

В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований. В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.

В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований. В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.

Следовательно, это мнение не имеет никаких оснований.

В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований. В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.

В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований. В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.

В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований. В древности люди считали, что в них живут души животных. Это мнение, конечно, не имеет никаких оснований.



Περιεχόμενα

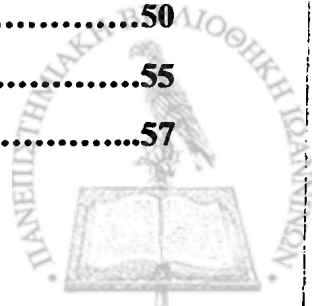
A.Εισαγωγή

1.Μηχανικός αερισμός

Η εξέλιξη του μηχανικού αερισμού.....	1
Βασικοί όροι και φυσιολογικές αρχές της μηχανικής αναπνοής	6
Προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη - Στοιχεία από πειραματικές μελέτες	11
Πνευμονικό οίδημα προκαλούμενο από τον αναπνευστήρα.....	13
Πνευμονικό οίδημα αυξημένης διήθησης	13
Πνευμονικό οίδημα αυξημένης διαπερατότητας.....	15
Παθολογοανατομικά ευρήματα	18
Ευρήματα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	19
Μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης από τη μηχανική αναπνοή.....	20
A.Μηχανικό τραύμα.....	21
Βαρότραυμα.....	21
Βολότραυμα.....	23
Ατελεκτατικό τραύμα.....	27
Το μηχανικό τραύμα σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη.....	29
B.Βιοτραύμα.....	33
Συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη - Στοιχεία από κλινικές μελέτες και θέσεις ομοφωνίας.....	38

2.Επιφανειοδραστικός παράγοντας

Ιστορική αναδρομή.....	43
Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	45
Λιπίδια.....	46
Πρωτεΐνες.....	50
Σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	55
Φυσιολογία του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	57



Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	61
Απεικονιστική μελέτη του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	63
Επιφανειοδραστικός παράγοντας και βρογχοκυψελιδική έκπλυση.....	64
Κλινική εμπειρία στη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	67

3.Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF)

Εισαγωγή.....	71
Σύνθεση του PAF.....	73
Υποδοχέας του PAF και ανταγωνιστές.....	75
PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AcH).....	76
Μηχανισμοί ελέγχου της βιολογικής δράσης του PAF και οξειδωμένα φωσφολιπίδια.....	78
PAF και οξεία πνευμονική βλάβη.....	79

Σκοπός της μελέτης.....	83
-------------------------	----

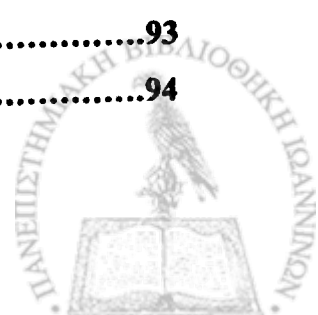
B.Πειραματικό μέρος

1.Υλικό και μέθοδος

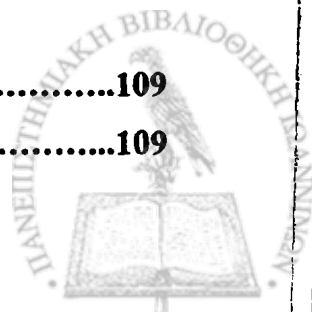
Πρωτόκολλο μελέτης.....	85
Δημογραφικά στοιχεία ασθενών.....	88
Κλινικές μετρήσεις.....	90
Διαδικασία λήψης του BAL.....	91

Εργαστηριακές μέθοδοι

α)Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών του BAL με τη μέθοδο Lowry.....	93
Αρχή της μεθόδου.....	93
Αντιδραστήρια.....	93
Διαλύματα εργασίας.....	93
Πειραματική πορεία.....	94



β)Προσδιορισμός αλβουμίνης στο BAL με τη μέθοδο της βρωμοκρεσόλης (BCG)	
Αρχή της μεθόδου.....	95
Αντιδραστήρια.....	95
Διαλύματα εργασίας.....	95
Πειραματική πορεία.....	96
γ)Εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Bligh-Dyer	
Αρχή της μεθόδου.....	98
Αντιδραστήρια.....	98
Πειραματική πορεία.....	98
Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC	
Αρχή της μεθόδου.....	99
Υλικά.....	99
Διαλύματα εργασίας.....	99
Πειραματική πορεία.....	100
δ)Προσδιορισμός λιπιδικού φωσφόρου	
Αρχή της μεθόδου.....	101
Αντιδραστήρια.....	101
Διαλύματα εργασίας.....	101
Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου λιπιδικού εκχυλίσματος	
Πειραματική πορεία.....	102
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	103
Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC	
Πειραματική πορεία.....	103
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	104
Παρατηρήσεις.....	104
ε)Βιολογικός προσδιορισμός του PAF σε BAL, με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού	
Αντιδραστήρια.....	105
Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού	
Διαλύματα εργασίας.....	105
Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια.....	107
Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων	
Αρχή της μεθόδου.....	109
Διαλύματα εργασίας.....	109



Πρότυπα διαλύματα PAF.....	110
Παρατηρήσεις.....	110
Πειραματική πορεία.....	110
στ)Ραδιομετρικός προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης	
Αρχή της μεθόδου.....	113
Αντιδραστήρια.....	113
Διαλύματα εργασίας.....	114
Πειραματική διαδικασία.....	115
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	116

3.Αποτελέσματα.....117

Ομάδα 1-Μηχανικός αερισμός.....118

Ολικές πρωτεΐνες.....	120
Αλβουμίνη.....	121
Ολικά φωσφολιπίδια.....	122
Είδη φωσφολιπιδίων.....	123
PAF.....	125
PAF-ακετυλοϋδρολάση.....	127
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/φωσφολιπίδια	128
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες.....	129
Κύτταρα.....	130

Ομάδα 2-Πνευμονία στον αναπνευστήρα.....131

Ολικές πρωτεΐνες.....	133
Αλβουμίνη.....	134
Ολικά φωσφολιπίδια.....	135
Είδη φωσφολιπιδίων.....	136
PAF.....	139
PAF-ακετυλοϋδρολάση.....	140
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/φωσφολιπίδια.....	141
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες.....	142
Κύτταρα.....	143

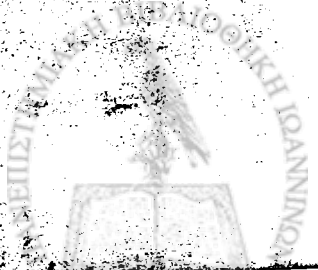


Ομάδα 3-Μηχανικός αερισμός.....	144
Ολικές πρωτεΐνες.....	146
Αλβουμίνη.....	147
Ολικά φωσφολιπίδια.....	148
Είδη φωσφολιπιδίων.....	149
PAF.....	152
PAF-ακετυλοϋδρολάση.....	153
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/φωσφολιπίδια.....	154
Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες.....	155
Κύτταρα.....	156
 4.Συζήτηση.....	 157
 Συμπεράσματα.....	 168
 Περίληψη.....	 169
 Summary.....	 171
 Συντομογραφίες.....	 173
 Βιβλιογραφία.....	 175



11

116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

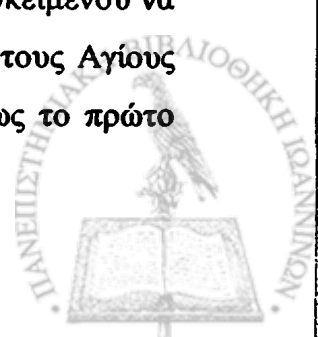


1.Μηχανικός αερισμός

Η εξέλιξη του μηχανικού αερισμού

Η έννοια της αναπνοής είναι συνδεδεμένη με την έννοια της ζωής. Οι κινέζοι φιλόσοφοι περιγράφουν το 'lien chi', τη ζωογόνο διαδικασία εισαγωγής του αέρα στο σώμα από το 2000 π.Χ. Ο Αναξιμένης από τη Μίλητο τον 6ο π.Χ. αιώνα αναγνωρίζει το πνεύμα σαν το αναγκαίο συστατικό για κάθε μορφή ζωής, ενώ πολλές είναι και οι βιβλικές αναφορές (Γένεσις 2:7, Ψαλμοί 104:29), που ταυτίζουν την έννοια της αναπνοής με τη ζωή. Η προσπάθεια της κατανόησης των βασικών εννοιών και των μηχανισμών της αναπνοής αποτέλεσε για πάνω από 2000 χρόνια βασικό αντικείμενο έρευνας για τους ανατόμους, φυσιολόγους, χημικούς, αλλά και πολλές φορές τους φιλόσοφους της κάθε εποχής.

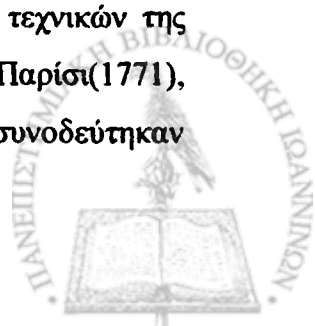
Ο Γαληνός είναι ο πρώτος που φέρεται να έχει αερίσει έναν οργανισμό: 'Αν φυσήξεις αέρα στο λάρυγγα ενός νεκρού ζώου, θα δεις ότι οι βρόγχοι του γεμίζουν και οι πνεύμονές του διατείνονται'¹. Ο Γαληνός, αγνοώντας την έννοια της διάχυσης, προσπάθησε να απαντήσει στο ερώτημα της μεταφοράς του αέρα στην καρδιά, αλλά η πειραματική του προσπάθεια σε ζωντανά ζώα αποτύγχανε, δεδομένου ότι κάθε φορά που άνοιγε τη θωρακική κοιλότητα το ζώο πέθαινε. Περισσότερο από 1000 χρόνια αργότερα ο Vesalius παρατηρούσε ότι η διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας συνοδευόταν από σύμπτωση των πνευμόνων και διακοπή της καρδιακής λειτουργίας, που όμως αναστρεφόταν αν άρχιζε αμέσως η εμφύσηση αέρα στην τραχεία². Δεν είναι γνωστό αν ο Vesalius ανέπτυξε πρώτος τη μέθοδο βασιζόμενος στο έργο του Γαληνού, ή απλώς ήταν ο πρώτος που περιέγραψε μια ήδη γνωστή διαδικασία. Ενδιαφέρουσα σύμπτωση αποτελεί το γεγονός ότι ο Παράκελσος, σύγχρονος του Vesalius, χρησιμοποίησε μια παρόμοια τεχνική στην προσπάθεια ανάνηψης ενός ασθενούς γύρω στο 1530 και το ερωτηματικό ποιος από τους δύο είχε την αρχική ιδέα παρέμεινε αναπάντητο³. Ο Vesalius είχε επανειλημμένα δοκιμάσει την εμφύσηση αέρα στις νεκροτομές και ο θρύλος λέει ότι όταν κατά τη νεκροτομή ενός ισπανού ευγενή η εμφύσηση προκάλεσε την επαναλειτουργία της καρδιάς, οι βοηθοί του θορυβήθηκαν τόσο που τον ανέφεραν στις θρησκευτικές αρχές. Προκειμένου να αποφύγει την πυρά ο Vesalius αναγκάστηκε να φύγει εσπευσμένα για τους Αγίους Τόπους, αλλά πέθανε κατά τη διάρκεια του ταξιδιού, αποτελώντας ίσως το πρώτο θύμα του μηχανικού αερισμού στην ανθρώπινη ιστορία⁴.



Οι μαθητές του Vesalius, με κύριο εκπρόσωπο τον Harvey στην Αγγλία, συνέχισαν τα πειράματα και το 1664 ο Hooke ήταν ο πρώτος που περιέγραψε πώς αερίζοντας διατραχειακά ένα σκυλί με ένα φουσερό, αυτό επιβίωσε για περισσότερο από μια ώρα, ενώ το αίμα του παρέμενε έντονα κόκκινο. Παρόλα αυτά η υποστήριξη της αναπνοής στους ανθρώπους δεν καταγράφεται επίσημα στην ιατρική βιβλιογραφία έως τα μέσα του 18ου αιώνα. Οι φόβοι εξάπλωσης των μολυσματικών νόσων (με σχετικά νωπή τη συλλογική εμπειρία της πανούκλας) αλλά και θρησκευτικές προκαταλήψεις ήταν ανάμεσα στους κύριους λόγους που αποθάρρυναν την εφαρμογή της αναζωογόνησης με την εμφύσηση αέρα.

Το 1740 η Ακαδημία Επιστημών στο Παρίσι εξέδωσε την πρώτη οδηγία με την οποία ενθαρρυνόταν η στόμα με στόμα αναζωογόνηση των παραλίγο πνιγμένων, ενώ σχεδόν ταυτόχρονα ο Forthergill⁵, ένας από τους διάσημους γιατρούς της εποχής, περιέγραφε στην Αγγλία την τεχνική αναζωογόνησης, είτε με τη στόμα με στόμα εμφύσηση, είτε με τη βοήθεια φουσερού. Ο Forthergill έκανε και την πρώτη αναφορά στους κινδύνους που εγκυμονεί ο αερισμός με θετική πίεση, δηλαδή η προώθηση του αέρα στις κυψελίδες με εφαρμογή θετικής πίεσης στον ανώτερο αεραγωγό (μύτη, στόμα). Η περίπτωση αφορούσε την καρδιοαναπνευστική αναζωογόνηση ενός απνοϊκού και άσφυγμου ασθενή, που είχε καταρρεύσει λόγω των αναθυμιάσεων μέσα σε ένα χυτήριο. Η αναζωογόνηση με τη στόμα με στόμα αναπνοή, που έγινε από έναν παρευρισκόμενο χειρουργό, ήταν επιτυχής και ο ασθενής μετά από λίγες μέρες επέστρεψε στη δουλειά του. Ο Forthergill, συζητώντας στον τύπο της εποχής το περιστατικό και την ταχεία ανάρρωση του ασθενή, υπέθεσε τότε η στόμα με στόμα αναζωογόνηση υπερείχε της εμφύσησης αέρα με φουσερό, μέθοδο αναζωογόνησης που είχε αρχίσει να εφαρμόζεται. Ο λόγος της υπεροχής ήταν *“...ότι οι πνεύμονες ενός ανθρώπου μπορεί να αντέξουν χωρίς βλάβη τόση πίεση, όση μπορεί να ασκήσει ένας άλλος άνθρωπος. Αυτή η πίεση δεν μπορεί να καθοριστεί εύκολα με το φουσερό”*. Έτσι ο Forthergill έγινε ο πρώτος που πιθανολόγησε στην ιατρική βιβλιογραφία τη βλάβη του πνευμονικού παρεγχύματος από την εφαρμογή θετικής πίεσης.

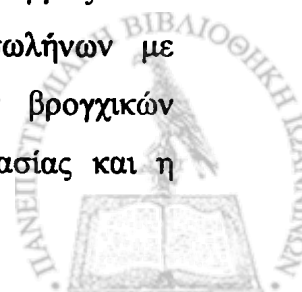
Το 1760 ο Buchan πρώτος που επισήμανε την αξία της τραχειοτομίας⁶ και το 1767 μια ομάδα ολλανδών εμπόρων ίδρυσε στο Amsterdam την πρώτη εταιρεία με σκοπό τη διάσωση των παραλίγο πνιγμένων (Maatschappy tot Redding von Dreykhingen) με κύριο στόχο την εφαρμογή και την ανάπτυξη των τεχνικών της αναζωογόνησης. Ανάλογες εταιρείες ιδρύθηκαν στη Βενετία(1768), το Παρίσι(1771), το Λονδίνο(1774) και τη Φιλαδέλφεια(1780)⁷. Οι επόμενες δεκαετίες συνοδεύτηκαν



από την εισαγωγή διαφόρων συσκευών αλλά και τεχνικών αναζωογόνησης και στις αρχές του 19ου αιώνα η ενδοτραχειακή εμφύσηση αέρα ή οξυγόνου με τη χρήση μιας σειράς συσκευών (φυσερών κατά κύριο λόγο) κατάφερε να μπει στην κλινική πράξη. Η δημοσίευση το 1827 και 1828 μιας σειράς πειραμάτων από τον Lero⁸, που παρατήρησε μεγάλη συχνότητα θανατηφόρου πνευμοθώρακα σε ζώα μετά από εργώδη αερισμό, έβαλε τις πρώτες αμφιβολίες για την ασφάλεια της μεθόδου. Τόσο η γαλλική όσο και η βρετανική ιατρική εταιρεία βασιζόμενες στα πειράματα αυτά εγκατέλειψαν τόσο την πρακτική του αερισμού με θετική πίεση, θεωρώντας τον επικίνδυνο, αν και αργότερα καταδείχθηκε ότι οι πιέσεις στα πειράματα αυτά υπερέβαιναν κατά πολύ τις πιέσεις που αναπτύσσονταν στην κλινική πράξη. Ο αερισμός με θετική πίεση εγκαταλείφθηκε λόγω της υποτιθέμενης επικινδυνότητάς του και η έμφαση στο υπόλοιπο του 19ου αιώνα δόθηκε στην ανάπτυξη του αερισμού αρνητικής πίεσης.

Η επανεισαγωγή του αερισμού θετικής πίεσης στην κλινική πράξη έγινε σε δύο στάδια. Το πρώτο αφορούσε την εισαγωγή του στη χειρουργική του θώρακα και συνέβη στις αρχές του 20ου αιώνα και το δεύτερο που αφορούσε τους μη χειρουργικούς ασθενείς στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Η χειρουργική θώρακα είχε μείνει πρακτικά στάσιμη επί αιώνες και το τέλος του 19ου αιώνα η χειρουργική δραστηριότητα περιοριζόταν στην παροχέτευση πνευμονικών αποστημάτων και βρογχεκτατικών ή φυματιωδών κοιλοτήτων. Αν και πνευμονεκτομή είχε επιχειρηθεί με επιτυχία στα ζώα από το 1880⁹, παρόμοιες επεμβάσεις σε ανθρώπους γίνονταν σπάνια και συνοδεύονταν από εξαιρετικά υψηλή θνητότητα¹⁰. Το 1896 οι Quenu και Longuet¹¹ συνειδητοποίησαν ότι για να εξασφαλισθεί η επιτυχία στις θωρακικές επεμβάσεις "...έπρεπε να υπάρχει διαφορά πίεσης μεταξύ του ενδοκυψελιδικού αέρα και του περιβάλλοντα αέρα". Ο χειρουργός έπρεπε να επιλέξει μεταξύ "...της μείωσης της εξωθωρακικής πίεσης, με σταθερή την ενδοπνευμονική, με συνέπεια να χειρουργεί σε κενό, είτε να αυξήσει την ενδοβρογχική πίεση". Τα επόμενα 15 χρόνια αναπτύχθηκαν αρκετές συσκευές για την επίτευξη των δύο παραπάνω προσεγγίσεων.

Η εκτεταμένη εισαγωγή της ενδοτραχειακής διασωλήνωσης μετά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο έδωσε άλλη ώθηση στην ανάπτυξη του αερισμού θετικής πίεσης, που μέχρι τότε εφαρμόζονταν με τη βοήθεια ειδικών масκών που εφαρμόζονταν αεροστεγώς στο πρόσωπο του ασθενούς. Η ανάπτυξη τραχειοσωλήνων με αεροθάλαμο, η κατανόηση της σημασίας της παροχέτευσης των βρογχικών εκκρίσεων, αλλά και της φυσιολογίας της μετεγχειρητικής ατελεκτασίας και η



εισαγωγή της τραχειοτομίας δημιούργησαν τις κατάλληλες προϋποθέσεις ανάπτυξης της μηχανικής αναπνοής.

Μια σειρά από εκτεταμένες επιδημίες πολιομυελίτιδας που συνέβησαν στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ στις δεκαετίες του 1930 και 1940 πυροδότησαν το δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης. Η παράλυση των αναπνευστικών μυών ήταν μια σχετικά σπάνια επιπλοκή, η θνητότητα της οποίας όμως με την αντιμετώπιση της εποχής (αερισμός αρνητικής πίεσης με σιδερένιο πνεύμονα και αναπνευστήρα cuirass) υπερέβαινε το 85%. Το καλοκαίρι του 1952 μια επιδημία πολιομυελίτιδας χτύπησε την Κοπεγχάγη. Από τους 31 πρώτους ασθενείς που εισήχθησαν με αναπνευστική παράλυση, οι 27 πέθαναν τις πρώτες 3 ημέρες. Η 32η ασθενής ήταν ένα 12χρονο κορίτσι. Όταν η κατάστασή της επιδεινώθηκε, ο Ibsen που ήταν ο υπεύθυνος αναισθησιολόγος του νοσοκομείου, αναγνωρίζοντας ότι ο αερισμός με αρνητική πίεση ήταν ανεπαρκής για τη διατήρηση μιας ικανοποιητικής ανταλλαγής αερίων προχώρησε σε τραχειοτομία, ώστε να είναι εφικτή η εφαρμογή μηχανικού αερισμού με θετική πίεση. Η ανταλλαγή των αερίων βελτιώθηκε εντυπωσιακά και αποφασίστηκε η εφαρμογή της μεθόδου σε όλες τις παρόμοιες περιπτώσεις. Το μόνο πρόβλημα ήταν η έλλειψη κατάλληλου εξοπλισμού, μια και ο αερισμός με θετική πίεση μπορούσε να δοθεί μόνο με σάκο (ambu). Στο υπόλοιπο της επιδημίας εκατοντάδες φοιτητές και τεχνικοί αέριζαν με το χέρι τα θύματα της επιδημίας με εντυπωσιακά κλινικά αποτελέσματα ^{12,13}.

Η εμπειρία της Κοπεγχάγης άλλαξε άρδην τον τρόπο αντιμετώπισης των ασθενών με αναπνευστική ανεπάρκεια στην Ευρώπη, αλλά και παγκόσμια. Πρώτον επιβεβαίωσε την κλινική αξία του αερισμού με θετική πίεση και κατέδειξε την ανάγκη δημιουργίας πρακτικών αναπνευστήρων θετικής πίεσης. Δεύτερον, περιορίζοντας και εντοπίζοντας την θεραπεία των οξέως και βαρέως πασχόντων ασθενών σε συγκεκριμένα τμήματα μέσα στο νοσοκομείο, αποτέλεσε τον προάγγελο της ανάπτυξης των μονάδων εντατικής θεραπείας. Και τρίτον έδειξε την ανάγκη μεταφοράς των πασχόντων, μετά τη σταθεροποίησή τους σε τοπικό επίπεδο, σε ειδικά κέντρα παροχής εξειδικευμένης φροντίδας. Ο Ibsen οργάνωσε ειδικές κινητές ομάδες, που μπορούσαν να διασωληνώσουν και να τραχειοτομήσουν τους ασθενείς αυτούς και να τους μεταφέρουν εφόσον το επέτρεπε η γενική τους κατάσταση, δημιουργώντας έτσι ένα πρώιμο, αλλά και εξαιρετικά επιτυχημένο σύστημα επείγουσας ιατρικής.



Οι Δανοί δεν ήταν βέβαια πλήρως ενημερωμένοι για τις εξελίξεις στην άλλη πλευρά του Ατλαντικού. Βαλβίδες που επέτρεπαν τον αερισμό με θετική πίεση είχαν αναπτυχθεί από την Αμερικανική Αεροπορία κατά το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο στην προσπάθεια αύξησης της αντοχής των πιλότων σε μεγάλα ύψη. Οι βαλβίδες αυτές επέτρεπαν τη μετατροπή της συνεχούς θετικής πίεσης σε διαλείπουσα (μόνο κατά την εισπνοή), επιτρέποντας την παθητική εκπνοή¹⁴. Η εισαγωγή των βαλβίδων αυτών σε αναπνευστήρα έγινε πρώτα από τη Bennett, η οποία το 1948 έβγαλε τον πρώτο αναπνευστήρα θετικής πίεσης. Ο αερισμός με θετική πίεση χρησιμοποιήθηκε σποραδικά στη δεκαετία του 50, για την αντιμετώπιση του οξέος πνευμονικού οιδήματος, των βαριών ασθματικών κρίσεων και της μετεγχειρητικής αναπνευστικής ανεπάρκειας. Η αναγνώριση της σημασίας της μηχανικής υποστήριξης στην αντιμετώπιση των παροξύνσεων, αλλά και των τελικών σταδίων της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, άρχισε να συνειδητοποιείται από τα μέσα της δεκαετίας του 50 και ο Munck ήταν ο πρώτος που κατέδειξε τη σημασία της μηχανικής υποστήριξης στη βελτίωση της πρόγνωσης των χρόνιων αποφρακτικών στο βαθμό που είχαν βέβαια κάποιες αναπνευστικές εφεδρείες και το 1961 ανακοίνωσε μια πρώτη σειρά 42 χρόνιων αποφρακτικών ασθενών με οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, 31 εκ των οποίων ανταποκρίθηκαν θετικά¹⁵. Η ομάδα του ήταν η πρώτη που ξεκίνησε τη σύγχρονη αντιμετώπιση της οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας στους ασθενείς αυτούς, παρακολουθώντας τα αέρια αίματος και εφαρμόζοντας τη μηχανική υποστήριξη της αναπνοής με θετική πίεση, όταν τα συντηρητικά μέτρα (οξυγόνο, αντιβιοτικά, βρογχοδιασταλτικά, αναλγητικά του αναπνευστικού κέντρου) αποτύγχαναν.

Έκτοτε η ανάπτυξη της μηχανικής αναπνοής και παράλληλα της εντατικής θεραπείας υπήρξε ραγδαία. Σήμερα δεκάδες νέοι αναπνευστήρες προτείνονται κάθε χρόνο στους κλινικούς γιατρούς και νέα (ή λιγότερο νέα) μοντέλα μηχανικής υποστήριξης παρουσιάζονται με συχνότητα τέτοια που δυσκολεύει την επαρκή κλινική τους αξιολόγηση. Παρόλα αυτά είναι εμφανής η έλλειψη μεγάλων προτυποποιημένων κλινικών ερευνών, που να απαντούν με απόλυτο τρόπο για τους τρόπους της μηχανικής υποστήριξης σε κάθε νοσολογική κατάσταση. Η μεθοδολογική δυσκολία που παρουσιάζει ο σχεδιασμός, αλλά και η εκτέλεση αυτών των ερευνών εξηγεί σε ένα βαθμό την έλλειψή τους. Είναι χαρακτηριστικό ότι μόλις την τελευταία τριετία εμφανίστηκαν στη βιβλιογραφία προτυποποιημένες κλινικές μελέτες για τη μηχανική υποστήριξη της οξείας πνευμονικής βλάβης (acute lung

injury, ALI) και του συνδρόμου της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (acute respiratory distress syndrome, ARDS).

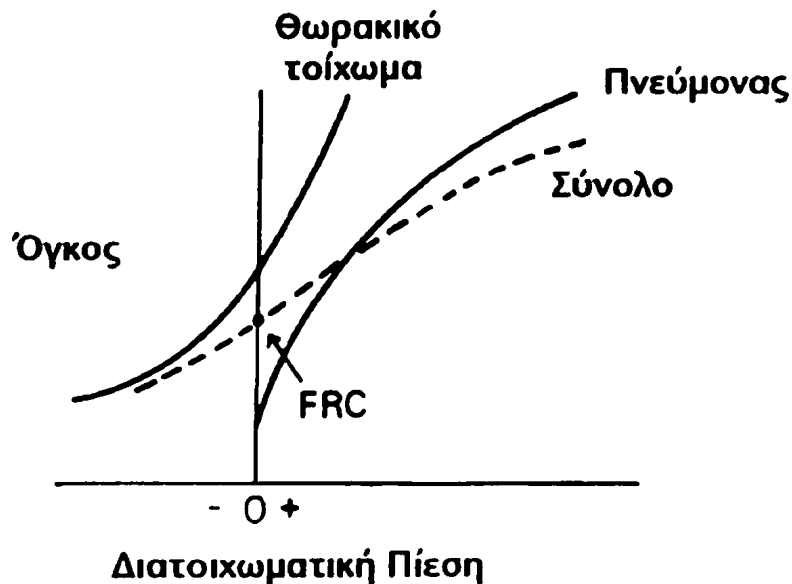
Η βλάβη που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός στα ζωικά μοντέλα περιγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία με τον όρο ventilator induced lung injury (VILI) και μεταφράζεται στο παρόν κείμενο σαν προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη. Ο όρος οξεία πνευμονική βλάβη (ALI) περιγράφει την οξεία επιδείνωση της αναπνευστικής λειτουργίας που αναπτύσσεται σε έδαφος φυσιολογικού πνεύμονα. Η βλάβη που μπορεί να προκαλέσει ο μηχανικός αερισμός στα ζώα έχει κοινά μορφολογικά, φυσιολογικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά με την οξεία πνευμονική βλάβη που προκαλείται πειραματικά από άλλες αιτίες, όπως η έκπλυση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, η έγχυση ολεϊκού οξέος ή ενδοτοξίνης.

Σε κλινικό επίπεδο η οξεία πνευμονική βλάβη, αλλά και το ARDS που αποτελεί την ακραία μορφή της, περιγράφηκαν και ορίστηκαν στην αμερικανο-ευρωπαϊκή διάσκεψη για το ARDS¹⁶ και οι ορισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στο παρόν κείμενο. Ο μηχανικός αερισμός έχει συνδεθεί με πνευμονική βλάβη σε κλινικό επίπεδο, αλλά σε αντίθεση με τα ζώα η ευθεία αιτιολογική σχέση βλάβης και μηχανικού αερισμού δεν έχει τεκμηριωθεί με απόλυτο τρόπο στους ανθρώπους. Κατά συνέπεια η βλάβη αυτή περιγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία με τον όρο ventilator associated lung injury (VALI) και μεταφράζεται σε συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη.

Βασικοί όροι και φυσιολογικές αρχές της μηχανικής αναπνοής

Ο πνευμονικός ιστός διακρίνεται για την ελαστικότητα του. Η τάση σύμπτυξης του πνεύμονα και η αντίθετη τάση έκπτυξης του θωρακικού τοιχώματος εξισορροπούν στη θέση της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (functional residual capacity, FRC), που αποτελεί και τη θέση ισορροπίας του αναπνευστικού συστήματος. Στο σχήμα 1.1 απεικονίζεται η μεταβολή του όγκου σε σχέση με τη διατοιχωματική πίεση (transmural pressure) για τον πνεύμονα, το θωρακικό τοίχωμα και το αναπνευστικό σύστημα στο σύνολό του. Η μεταβολή του όγκου σε σχέση με την πίεση ορίζεται σαν ενδοτικότητα (compliance, $\Delta V/\Delta P$). Ακόμη και το φυσιολογικό αναπνευστικό σύστημα η ενδοτικότητα δεν είναι σταθερή στο σύνολο του φάσματος των όγκων, αλλά μόνο σε περιορισμένα υποτμήματά του.



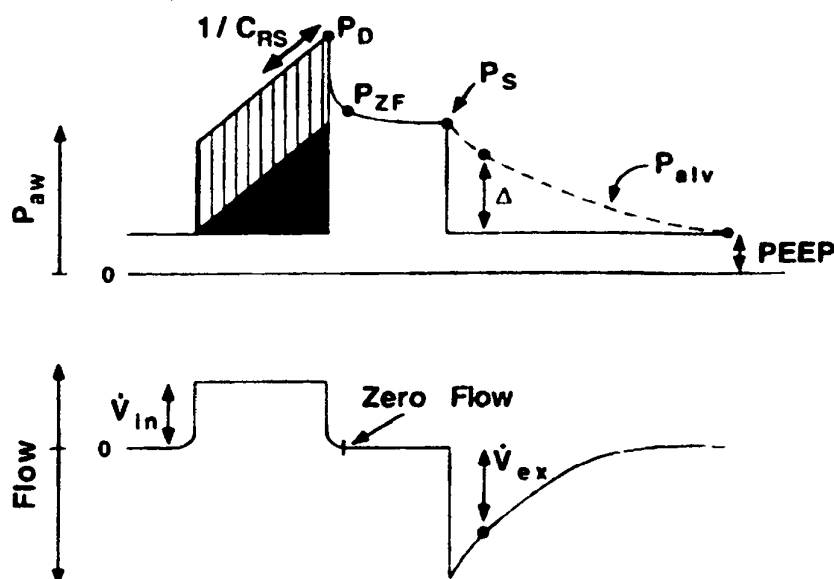


Σχήμα 1.1 Μεταβολή του όγκου σε σχέση με τη διατοιχωματική πίεση (*transmural pressure*) για τον πνεύμονα, το θωρακικό τοίχωμα και το αναπνευστικό σύστημα στο σύνολό του.

Κατά τον ελεγχόμενο αερισμό με θετική πίεση η χορήγηση του αέρα μπορεί να γίνεται είτε με τη χορήγηση προκαθορισμένου όγκου (συχνότερα), είτε με τη χορήγηση προκαθορισμένης πίεσης. Στο σχήμα 1.2 φαίνεται η μεταβολή της πίεσης των αεραγωγών και της ροής κατά τη διάρκεια της χορήγησης μιας αναπνοής με προκαθορισμένο όγκο (*volume control ventilation*) και σταθερή εισπνευστική ροή. Η είσοδος του αέρα στους αεραγωγούς συνοδεύεται από μια μεγάλη αύξηση της πίεσης, που είναι και η υψηλότερη κατά τη διάρκεια του αναπνευστικού κύκλου (P_D). Η πίεση αυτή εξαντλείται στο μεγαλύτερο μέρος της στους αεραγωγούς. Η ολοκλήρωση της χορήγησης του όγκου και ο τερματισμός της εισπνευστικής ροής (*zero flow*) συνοδεύεται από την τελοεισπνευστική πίεση παύσης (P_s). Η πίεση αυτή είναι η πίεση που ασκείται στους μικρότερους αεραγωγούς και στις κυψελίδες και έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, μια και είναι η πίεση που καθορίζει τη μηχανική καταπόνηση που δέχεται ο πνευμονικός ιστός κατά τη διάτασή του.

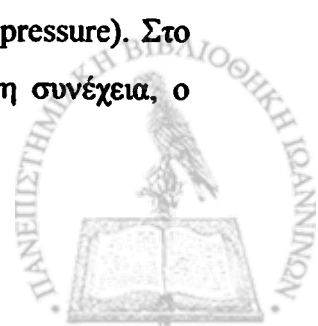
Η εκπνοή είναι ένα παθητικό φαινόμενο, που βασίζεται στις ελαστικές ιδιότητες του διατεταμένου πνευμονικού ιστού. Η πίεση στους αεραγωγούς κατά τη διάρκεια της εκπνοής πέφτει και σταθεροποιείται στην τελοεκπνευστική της τιμή. Η τιμή αυτή φυσιολογικά είναι μηδέν, μια και η ροή έχει μηδενισθεί και η πίεση στους αεραγωγούς και τις κυψελίδες ισούται με την πίεση στο στόμα. Κατά τη διάρκεια της

μηχανικής αναπνοή υπάρχει δυνατότητα εφαρμογή θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (positive end expiratory pressure-PEEP), έτσι ώστε η πίεση στο τέλος της εκπνοής να μη μηδενίζεται, αλλά να παραμένει σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο με ανάλογη επίπτωση στον τελοεκπνευστικό όγκο.

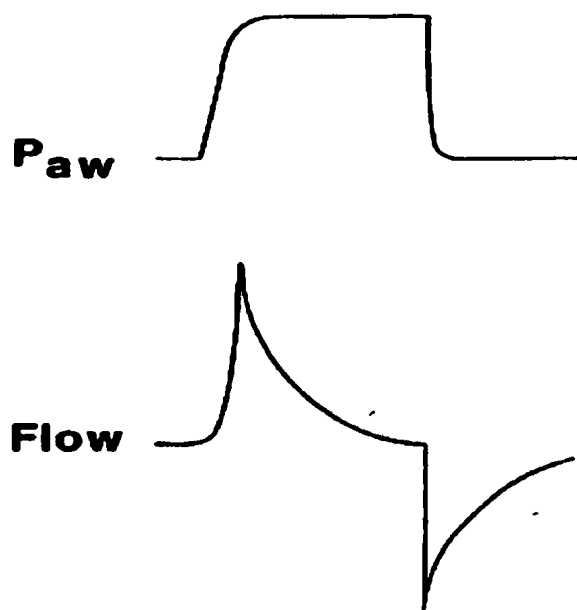


Σχήμα 1.2. Μεταβολή της πίεσης των αεραγωγών (P_{aw}) και της ροής ($Flow$) κατά τη διάρκεια της χορήγησης μιας αναπνοής με προκαθορισμένο όγκο (V_T) και σταθερή εισπνευστική ροή (V_{in}). Η έναρξη της εισπνευστικής ροής και η χορήγηση του αναπνεόμενου όγκου προκαλούν αύξηση της πίεσης στη μέγιστη τιμή της (P_D). Ο μηδενισμός της χορηγούμενης ροής (zero flow) προκαλεί πτώση της πίεσης (P_{ZF}), η οποία μετά την ανακατανομή του αέρα κατά τη διάρκεια της εισπνευστικής παύλας ισούται με τη στατική (plateau) πίεση παύσης P_s . Στη συνέχεια αρχίζει η εκπνευστική ροή (V_{ex}) που σταματάει στο επίπεδο της PEEP. Το πηλίκο $V_T / P_s - PEEP$ υπολογίζει την ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος (C_{RS}), ενώ το πηλίκο $P_D - P_s / V_{in}$ τη μέγιστη εισπνευστική αντίσταση. Ο υπολογισμός των εκπνευστικών αντιστάσεων προϋποθέτει μέτρηση ή υπολογισμό της κυψελιδικής πίεσης (P_{alv}).

Κατά τη χορήγηση αερισμού με προκαθορισμένη πίεση (pressure control ventilation) η μέγιστη πίεση ταυτίζεται με την πίεση παύσης (plateau pressure). Στο σύνολο σχεδόν των πειραματικών εργασιών που παρουσιάζονται στη συνέχεια, ο



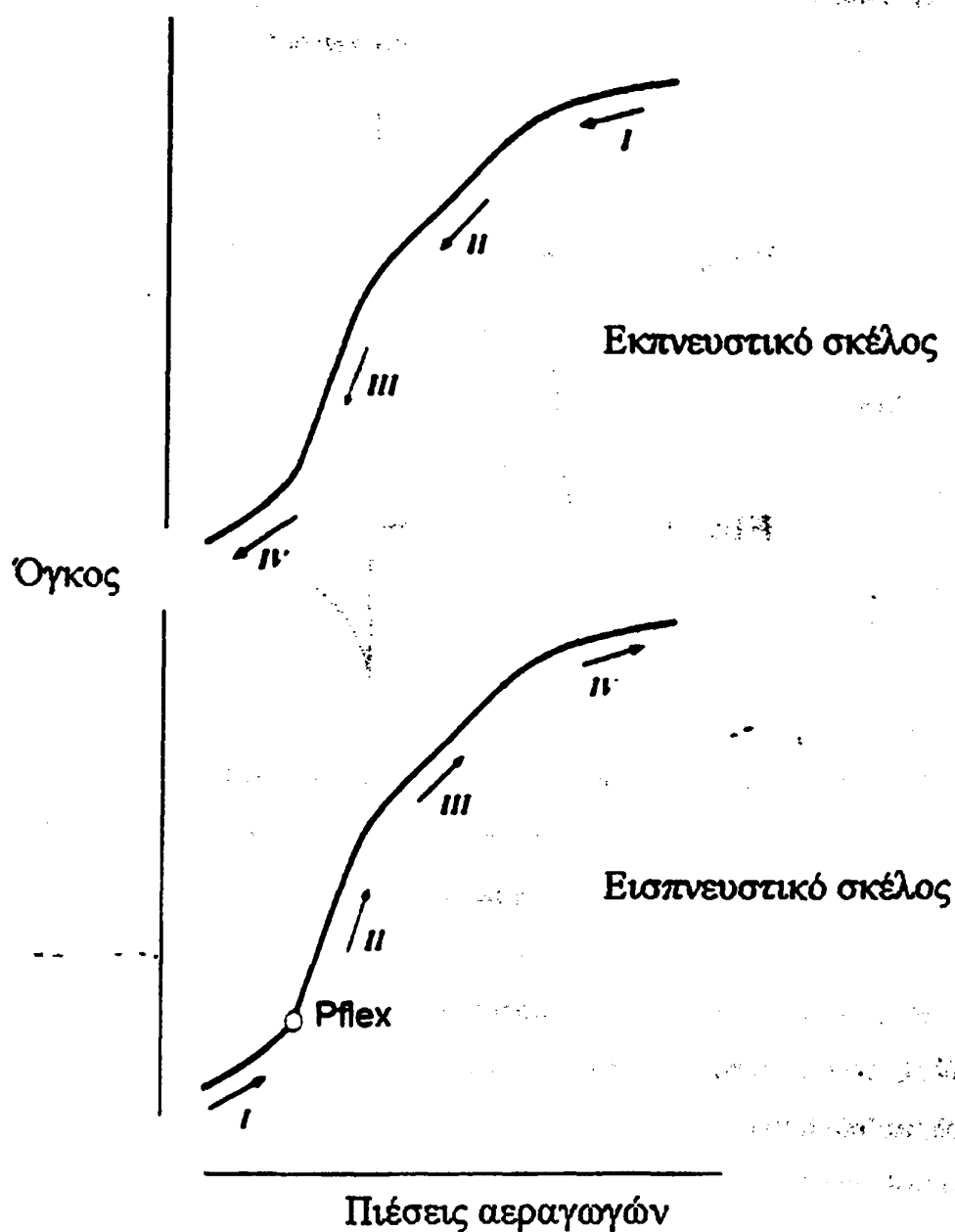
αερισμός γίνεται με προκαθορισμένη πίεση, κατά συνέπεια οι αναφερόμενες μέγιστες πιέσεις ταυτίζονται με τις πιέσεις παύσης.



Σχήμα 1.3. Μεταβολή της πίεσης των αεραγωγών (P_{aw}) και της ροής (flow) κατά τη διάρκεια της χορήγησης μιας αναπνοής με προκαθορισμένη πίεση και σταθερή συχνότητα. Η μέγιστη πίεση και η πίεση παύσης συμπίπτουν.

Η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων διευκολύνεται από την καταγραφή της καμπύλης πίεσης όγκου. Η καμπύλη έχει ένα εισπνευστικό και ένα εκπνευστικό σκέλος, τα οποία μπορεί να αποτελούνται από διαφορετικής κλίσης υποτμήματα. Στο σχήμα 1.4 απεικονίζεται ένα θεωρητικό εισπνευστικό και εκπνευστικό σκέλος της καμπύλης πίεσης όγκου. Κάθε σκέλος μπορεί να έχει μέχρι 4 υποτμήματα. Η μετάβαση του μεσαίου στο κατώτερο τμήμα μπορεί να γίνει με ένα διακριτό σημείο καμπής που λέγεται κατώτερο σημείο καμπής (lower inflection point, P_{flex}), και υποσημαίνει τη μαζική διάνοιξη των κλειστών κυψελίδων. Το μεσαίο τμήμα μεταπίπτει συνήθως στο ανώτερο τμήμα της καμπύλης με ένα διακριτό σημείο καμπής που λέγεται ανώτερο σημείο καμπής (upper inflection point) και υποσημαίνει την υπέρβαση των ελαστικών ιδιοτήτων του πνευμονικού ιστού.





Σχήμα 1.4. Εισπνευστικό και εκπνευστικό σκέλος της καμπύλης πίεσης όγκου. Εισπνευστικό σκέλος: I-έκπτυξη του *baby lung*, II-μαζική κυψελιδική διάνοιξη, III-ελαστική έκπτυξη του πνευμονικού ιστού, IV-υπερδιάταση των ινών κολλαγόνου. Εκπνευστικό σκέλος: I- υπερδιάταση των ινών κολλαγόνου, II-ελαστική σύμπτυξη του πνευμονικού ιστού, III- μαζική κυψελιδική σύγκλειση, IV-μαζική παγίδευση αέρα (*air trapping*). (Τροποποιημένο από Marini JJ, Evans TW. *Acute lung injury*, Springer editions, 1998).



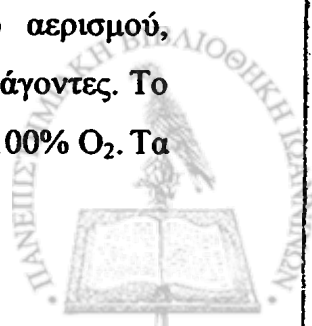
Προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη-

Στοιχεία από πειραματικές μελέτες

Η ευρεία χρήση του μηχανικού αερισμού συνδέθηκε εξ αρχής με το θέμα της ασφάλειας και των επιπλοκών που μπορεί να προκαλέσει. Η πρώτη προσπάθεια εκτεταμένης εισαγωγής του μηχανικού αερισμού στην κλινική πράξη στις αρχές του 19ου αιώνα δεν ευοδώθηκε λόγω της σύνδεσής του με αυξημένο κίνδυνο βαροτραύματος⁸, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το βαρότραυμα, που αποτέλεσε την πρώτη μορφή βλάβης που αναγνωρίστηκε, αφορά την παρουσία αέρα έξω από τις κυψελίδες και μπορεί να έχει πολλαπλές κλινικές εκδηλώσεις. Ίσως επειδή ορισμένες μορφές του, όπως για παράδειγμα ο πνευμοθώρακας υπό τάση, είναι κλινικά εντυπωσιακές και ιδιαίτερα επικίνδυνες, αλλά και ίσως η ευκολία με την οποία θεωρήθηκε ότι μπορεί να εξηγηθεί το φαινόμενο (υπέρβαση των ελαστικών ιδιοτήτων του πνευμονικού ιστού από την ολική ή την τοπική υπερδιάταση), επικέντρωσε αρχικά το κλινικό ενδιαφέρον σε αυτήν τη μορφή της βλάβης. Αρκετές μελέτες έδειξαν όμως στη συνέχεια, ότι ο μηχανικός αερισμός μπορεί να βλάψει τον πνευμονικό ιστό και με λιγότερο "ηχηρούς" τρόπους.

Ο Greenfield¹⁷ μελέτησε πρώτος το 1964 την επίδραση της μηχανικής αναπνοής στο υγιές πνευμονικό παρέγχυμα. Σκυλιά με άθικτο θώρακα αερίσθηκαν για 2 ώρες, με μέγιστη εισπνευστική πίεση 26-32 cmH₂O. Τα ζώα ανάρρωσαν για 24 ώρες και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θωρακοτομή. Η μακροσκοπική εξέταση των πνευμόνων τους έδειξε ατελεκτατικές ζώνες, ενώ το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είχε αυξημένη επιφανειακή τάση.

Τέσσερα χρόνια αργότερα και ενώ είχε προηγηθεί η εμπειρία της ευρείας χρήσης του μηχανικού αερισμού στα θύματα της επιδημίας της πολιομυελίτιδας, ο Sladen¹⁸ ανέφερε ότι οι "...χρόνια μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς υπέφεραν από επιβαρημένη πνευμονική λειτουργία, αυξημένη τριχοειδοκυψελιδική διαφορά και μειωμένη πνευμονική ενδοτικότητα". Η έννοια της συνδεόμενης με τον αναπνευστήρα πνευμονικής βλάβης άρχισε να αναγνωρίζεται και αποδόθηκε τότε με τον όρο "πνεύμονας στον αναπνευστήρα" (respirator lung). Αρκετοί πάντως αμφισβήτησαν τότε την άμεση βλαπτική επίδραση του μηχανικού αερισμού, αποδίδοντας την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας σε άλλους παράγοντες. Το 1971 ο Nash¹⁹ αέρισε κατσίκες με μέγιστη πίεση 13 cmH₂O με αέρα και 100% O₂. Τα



ζώα που αερίσθηκαν με 100% O₂ δεν επιβίωσαν για περισσότερες από τέσσερις ημέρες και στη νεκροτομή τα πνευμόνια τους είχαν μεγάλης έκτασης πνευμονικό οίδημα και μεμβράνες υαλίνης. Αντίθετα τα ζώα που αερίσθηκαν με αέρα, παρέμειναν σε καλή κατάσταση και τα πνευμόνια τους δεν διέφεραν από τα ζώα μάρτυρες. Ο Nash κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο παρατεταμένος μηχανικός αερισμός δεν προκαλεί πνευμονική βλάβη, αν και σωστά επισήμανε ότι χρησιμοποίησε χαμηλές μέγιστες εισπνευστικές πιέσεις, ενώ απέδωσε τις βλάβες που είχαν αναφερθεί από προηγούμενους ερευνητές στην τοξικότητα από οξυγόνο.

Οι Webb και Tierney²⁰ ήταν οι πρώτοι που έδειξαν με αδιαμφισβήτητο τρόπο, ότι ο μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλέσει πνευμονικό οίδημα σε υγιές πνευμονικό παρέγχυμα. Αέρισαν ποντίκια με μέγιστες εισπνευστικές πιέσεις 15, 30, και 45 cmH₂O. Καμία ανωμαλία δεν διαπιστώθηκε στα ζώα που αερίσθηκαν για μία ώρα με 15 cmH₂O. Ήπιο διάμεσο πνευμονικό οίδημα βρέθηκε στα ζώα που αερίσθηκαν για μια ώρα με μέγιστη πίεση 30 cmH₂O και εκσεσημασμένο κυψελιδικό πνευμονικό οίδημα βρέθηκε στα ζώα που αερίσθηκαν με 45 cmH₂O για 13-35 λεπτά. Μετέπειτα έρευνες²¹ έδειξαν ότι για να κάνουν τα ποντίκια πνευμονικό οίδημα, αρκούν λίγα λεπτά (2-5 min) αερισμού με μέγιστες εισπνευστικές πιέσεις 45 cmH₂O.

Η αναπαραγωγή παρόμοιων ευρημάτων σε μεγαλύτερα ζώα απαιτούσε πολύ μεγαλύτερη χρονική διάρκεια μηχανικού αερισμού²², για λόγους που δεν είναι τελείως ξεκαθαρισμένοι. Ο John²³ αέρισε κουνέλια για 6 ώρες με μέγιστη πίεση 20 cmH₂O και διαπίστωσε ότι ορισμένα, αλλά όχι όλα τα ζώα, είχαν διάμεσο και κυψελιδικό οίδημα στη μικροσκοπική εξέταση. Ο Kolobow²⁴ διαπίστωσε ότι απαιτούνταν αρκετές ώρες για να προκληθεί πνευμονική βλάβη στα πρόβατα, ακόμη και με τη χρησιμοποίηση υψηλών πιέσεων. Όλα τα πρόβατα είχαν μειωμένη πνευμονική ενδοτικότητα και επηρεασμένη οξυγόνωση μετά από δύο ημέρες μηχανικού αερισμού με μέγιστη πίεση 50 cmH₂O, ενώ μερικά πέθαναν πριν συμπληρωθούν οι 48 ώρες. Η βλάβη στα μεγάλα ζώα μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι το επίπεδο της εφαρμοζόμενης πίεσης, το μέγεθος του παρεχόμενου αναπνεόμενου όγκου, ο όγκος του πνεύμονα που αερίζεται, η θετική τελοεκπνευστική πίεση, η διάρκεια του μηχανικού αερισμού, η ηλικία και το αν ο θώρακας είναι ανοικτός ή κλειστός. Η φύση και οι μηχανισμοί του πνευμονικού οιδήματος που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός εξετάζονται στη συνέχεια.



Πνευμονικό οίδημα προκαλούμενο από τον αναπνευστήρα

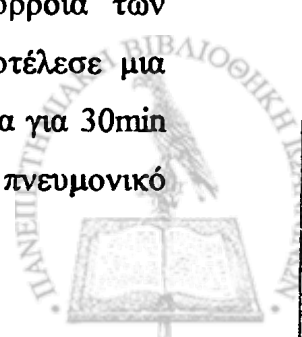
Η φύση του πνευμονικού οιδήματος (αυξημένης διήθησης-υδροστατικό ή αυξημένης διαπερατότητας) που προκαλεί η εφαρμογή του μηχανικού αερισμού με θετική πίεση δεν αποτελεί ένα ερώτημα μόνο με θεωρητική, αλλά και κλινική σημασία. Ένα μεγάλο μέρος των μηχανικά αεριζόμενων ασθενών έχει οξεία ή χρόνια πνευμονική βλάβη, οπότε η εφαρμογή του μηχανικού αερισμού θα μπορούσε να έχει επίπτωση στην πρόκληση νέας βλάβης, στην επιδείνωση της υπάρχουσας ή στην αναστολή της επούλωσής της. Επιπλέον ο καθορισμός της φύσης του οιδήματος θα μπορούσε να κατευθύνει και τη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Στο πνευμονικό οίδημα αυξημένης διήθησης η διαταραχή της ισορροπίας των υδροστατικών και κολλοειδωσμοτικών πιέσεων εντός και εκτός του αγγείου, προκαλεί διήθηση υγρού στο διάμεσο και στη συνέχεια στον κυψελιδικό χώρο, με τη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα. Στο πνευμονικό οίδημα αυξημένης διαπερατότητας υπάρχει βλάβη τόσο στο τριχοειδικό ενδοθήλιο, όσο και στο κυψελιδικό επιθήλιο, με αποτέλεσμα την "εξίδρωση" υγρού από τα αγγεία στις κυψελίδες.

Πνευμονικό οίδημα αυξημένης διήθησης

Οι Webb και Tierney²⁰, οι πρώτοι που περιέγραψαν το προκαλούμενο από τον αναπνευστήρα πνευμονικό οίδημα, το απέδωσαν σε υδροστατικές αιτίες. Θεώρησαν ότι η αύξηση της επιφανειακής τάσης στις μηχανικά αεριζόμενες κυψελίδες προκαλεί μείωση της αρνητικής πίεσης που περιβάλλει τα πνευμονικά τριχοειδή και κατά συνέπεια αύξηση της διατοιχωματικής τους πίεσης και της διήθησης υγρού. Ήδη από το 1966 ο Farridy²⁵ έδειξε ότι οι καμπύλες πίεσης όγκου αφαιρεμένων πνευμόνων σκύλων, που αερίζονταν μηχανικά, ήταν επηρεασμένες από το μηχανικό αερισμό, ενώ το πνευμονικό έκτυσμα είχε αυξημένη επιφανειακή τάση. Τα ευρήματα αυτά συσχετιζόταν θετικά με τον αναπνεύμενο όγκο και τη διάρκεια του αερισμού. Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα του McClenahan για τους πνεύμονες ποντικών²⁶. Η αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια, να συμμετέχει και στο οίδημα αυξημένης διαπερατότητας.

Η ανάπτυξη υδροστατικού πνευμονικού οιδήματος, σαν απόρροια των αιμοδυναμικών διαταραχών που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός, αποτέλεσε μια ακόμη ερευνητική υπόθεση. Ο Parker αέρισε σκυλιά με ανοιχτό θώρακα για 30min με μέγιστη πίεση 64 cmH₂O, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο ένα ήπιο πνευμονικό



οιδήμα²². Υπολόγισε την τριχοειδική πίεση διήθησης από τη μέση πίεση της πνευμονικής αρτηρίας και την πίεση του αριστερού κόλπου και την βρήκε αυξημένη κατά 12,5 cmH₂O. Η αύξηση αυτή χωρίς να είναι ιδιαίτερα μεγάλη, θα μπορούσε κατά τον Parker να ήταν ακόμη μικρότερη αν τα ζώα είχαν κλειστό θώρακα, οπότε η αυξημένη ενδοθωρακική πίεση θα προκαλούσε μείωση της καρδιακής παροχής. Από την άλλη η συμμετοχή του αιμοδυναμικού παράγοντα, έστω και επικουρικά, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί στις εξαρτώμενες περιοχές, που δέχονται τον κύριο όγκο της αιμάτωσης. Η επίδραση του ανοιχτού ή κλειστού θώρακα στην αιμοδυναμική εικόνα (και κατά συνέπεια στη δημιουργία υδροστατικού πνευμονικού οιδήματος) είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Η αυξημένη διήθηση υγρού μπορεί να εντοπίζεται τόσο στα "κυψελιδικά" αγγεία, δηλαδή αυτά που είναι σε άμεση και εκτεταμένη επαφή με το τοίχωμα των κυψελίδων, όσο και στα εξωκυψελιδικά, που βρίσκονται στις γωνίες των κυψελίδων και έχουν σχετικά μειωμένη άμεση επαφή με τις κυψελίδες. Αν και η διαφοροποίηση σε κυψελιδικά και εξωκυψελιδικά αγγεία έχει μάλλον θεωρητική σημασία, δεδομένου ότι το ίδιο αγγείο μπορεί να έχει μια κυψελιδική και μια εξωκυψελιδική μοίρα, φαίνεται ότι η διήθηση εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στη δεύτερη. Η αύξηση της μέσης κυψελιδικής πίεσης μπορεί να προκαλέσει ακόμη και διακοπή της ροής στα "κυψελιδικά" αγγεία (ζώνη-1 κατά West). Η επέκταση συνθηκών συμβατών με ζώνης-1 κατά West επιτάχυναν τη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος σε πνεύμονες σκύλου²⁷. Οι διατοιχωματικές τριχοειδικές πιέσεις πρέπει να υπερβούν τα 50 mmHg σε απομονωμένους πνεύμονες, ενώ σε περίπτωση άθικτου θωρακικού τοιχώματος απαιτούνται ακόμη μεγαλύτερες, ώστε να αρχίσει να εμφανίζεται το φαινόμενο της μηχανικής καταπόνησης των πνευμονικών τριχοειδών (capillary stress failure), που μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της διήθησης και εξετάζεται με λεπτομέρεια στο κεφάλαιο 'Μηχανικό τραύμα σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη'.

Η αυξημένη διήθηση από τα εξωκυψελιδικά αγγεία έχει αποδοθεί στο φαινόμενο της αλληλεξάρτησης (interdependence). Φυσιολογικά με την αλληλεξάρτηση εξασφαλίζεται η ομοιογενής έκπτυξη του πνευμονικού παρεγχύματος, μια που το εσωτερικό τοίχωμα μια κυψελίδας είναι ταυτόχρονα και το εξωτερικό τοίχωμα της γειτονικής της. Όταν οι πνεύμονες διατείνονται, η δύναμη που ασκείται στο πνευμονικό παρέγχυμα έχει κατεύθυνση προς τα έξω και η πίεση στο διάμεσο χώρο που περιβάλλει τα εξωκυψελιδικά αγγεία μειώνεται. Με δεδομένο ότι η πίεση μέσα στα αγγεία παραμένει σταθερή, η διατοιχωματική πίεση των



εξωκυψελιδικών αγγείων αυξάνεται στην περίπτωση αυτή²⁸. Η μεταβολή αυτή έχει υπολογιστεί ότι υπερβαίνει κατά πολύ τη μεταβολή της υπεζωκοτικής πίεσης²⁹. Η αλληλεξάρτηση μεταξύ των αγγείων και του περιβάλλοντος πνευμονικού παρεγχύματος είναι σημαντική για τη δημιουργία υδροστατικού πνευμονικού οιδήματος, όπως έχει δείχθει τόσο σε απομονωμένους πνεύμονες³⁰, όσο και σε ζώα με ανοιχτό θώρακα³¹.

Η αυξημένη διήδρωση από τα εξωκυψελιδικά αγγεία είναι πιθανότατα και ο κυρίαρχος μηχανισμός που εξηγεί τη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος με την αύξηση της PEEP σε απομονωμένους αιματούμενους πνεύμονες που αερίζονται με σταθερούς αναπνεόμενους όγκους³². Η εφαρμογή σταδιακά αυξανόμενης PEEP στην περίπτωση αυτή, αν και μείωνε τη συνολική αιμάτωση διατείνοντας τους πνεύμονες και επεκτείνοντας τη ζώνη-1, αυξάνοντας τον όγκο των κυψελίδων αύξαινε παράλληλα τη διατοιχωματική πίεση στα εξωκυψελιδικά αγγεία και το συνοδό οίδημα. Η κατάσταση βέβαια είναι διαφορετική όταν ο θώρακας είναι κλειστός, μια και σε αυτήν την περίπτωση η πνευμονική έκπτυξη είναι σημαντικά μικρότερη³³.

Συμπερασματικά η συνεισφορά του υδροστατικού μηχανισμού στο οίδημα που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός δεν είναι ποσοτικά σημαντική. Η μοναδική περίπτωση που αυτό μπορεί να συμβεί, είναι όταν ο αερισμός των πνευμονικών τμημάτων είναι έντονα ανομοιογενής, οπότε η τοπική υπερέκπτυξη προκαλεί μεγάλη αύξηση των διατοιχωματικών πιέσεων και αυξημένη διήθηση.

Πνευμονικό οίδημα αυξημένης διαπερατότητας

Η αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού έχει πιστοποιηθεί σε πλήθος πειραματικών μελετών. Η αύξηση της διαπερατότητας μπορεί να αφορά τόσο το κυψελιδικό επιθήλιο, όσο και το τριχοειδικό ενδοθήλιο.

Η αύξηση της επιθηλιακής διαπερατότητας που συνοδεύει την αύξηση των πνευμονικών όγκων, είναι φυσιολογικό φαινόμενο για τις μικρού μοριακού βάρους υδρόφιλες ουσίες. Η αύξηση της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας, που προκαλεί η προσθήκη θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης, συνοδεύεται στα πρόβατα με αυξημένη κάθαρση του νεφελοποιημένου ^{99m}Tc-DTPA (διεθυλο-τριαμινο-πενταοξικό οξύ), είτε κατά το μηχανικό αερισμό³⁴, είτε κατά την αυτόματη αναπνοή³⁵. Η αύξηση της κάθαρσης ήταν πολύ μεγαλύτερη από την υπολογιζόμενη αύξηση της κυψελιδικής επιφάνειας. Ανάλογη αύξηση της επιθηλιακής



διαπερατότητας μετά από αύξηση των πνευμονικών όγκων διαπιστώθηκε και σε ανθρώπους^{36,37}. Ο Marks³⁶ διαπίστωσε ότι η αύξηση της κάθαρσης παρατηρήθηκε ανεξάρτητα με το αν η αύξηση του πνευμονικού όγκου επιτεύχθηκε μετά από εφαρμογή θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης ή από αυτόματη υπερδιάταση.

Ο Egan³⁸ ήταν ο πρώτος που μελέτησε τη διαπερατότητα του επιθηλίου, κατά τη στατική υπερδιάταση λοβών γεμισμένων με υγρό, σε πρόβατα με κλειστό θώρακα. Η διαπερατότητα σε υδρόφιλες ουσίες διαφορετικών μεγεθών εκτιμήθηκε με την αρχή του ισοδύναμου πόρου, η ακτίνα του οποίου αυξήθηκε από 1 nm όταν η πίεση έκπτυξης ήταν 20 cmH₂O, σε 5 nm στα 40 cmH₂O. Σε μερικές περιπτώσεις καταγράφηκε και ελεύθερη διάχυση της αλβουμίνης από το επιθήλιο, που υποσήμαινε μεγάλα χάσματα του επιθηλιακού φραγμού. Οι μεταβολές αυτές, που παρατηρήθηκαν και σε σκυλιά³⁹, παρέμεναν ή ακόμη και αυξάνονταν μετά τη διακοπή της πνευμονικής έκπτυξης, στοιχείο που συνηγορούσε υπέρ μη αναστρέψιμης επιθηλιακής βλάβης. Ο Egan συνειδητοποίησε όμως, ότι η έκπτυξη μεμονωμένων λοβών και όχι ολόκληρου του πνεύμονα ή του θώρακα, προκαλούσε μια δυσανάλογα μεγάλη έκπτυξη, που οφειλόταν στη συμπίεση των γειτονικών λοβών ή πνευμόνων. Η μεγάλη αυτή έκπτυξη δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί αν η ίδια πίεση έκπτυξης εφαρμοζόταν σε ολόκληρο τον πνεύμονα αντί για ένα συγκεκριμένο λοβό. Πραγματοποίησε λοιπόν πειράματα σε κουνέλια με κλειστό θώρακα, στα οποία εφάρμοσε την ίδια πίεση έκπτυξης (40 cmH₂O) τόσο σε ολόκληρο τον πνεύμονα, όσο και σε συγκεκριμένα βρογχοπνευμονικά τμήματα για 20 min⁴⁰. Η τμηματική ή λοβαία στατική έκπτυξη προκάλεσε 6-12 φορές αύξηση του όγκου σε σχέση με τον αντίστοιχο στη λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα, και διαπερατότητα του επιθηλίου σε όλες τις ουσίες που εξετάστηκαν (κυανοκοβαλαμίνη, κυτόχρωμα c, και αλβουμίνη: μέγεθος 0,6, 1,7 και 3,5 nm αντίστοιχα). Αντίθετα η αντίστοιχη έκπτυξη ολόκληρου του πνεύμονα προκάλεσε μια μεταβολή όγκου κατά 3-4 φορές σε σχέση με τον αντίστοιχο της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας, μια πολύ μικρότερη αύξηση της διαπερατότητας στις ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και ελάχιστες ή καμία μεταβολή στη διαπερατότητα στην αλβουμίνη. Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα του Kim⁴¹, ο οποίος διαπίστωσε ότι η διαπερατότητα του επιθηλίου απομονωμένων πνευμόνων βατράχου δεν επηρεαζόταν όταν η έκπτυξη του πνευμονικού ιστού ήταν στα φυσιολογικά όρια, ενώ αυξανόταν από τη μεγάλη υπερδιάταση. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι μόνο εξαιρετικά μεγάλες μεταβολές του πνευμονικού όγκου μπορούν να επηρεάσουν την



επιθηλιακή διαπερατότητα σε μεγάλα μόρια κατά τη στατική έκπτυξη του πνευμονικού παρεγχύματος.

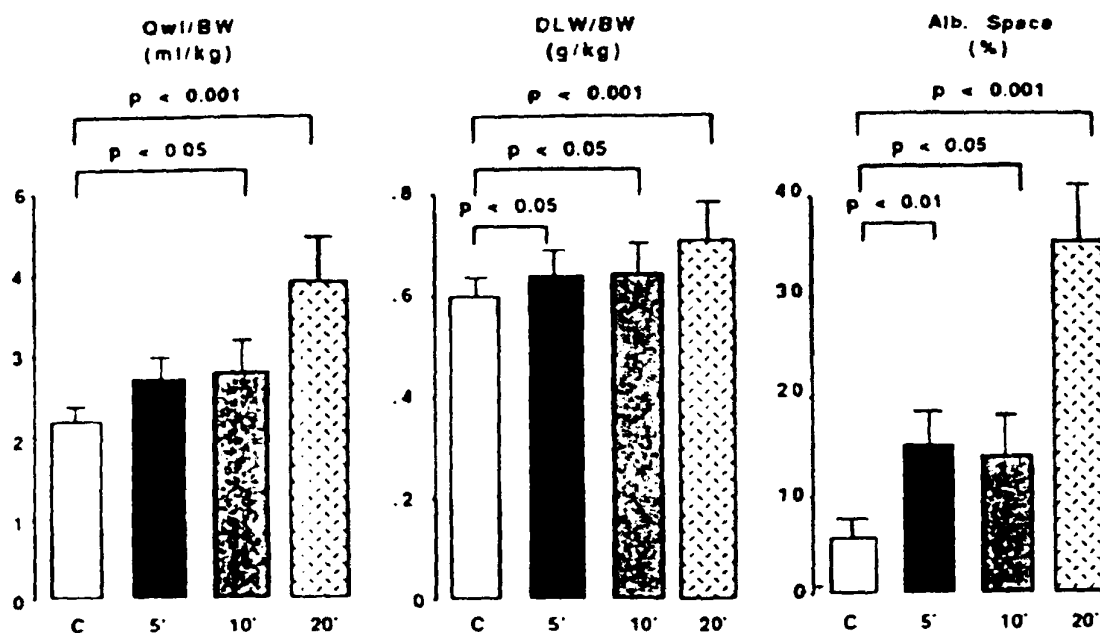
Σε αντίθεση με τη μάλλον ήπια επίδραση της στατικής μεταβολής των όγκων στην επιθηλιακή διαπερατότητα, η παρατεταμένη περιοδική πνευμονική έκπτυξη κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού προκαλεί σημαντικές διαταραχές. Η παρουσία κυψελιδικού πνευμονικού οιδήματος, μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό, χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα αυξημένη επιθηλιακή διαπερατότητα στις πρωτεΐνες και συνοδεύεται από μορφολογικές αλλοιώσεις ορατές με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο⁴², που παρουσιάζονται στη συνέχεια. Ο μηχανικός αερισμός προβάτων με μέγιστη πίεση 41 cmH₂O για 8 ώρες, χωρίς να προκαλέσει πνευμονικό οίδημα, αύξησε την επιθηλιακή διαπερατότητα στις ουσίες μικρού μοριακού βάρους (DTPA), όχι όμως και στην αλβουμίνη⁴³. Μικρές περίοδοι μηχανικού αερισμού με υψηλή πίεση στα ποντίκια δεν συνοδεύτηκαν από σημαντικές μεταβολές της διαπερατότητας⁴⁴.

Η μεταβολή της ενδοθηλιακής διαπερατότητας κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού είναι η δεύτερη ενδιαφέρουσα πλευρά του οιδήματος αυξημένης διαπερατότητας. Η εκτίμηση της μεταβολής αυτής γίνεται με τη μέτρηση του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος και του βάρους του ξηρού πνεύμονα, του οποίου έχει αφαιρεθεί το αίμα²¹. Η αύξηση του βάρους του ξηρού πνεύμονα κατά τη διάρκεια του οιδήματος συμβαίνει στο οίδημα αυξημένης διαπερατότητας, ενώ δεν συμβαίνει στο υδροστατικό οίδημα⁴⁵ και ουσιαστικά καταγράφει τη ροή υγρών και πρωτεϊνών του πλάσματος προς το διάμεσο χώρο και τις κυψελίδες. Οι μεταβολές της διαπερατότητας εκτιμώνται με μεγαλύτερη ακρίβεια μετά από ενδοφλέβια έγχυση σημασμένης με I-125 αλβουμίνης και μέτρηση του εξωαγγειακού πνευμονικού χώρου κατανομής της. Ο Dreyfuss²¹ αέρισε ποντίκια με κλειστό θώρακα με μέγιστη πίεση 45 cmH₂O και μετά από 5 min αερισμού υπήρχαν σημεία διάμεσου πνευμονικού οιδήματος μικροσκοπικά, ενώ το βάρος του ξηρού πνεύμονα και ο χώρος κατανομής της αλβουμίνης ήταν αυξημένα. Μετά από 10 min το οίδημα παρέμενε στο διάμεσο χώρο, ενώ μετά από 20 min άρχισε να κατακλύζει και τις κυψελίδες. Στο σχήμα 1.4 φαίνονται οι μεταβολές του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος, του βάρους του ξηρού πνεύμονα και του χώρου κατανομής της αλβουμίνης, που δείχνουν τη χρονική εξέλιξη του πνευμονικού οιδήματος.

Συμπερασματικά το πνευμονικό οίδημα που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός φαίνεται ότι έχει κατά κύριο λόγο χαρακτηριστικά συμβατά με το πνευμονικό οίδημα



αυξημένης διαπερατότητας. Αν και η συμβολή της υδροστατικής συνιστώσας στα ζώα με κλειστό θώρακα είναι ιδιαίτερα περιορισμένη όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν θα πρέπει να αγνοείται ότι οποιαδήποτε, έστω και μικρή, αύξηση της πίεσης τριχοειδικής διήθησης μπορεί να προκαλέσει μεγάλη επιπλέον εκροή υγρών, όταν το τριχοειδικό ενδοθήλιο είναι επηρεασμένο.



Σχήμα 1.5. Βάρος υγρού πνεύμονα/βάρος σώματος (Q_{wl}/BW), βάρος ξηρού πνεύμονα/βάρος σώματος (DLW/BW) και χώρος κατανομής της αλβουμίνης ($Alb.Sp$) για ποντίκια που αερίστηκαν με μέγιστη πίεση 45 cm H_2O ανάλογα με το χρόνο μηχανικού αερισμού.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Οι πνεύμονες των ζώων με VILI επιδεικνύουν μια κοινή εικόνα εκτεταμένων ατελεκτασιών, έντονης συμφόρησης και διόγκωσης λόγω του οιδήματος. Η έκταση των βλαβών εξαρτάται από τη διάρκεια και από τα χαρακτηριστικά (πίεση, όγκος, συχνότητα) του μηχανικού αερισμού. Αρχικά το οίδημα περιορίζεται στο διάμεσο χώρο και δίνει την εικόνα του περιβρογχικού cuffing στο μικροσκόπιο⁴⁶. Στα μικρά ζώα ο αερισμός με υψηλές πιέσεις προκαλεί κυψελιδικό οίδημα σε λιγότερο από μία ώρα. Αν και δε είναι εύκολη η διάκριση της φύσης του οιδήματος με βάση την παθολογοανατομική του εικόνα, τα περισσότερα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνηγορούν υπέρ οιδήματος αυξημένης διαπερατότητας. Οι Webb και Tierney²⁰ ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν ότι το οιδηματικό υγρό ήταν πλούσιο σε πρωτεΐνες,



συμπεραίνοντας ότι πρόκειται για εξίδρωμα. Ο Tsuno⁴⁷ αερίζοντας νεαρούς χοίρους για 22 ώρες με μέγιστη πίεση 40 cmH₂O προκάλεσε πνευμονική βλάβη χαρακτηριζόμενη από σοβαρή υποξαιμία. Μερικοί από τους χοίρους θανατώθηκαν αμέσως μετά τις 22 ώρες, ενώ άλλοι υποστηρίχθηκαν για αρκετές ημέρες με αερισμό φυσιολογικών πιέσεων και όγκων. Η παθολογοανατομική εξέταση των ζώων που θανατώθηκαν αμέσως, έδειξε σοβαρές, διάχυτες κυψελιδικές βλάβες με σχηματισμό μεμβρανών υαλίνης, κυψελιδική αιμορραγία και διήθηση από ουδετερόφιλα. Οι βλάβες αυτές ήταν παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια του ανθρώπινου ARDS. Αρκετές μέρες μετά την αρχική περίοδο του τραυματικού μηχανικού αερισμού διαπιστώθηκαν βλάβες παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται στα όψιμα στάδια του ARDS, όπως εκτεταμένες κυψελιδικές περιοχές με σύμπτωση και πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών και των τύπου II κυψελιδικών κυττάρων.

Η διαφορά που έχει παρατηρηθεί στην παθολογοανατομική εικόνα μεταξύ των μικρών και των μεγάλων ζώων συχνά οφείλεται στη διαφορετική χρονική διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Το οίδημα αναπτύσσεται τόσο γρήγορα (λίγα λεπτά) στα μικρά ζώα, που δεν υπάρχει αρκετός χρόνος για την ανάπτυξη αναγνωρίσιμης φλεγμονής και ουδετεροφιλικής διήθησης του πνευμονικού ιστού. Αντίθετα οι αρκετές ώρες που απαιτούνται για την πρόκληση του οιδήματος στα μεγαλύτερα ζώα επιτρέπουν τη μετανάστευση, την προσέλκυση και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων.

Ευρήματα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η μελέτη των μηχανικά αεριζόμενων πνευμόνων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε τις σημαντικές μεταβολές που προκαλούνται κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Διακοπή της συνέχειας των τύπου I κυψελιδικών κυττάρων έχει περιγραφεί σε κουνέλια που αερίζονταν για 6 ώρες με μέγιστη πίεση 20 cmH₂O⁴⁸, ενώ ο Dreyfuss χρησιμοποιώντας υψηλότερες πιέσεις στα ποντίκια έδειξε σημαντικές μεταβολές τόσο του επιθηλίου όσο και του ενδοθηλίου²¹. Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν υπέρ του οιδήματος αυξημένης διαπερατότητας, δεδομένου ότι το υδροστατικό πνευμονικό οίδημα συνοδεύεται από ελάχιστες⁴⁹ ή καθόλου⁵⁰ ιστολογικές αλλοιώσεις.

Αντίθετα στους πνεύμονες των ποντικών που μελέτησε ο Dreyfuss²¹ παρατηρήθηκε αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη, και σχηματισμός κυστιδίων, που ήταν γεμάτα με υγρό το οποίο είχε πυκνότητα

πλάσματος. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκαν εκτεταμένες διακοπές της συνέχειας τόσο του ενδοθηλίου, όσο και του επιθηλίου. Η παράταση του μηχανικού αερισμού συνοδεύτηκε από επίταση της παραπάνω εικόνας και πλήρωση των κυψελίδων με υγρό.

Η κατανομή των βλαβών που παρατηρήθηκαν δεν ήταν ομοιόμορφη. Η επιθηλιακή μεμβράνη ήταν σχεδόν άθικτη σε ορισμένες περιοχές, ενώ σε άλλες η καταστροφή της ήταν σχεδόν πλήρης, αφήνοντας πλήρως εκτεθειμένη τη βασική μεμβράνη. Ένα ακόμη ενδιαφέρον στοιχείο ήταν το ότι και σε σχεδόν πλήρη επιθηλιακή καταστροφή, τα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα δεν φαίνονταν ιδιαίτερα επηρεασμένα. Μεμβράνες υαλίνης κάλυπταν τις κατεστραμμένες περιοχές, ενώ οι διακοπές της ακεραιότητας του ενδοθηλίου επέτρεπαν την άμεση επαφή των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων και της βασικής μεμβράνης. Η έκταση της καταστροφής των κυψελιδικών κυττάρων εξηγεί και τα υψηλά επίπεδα κυτταρικών ενζύμων, όπως η γαλακτική δεϋδρογενάση και η ασπαρτική αμινοτρασφεράση, που απομονώθηκαν στο BAL των ποντικών με VILI⁵¹. Ένα επίσης ενδιαφέρον στοιχείο ήταν ότι η προσθήκη PEEP 10 cmH₂O συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της παρατηρηθείσας βλάβης⁴².

Τα παραπάνω ευρήματα έχουν περιγραφεί σε πνεύμονες με πνευμονικό οίδημα υψηλής διαπερατότητας (ανεξαρτήτως αιτιολογίας) και σχεδόν ποτέ σε πνεύμονες με υδροστατικό πνευμονικό οίδημα.

Μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης από τη μηχανική αναπνοή

Οι μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης στο μηχανικά αεριζόμενο πνεύμονα έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας την τελευταία εικοσαετία. Όπως είναι φυσικό η έμφαση δόθηκε αρχικά στη μελέτη της επίδρασης των μηχανικών παραμέτρων (πίεση, όγκος, συχνότητα), με εντυπωσιακά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάδειξη των αιτιών και των συνθηκών που συνδέονται με την πρόκληση της βλάβης. Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα, αλλά και η εξέλιξη της επιστημονικής συζήτησης που συνδέεται με πολύ άμεσο τρόπο με την ασφαλή εφαρμογή του μηχανικού αερισμού στους ασθενείς παρουσιάζονται στη συνέχεια, με τον τίτλο *μηχανικό τραύμα*.

Στη δεκαετία του 90 όμως, συμπληρωματικά με τη δυνητικά βλαπτική δράση των μηχανικών παραμέτρων, φάνηκε ότι η βλάβη μπορεί να πυροδοτηθεί και μέσω



Οι μηχανικές παράμετροι που ενοχοποιήθηκαν αρχικά για την πρόκληση βλάβης κατά τη μηχανική αναπνοή, ήταν η αυξημένη πίεση (barotrauma-βαρότραυμα) και ο αυξημένος όγκος (volutrauma-βολότραυμα). Σήμερα είναι πλέον σαφές ότι οι παραπάνω παράγοντες ασκούν τη βλαπτική τους επίδραση μέσω της υπερβολικής τελοεισπνευστικής διάτασης (end-inspiratory overstretch) που προκαλούν. Εκτός από την τελοεισπνευστική υπερδιάταση και η επαναλαμβανόμενη διάνοιξη και σύγκλειση των κυψελίδων (atelectrauma-ατελεκτατικό τραύμα) προκαλεί βλάβη. Οι παραπάνω παράγοντες, όπως και η επίδρασή τους όχι μόνο σε υγιείς, αλλά και σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη, εξετάζονται στη συνέχεια.

Η άποψη, ότι οι υψηλές πιέσεις των αεραγωγών κατά τη διάρκεια της μηχανικής αναπνοής μπορεί να προκαλέσουν βλάβη με τη μορφή της διαφυγής αέρα, διατυπώθηκε σχεδόν ταυτόχρονα με την εφαρμογή του μηχανικού αερισμού με θετική πίεση. Ο Macklin⁵² περιέγραφε ήδη από το 1939 πως ‘... όταν αυξάνει η διαφορά πίεσης μεταξύ της κυψελίδας και του ελύτρου του αγγείου, ο αέρας μπορεί να διαφύγει στο διάμεσο ιστό.’ Η διαφυγή αυτή μπορεί να πάρει οποιανδήποτε από τις μορφές που σήμερα χαρακτηρίζονται σα βαρότραυμα (πνευμομεσοθωράκιο, υποδόριο εμφύσημα, πνευμοθώρακα, πνευμοπνευμοπνευμόνιο, πνευμοπερικάρδιο, πνευμοπεριτόναιο, εμβολή αέρα) και η κλινική της έκφραση μπορεί να είναι ιδιαίτερα θορυβώδης, αλλά και επικίνδυνη.

Αυτό που όμως μετά από τόσες δεκαετίες δεν έχει ξεκαθαρισθεί απόλυτα είναι ποια πίεση (peak, plateau, mean, PEEP) είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία βαροτραύματος, αλλά και ποια είναι τα όρια πάνω από τα οποία αυξάνεται ο κίνδυνος πρόκλησής του. Αυτό που είναι σίγουρο, είναι ότι οι απόλυτες τιμές των πιέσεων των αεραγωγών δεν είναι τόσο σημαντικές για την πρόκληση βαροτραύματος, όσο οι διαφορές των πιέσεων (π.χ. η διαπνευμονική πίεση, δηλαδή η διαφορά της

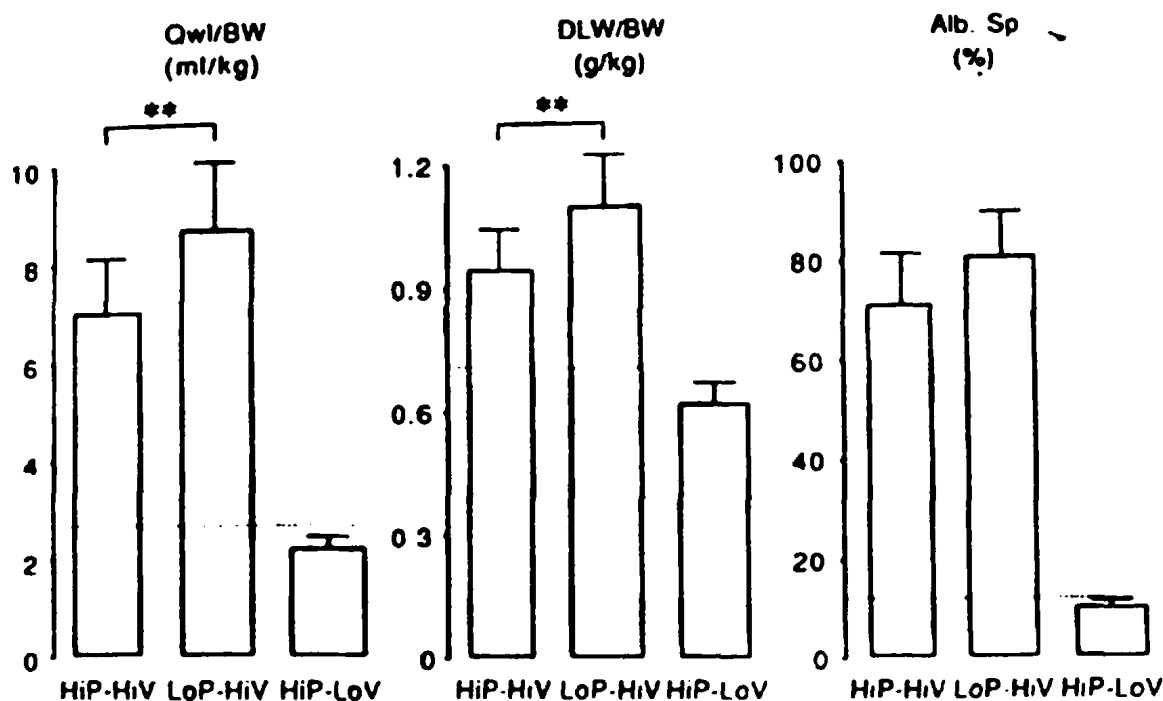
κυψελιδικής και της υπεζωκοτικής) και η τοπική διάταση που προκαλείται εξαιτίας τους. Ο Bouhuys⁵³ διαπίστωσε ότι οι τρομπετίστες ανέπτυσαν εκατοντάδες φορές την ημέρα πιέσεις της τάξης των 150 cmH₂O στους αεραγωγούς, χωρίς βεβαίως να προκαλείται βαρότραυμα.

Η μειωμένη συμβολή των αυξημένων πιέσεων στη βλάβη του πνευμονικού παρεγχύματος που προκαλείται από το μηχανικό αερισμό, καταδείχθηκε με πολύ εντυπωσιακό τρόπο στα πειράματα του Dreyfuss⁵⁰. Ο Dreyfuss αέρισε ποντίκια με τρεις διαφορετικούς τρόπους (σχ. 1.6). Ο πρώτος περιελάμβανε αερισμό με υψηλές πιέσεις (μέγιστη πίεση 45cm H₂O) και προκάλεσε σημαντικού βαθμού πνευμονικό οίδημα. Ο δεύτερος περιελάμβανε αερισμό με ψηλούς όγκους και χαμηλές πιέσεις και για να το πετύχει αυτό χρησιμοποίησε αναπνευστήρα αρνητικής πίεσης (iron lung). Και ο τρόπος αυτός συνοδεύτηκε από ανάπτυξη σημαντικού βαθμού πνευμονικού οιδήματος. Ο τρίτος περιελάμβανε αερισμό ποντικών στα οποία είχε περιδεθεί ο θώρακας, με ανάλογες με την πρώτη ομάδα υψηλές πιέσεις (μέγιστη πίεση 45cm H₂O), οι οποίες όμως λόγω της χαμηλής ενδοτικότητας συνοδεύονταν από χαμηλότερους αναπνεόμενους όγκους. Στην ομάδα αυτή δεν αναπτύχθηκε πνευμονικό οίδημα, στοιχείο που επιβεβαιώνει ότι ο όγκος και όχι η πίεση είναι το κύριο βλαπτικό μέγεθος.

Οι αυξημένες πιέσεις δεν είναι τόσο βλαπτικές για το πνευμονικό παρέγχυμα, όσο οι αυξημένοι όγκοι. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι δεν μπορεί να αποδειχθούν επικίνδυνες, μια και εκτός από την διαφυγή αέρα από τις κυψελίδες, οι αυξημένες ενδοθωρακικές πιέσεις συνεπάγονται μια σειρά από φυσιολογικές μεταβολές. Μια από αυτές είναι η επέκταση της ζώνης I κατά West, συνθηκών δηλαδή στις οποίες οι πίεση στις κυψελίδες είναι μεγαλύτερη από την πίεση στα περιβάλλοντα πνευμονικά τριχοειδή. Μια άλλη, πολύ σημαντική κλινικά μεταβολή, είναι αυτή που προκαλεί η επίδραση των ενδοθωρακικών πιέσεων στη συστηματική κυκλοφορία.

Η σημασία του ελέγχου των πιέσεων των αεραγωγών και ειδικά της πίεσης παύσης που αντιστοιχεί στον τελοεισπνευστικό όγκο, επισημάνθηκε από την Επιτροπή Ομοφωνίας για το μηχανικό αερισμό των ασθενών⁵⁴, η οποία τόνισε ότι η τήρηση συγκεκριμένων ορίων πίεσης ($P_{pr} < 35$ cmH₂O), μειώνει την πιθανότητα βλαβών.





Σχήμα 1.6. Βάρος υγρού πνεύμονα/βάρος σώματος (Qwl/BW), βάρος ξηρού πνεύμονα/βάρος σώματος (DLW/BW) και χώρος κατανομής της αλβουμίνης ($Alb.Sp$) για ποντίκια που αερίστηκαν με τρεις διαφορετικές στρατηγικές: υψηλή πίεση-υψηλός όγκος ($HiP-HiV$), χαμηλή πίεση-υψηλός όγκος ($LoP-HiV$), υψηλή πίεση- χαμηλός όγκος ($HiP-LoV$).

Βολότραυμα

Η έννοια της βλάβης από τον όγκο εισήχθη από τον Dreyfuss στα μέσα της δεκαετίας του 80, καθορίζοντας σαν κρίσιμη παράμετρο για την πρόκληση βλάβης τον όγκο, με μια σειρά πειραμάτων που περιληπτικά αναφέρονται παραπάνω (σχήμα 1.6). Μέχρι τότε η βλάβη που προκαλούσε η μεγάλη υπερδιάταση θεωρούνταν αποτέλεσμα των υψηλών πιέσεων που απαιτούνταν για τη χορήγηση των υψηλών όγκων.

Αρκετοί ερευνητές ήρθαν την επόμενη δεκαετία να επαβεβαιώσουν την προσέγγιση του Dreyfuss, με διαφορετικές πειραματικές μεθοδολογίες και σε διάφορα είδη. Ο Hernandez⁵⁵ χρησιμοποίησε τη σταθερά τριχοειδικής διήθησης, σα μέτρο της ακεραιότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης και μελέτησε απομονωμένους πνεύμονες κουνελιών, οι οποίοι είχαν αφαιρεθεί μετά από αερισμό του άθικτου ζώου για 1 ώρα. Συνέκρινε το αποτέλεσμα χρησιμοποίησης τριών

24
διαφορετικών επιπέδων πίεσης (15, 30 και 45 cmH₂O) σε κουνέλια με ελεύθερο θώρακα και σε κουνέλια στα οποία είχε τοποθετηθεί ένας θωρακοκοιλιακός νάρθηκας, που παρεμπόδιζε τη θωρακοκοιλιακή έκπτυξη. Ο αερισμός με 15 cmH₂O και ελεύθερο θώρακα δεν επηρέασε τη σταθερά τριχοειδικής διήθησης, ο αερισμός με 30 cm H₂O την αύξησε κατά 31%, ενώ ο αερισμός με 45 cmH₂O την αύξησε κατά 430%. Ο περιορισμός του αναπνεόμενου όγκου με το νάρθηκα απέτρεψε οποιαδήποτε αύξηση της σταθεράς τριχοειδικής διήθησης, ακόμη και όταν χρησιμοποιήθηκε η υψηλότερη πίεση. Ο Adkins⁵⁶ διαπίστωσε ότι η σταθερά τριχοειδικής διήθησης των πνευμονικών τριχοειδών αύξανε πολύ περισσότερο σε νεαρά κουνέλια, που αερίζονταν με μέγιστη πίεση 30-55 cmH₂O, σε σχέση με ενήλικα που αερίζονταν με την ίδια πίεση. Η διαφορά αποδόθηκε στην αυξημένη φυσιολογικά πνευμονική και θωρακική ενδοτικότητα των νεαρών σε σχέση με τα ενήλικα κουνέλια, που προκαλεί αυξημένους όγκους για την ίδια μέγιστη πίεση στα νεαρά ζώα.

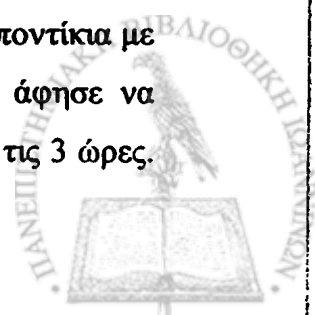
Σε ανάλογα πειράματα, ο Carlton⁵⁷ αέρισε πρόβατα, στα οποία είχε τοποθετηθεί ένα σύστημα συλλογής της πνευμονικής λέμφου, με μέγιστη πίεση 58 cmH₂O για 4-8 ώρες. Τα μισά ζώα αερίστηκαν με ελεύθερο θώρακα, ενώ στα υπόλοιπα ο θώρακας και η κοιλιά είχαν περιδεθεί. Προσδιορίστηκε η ροή της λέμφου, η οποία αυξήθηκε 6 φορές στην ομάδα με τον ελεύθερο θώρακα, ενώ παρέμεινε αμετάβλητη στην άλλη ομάδα. Ο Carlton προσπάθησε να καθορίσει τον ουδό πίεσης ή όγκου, που συνδυάζεται με πρόκληση οιδήματος και μεταβολών της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας. Για να το επιτύχει αυτό αύξαινε κάθε 4 ώρες τη μέγιστη πίεση σταδιακά (από τη βασική της τιμή 16 cmH₂O, στα 33, στα 43 και τέλος στα 58 cmH₂O, που αντιστοιχούσε σε αναπνεόμενο όγκο 57ml/kg). Η ροή της λέμφου αυξήθηκε μόνο στο τελευταίο στάδιο, ενώ στα άλλα δεν μεταβλήθηκε και ο Carlton θεώρησε ότι η αύξηση της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας δεν γίνεται σταδιακά, αλλά μόλις γίνει υπέρβαση ενός ουδού, τον οποίον προσδιόρισε κοντά στις μέγιστες πιέσεις που χρησιμοποίησε. Η προσεκτικότερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μελέτης, δείχνει όμως ότι το ερώτημα ύπαρξης και καθορισμού του ουδού δεν έχει εύκολη και κατηγορηματική απάντηση. Η σχέση αλβουμίνης-σφαιρινών στη λέμφο σε σύγκριση με το πλάσμα στη συγκεκριμένη μελέτη μεταβάλλεται πολύ πριν τη μέγιστη πίεση και η μεταβολή αυτή δείχνει ότι η τριχοειδοκυψελιδική μεμβράνη αρχίζει να επηρεάζεται πολύ νωρίτερα από την εφαρμογή της μέγιστης πίεσης.



Εκτός από τις απόλυτες τιμές των πιέσεων και των όγκων που εφαρμόζονται, σημασία φαίνεται ότι έχει η διάρκεια της έκθεσης και το ιστορικό της μηχανικής καταπόνησης του πνευμονικού ιστού (volume history) φαίνεται ότι είναι μια ανεξάρτητη, σημαντική παράμετρος που δεν πρέπει να αγνοείται. Ο Tsuno⁵⁸ επιβεβαίωσε τη σημασία της χρονικής παραμέτρου αερίζοντας πρόβατα με μέγιστη πίεση 30 cmH₂O. Η πίεση αυτή αντιστοιχούσε σε αναπνεόμενο όγκο 30ml/kg, όγκο πολύ μικρότερο από τον μέγιστο όγκο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη του Carlson. Όλα τα ζώα, μετά από 40 ώρες μηχανικού αερισμού, είχαν σημαντικές παθολογοανατομικές μεταβολές και αύξηση του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος. Σε μικρότερα σε μέγεθος ζώα (π.χ. ποντίκια), στα οποία η προκαλούμενη από το μηχανικό αερισμό βλάβη εμφανίζεται εξαιρετικά γρήγορα, η παράταση του μηχανικού αερισμού ακόμη και με εξαιρετικά 'φιλικές' από πλευρά όγκου συνθήκες προκαλεί πάντα σημαντική ιστική βλάβη²¹. Κατά συνέπεια η αναζήτηση του ουδού πίεσης και όγκου που προκαλεί πνευμονική βλάβη, είναι εξαιρετικά δύσκολη μια και η μηχανική καταπόνηση είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Η αναστρεψιμότητα της βλάβης και οι μηχανισμοί που υπεισέρχονται σε αυτήν είναι ένα επίσης σημαντικό ερώτημα. Όπως αναμένεται η χρησιμοποίηση υψηλών όγκων για μακρά περίοδο προκαλεί σημαντική και μη αναστρέψιμη βλάβη^{21,24}. Η χρησιμοποίηση όμως χαμηλότερων όγκων ή η μικρή διάρκεια έκθεσης σε υψηλούς όγκους φαίνεται να συνδέεται με δυνητικά αναστρέψιμη βλάβη στο πνευμονικό παρέγχυμα. Στη σειρά των πειραμάτων που αναφέρονται παραπάνω ο Carlton αφού αέρισε πρόβατα με 58 cmH₂O για 4 ώρες, τα άφησε στη συνέχεια να ανανήψουν για 6 ώρες. Μετά τις 6 ώρες η ροή της πνευμονικής λέμφου, αλλά και η σχέση των πρωτεϊνών λέμφου-πλάσματος επανήλθαν στις φυσιολογικές τιμές τους, στοιχεία συμβατά με κάθαρση του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας. Η σχέση αλβουμίνης-σφαιρινών στη λέμφο παρέμεινε χαμηλή σε σχέση με το πλάσμα ακόμη και στο τέλος της 6ωρης περιόδου, στοιχείο που δείχνει ότι η αποκατάσταση της ακεραιότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης, τουλάχιστον όσον αφορά το σκέλος της διακίνησης των πρωτεϊνών, καθυστερεί σημαντικά.

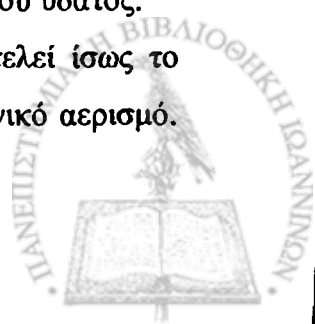
Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα σειρά πειραμάτων ο Dreyfuss⁴⁴ αέρισε ποντίκια με μέγιστη πίεση 35 cmH₂O για μόλις 2 λεπτά, τα οποία στη συνέχεια άφησε να ανανήψουν για διαφορετικές χρονικές περιόδους, που έφθαναν μέχρι και τις 3 ώρες.



Μια υποομάδα των ζώων θανατώθηκε αμέσως και παρόλο που μακροσκοπικά δεν εμφάνιζε κυψελιδικό οίδημα, παρουσίασε αυξημένο βάρος ξηρού πνεύμονα και χώρο κατανομής της αλβουμίνης. Η εξέταση όμως με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε διαταραχές του ενδοθηλίου, παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται μετά από αερισμό για μακρά περίοδο. Μια ομάδα πειραματόζων υποβλήθηκε σε βρογχοκυψελιδική έκπλυση και έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης του όγκου του οιδηματικού υγρού, χρησιμοποιώντας την ουρία σα δείκτη διάλυσης. Ο όγκος του υγρού που επάλειφε το κυψελιδικό επιθήλιο μετά από 2 λεπτά μηχανικού αερισμού ήταν αυξημένος κατά 180% και η ποσότητα των ολικών πρωτεϊνών κατά 80% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης απομονώθηκε ένας σημαντικός αριθμός ερυθροκυττάρων και λευκών αιμοσφαιρίων. Τα παραπάνω ευρήματα είναι συμβατά με τα ευρήματα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, που εντόπισαν τις βλάβες κατά κύριο λόγο στο ενδοθήλιο. Η παρουσία βέβαια έμμορφων στοιχείων του αίματος στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα δείχνει ότι θα πρέπει να υπάρχουν και κάποια μικρά ρήγματα της επιθηλιακής μεμβράνης.

Η ταχύτητα αποκατάστασης του οιδήματος που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός εκτιμήθηκαν τόσο με τον υπολογισμό του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος, όσο και το βάρος του ξηρού πνεύμονα. Και τα δύο 15 λεπτά μετά τη διακοπή του μηχανικού αερισμού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, στοιχείο που δείχνει την ταχύτατη απορρόφηση του οιδηματικού υγρού από τον κυψελιδικό και διάμεσο χώρο. Αν και η απορρόφηση του οιδηματικού υγρού δεν είναι ταυτόσημη με την αποκατάσταση της ακεραιότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης, ο χώρος κατανομής της ραδιοσημασμένης με I-125 αλβουμίνης που ενέθηκε μετά την παύση του μηχανικού αερισμού ήταν φυσιολογικός, στοιχείο που δείχνει αναστροφή των μειζόνων διαταραχών της διαπερατότητας. Ο όγκος του υγρού που επάλειφε το επιθήλιο παρουσίασε μεταβολή ανάλογη με το εξωαγγειακό πνευμονικό ύδωρ κατά την περίοδο της ανάνηψης, αντανakλώντας την ταυτόχρονη απορρόφηση των υγρών από τον κυψελιδικό και το διάμεσο χώρο. Αντίθετα η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του υγρού που επαλείφει τις κυψελίδες δεν μεταβλήθηκε στη διάρκεια της 3ωρης ανάνηψης, εύρημα συμβατό με ευρήματα άλλων ερευνητών⁵⁹, που δείχνουν ότι η απορρόφηση των πρωτεϊνών του κυψελιδικού υγρού καθυστερεί σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη του ύδατος.

Συμπερασματικά η υπερδιάταση του πνευμονικού ιστού αποτελεί ίσως το σημαντικότερο μηχανικό παράγοντα πρόκλησης βλάβης κατά το μηχανικό αερισμό.



Η σημασία του έχει πλέον καταδειχθεί με απόλυτο τρόπο σε πειραματόζωα με προϋπάρχουσα πνευμονική βλάβη, ενώ την τελευταία τριετία έχουν αρχίσει να παρουσιάζονται και οι πρώτες προτυποποιημένες κλινικές μελέτες που αποδεικνύουν τη βλαπτική δράση των υψηλών αναπνεόμενων όγκων σε ασθενείς με ARDS, που παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Ατελεκτατικό τραύμα

Στη δεκαετία του 90 έγινε σαφές, ότι εκτός από τον αερισμό με υψηλούς όγκους και ο αερισμός με χαμηλούς όγκους μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη, όταν κάθε αναπνοή συνδυάζεται με διάνοιξη και σύγκλειση των κυψελίδων. Η ιδέα ότι η επανειλημμένη σύγκλειση και διάνοιξη των αεραγωγών μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Robertson⁶⁰, που μελετούσε τις διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα και το σύνδρομο της αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών. Η βασική του ιδέα ήταν ότι όταν οι κυψελίδες είναι ατελεκτατικές, η μεσόφαση αέρα υγρού μετατοπίζεται από τις κυψελίδες στις οποίες βρίσκεται φυσιολογικά κεντρικότερα, σε αεραγωγούς όπως τα τελικά βρογχιόλια. Η επαναδιάνοιξη στη συνέχεια απαιτεί ανάπτυξη σχετικά υψηλών πιέσεων και το shear stress που αναπτύσσεται μπορεί να προκαλέσει ρήξη του επιθηλίου και να προκαλέσει πνευμονική βλάβη.

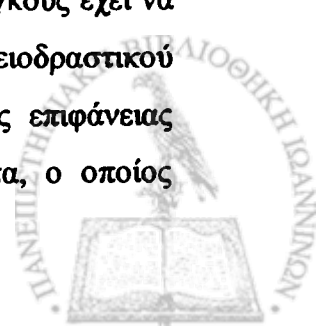
Ο Mead υπολόγισε την πίεση που απαιτείται για τη διάνοιξη μιας κλειστής κυψελίδας που περιβάλλεται από ανοιχτές⁶¹. Συγκεκριμένα βρήκε ότι η πίεση που απαιτείται για τη διάνοιξη ισούται με τη διαπνευμονική πολλαπλασιασμένη κατά ένα παράγοντα $(V/V_0)^{2/3}$, όπου V ο όγκος σε πλήρη έκπτυξη και V_0 ο αρχικός όγκος. Έτσι για παράδειγμα ο δεκαπλασιασμός του όγκου μιας σχεδόν κλειστής κυψελίδας, όταν η διαπνευμονική πίεση είναι 30cm H₂O, απαιτεί ανάπτυξη πιέσεων που φτάνει τα 140 cmH₂O. Η βλάβη που προκαλείται από την επανειλημμένη διάνοιξη και σύγκλειση κωδικοποιήθηκε σαν ατελεκτατικό τραύμα (atelectrauma).

Ο Taskar⁶² χρησιμοποιώντας αρνητική τελοεκπνευστική πίεση, έδειξε ότι ο υγιής πνεύμονας δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα, όταν τα τελικά βρογχοπνευμονικά τμήματα ανοιγοκλείνουν για περιορισμένο χρονικό διάστημα (μία ώρα), παρόλο που η παρέμβασή του συνοδεύτηκε από επιδείνωση της ανταλλαγής των αερίων και της ενδοτοκότητας. Η εφαρμογή όμως παρόμοιας τεχνικής από την ίδια ομάδα για 3 ώρες σε βρογχοπνευμονικά τμήματα τα οποία είχαν υποστεί αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, συνοδεύτηκε από σημαντικές

φυσιολογικές (μείωση της μερικής πίεσης οξυγόνου και της ενδοτικότητας), αλλά και ιστολογικές διαταραχές (νέκρωση του επιθηλίου των βρογχιολίων και σχηματισμός μεμβρανών υαλίνης)⁶³. Ο Woo⁶⁴ αέρισε για 8 ώρες, με μεγάλους όγκους (50ml/kg), σκυλιά με κλειστό θώρακα χωρίς να παρατηρήσει σημαντικές βλάβες. Ο αερισμός με παρόμοιες συνθήκες σκυλιών με ανοιχτό θώρακα συνοδεύτηκε όμως από σημαντικού βαθμού πνευμονικό οίδημα. Παρά τις αιμοδυναμικές διαφορές μεταξύ των δύο καταστάσεων, η σημαντική φυσιολογική διαφορά ήταν η μείωση της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας στα σκυλιά με ανοιχτό θώρακα, που σε συνδυασμό με τη μηδενική τελοεκπνευστική πίεση που χρησιμοποιήθηκε προκάλεσε συνεχή σύγκλειση και διάνοιξη των αεροφόρων κοιλοτήτων. Στο καταπονημένο από τους υψηλούς όγκους πνευμονικό παρέγχυμα, το ατελεκτατικό τραύμα μεγιστοποίησε την ένταση και έκταση της βλάβης.

Ο Muscedere⁶⁵ χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο μη αιματούμενου πνεύμονα ποντικού, δοκίμασε διαφορετικές στρατηγικές αερισμού και μελέτησε τα αποτελέσματά τους από φυσιολογική και από ιστολογική σκοπιά. Στη μελέτη του έδειξε ότι η προσθήκη PEEP ανώτερης από το κατώτερο σημείο καμψής της καμπύλης πίεσης όγκου (lower inflection point), το οποίο μπορεί να θεωρηθεί το σημείο πάνω από το οποίο γίνεται μαζική διάνοιξη των κυψελίδων και μετάβαση στο μεσαίο τμήμα της καμπύλης πίεσης όγκου που έχει και την καλύτερη ενδοτικότητα, συνοδεύεται από βελτιστοποίηση της μηχανικής συμπεριφοράς του πνεύμονα και από ελάχιστα παθολογοανατομικά ευρήματα βλάβης. Η απουσία PEEP ή η προσθήκη PEEP μικρότερης από το κατώτερο σημείο καμψής συνοδεύτηκε από φυσιολογικές και παθολογοανατομικές διαταραχές (βλάβες του τοιχώματος των αεραγωγών, σχηματισμός μεμβρανών υαλίνης). Η ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ότι, όπως και στο μοντέλο του Woo που αναφέρεται παραπάνω, η έλλειψη θωρακικού τοιχώματος μεγιστοποιεί την έκταση της σύγκλεισης και της διάνοιξης. Το σίγουρο είναι ότι όταν το κατώτερο σημείο καμψής περιλαμβάνεται στο φάσμα του αναπνεόμενου όγκου, τότε συμβαίνει σύγκλειση και διάνοιξη των κυψελίδων κατά τη διάρκεια του αναπνευστικού κύκλου και ατελεκτατικό τραύμα.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα με τον αερισμό σε χαμηλούς όγκους έχει να κάνει με τη μειωμένη παραγωγή και την αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ο υπεραερισμός και η έκταση της ενεργού κυψελιδικής επιφάνειας καθορίζουν το ρυθμό παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο οποίος



επιηρεάζεται ιδιαίτερα όταν υπάρχουν εκτεταμένες ατελεκτασίες. Επίσης η διάνοιξη και σύγκλειση των κυψελίδων μπορεί να προκαλέσει τη συμπίεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τις κυψελίδες στους αεραγωγούς και τη συνακόλουθη αδρανοποίησή του. Οι ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά οδηγούν σε ένα φαύλο κύκλο, μια και από τη μια προκαλούνται από τις ατελεκτασίες, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να τις πυροδοτήσουν.

Η σημασία της παρουσίας κλειστών κυψελίδων δεν περιορίζεται μόνο στις διαταραχές που οφείλονται σε αυτό καθαυτό το ατελεκτατικό τμήμα. Στον αερισμό με σταθερό όγκο, η 'αποστράτευση' κάποιων κυψελίδων συνεπάγεται ότι ο χορηγούμενος όγκος θα πάει στις υπόλοιπες ανοιχτές. Ανάλογα λουπών με την έκταση του ατελεκτατικής επιφάνειας, μπορεί να συμβεί υπερδιάταση του υπόλοιπου πνευμονικού παρεγχύματος και να παρατηρείται ταυτόχρονα βολότραυμα και ατελεκτατικό τραύμα. Η αναγνώριση της ταυτόχρονης αυτής διαταραχής, η οποία είναι πολύ συχνή στο ARDS, και η ανάγκη επιστράτευσης αλλά και διατήρησης ανοιχτών των κυψελίδων προκειμένου να αποφευχθεί η πνευμονική βλάβη οδήγησε στην υιοθέτηση προστατευτικών μεθόδων αερισμού, όπως η πρηγής θέση, ο υψίσυχνος αερισμός, ή ο αερισμός με υγρό μέσο (φθοριωμένοι υδρογονάνθρακες).

Το μηχανικό τραύμα σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη

Το σύνολο των στοιχείων που παρουσιάζονται παραπάνω αφορούν τη μελέτη του υγιούς πνευμονικού ιστού. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς, ότι από τη στιγμή που ο μηχανικός αερισμός προκαλεί βλάβη στο υγιές πνευμονικό παρέγχυμα, η βλαπτική δράση του στο παθολογικό πνευμονικό παρέγχυμα αναμένεται ιδιαίτερα έντονη. Το γεγονός ότι πολύ συχνά ο μηχανικός αερισμός εφαρμόζεται σε ασθενείς με χρόνιες ή οξείες παθήσεις του πνευμονικού παρεγχύματος, καθιστά ιδιαίτερα σημαντική τη γνώση των δυνητικών επιπτώσεών του. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πειραματικά στοιχεία που αφορούν τον αερισμό πνευμόνων με προϋπάρχουσα βλάβη.

Η βλαπτική επίδραση του μηχανικού αερισμού σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη έχει πιστοποιηθεί σε ένα πλήθος πειραματικών εργασιών, που χρησιμοποίησαν διαφορετικούς τρόπους πρόκλησης πνευμονικής βλάβης. Ο Bowton⁶⁶ μελέτησε την επίδραση διαφορετικών αναπνεόμενων όγκων σε απομονωμένο, αρδευόμενο με φυσιολογικό ορό πνεύμονα κουνελιού, στο οποίον είχε προκληθεί βλάβη από ολεϊκό οξύ. Μόλις 30 λεπτά μετά από αερισμό με 18ml/kg το

βάρος του πνεύμονα αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με το αντίστοιχο για αερισμό 6ml/kg και η σημαντική αυτή διαφορά παρέμεινε καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο Hernandez⁶⁷ μελέτησε την επίδραση του μηχανικού αερισμού, της έγχυσης ολεϊκού οξέος και του συνδυασμού τους σε ένα παρόμοιο μοντέλο απομονωμένου πνεύμονα κουνελιού. Η σταθερά τριχοειδικής διήθησης και η σχέση του βάρους υγρού προς ξηρό πνεύμονα που χρησιμοποίησε για να ποσοτικοποιήσει το πνευμονικό οίδημα, δεν μεταβλήθηκαν όταν χορηγήθηκαν είτε μικρές δόσεις ολεϊκού οξέος, είτε μηχανικός αερισμός με σχετικά χαμηλές πιέσεις (25 cmH₂O για 15 λεπτά). Όταν όμως η χορήγηση ολεϊκού οξέος συνοδεύτηκε από μηχανικό αερισμό διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της σταθεράς τριχοειδικής διήθησης και επιπλέον η σχέση του βάρους υγρού προς ξηρό πνεύμονα στην περίπτωση της συνδυασμένης παρέμβασης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την κάθε παρέμβαση ξεχωριστά. Σε μια εργασία της ίδιας ομάδας ο Coker⁶⁸ συνδύασε διαφορετικές μέγιστες πιέσεις (15, 30 και 45 cmH₂O) με την έγχυση ενός αδρανοποιητή του επιφανειοδραστικού παράγοντα (dioctyl succinate) στο ίδιο ζωικό μοντέλο και διαπίστωσε ότι ο συνδυασμός υψηλών πιέσεων (30 και 45 cmH₂O) και αδρανοποίησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα αύξανε σημαντικά τη σταθερά τριχοειδικής διήθησης σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη παρέμβαση ξεχωριστά. Η μικροσκοπική εξέταση των πνευμόνων που υποβλήθηκαν είτε μόνο σε μηχανικό αερισμό, είτε μόνο σε αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έδειξε ελάχιστες βλάβες σε σχέση με τους πνεύμονες που υποβλήθηκαν και στα δύο, οι οποίοι είχαν εκτεταμένη αιμορραγία, πνευμονικό οίδημα και σχηματισμό μεμβρανών υαλίνης. Οι παραπάνω μελέτες αφορούν απομονωμένους πνεύμονες, αλλά και μελέτες^{69,70} σε άθικτα ζώα (ποντίκια), τα οποία είχαν ελαφρά πνευμονική βλάβη από ολεϊκό, υδροχλωρικό οξύ ή α-ναφθυλθειουρία, επιβεβαίωσαν ότι ο συνδυασμός του μηχανικού αερισμού με υψηλές πιέσεις και όγκους με οποιονδήποτε από τους παραπάνω βλαπτικούς παράγοντες επιδεινώνει σημαντικά το πνευμονικό οίδημα και τις διαταραχές της διαπερατότητας που προκαλούνται σε σχέση με τη μεμονωμένη εφαρμογή είτε του μηχανικού αερισμού, είτε των παραπάνω παραγόντων.

Η διερεύνηση της σημασίας του ατελεκτατικού τραύματος σε πνεύμονες με προϋπάρχουσα βλάβη έγινε από την ομάδα του Sykes⁷¹, που αέρισε με χαμηλές πιέσεις (15 cmH₂O) κουνέλια στα οποία είχε απομακρυνθεί ο επιφανειοδραστικός παράγοντας με επανειλημμένη βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Υπολόγισε το κατώτερο σημείο καμπής της καμπύλης πίεσης όγκου (8 cmH₂O) και εφάρμοσε στη μία

υποομάδα PEEP 1-2 cmH₂O και στην άλλη 8-12 cmH₂O. Αν και δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στη θνητότητα, η οξυγόνωση αλλά και ο σχηματισμός μεμβρανών υαλίνης ήταν σημαντικά βελτιωμένα στην ομάδα της υψηλής PEEP. Η πρόκληση βλάβης με υδροχλωρικό οξύ και η εφαρμογή της ίδιας ακριβώς πειραματικής μεθοδολογίας από την ίδια ομάδα έδειξε σημαντικά βελτιωμένη οξυγόνωση και ενδοτικότητα στην ομάδα της υψηλής PEEP, χωρίς όμως διαφορές στην επιβίωση και την ιστολογική εικόνα⁷².

Τα παραπάνω στοιχεία επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι η προϋπάρχουσα πνευμονική βλάβη πολλαπλασιάζει τις βλαπτικές επιπτώσεις του μηχανικού αερισμού. Η ανομοιογένεια που παρατηρείται στις μηχανικές ιδιότητες του πνεύμονα με την οξεία πνευμονική βλάβη, είναι ένα κομβικό σημείο στην κατανόηση της διαφοράς της παθοφυσιολογίας του μηχανικού τραύματος στον υγίη και στον παθολογικό πνεύμονα. Ο Broccard⁷³ έδειξε τη διαφορά που μπορεί να έχει η οξεία πνευμονική βλάβη στην έκταση και την εντόπιση, σε σκυλιά με βλάβη από ολεϊκό οξύ, που αερίζονταν με υψηλούς όγκους και PEEP. Τα μισά σκυλιά αερίστηκαν σε ύπτια θέση και τα άλλα μισά σε πρηνή. Τα σκυλιά που αερίστηκαν σε πρηνή θέση είχαν σημαντικά καλύτερη ιστολογική εικόνα μετά το τέλος του πειράματος και η διαφορά οφειλόταν κυρίως στις εξαρτώμενες περιοχές. Η ίδια ομάδα πρόσφατα ανακοίνωσε⁷⁴ και τα αποτελέσματα του ίδιου πρακτικά πειράματος σε σκυλιά που είχαν υποστεί οξεία πνευμονική βλάβη αποκλειστικά από μηχανικό τραύμα (υψηλοί όγκοι-χαμηλή PEEP). Και σε αυτήν την περίπτωση η πρηνής θέση προκάλεσε ιστολογικά μικρότερη, αλλά κυρίως πιο ομοιογενή κατανομή της βλάβης μεταξύ εξαρτώμενων (ραχιαίων) και μη εξαρτώμενων περιοχών. Η αυξημένες υδροστατικές πιέσεις και η αυξημένη αιματική ροή στις εξαρτώμενες (ραχιαίες) περιοχές στην ύπτια θέση αυξάνει την πιθανότητα πλήρωσης των κυψελίδων τοπικά με υγρό, με όλα όσα αυτό συνεπάγεται. Η αυξημένη αιματική ροή φαίνεται ότι συμβάλλει ανεξάρτητα στην έκταση της βλάβης που προκαλείται από τους μηχανικούς παράγοντες, όπως έδειξε η ίδια ομάδα σε ένα μοντέλο απομονωμένου πνεύμονα κουνελιού, στο οποίο δοκιμάστηκαν διαφορετικά επίπεδα αιματικής ροής⁷⁵.

Η επίδραση της ανομοιογένειας της βλάβης στην πνευμονική μικροκυκλοφορία μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική, όπως ήδη έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο του 'πνευμονικού οιδήματος αυξημένης διήθησης'. Όπως έδειξε ο Mead η έκπτυξη πνευμόνων με ανομοιογενείς μηχανικές ιδιότητες, μπορεί να προκαλέσει μεγάλες διατοιχωματικές πιέσεις στα τριχοειδή, που βρίσκονται σε περιοχές που

υφίστανται έντονα αρνητικές πιέσεις⁶¹. Η αυξημένη διατοιχωματική πίεση στα πνευμονικά τριχοειδή μπορεί να προκαλέσει stress failure όπως έδειξε η ομάδα του West⁷⁶. Η εφαρμογή διατοιχωματικής πίεσης 40 cmH₂O στα πνευμονικά τριχοειδή κουνελιών συνοδεύτηκε από εκτεταμένες βλάβες στο ενδοθήλιο και στο επιθήλιο, αν και τα κουνέλια αερίζονταν με σχετικά χαμηλούς όγκους (διαπνευμονική πίεση 5 cmH₂O). Στην επόμενη εργασία τους⁷⁷ μελέτησαν την επίδραση των υψηλών (διαπνευμονική πίεση 20 cmH₂O) και των χαμηλών πνευμονικών όγκων (διαπνευμονική πίεση 5 cmH₂O), σε διαφορετικά επίπεδα διατοιχωματικής πίεσης των τριχοειδών. Διαπίστωσαν ότι σε υψηλά επίπεδα διατοιχωματικής πίεσης (32,5 cmH₂O) υπήρχε σημαντικά εντονότερη βλάβη τόσο στο ενδοθήλιο, όσο και στα τύπου I κυψελιδικά κύτταρα στους υψηλούς όγκους. Η αύξηση της μικροαγγειακής διαπερατότητας που συνοδεύει την αύξηση της διατοιχωματικής πίεσης των τριχοειδών, είχε δειχθεί σε απομονωμένους πνεύμονες σκύλων⁷⁸, κουνελιών και αλόγων⁷⁹ και αποδόθηκε στην αύξηση των διαστάσεων των πόρων του ενδοθηλίου (stretched pore phenomenon), που αποδείχθηκε ότι ήταν άμεσα αναστρέψιμη μετά τη μείωση των αυξημένων πιέσεων⁸⁰. Η μεγάλη διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ των ειδών στην ανεπάρκεια των τριχοειδών⁷⁹ (τα κουνέλια είναι πιο ευαίσθητα από τα σκυλιά και αυτά με τη σειρά τους από τα άλογα), το γεγονός ότι η ανεπάρκεια αυτή φαίνεται να παραμένει σταθερή και να μην επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου, αλλά και ο σχεδιασμός των μελετών (οι περισσότερες αφορούν στατική και όχι περιοδική έκπτυξη του πνευμονικού παρεγχύματος), δυσκολεύουν την αποτίμηση του φαινομένου του stress failure. Η συμμετοχή του stress failure στη βλάβη που προκαλεί το μηχανικό τραύμα πρέπει να θεωρείται δεδομένη, χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες για να δείξουν κατά πόσο η συμμετοχή αυτή είναι σημαντική κατά τη διάρκεια του συνήθους μηχανικού αερισμού του παθολογικού πνεύμονα.



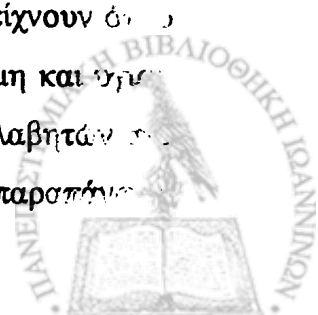
Β.Βιοτραύμα

Οι μορφές της πνευμονικής βλάβης που περιγράφηκαν παραπάνω προκαλούνται από την άμεση μηχανική καταπόνηση του πνευμονικού παρεγχύματος από την πίεση και τον όγκο. Την τελευταία δεκαετία όμως, έχει συγκεντρωθεί ένας σημαντικός όγκος πειραματικών δεδομένων που υποστηρίζουν ότι εκτός από τη άμεση μηχανική βλάβη, ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας πρόκλησης πνευμονικής βλάβης από το μηχανικό αερισμό μπορεί να έχει φλεγμονώδη και κυτταρική αιτιολογία. Η βλάβη που προκαλείται από φλεγμονώδεις και κυτταρικούς μηχανισμούς περιγράφεται με τον όρο βιολογικό τραύμα ή βιοτραύμα (biotrauma)⁸¹.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανικός αερισμός πνευμόνων προϋπάρχουσα βλάβη μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη, η οποία έχει φλεγμονώδη αιτιολογία. Σε μια από τις πρώτες εργασίες που το τεκμηρίωσα, ο Kawano⁸² μελέτησε μηχανικά αεριζόμενα κουνέλια, τα οποία είχαν υποστεί εκτεταμένη βρογχοκυψελιδική έκλυση προκειμένου να απομακρυνθεί επιφανειοδραστικός παράγοντας. Διαπίστωσε ότι τα κουνέλια ανέπτυξαν σε ελαφρώς υποξαιμία, ενώ η παθολογοανατομική εικόνα των πνευμόνων τους χαρακτηριζόταν από εκτεταμένη ουδετεροφιλική διήθηση. Στα κουνέλια, στα οποία τα ουδετερόφιλα μειώθηκαν με τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων (nitrogen mustard) πριν τη βρογχοκυψελιδική έκλυση, η οξυγόνωση αλλά και η παθολογοανατομική εικόνα ήταν ιδιαίτερα βελτιωμένη. Με βάση τα παραπάνω ο Kawano συμπέρανε ότι οι μεσολαβητές που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της πνευμονικής βλάβης από τον αναπνευστήρα.

Σε εργασία της ίδιας ομάδας σε ένα παρόμοιο μοντέλο πνευμονικής βλάβης μετά από έκλυση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο Imai⁸³ διαπίστωσε συμβατικός μηχανικός αερισμός συνοδευόταν από σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις μεσολαβητών (μεταξύ των οποίων και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων-PAF αλλά και η θρομβοξανή B₂) στο βρογχοκυψελιδικό έκλυμα, σε σχέση με τον αερισμό υψηλής συχνότητας. Ανάλογα αποτελέσματα για τον PAF διαπιστώθηκαν και με πρόωρους μπαμπούνους⁸⁴.

Την τελευταία πενταετία υπάρχουν πειραματικά στοιχεία που δείχνουν ότι ο συμβατικός μηχανικός αερισμός όχι μόνο των παθολογικών, αλλά ακόμη και των υγιών πνευμόνων μπορεί να προκαλέσει αύξηση στην συγκέντρωση των μεσολαβητών στο βρογχοκυψελιδικό έκλυμα. Σε μια χαρακτηριστική επίδειξη των παραπάνω

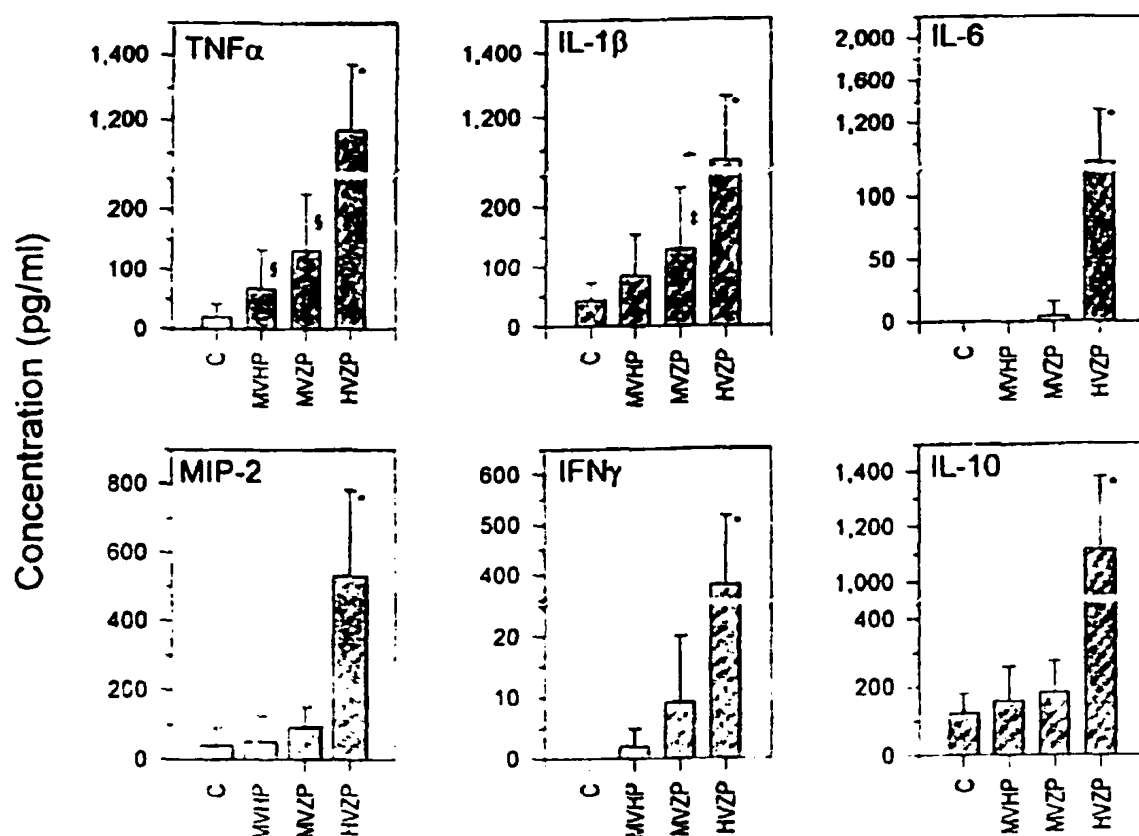


Tremblay⁸⁵ χρησιμοποίησε ένα μοντέλο απομονωμένου, μη αιματούμενου πνεύμονα ποντικού, το οποίο αέρισε με 4 διαφορετικούς τρόπους. Συγκεκριμένα δοκίμασε αερισμό με σχετικά υψηλούς όγκους (40ml/kg) τον οποίο συνδύασε με υψηλή (10 cmH₂O) και μηδενική PEEP και αερισμό με σχετικά χαμηλούς όγκους (7ml/kg) τον οποίο συνδύασε με υψηλή (10 cmH₂O) και μέτρια PEEP (3 cmH₂O-ομάδα ελέγχου). Όπως φαίνεται (σχήμα 1.7) ο αερισμός με υψηλούς όγκους και μηδενική PEEP αποδείχθηκε ιδιαίτερα τραυματικός, μια και όλοι οι μεσολαβητές που μελετήθηκαν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση. Αύξηση παρατηρήθηκε και στις υπόλοιπες ομάδες, όχι όμως στο βαθμό που παρατηρήθηκε στην προαναφερθείσα. Ο ομοιόμορφος τρόπος μεταβολής όλων των μεσολαβητών που μελετήθηκαν δείχνει ότι ο συνδυασμός υψηλών όγκων-μηδενικής PEEP είναι μακράν ο πιο τραυματικός, ακολουθούμενος από το συνδυασμό μετρίων όγκων-μηδενικής PEEP. Θα πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι οι ακραίες συνθήκες (40ml/kg) που χρησιμοποιήθηκαν στο παραπάνω μοντέλο, προκαλούν το θάνατο σε λιγότερο από μία ώρα όταν εφαρμόζονται σε άθικτα ποντίκια.

Η μεταβολή των κυτοκινών στην παραπάνω εργασία συνοδεύτηκε από αύξηση του c-fos mRNA, ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόωπη αντίδραση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων (early response gene), συμπεριλαμβανομένης και της υπερέκτασης (stretching) των κυττάρων. Η υπερέκταση των A549 κυττάρων, μιας ανθρώπινης σειράς τύπου II κυψελιδικών κυττάρων, προκάλεσε την απελευθέρωση IL-8⁸⁶, ενώ ανοσοϊστοχημικές μελέτες δείχνουν ότι το επιθήλιο των αεραγωγών, αλλά και το κυψελιδικό μπορεί να παράγουν κυτοκίνες⁸⁷. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν ότι και στο πνευμονικό παρέγχυμα παρατηρείται το φαινόμενο της μηχανομετατροπής (mechanotransduction), της μετατροπής δηλαδή των μηχανικών παραμορφώσεων κυττάρων ή υποδοχέων σε ενδοκυττάρια μηνύματα⁸⁸.

Το φαινόμενο της μηχανομετατροπής έχει περιγραφεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα⁸⁹, στα μυοκαρδιακά κύτταρα⁹⁰, στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων⁹¹ και στα οστά⁹². Ο τρόπος με τον οποίο αποκωδικοποιούνται τα μηχανικά μηνύματα δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως. Από τους πολλούς μηχανισμούς που έχουν προταθεί⁹³, τα κανάλια ιόντων που ενεργοποιούνται με τη διάταση (stretch activated ion channels)⁹⁴ και η σύνδεση του εξωκυττάριου υλικού με τον κυτταρικό σκελετό μέσω των ιντεγκρινών (extracellular matrix-integrin-cytoskeleton pathway)⁹⁵ έχουν αποσπάσει την περισσότερη προσοχή.





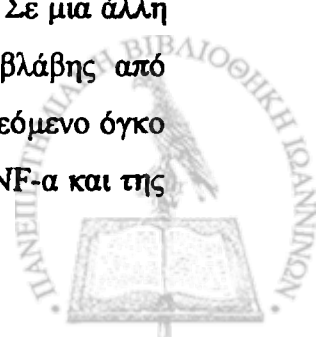
Σχήμα 1.7. Συγκέντρωση κυτοκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα απομονωμένου, μη αιματούμενου πνεύμονα ποντικού μετά από 2 ώρες μηχανικού αερισμού με 4 διαφορετικές μεθόδους αερισμού. Control: $V_T=7\text{ml/kg}$, $PEEP=3\text{ cmH}_2\text{O}$, MVHP= μέτριοι όγκοι (15ml/kg) και υψηλή PEEP ($10\text{ cmH}_2\text{O}$), MVZP=μέτριοι όγκοι (15ml/kg) και μηδενική PEEP, HVZP= υψηλοί όγκοι (40ml/kg) και μηδενική PEEP.

Η συμμετοχή των φλεγμονωδών κυτοκινών στην πορεία της προκαλούμενης από τον αναπνευστήρα πνευμονικής βλάβης δείχθηκε από τον Narimanbekov⁹⁶, ο οποίος αέρισε για 8 ώρες κουνέλια με μέγιστη πίεση $24\text{ cmH}_2\text{O}$, στα οποία είχε εκπλυθεί ο επιφανειοδραστικός παράγοντας. Η χορήγηση ανασυνδυασμένου ανταγωνιστή των υποδοχέων της IL-1 (IL-1ra) συνοδεύτηκε από μείωση της βλάβης που προκάλεσε ο αερισμός. Τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε ο IL-1ra είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλβουμίνης και ελαστάσης στο βρογχοκυψελιδικό τους έκπλυμα και λιγότερη ουδετεροφιλική διήθηση στον πνευμονικό ιστό.

Ο Takata⁹⁷ έδειξε ότι ο συμβατικός αερισμός κουνελιών στα οποία είχε εκπλυθεί ο επιφανειοδραστικός παράγοντας για μία ώρα, με μέγιστη πίεση 28 cmH₂O και τελοεκπνευστική 5 cmH₂O (που προκαλούσε μια μέση πίεση αεραγωγών 13 cmH₂O), συνοδεύτηκε από μεγάλη αύξηση του TNF-α mRNA των κυψελιδικών κυττάρων. Ο αερισμός με υψηλή συχνότητα με την ίδια μέση πίεση αεραγωγών και για την ίδια χρονική διάρκεια προκάλεσε ελάχιστη αύξηση του TNF-α mRNA των κυψελιδικών κυττάρων.

Η παρουσία των μεσολαβητών στον πνεύμονα συνδυάζεται πάντα με ουδετεροφιλική διήθηση, η οποία αποτελεί μόνιμο χαρακτηριστικό του VILI. Εκτός όμως από τα πολυμορφοπύρρηνα και τα κυψελιδικά μακροφάγα μπορεί να συμμετέχουν στην παθογένεση της βλάβης. Η σημασία των κυψελιδικών μακροφάγων στην πρόκληση της βλάβης δείχθηκε από τον Rugin⁹⁸, σε ένα μοντέλο τεχνητού πνεύμονα το οποίο αποτελούνταν από μια διατατή πλαστική μεμβράνη. Στην μεμβράνη αυτή καλλιεργήθηκαν απομονωμένες πνευμονικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες υποβλήθηκαν σε παρατεταμένη κυκλική έκπτυξη, ανάλογη με αυτή που προκαλεί στα κύτταρα ο μηχανικός αερισμός. Η επιμήκυνση της αρχικής διαμέτρου των κυττάρων κατά 7%, που συνοδεύτηκε από αύξηση της επιφάνειας κατά 12%, προκάλεσε την αυξημένη έκκριση IL-6, IL-8 και μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (matrix metalloproteinase-9), κατ' αποκλειστικότητα σχεδόν από τα κυψελιδικά μακροφάγα.

Η συμμετοχή των κυτοκινών και η πυροδότηση φλεγμονωδών μηχανισμών στην πρόκληση της πνευμονικής βλάβης από το μηχανικό αερισμό έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, που δεν περιορίζεται στον πνεύμονα. Το ερώτημα κατά πόσον η φλεγμονώδης αντίδραση στον πνεύμονα μπορεί να πυροδοτήσει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση είναι αναμενόμενο από φυσιολογική άποψη, μια και ο πνεύμονας υποδέχεται το σύνολο της καρδιακής παροχής, ενώ πάνω από το ένα τρίτο των ουδετερόφιλων που βρίσκονται στην περιφέρεια (εκτός του μυελού των οστών) εντοπίζεται στον πνεύμονα. Σε μια πρόσφατη μελέτη ο von Bethman⁹⁹ χρησιμοποίησε έναν απομονωμένο αιματούμενο πνεύμονα ποντικού, τον οποίο αέρισε με 'φυσιολογικές' (10 cmH₂O) και 'υψηλές' (25 cmH₂O) διαπνευμονικές πιέσεις και διαπίστωσε ότι η χρησιμοποίηση 'υψηλών' πιέσεων και η υπερδιάταση συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση του TNF-α και της IL-6 στο αίμα. Σε μια άλλη μελέτη ο Chiumello¹⁰⁰ χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο πνευμονικής βλάβης από εισρρόφηση οξέος, έδειξε ότι ο αερισμός ποντικών για 4 ώρες με αναπνεόμενο όγκο 16ml/kg, αλλά χωρίς PEEP, συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση του TNF-α και της

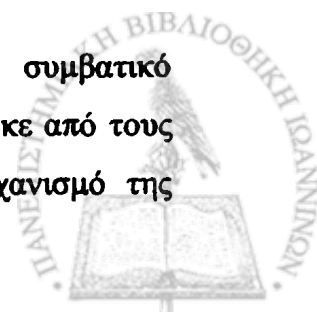


φλεγμονώδους πρωτεΐνης των μακροφάγων (macrophage inflammatory protein) MIP-2 στον ορό, γεγονός που δεν συνέβη όταν ο ίδιος αναπνεόμενος όγκος συνδυάστηκε με PEEP 5 cmH₂O. Οι δύο παραπάνω εργασίες δείχνουν ενδεικτικά ότι τόσο η υπερδιάταση, όσο και η επαναλαμβανόμενη σύγκλειση και διάνοιξη των κυψελίδων, εκτός από την τοπική βλάβη που προκαλούν, μπορεί να συνοδεύονται από απώλεια της διαμερισματοποίησης της φλεγμονώδους αντίδρασης στον πνεύμονα και σημαντική αύξηση των κυτοκινών στην κυκλοφορία.

Η παρουσία των φλεγμονωδών μεσολαβητών στη συστηματική κυκλοφορία έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας και shock^{101,102,103}. Η υπόθεση ότι η τοπική παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών στον πνεύμονα λόγω του μηχανικού αερισμού, στο βαθμό που συνοδεύεται από την είσοδό τους στη συστηματική κυκλοφορία, μπορεί να πυροδοτήσει ή να ευνοήσει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, είναι μια υπόθεση με εξαιρετικό κλινικό ενδιαφέρον¹⁰⁴, η τεκμηρίωση της οποίας παρουσιάζει τεράστιες μεθοδολογικές δυσκολίες. Η διαπίστωση ότι το μεγαλύτερο μέρος της θνητότητας των ασθενών με ARDS¹⁰⁵, οφείλεται στην πολυοργανική ανεπάρκεια και όχι σε αναπνευστικούς λόγους έρχεται να ενισχύσει αυτήν την υπόθεση.

Η οξεία πνευμονική βλάβη μπορεί να προκληθεί από ένα πλήθος παραγόντων που προσβάλλουν άμεσα (π.χ. εισρρόφηση, πνευμονική λοίμωξη) ή έμμεσα (π.χ. σήψη, έγκαιμα, τραύμα) τον πνεύμονα. Ο μηχανικός αερισμός, όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα¹⁰⁶, μπορεί να ανήκει στους παράγοντες αυτούς. Κλινικά στοιχεία δείχνουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού και κυτοκινών στο αίμα ασθενών με πολυοργανική ανεπάρκεια εντοπίζονται αμέσως μετά το πιο προσβεβλημένο όργανο και στους ασθενείς με ARDS οι συγκεντρώσεις της IL-1β και της IL-6 ήταν υψηλότερες στο αρτηριακό αίμα που ελήφθη με καθετήρα Swan-Ganz σε σχέση με το μικτό φλεβικό¹⁰⁷. Το στοιχείο αυτό δείχνει ότι η οξεία πνευμονική βλάβη προκαλεί την έγχυση κυτοκινών στη συστηματική κυκλοφορία. Τα υψηλά επίπεδα TNF-α, IL-1β, IL-6 και IL-8 έχουν συνδυασθεί με δυσμενείς προοπτικές επιβίωσης σε ασθενείς με ARDS¹⁰⁸. Δυστυχώς δεν υπάρχουν μεγάλες προτυποποιημένες κλινικές μελέτες που να εξετάζουν τη σύνδεση της προκαλούμενης από τον αναπνευστήρα πνευμονικής βλάβης και της πολυοργανικής ανεπάρκειας.

Ένας άλλος μηχανισμός που θα μπορούσε να συνδέσει το συμβατικό μηχανικό αερισμό και τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση προτάθηκε από τους Nahum και Marini¹⁰⁹ και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το μηχανισμό της



διαπίδυσης μικροβίων από το έντερο (bacterial translocation). Η έγχυση *Escherichia Coli* στους πνεύμονες μηχανικά αεριζόμενων σκύλων συνοδεύτηκε από αυξημένη επίπτωση βακτηριαμίας, όταν χρησιμοποιήθηκαν στρατηγικές μηχανικού αερισμού με χαμηλή PEEP (3 cmH₂O) και υψηλή διαπνευμονική πίεση (35 cmH₂O), σε σχέση με λιγότερο τραυματικές στρατηγικές, που χρησιμοποιούσαν την ίδια διαπνευμονική πίεση αλλά υψηλότερη PEEP (10 cmH₂O) ή μικρότερη διαπνευμονική πίεση (15 cmH₂O).

Συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη- Στοιχεία από κλινικές μελέτες και θέσεις ομοφωνίας

Η συγκέντρωση των πειραματικών στοιχείων που αναφέρθηκαν παραπάνω, απεικονιστικές μελέτες, κάποιες πρώιμες μη προτυποποιημένες κλινικές μελέτες και βεβαίως η βελτίωση των τεχνολογικών μέσων που διαθέτουμε ήρθαν να μεταβάλλουν ριζικά τον τρόπο με τον οποίο αντιμετωπίζουμε σήμερα τον μηχανικά αεριζόμενο ασθενή.

Η εξέλιξη της κλινικής σκέψης ακολούθησε όπως ήταν φυσικό τα πειραματικά αποτελέσματα και ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 80 άρχισε να εξετάζεται η ανάγκη ελέγχου του τελοεισπνευστικού όγκου, της υπερδιάτασης και του βολοτραύματος, αντί για το βαρότραυμα¹¹⁰. Η ανομοιογένεια της βλάβης στο ALI και στο ARDS ήταν άλλο ένα σημαντικό στοιχείο που τεκμηριώθηκε με τις φυσιολογικές και τις απεικονιστικές μελέτες του Gattinoni¹¹¹. Η διαπίστωση ότι στον ίδιο πνεύμονα μπορεί να συνυπάρχουν ανοιχτές κυψελίδες, κυψελίδες δυνητικά επιστρατεύσιμες, αλλά και κλειστές κυψελίδες που δεν ανταποκρίνονται καθόλου στις μεταβολές της χορηγούμενης πίεσης, έδειξε ότι η ενιαία προσέγγιση του αναπνευστικού συστήματος στο σύνολό του, είχε σοβαρότατους περιορισμούς. Η νέα προσέγγιση βασίστηκε στην έννοια του 'baby lung', του μικρού δηλαδή ποσοστού του συνολικού πνευμονικού παρεγχύματος που μπορεί να υποδέχεται τον αναπνεόμενο όγκο και η προστασία του οποίου από ενδεχόμενη υπερδιάταση αποτελεί απόλυτη προτεραιότητα κατά το χειρισμό του μηχανικά αεριζόμενου ασθενή με ALI/ARDS.

Προκειμένου να αποφευχθεί η υπερδιάταση εγκαταλείφθηκε η προσήλωση στην επίτευξη φυσιολογικών τιμών αερίων αίματος και εισήχθη η έννοια της



επιτρεπόμενης υπερκαπνίας (permissive hypercapnia), όπου βέβαια το επέτρεπε η γενική κατάσταση των ασθενών. Στην πρώτη κλινική μελέτη (αναδρομική, μη προτυποποιημένη) το 1990 ο Hickling¹¹² αναφέρει ευνοϊκά αποτελέσματα στην επιβίωση των ασθενών με ARDS που αερίζονταν με χαμηλούς αναπνεόμενους όγκους και επιτρεπόμενη υπερκαπνία, συγκρίνοντας την επιβίωση των ασθενών του με την προβλεπόμενη από το Apache II. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρει το 1991 και ο Suchyta¹¹³.

Τον Ιανουάριο του 1993 διοργανώνεται στο Illinois μια κοινή διάσκεψη της European Society of Intensive Care Medicine, του American College of Chest Physicians και της Society of Critical Care Medicine με κύριο θέμα το μηχανικό αερισμό και την αντιμετώπιση της οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας^{114,115}. Αν και η διάσκεψη επισήμανε την έλλειψη διπλών τυφλών μελετών που θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν την κλινικό γιατρό και να εγγυηθούν με απόλυτο τρόπο το κλινικό όφελος και προσέγγισε περισσότερο από τη σκοπιά της φυσιολογίας τη μηχανική αναπνοή, έδωσε για πρώτη φορά σαφείς και επαρκώς θεμελιωμένες θέσεις ομοφωνίας για το μηχανικό αερισμό. Η αποφυγή της συνδεόμενης με τον αναπνευστήρα βλάβης δεν περιλαμβάνεται επισήμως στους φυσιολογικούς και κλινικούς στόχους του μηχανικού αερισμού, αλλά η αποφυγή της υπερδιάτασης και ο έλεγχος των τελοεισπνευστικών πιέσεων ($P_{plateau} < 35 \text{ cmH}_2\text{O}$) διατυπώνεται με σχεδόν απόλυτο τρόπο.

Η απόδειξη ότι η επαρκής PEEP μειώνει το ποσοστό του πνευμονικού παρεγχύματος που υφίσταται φασική διάνομιση και σύγκλειση κατά τη διάρκεια της μηχανικής αναπνοής σε ασθενείς με ARDS¹¹⁶, σε συνδυασμό με τα πειραματικά στοιχεία που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο του ατελεκτατικού τραύματος, οδήγησαν στη συνειδητοποίηση της ανάγκης ελέγχου του τελοεκπνευστικού όγκου, με εφαρμογή PEEP μεγαλύτερης από το κατώτερο σημείο καμπής (lower inflection point). Αντίστοιχα και όσον αφορά τον τελοεισπνευστικό όγκο, αποδείχθηκε και κλινικά ότι η κίνηση του αναπνεόμενου όγκου πάνω από το ανώτερο σημείο καμπής (upper inflection point) συνοδευόταν από απεικονιστικά εμφανή υπερδιάταση¹¹⁷. Η ανάγκη κίνησης του αναπνεόμενου όγκου στο ευθύ τμήμα της καμπύλης πίεσης όγκου, μεταξύ των δύο σημείων που προαναφέρθηκαν δεν είναι πάντα εύκολη υπόθεση μια και πολύ συχνά σε περιπτώσεις ALI και ARDS το τμήμα αυτό είναι ιδιαίτερα βραχύ¹¹⁸. Η μόνη λύση στην περίπτωση αυτή είναι η εφαρμογή PEEP μεγαλύτερης από το κατώτερο σημείο καμπής και η χρησιμοποίηση χαμηλών

αναπνεόμενων όγκων. Ο Roupie¹¹⁹ υπολόγισε ότι για να εξασφαλισθεί η κίνηση του αναπνεόμενου όγκου στο ευθύ τμήμα της καμπύλης πίεσης όγκου στο 100% των ασθενών με ARDS, πρέπει ο αναπνεόμενος όγκος να μην υπερβαίνει τα 5,5ml/kg.

Η διάσκεψη ομοφωνίας για το ARDS που οργάνωσε το 1998 η American Thoracic Society και η European Society of Intensive Care Medicine¹²⁰ υιοθέτησε πολλά σημεία της προβληματικής που αναπτύσσεται παραπάνω. Η αποφυγή της επέκτασης της πνευμονικής βλάβης λόγω των τραυματικών χαρακτηριστικών του μηχανικού αερισμού καταγράφεται πλέον σαν ένας από τους κύριους στόχους της μηχανικής υποστήριξης, ενώ η ελαχιστοποίηση των πιέσεων των αεραγωγών και η αποφυγή της περιοδικής διάνοιξης και σύγκλεισης καταγράφονται πλέον σαν κλινικές συστάσεις. Η έλλειψη κλινικών μελετών δεν επέτρεψε την περαιτέρω εξειδίκευση της παραπάνω προσέγγισης, αλλά η διάσκεψη έθεσε πλήθος κλινικών ερωτημάτων που θέτουν τα πειραματικά δεδομένα και τις ερευνητικές κατευθύνσεις που πρέπει να ακολουθηθούν.

Τον Οκτώβριο του 1998 οι ίδιες εταιρείες οργάνωσαν στο Τορόντο μια διεθνή διάσκεψη ομοφωνίας για τη συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα βλάβη στο ARDS¹²¹. Η διάσκεψη επαναξιολόγησε τα πειραματικά στοιχεία που αφορούν την προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα πνευμονική βλάβη, επισημαίνοντας την μεγάλη προσοχή που απαιτείται στην υιοθέτηση των όποιων αποτελεσμάτων των ζωικών μοντέλων. Αναγνώρισε τη σημασία αλλά και τις μεθοδολογικές δυσκολίες πραγματοποίησης και ερμηνείας της καμπύλης πίεσης όγκου. Επισήμανε την αδυναμία σχεδιασμού κλινικών ερευνών που θα ελέγχουν αυτόνομα τους πιθανολογούμενους παράγοντες κινδύνου και την αδυναμία καθορισμού κάποιων δεικτών διάγνωσης και παρακολούθησης της βλάβης. Η πραγματοποίηση 5 προτυποποιημένων κλινικών ερευνών την τελευταία διετία (1998-2000) με αντικείμενο το μηχανικό αερισμό στην οξεία πνευμονική βλάβη, στα στοιχεία των οποίων είχαν πρόσβαση οι συμμετέχοντες, τους οδήγησε στην πιο εμπειριστατωμένη διατύπωση των ίδιων περίπου κλινικών οδηγιών με την προηγούμενη διάσκεψη, με μόνη ίσως διαφορά την αυξημένη έμφαση που δόθηκε στο βολότραυμα. Τα στοιχεία των ερευνών αυτών παρουσιάζονται στην συνέχεια. Τέλος η διάσκεψη επισήμανε την ενδεχόμενη σημασία χειρισμών όπως η πρηνής θέση και ο αερισμός με υψηλή συχνότητα στην προσπάθεια αποφυγής της συνδεόμενης με τον αναπνευστήρα πνευμονικής βλάβης.

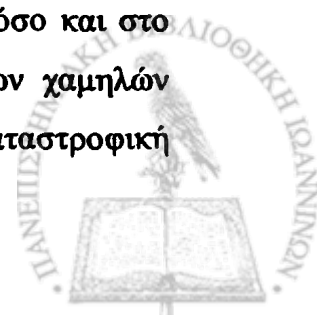


Ο Amato¹²², παρουσιάζοντας την πρώτη προτυποποιημένη μελέτη για το μηχανικό αερισμό στην οξεία πνευμονική βλάβη, μελέτησε 53 ασθενείς με πρώιμο ARDS. Οι μισοί αερίστηκαν με αναπνεόμενο όγκο 12ml/kg και τη μικρότερη δυνατή PEEP που εξασφάλιζε επαρκή οξυγόνωση (συμβατική μέθοδος), ενώ οι άλλοι μισοί με 6ml/kg, οδηγό πίεση 20 cmH₂O και PEEP 2 cmH₂O πάνω από το κατώτερο σημείο καμπής ('προστατευτική' μέθοδος). Η 'προστατευτική' μέθοδος συνοδεύτηκε από αυξημένη επιβίωση στις 28 ημέρες, καλύτερο ποσοστό απογαλακτισμού και μικρότερη επίπτωση βαροτραύματος.

Ο Brochard¹²³ μελέτησε 116 ασθενείς με ARDS σε μια πολυκεντρική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 25 κέντρα. Συγκρίθηκε μια στρατηγική μηχανικού αερισμού που περιόριζε την τελοεισπνευστική πίεση στα 25cm H₂O και επέτρεπε την υπερκαπνία, με μια πιο συμβατική που κρατούσε την τελοεισπνευστική πίεση κάτω από 35 cmH₂O και στόχευε τη νορμοκαπνία. Ο μέσος αναπνεόμενος όγκος στην πρώτη περίπτωση ήταν 7ml/kg και στη δεύτερη 10ml/kg. Ίσως λόγω αυτής της μικρής διαφοράς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην επιβίωση την 60η ημέρα, στη διάρκεια του μηχανικού αερισμού, στην επίπτωση του πνευμοθώρακα και στην ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας.

Ο Stewart¹²⁴ μελέτησε 120 ασθενείς με οξεία πνευμονική βλάβη. Από το πρώτο 24ωρο του μηχανικού αερισμού οι ασθενείς αερίζονταν είτε με αναπνεόμενους όγκους 7ml/kg (και PEEP 9 cmH₂O), είτε με 11ml/kg (και PEEP 7 cmH₂O). Δεν διαπιστώθηκε διαφορά στη θνητότητα, ενώ η υποομάδα των χαμηλών όγκων είχε αυξημένο ποσοστό επιπλοκών. Ο Brower¹²⁵ μελέτησε 52 ασθενείς από 8 κέντρα, αερίζοντας τους μισούς με χαμηλούς όγκους (7ml/kg) σε σχέση με τους υπόλοιπους (11ml/kg), χωρίς να καταδεικνύει σημαντικές διαφορές.

Η μεγάλη πολυκεντρική έρευνα που διοργάνωσε το NIH¹²⁶ ήρθε να διαλύσει τις αμφισβητήσεις που είχαν προκαλέσει οι προηγούμενες έρευνες, είτε λόγω ανεπαρκούς σχεδιασμού, είτε λόγω μικρού δείγματος. Η έρευνα συνέκρινε ένα παραδοσιακό μοντέλο αερισμού της οξείας πνευμονικής βλάβης που περιλάμβανε αναπνεόμενους όγκους 12 ml/kg, με ένα άλλο που χρησιμοποιούσε χαμηλότερους όγκους (6ml/kg) και λίγο υψηλότερη PEEP. 861 ασθενείς μελετήθηκαν, πριν η μελέτη διακοπεί μια και υπήρχε μεγάλη διαφορά τόσο στη θνητότητα όσο και στο ποσοστό αποδέσμευσης από τον αναπνευστήρα υπέρ της ομάδας των χαμηλών όγκων. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν με εντυπωσιακό τρόπο την καταστροφική



επίδραση των υψηλών όγκων επιβεβαιώνοντας τα πειραματικά δεδομένα από τα ζωικά μοντέλα.

Σε μια πρόσφατη προτυποποιημένη μελέτη ο Ranieri¹²⁷ μελέτησε 44 ασθενείς με ARDS, οι μισοί από τους οποίους αερίστηκαν με βάση την καμπύλη πίεσης όγκου (αναπνεόμενος όγκος 8ml/kg, PEEP 15 cmH₂O), ενώ οι άλλοι μισοί συμβατικά με αναπνεόμενους όγκους και PEEP που εξασφάλιζαν νορμοκαπνία και την καλύτερη δυνατή οξυγόνωση αντίστοιχα (αναπνεόμενος όγκος 11ml/kg, PEEP 7 cmH₂O). Οι ασθενείς που αερίστηκαν συμβατικά είχαν στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αυξημένες συγκεντρώσεις IL-1β, IL-6, IL-1 και TNF-α και στο πλάσμα αυξημένες συγκεντρώσεις TNF-α σε σύγκριση με την ομάδα των χαμηλών όγκων, στοιχείο που δείχνει, ότι όπως και στα πειραματικά μοντέλα, εκτός από το μηχανικό και το βιολογικό τραύμα αποτελεί τμήμα της συνδεόμενης με τον αναπνευστήρα πνευμονικής βλάβης. Εξακολουθούν βέβαια να χρειάζονται πολλές προτυποποιημένες μελέτες για να αποτυπωθεί η κλινική σημασία της συνδεόμενης με τον αναπνευστήρα βλάβης στην οξεία πνευμονική βλάβη και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όσο και στις περιπτώσεις που αερίζονται πνεύμονες χωρίς προϋπάρχουσα βλάβη.

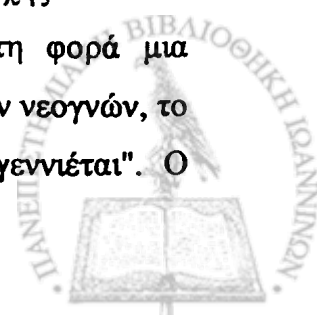


2. Επιφανειοδραστικός παράγοντας

Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία του επιφανειοδραστικού παράγοντα και της μηχανικής αναπνοής είναι παράλληλη και συνδεδεμένη. Το 1774 ο Joseph Priestley στην προσπάθειά του να απομονώσει διάφορα αέρια από το οξείδιο του υδραργύρου, απομονώνει το οξυγόνο¹²⁸ και δύο χρόνια αργότερα ένας σκοτσέζος χειρουργός, ο John Hunter, προτείνει τη χρήση του για τον αερισμό των ασθενών με φουσερό¹²⁹, που αντιστοιχούσε στην αμυα της εποχής. Η σημασία της ανακάλυψης του Priestley έγινε αντιληπτή από το διάσημο γάλλο χημικό Antoine Lavoisier, ο οποίος έδωσε και στο οξυγόνο το όνομά του. Στο περίφημο έργο του "Traite Elementaire de Chimie", που εκδόθηκε το 1789, ο Lavoisier θεωρεί ότι "το οξυγόνο τροφοδοτεί όλες τις μεταβολικές αντιδράσεις του οργανισμού"¹³⁰. Σε συνεργασία με το φίλο του Pierre Simon de Laplace, διάσημο μαθηματικό, φυσικό και αστρονόμο της εποχής κατασκεύασαν ένα θερμιδόμετρο προκειμένου να αποδείξουν την "αναλογία αερισμού και αναπνοής"¹³¹. Λίγα χρόνια αργότερα ο Laplace¹³² στο πεντάτομο έργο του "Traite de Mecanique Celeste" διατυπώνει τη μαθηματική σχέση μεταξύ της αναπτυσσόμενης δύναμης, της επιφανειακής τάσης και της ακτίνας της καμπύλης (νόμος του Laplace), που είναι απαραίτητη για την κατανόηση της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο τοίχωμα της κυψελίδας.

Η πολιτικά ταραγμένη εποχή, θύμα της οποίας υπήρξε τελικά και ο Laplace (αποκεφαλίστηκε το 1794), που οδήγησε στην επιβολή του Ναπολέοντα άνοιξε νέους δρόμους για την ανάπτυξη της ιατρικής έρευνας της εποχής. Η παθολογοανατομική εξέταση, η εξέταση του αίματος, η είσοδος της χημείας στην ιατρική, η σύνδεση της παθολογίας με τη χειρουργική που μέχρι τότε ασκούνταν στα κουρεία, ήταν μερικές από τις προόδους που επέφερε η άρση θρησκευτικών περιορισμών αιώνων. Η δοκιμασία επίπλευσης (floating test) επανεισήχθη στην ιατροδικαστική πρακτική της εποχής, προκειμένου να διαπιστωθεί αν ένα νεογνό είχε πεθάνει πριν ή μετά τη γέννησή του και η "ατελεκτασία" μπήκε στην ιατρική ορολογία της εποχής. Το 1835 ο γερμανός γυναικολόγος Eduard Jorg¹³³ δημοσιεύει για πρώτη φορά μια εκτεταμένη μονογραφία για το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών, το οποίο επιτυχημένα αποκαλεί "εμβρυϊκό πνεύμονα στο μωρό που γεννιέται". Ο



Virchow¹³⁴ είναι ο πρώτος που βλέπει τις κυψελίδες στο μικροσκόπιο και ονομάζει μυελίνη μια ουσία που βλέπει μέσα σε αυτές και που βάφεται μπλε με την αιματοξυλίνη, αλλά η πρώτη σωστή παθολογοανατομική περιγραφή της υαλίνης μεμβράνης στα νεογνά έγινε από τον Hochheim¹³⁵ το 1903, ο οποίος πίστευε ότι η μεμβράνη αυτή αποτελούσε αποτέλεσμα εισρρόφησης του αμνιακού υγρού. Η γερμανόγλωσση αναφορά πέρασε εν πολλοίς απαρατήρητη και η υαλίνη μεμβράνη στα πρόωρα νεογνά "ξαναανακαλύφτηκε" από τους Farber και Sweet¹³⁶ το 1931.

Η θεωρία των επιφανειακών δυνάμεων που διατυπώθηκε το τέλος του 19ου αιώνα από το λόρδο Rayleigh¹³⁷, ο οποίος για αυτήν την εργασία του τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1904, ήταν αυτή στην οποία στηρίχθηκε ο σουηδός φυσιολόγος Kurt von Neergard, ο οποίος το 1929 στο κλασσικό του άρθρο "Νέες σκέψεις για μια βασική αρχή της μηχανικής της αναπνοής. Οι δυνάμεις επαναφοράς του πνεύμονα εξαρτώνται από την επιφανειακή τάση των κυψελίδων" αναγνώρισε τη σημασία του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μηχανική της αναπνοής¹³⁸. Ο von Neergard μελέτησε πνεύμονες σκύλων και χοίρων και υπολόγισε τις καμπύλες πίεσης-όγκου σε διαφορετικές κάθε φορά καταστάσεις. Συνειδητοποίησε την κλινική σημασία της ανακάλυψής του γράφοντας: "Η σημαντική δύναμη της επιφανειακής τάσης, η οποία στη συνέχεια είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο ποσοστό της πνευμονικής επαναφοράς, παρεμποδίζει την αρχική διάνοιξη των πνευμόνων". Το γεγονός ότι το παραπάνω άρθρο ήταν γραμμένο στα γερμανικά, αλλά και ότι ο von Neergard δεν ασχολήθηκε στη συνέχεια με τη μηχανική της αναπνοής, οδήγησε στην αγνόησή του για σχεδόν 20 χρόνια.

Το τέλος του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου και η προσπάθεια να προληφθούν, να διαγνωσθούν, αλλά και να αντιμετωπισθούν οι πνευμονικές βλάβες από τα χημικά αέρια ενθάρρυναν την έρευνα στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Το 1946 ο Macklin αναγνώρισε τα πνευμονοκύτταρα¹³⁹, το 1950 καθόρισε το μέγεθος τους¹⁴⁰, ενώ το 1954 σε ένα κλασσικό του άρθρο στο *Lancet* συνέδεσε τα πνευμονοκύτταρα με το φιλμ που επαλείφει τις κυψελίδες και μειώνει την επιφανειακή τάση¹⁴¹. Το 1956 ο Clements άρχισε ποσοτικές μελέτες προσπαθώντας να ποσοτικοποιήσει την επιφανειακή τάση με μια ειδική ζυγαριά¹⁴². Μελέτησε γάτες, ποντίκια και σκύλους και διαπίστωσε ότι η επιφανειακή τάση έπεφτε από 45dynes/cm σε λιγότερο από 10dynes/cm, όταν η επιφάνεια στην οποία απλωνόταν το μελετούμενο υλικό μειωνόταν στο 30% της αρχικής¹⁴³. Το 1959 η Mary Avery και ο Jere Mead δημοσίευσαν το άρθρο με το οποίο αποδεικνυόταν ότι η νόσος της υαλοειδούς

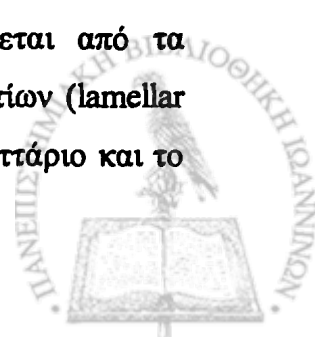


μεμβράνης οφείλεται σε διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα¹⁴⁴. Χρησιμοποιώντας μια ζυγαριά παρόμοια με αυτήν που είχε σχεδιάσει ο Clements μελέτησαν την επιφανειακή τάση σε νεογνά που πέθαναν από το σύνδρομο της υαλοειδούς μεμβράνης ή από άλλες αιτίες. Στα τελευταία η μέση επιφανειακή τάση ήταν 7 dynes/cm, ενώ στα νεογνά με το σύνδρομο της υαλοειδούς μεμβράνης ήταν 30 dynes/cm. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το σύνδρομο "συνδέεται με την απουσία ή την καθυστερημένη εμφάνιση ορισμένων ουσιών, οι οποίες φυσιολογικά επιτρέπουν την διατήρηση χαμηλής επιφανειακής τάσης στην εσωτερική επιφάνεια, όταν μειώνεται ο πνευμονικός όγκος".

Το 1961 ο Thannhauser¹⁴⁵ έδειξε ότι ο πνεύμονας περιέχει ασυνήθιστα υψηλά ποσά δυαλμιτικής λεκιθίνης (τώρα γνωστή σαν δυαλμιτική φωσφατιδυλοχολίνη-DPPC), ενώ το 1967 ο Gluck¹⁴⁶ έδειξε ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπινου πνεύμονα, η DPPC παράγεται και εκκρίνεται στο αμνιακό υγρό και το 1972 εισήγαγε την πρώτη δοκιμασία καθορισμού της εμβρυϊκής πνευμονικής ωριμότητας χρησιμοποιώντας το λόγο λεκιθίνης σφιγγομυελίνης στο αμνιακό υγρό¹⁴⁷. Στο ίδιο εργαστήριο ο Hallman το 1975 επισήμανε τη σημασία της φωσφατιδυλογλυκερόλης¹⁴⁸ και ο Jobe το 1976 έδειξε ότι τα πνευμονικά φωσφολιπίδια έχουν ένα κυψελιδικό και έναν ενδοκυττάριο χώρο κατανομής και καθόρισε την ημιζωή τους¹⁴⁹. Η αναγνώριση των πρωτεϊνών και του τρόπου αποθήκευσης και έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα^{150,151}, επισκιάστηκε από τη χορήγησή του αρχικά σε πειραματόζωα¹⁵² και για πρώτη φορά σε νεογνά το 1980 με εντυπωσιακά αποτελέσματα¹⁵³. Η πρώτη μεγάλη προτυποποιημένη κλινική έρευνα το 1985 κατέδειξε την αποτελεσματικότητα της χορήγησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη θεραπευτική αντιμετώπιση του συνδρόμου της αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών¹⁵⁴, ενώ η εισαγωγή της στη θεραπευτική των ενηλίκων αποτελεί ακόμη και σήμερα αντικείμενο έντονης συζήτησης και εξετάζεται στη συνέχεια.

Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας είναι ένα μίγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που επαλείφει την εσωτερική επιφάνεια των κυψελίδων. Συντίθεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II υπό τη μορφή των πολυστιβαδωτών σωματίων (lamellar bodies) και στη συνέχεια εκκρίνεται στον κυψελιδικό χώρο. Το ενδοκυττάριο και το



εξωκυττάριο διαμέρισμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν περίπου την ίδια σύνθεση. Αποτελούνται κατά 90% από λιπίδια και κατά 10% από πρωτεΐνες (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1:Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα	
Λιπίδια: 90%	
Φωσφολιπίδια	80-90%
PC	70-80%
PG, PI (όξινα φωσφολιπίδια)	10%
PS, PE, Sph	<5%
Ουδέτερα λιπίδια	10-20%
Πρωτεΐνες:10%	
SP-A	≈50%
SP-B	<1%
SP-C	<1%
SP-D	≈50%

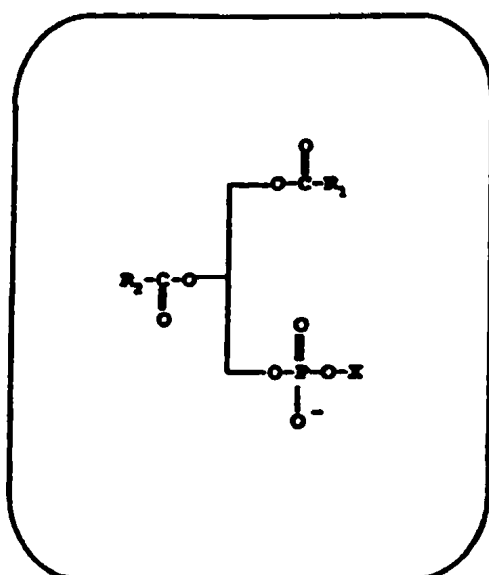
Λιπίδια

Από τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα το 80-90% είναι φωσφολιπίδια και το υπόλοιπο 10-20% ουδέτερα λιπίδια. Το κύριο φωσφολιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), που αποτελεί το 70-80% των φωσφολιπιδίων. Στα περισσότερα θηλαστικά τα διακυλογλυκεροφωσφολιπίδια συνδέονται με κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 1 και ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 (κορεσμένη/ακόρεστη μορφή). Η κύρια μορφή όμως με την οποία απαντάται η φωσφατιδυλοχολίνη στον ανθρώπινο επιφανειοδραστικό παράγοντα είναι η διπαλμιτική φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) (16:0/16:0), με παλμιτικό οξύ στη θέση R1 και R2, ενώ έχουν απομονωθεί και πολλές άλλες μορφές.

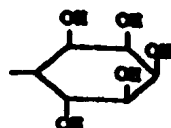
Υπάρχουν δύο δεξαμενές κορεσμένης φωσφατιδυλοχολίνης στον πνευμονικό ιστό, μία σχετιζόμενη με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα και μία όχι. Ήδη κατά την εγκυμοσύνη και πριν την εμφάνιση των τύπου II κυψελιδικών κυττάρων, 20% της συνολικής PC είναι κορεσμένη PC, κυρίως DPPC¹⁵⁵, που βρίσκεται κυρίως στις



Φωσφολιπίδιο

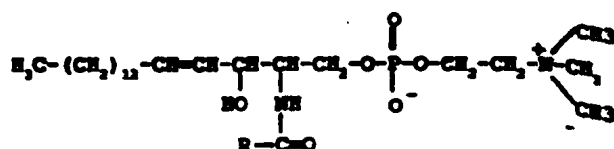
 $\Delta \nu \bar{X} \equiv$

- H Φωσφατιδικό οξύ (PA)
- $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2^+$ Φωσφατιδοελαϊθανολαμίνη (PE)
- $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ Φωσφατιδοχολίνη (PC)
- $-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$ Φωσφατιδογλυκερόλη (PG)
- $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ Φωσφατιδοστερίνη (PS)

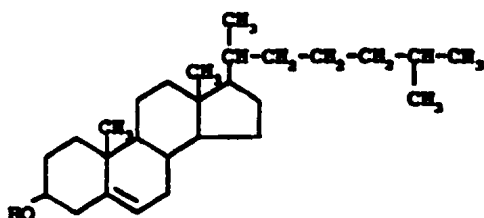


Φωσφατιδοινοσιτόλη (PI)

R: λιπαρή αλυσίδα μεγάλου μήκους



Σφινγομυελίνη (SM)



Χοληστερόλη (Chol)

Σχήμα 2.1. Χημικοί τύποι των φωσφολιπιδίων.

μεμβράνες διαφόρων πνευμονικών κυττάρων. Ο Gail διαπίστωσε ότι οι ποσότητες της κορεσμένης PC στο έκπλυμα μιας σειράς θηλαστικών συσχετίζονταν με την έκταση της κυψελιδικής επιφάνειας¹⁵⁶ και διατύπωσε την άποψη ότι τα αποθέματα της κορεσμένης PC είναι μεγαλύτερα σε ζώα με γρήγορη αναπνευστική συχνότητα και μικρή κυψελιδική επιφάνεια, σε σχέση με τα ζώα που έχουν μικρότερη αναπνευστική συχνότητα και μεγαλύτερη αναπνευστική επιφάνεια. Οι Wright και Clements¹⁵⁷ υπολόγισαν όμως ότι απαιτούνται σχεδόν τα 2/3 της κορεσμένης PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα προκειμένου να σχηματισθεί ένα μονομοριακό φιλμ που να καλύπτει ολόκληρη την κυψελιδική επιφάνεια, στοιχείο που υποδηλώνει ότι τα αποθέματα της DPPC είναι σχετικά περιορισμένα και υπό συνεχή έλεγχο.

Οι ποσότητες της κορεσμένης PC στον πνεύμονα επηρεάζονται από τη διατροφή. Οι ποσότητες αυτές έχουν βρεθεί επηρεασμένες στη νηστεία¹⁵⁸, στην έλλειψη των απαραίτητων λιπαρών οξέων¹⁵⁹ ή χολίνης¹⁶⁰. Ποντίκια που έμειναν νηστικά για 48 ώρες είχαν μειωμένες ποσότητες ολικής και κορεσμένης PC στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, οι οποίες όμως διορθώθηκαν μετά από 96 ώρες νηστείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου¹⁶¹, δείχνοντας ότι υπάρχουν προσαρμοστικοί μηχανισμοί που μεσοπρόθεσμα εξασφαλίζουν τη ποσοτική σταθερότητα της δεξαμενής του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

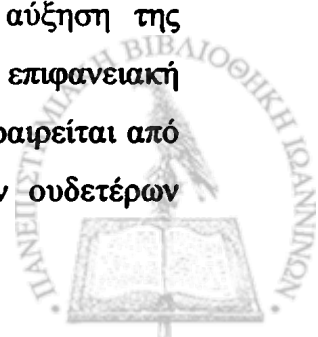
Η λειτουργία της DPPC στο σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνίσταται στη μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ αέρα και υγρής φάσης στις κυψελίδες. Το πολικό άκρο της DPPC συνδέεται με την υγρή φάση, ενώ το μη πολικό (δύο ευθείες αλυσίδες παλμιτικού οξέος) κατευθύνεται προς τον αέρα. Η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των αλυσίδων των λιπαρών οξέων και του πολικού άκρου της DPPC είναι 40nm. Όταν η κυψελιδική επιφάνεια μειώνεται, τα μόρια της DPPC έρχονται πάρα πολύ κοντά το ένα με το άλλο, με συνέπεια να μην υπάρχει επαφή μεταξύ του αέρα και της υγρής φάσης και η επιφανειακή τάση να μειώνεται στο ελάχιστο. Η αντίστοιχη απόσταση για παράδειγμα στην ακόρεστη PC, στην παλμιτικο-λινολεϊκή PC για παράδειγμα, δεν μπορεί να μειωθεί κάτω από 60-80nm, επειδή οι αλυσίδες των ακόρεστων λιπαρών οξέων περιστρέφονται γύρω από τους διπλούς δεσμούς. Σαν αποτέλεσμα μια μονοστιβάδα από ακόρεστη PC θα επέτρεπε σημαντική επαφή μεταξύ του αέρα και της υγρής φάσης και η επιφανειακή τάση δεν θα μειωνόταν επαρκώς. Από θεωρητική άποψη λοιπόν το μόριο της DPPC είναι το ιδανικότερο για τη μείωση της επιφανειακής τάσης.



Η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) είναι το κύριο όξινο φωσφολιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα και αποτελεί περίπου το 10% των φωσφολιπιδίων. Το ποσοστό αυτό είναι ιδιαίτερα υψηλό και απαντάται μόνο στον άνθρωπο¹⁶² και στο ποντίκι¹⁶³, ενώ σε άλλα είδη το κύριο όξινο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI)¹⁶⁴. Στον εμβρυϊκό πνεύμονα το ποσοστό της PG είναι εξαιρετικά χαμηλό σε αντίθεση με την PI^{165,166}. Προς το τέλος της εγκυμοσύνης αλλά κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της νεογνικής περιόδου, η PG αυξάνεται ενώ η PI μειώνεται¹⁶⁷. Αυτή η αντίστροφη μεταβολή των δύο όξινων φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν περιορίζεται στην εγκυμοσύνη, αλλά έχει επισημανθεί και σε νοσολογικές οντότητες όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση¹⁶⁸, η κυψελιδική πρωτεϊνώση¹⁶⁹, και το ARDS¹⁷⁰. Φαίνεται λοιπόν ότι ο δείκτης PG/PI αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης και ωριμότητας των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων.

Η PG δεν φαίνεται να συνεισφέρει ιδιαίτερα στη μείωση της επιφανειακής τάσης σε σχέση με την PI, όπως φάνηκε από πειράματα σε σκυλιά στα οποία η PG αντικαταστάθηκε με PI¹⁷¹. Φαίνεται ότι το φορτίο και όχι η δομή των όξινων φωσφολιπιδίων είναι το σημαντικό στοιχείο για την εκπλήρωση του ρόλου τους. Ενός ρόλου που περιλαμβάνει τη ρύθμιση της διακίνησης των φωσφολιπιδίων από την κυψελίδα και την αναστολή μεσολαβητών της φλεγμονής όπως ο PAF, η θρομβίνη και το ADP. Φαίνεται ότι η παρουσία της PG επάγει την πρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα τύπου II κύτταρα και αυτή η επαγωγή εξαρτάται από τη συγκέντρωση της PG¹⁷².

Τα ουδέτερα λιπίδια έχουν ερευνηθεί πολύ λιγότερο από τα φωσφολιπίδια. Ανεξήγητος παραμένει ο λόγος για τον οποίον διαφορετικά είδη έχουν τελείως διαφορετικές αναλογίες ουδετέρων λιπιδίων στον επιφανειοδραστικό τους παράγοντα, κάτι που δεν συμβαίνει με τα φωσφολιπίδια. Η προσθήκη μονο-, δι-, ή τριακυλογλυκερόλης ή ελεύθερου παλμιτικού οξέος σε DPPC ή μίγμα DPPC-PG αυξάνει την ταχύτητα απορρόφησης, μεταβάλλοντας τον τρόπο "συσκευασίας" των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Η χοληστερόλη αυξάνει επίσης την ταχύτητα απορρόφησης κυστιδίων που αποτελούνται κυρίως από DPPC, αυξάνοντας τη ρευστότητα και βελτιώνοντας την ανάπτυξη του film¹⁷³. Με την αύξηση της ρευστότητας που προκαλεί η χοληστερόλη, περιορίζεται η ελάχιστη επιφανειακή τάση κατά τη συμπίεση και αυτός είναι ο λόγος που η χοληστερόλη αφαιρείται από τα περισσότερα τροποποιημένα φυσικά surfactant. Η παρουσία των ουδετέρων



λιπιδίων έχει αποδειχθεί απαραίτητη σε διάφορα μίγματα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών για την επίτευξη της βέλτιστης επιφανειοδραστικής συμπεριφοράς¹⁷⁴. Τέλος ορισμένα ουδέτερα λιπίδια όπως η βιταμίνη Ε και το πλασμαλογόνο επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση¹⁷⁵.

Πρωτεΐνες

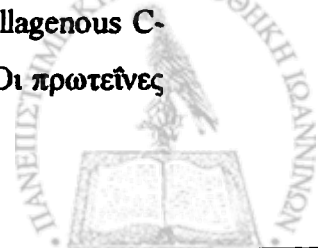
SP-A

Η SP-A αποτελεί το 50% των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Πρόκειται για μια υδρόφιλη πρωτεΐνη, το μονομερές της οποίας έχει μοριακό βάρος 32kD. Ανακαλύφθηκε το 1972 από τον King¹⁷⁶ και το γονίδιο που κωδικοποιεί τα 248 αμινοξέα της πρωτεΐνης απομονώθηκε από τον White¹⁷⁷ το 1985 στο μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 10. Η αλληλουχία των αμινοξέων είναι περίπου ίδια στον άνθρωπο, το ποντίκι¹⁷⁸, το σκύλο¹⁷⁹ και το κουνέλι¹⁸⁰.

Το αμινοτελικό άκρο της SP-A αποτελείται αρχικά από 20 αμινοξέα και έχει το χαρακτήρα "πεπτιδίου-ταυτότητας" (signal peptide). Σε αναλογία με άλλες εκκριτικές πρωτεΐνες, το πεπτίδιο αυτό εξασφαλίζει την είσοδο στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και όταν αυτό συμβεί το μεγαλύτερο μέρος του αποκόπτεται και παραμένει μόνο ένα μικρό τμήμα του, αποτελούμενο από 7 αμινοξέα. Το αμινοτελικό τμήμα του πεπτιδίου αυτού περιέχει μια κυστεΐνη, που λόγω των δισουλφιδικών δεσμών της, εξασφαλίζει τη σταθερότητα της ολιγομεροποίησης της SP-A.

Μετά από το αμινοτελικό πεπτίδιο ακολουθεί μια σειρά από 24 τριάδες αμινοξέων. Καθεμία από τις τριάδες έχει τη μορφή γλυκίνη-X-Y, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ και Y υδροξυπρολίνη σε 13 από τις 24 τριάδες. Η αλληλουχία αυτή, που συναντάται και στις πρωτεΐνες του κολλαγόνου, διευκολύνει το σχηματισμό τριπλής έλικας (τριμερής μορφή) στη δευτερογενή δομή της πρωτεΐνης. Μετά από τις 24 τριάδες ακολουθεί μια περιοχή 30-40 αμινοξέων που συνδέει την προηγούμενη περιοχή με το καρβοξυτελικό άκρο. Ο ρόλος της περιοχής αυτής δεν έχει ξεκαθαρισθεί και ίσως να αποτελεί απλώς μια γέφυρα. Η αφαίρεσή της δεν φαίνεται να επηρεάζει ούτε τη σύνδεση με τους υδρογονάνθρακες, ούτε τη δραστηριότητα λεκτίνης που έχει η SP-A.

Τα υπόλοιπα 120 αμινοξέα σχηματίζουν μια δομή με λειτουργικές και δομικές ομοιότητες με μια ομάδα πρωτεϊνών που αποκαλούνται C-λεκτίνες (collagenous C-type lectins, collectins)¹⁸¹, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η SP-D. Οι πρωτεΐνες



αυτές αναγνωρίζουν και συνδέουν υδατάνθρακες με γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες και η σύνδεση αυτή γίνεται με εξαρτώμενο από το ασβέστιο τρόπο. Η περιοχή αναγνώρισης των υδατανθράκων (carbohydrate-recognition domain-CRD) που χαρακτηρίζει αυτήν την ομάδα πρωτεϊνών είναι κοινή και αποτελείται από 18 αμινοξέα με σχετικά σταθερή θέση στην αλληλουχία των 120 αμινοξέων. Η σχετική θέση 4 κυστεϊνών είναι κοινή σε όλες τις CRD και με τους δισουλφιδικούς δεσμούς τους σταθεροποιούν τη σύνδεση με τους υδατάνθρακες.

Η λειτουργική μορφή της SP-A, που αποτελείται συνήθως από ένα σύμπλεγμα 18 ολιγομερών (6 τριμερών), έχει μοριακό βάρος περίπου 650kD. Οι παράγοντες που έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου της SP-A είναι το cAMP¹⁸², η προσταγλανδίνη E2¹⁸³, ο epidermal growth factor και η ιντερφερόνη-γ¹⁸⁴, ενώ αυτοί που την μειώνουν είναι ο transforming growth factor β¹⁸⁵ και η ινσουλίνη¹⁸⁶. Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν και προς τις δύο κατευθύνσεις, ανάλογα με τη δόση και τη διάρκεια της έκθεσης¹⁸⁷. Τα γονίδια της SP-A εκφράζονται στα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα, στα κύτταρα Clara και στα κύτταρα των υποβλεννογονίων αδένων των αεραγωγών.

Η SP-A δεσμεύει ειδικά την DPPC¹⁸⁸ και συσσωρεύει τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα παρουσία ασβεστίου¹⁸⁹. Συνδέεται επίσης με αρκετά γλυκολιπίδια και ουδέτερα γλυκοσφιγγολιπίδια και επιταχύνει την απορρόφηση των φωσφολιπιδίων από τη μεσόφαση υγρού-αέρα. Η SP-A εντοπίζεται στις γωνίες του πλέγματος της σωληνώδους μυελίνης συμβάλλοντας στη σταθερότητά του¹⁹⁰ και σε συνεργασία με τη SP-B ευνοεί τη μετατροπή των πολυστιβαδωτών σωματίων σε σωληνώδη μυελίνη¹⁹¹. Όλες οι παραπάνω δράσεις συνηγορούν στο σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο που έχει η SP-A στην παραγωγή και στη διακίνηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το ενδοκυττάριο στο εξωκυττάριο διαμέρισμα.

Εκτός όμως από το μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα, φαίνεται ότι η SP-A παίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο και στο αμυντικό σύστημα του πνεύμονα. Η πρώτη μελέτη για το θέμα έγινε από τον Tenner¹⁹², που έδειξε ότι η καθαρμένη SP-A ενίσχυε τη FcR- and CR1-μεσολαβούμενη φαγοκύτωση από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση των λευκοκυττάρων. Μια σειρά από μελέτες στη συνέχεια, έδειξαν την αλληλεπίδραση της SP-A με ποικίλους μικροοργανισμούς in vitro, όπως για παράδειγμα τον *Haemophilus influenza* τύπου A¹⁹³, τον πνευμονιόκοκκο¹⁹⁴, το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης¹⁹⁵, την *Pneumocystis Carinii*¹⁹⁶ και τον ιό της Influenza τύπου A¹⁹⁷. Η

αλληλεπίδραση αυτή αφορά την αναγνώριση κάποιων ολιγοσακχαριδών των παραπάνω μικροοργανισμών από τη CRD-περιοχή της SP-A, την οψωνινοποίησή τους, αλλά και την άμεση επίδραση της SP-A στα κυψελιδικά μακροφάγα και την ενεργοποίησή τους¹⁹⁸. Η έλλειψη της SP-A σε υγιή ποντίκια δεν συνοδεύτηκε από διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας ή του μεταβολισμού των λιπιδίων^{199,200}. Αντίθετα τα ποντίκια είχαν αυξημένο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, πιο έντονη φλεγμονώδη αντίδραση του πνεύμονα, αυξημένη συχνότητα επινέμησης του σπλήνα μετά από ενδοτραχειακό ενοφθαλμισμό Group B στρεπτόκοκκων και αυξημένη ευαισθησία σε *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*²⁰¹. Οι φυσιολογικές λειτουργίες της SP-A συνοψίζονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Φυσιολογικές λειτουργίες της SP-A
Σχηματισμός σωληνώδους μυελίνης
Εμπλουτισμός της διτλοστιβάδας με κορεσμένα λιπίδια
Ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα
Ρύθμιση της κάθαρσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα
Ρύθμιση της λειτουργίας των κυψελιδικών μακροφάγων

SP-B

Η SP-B είναι ένα υδρόφοβο, θετικά φορτισμένο πεπτίδιο που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο χρωμόσωμα 2 και εκφράζεται μόνο στα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα και στα κύτταρα Clara. Αποτελεί περίπου το 1% των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η πρώτη μορφή της πρωτεΐνης είναι ένα πολυπεπτίδιο 381 αμινοξέων και μοριακού βάρους περίπου 40kDa. Η ενδοκυττάρια πρωτεολυτική επεξεργασία του, δίνει την τελική ώριμη μορφή στο μονομερές της SP-B (79 αμινοξέα, μοριακό βάρος 8kDa). Στον κυψελιδικό χώρο η SP-B βρίσκεται συνήθως με τη μορφή διμερών (και σπανιότερα ολιγομερών), με τα δύο μόρια της SP-B να συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ κυστεϊνών²⁰².

Ο ρόλος της SP-B συνίσταται στην επιτάχυνση της προσρόφησης των φωσφολιπιδίων στη μεσόφαση αέρα υγρού κατά ένα παράγοντα μεγαλύτερο του 150²⁰³, μια δράση που ενισχύεται ακόμη περισσότερο από την παρουσία ιόντων ασβεστίου²⁰⁴. Η προσθήκη SP-B σε μίγμα DPPC και PG προκάλεσε σημαντική μείωση της επιφανειακής τάσης του μίγματος, ενώ η χορήγηση του μίγματος σε



κουνέλια σε αντίθεση με τη χορήγηση σκέτων φωσφολιπιδίων συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της πνευμονικής ενδοτικότητας²⁰⁵. Το ισχυρά θετικό φορτίο της SP-B αντιδρά με την αρνητικά φορτισμένη κεφαλή της φωσφατιδυλογλυκερόλης πριν ή κατά τη διάρκεια της συμπίεσης της μεμβράνης, βελτιώνοντας έτσι τις επιφανειοδραστικές της ιδιότητες, μια και αυξάνεται η σχετική αναλογία της DPPC²⁰⁶. Η SP-B φαίνεται τέλος ότι είναι απαραίτητη (μαζί με SP-A και ασβέστιο) για το σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης από τα πολυστιβαδωτά σωματίδια²⁰⁷.

Η ανεπάρκεια της SP-B αναγνωρίστηκε σαν αιτία πνευμονικής νόσου το 1993 και είναι το μόνο κλινικό σύνδρομο που έχει βρεθεί ότι αφορά πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα²⁰⁸. Τα νεογνά που αναπτύσσουν το σύνδρομο είναι συνήθως τελειώμνηνα και αμέσως μετά τον τοκετό αναπτύσσουν αναπνευστική δυσχέρεια, που προοδευτικά επιδεινώνεται. Η ακτινολογική εικόνα είναι αυτή του νεογνικού συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας και η χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα συνοδεύεται από μικρή και παροδική βελτίωση της κλινικής εικόνας. Ανάλογη είναι και η ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή. Η νόσος είναι θανατηφόρος και η μέση επιβίωση είναι 3 μήνες, αν και αναφέρονται περιστατικά που επιβίωσαν για περισσότερο από ένα χρόνο με εντατική υποστηρικτική θεραπεία. Αυτή τη στιγμή θεραπεία επιλογής θεωρείται η μεταμόσχευση. Η νόσος πιθανότατα μεταβιβάζεται με σωματικά υπολειπόμενο τρόπο.

SP-C

Η SP-C είναι η μοναδική πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα που εκφράζεται αποκλειστικά στα πνευμονοκύτταρα τύπου II στον ώριμο πνεύμονα. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 και όπως και η SP-B μεταφράζεται αρχικά σε ένα μεγαλύτερο πεπτίδιο, το οποίο μετατρέπεται ενδοκυτταρικά στην ενεργή μορφή του με πρωτεόλυση. Αυτή η ενεργή μορφή είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από 35 αμινοξέα, στο οποίο συνδέονται ομοιοπολικά 2 παμιτοϋλο- αλυσίδες (μοριακό βάρος 4kD). Η μορφή αυτή παρουσιάζει πάρα πολλές ομοιότητες μεταξύ διαφόρων ειδών, στοιχείο που υποδηλώνει σημαντικές και ειδικές λειτουργίες. Το μέγεθος της έλικας της SP-C ταιριάζει απόλυτα με το πάχος μιας διπλοστιβάδας από DPPC και ο διαμεμβρανικός προσανατολισμός του μορίου της εξηγεί πολλές από τις ιδιότητες και λειτουργίες της.



Η SP-C βελτιώνει τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες διαφόρων μιγμάτων λιπιδίων και επιταχύνει την προσρόφηση των φωσφολιπιδίων. Αυξάνει την αντίσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στις διάφορες πρωτεΐνες του ορού και ευνοεί την πρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα τύπου II κύτταρα, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στη διακίνηση και κυκλοφορία του επιφανειοδραστικού παράγοντα²⁰⁹.

SP-D

Η SP-D είναι μια υδρόφιλη πρωτεΐνη και η μοναδική από τις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα που δεν φαίνεται ότι παίζει ρόλο στις βιοφυσικές λειτουργίες του. Ανήκει όπως και η SP-A, με την οποία έχει αρκετές ομοιότητες, στις τύπου C-λεκτίνες. Κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 10, εκφράζεται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και στα κύτταρα Clara στον πνεύμονα, ενώ είναι και η μοναδική από τις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχει βρεθεί ότι εκφράζεται και εκτός πνεύμονα, στο γαστρικό βλεννογόνο.

Το μονομερές της αποτελείται από μια περιοχή με δομή κολλαγόνου, σαν αυτή που συναντάται στην SP-A, που είναι όμως μεγαλύτερη σε μέγεθος. Η περιοχή αυτή συνδέεται κατευθείαν, χωρίς συνδετική περιοχή όπως συμβαίνει στην SP-A, με την περιοχή αναγνώρισης των υδατανθράκων (carbohydrate-recognition domain-CRD). Το μοριακό βάρος του μονομερούς που προκύπτει είναι περίπου 43kDa. Τα μονομερή ενώνονται ανά 3 με δισουλφιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας τριμερή. 4 τριμερή ενώνονται στα αμινοτελικό τους άκρο και σχηματίζουν μια δομή σχήματος σταυρού, που είναι η μορφή με την οποία απαντάται η SP-D στους πνεύμονες, όπως επιβεβαιώνεται και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η σταυροειδής αυτή δομή, που έχει πλάτος 92nm, έχει την ικανότητα δέσμευσης υδατανθράκων που βρίσκονται στην επιφάνεια ιών, βακτηριδίων, πρωτόζων ή μυκήτων. Πέραν αυτού στην επιφάνεια των κυψελιδικών μακροφάγων έχει απομονωθεί ειδικός υποδοχέας για την SP-D, που δεν αφορά τη CRD περιοχή²¹⁰. Μέσω των δύο παραπάνω ιδιοτήτων της η SP-D ρυθμίζει την οψωνινοποίηση, αλλά και τη φαγοκύτωση διαφόρων μικροοργανισμών, τη δέσμευση βακτηριακών τοξινών και τη χημειοταξία των μακροφάγων, παίζοντας ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα του πνεύμονα²¹¹.

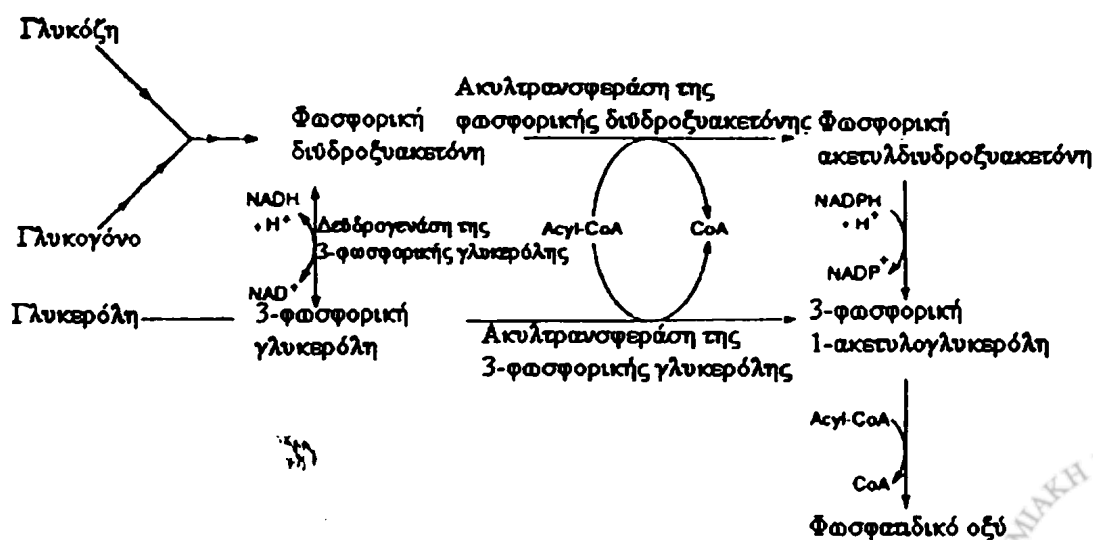


Σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Η σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα γίνεται στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, που αποτελούν το 15% των κυττάρων του πνεύμονα. Η βάση της σύνθεσης των λιπιδίων είναι η γλυκερόλη, κύρια πηγή της οποίας αποτελεί η γλυκόζη της κυκλοφορίας²¹². Αν και η γλυκερόλη αυτή καθαυτή μπορεί να αποτελεί υπόστρωμα σύνθεσης φωσφατιδικού οξέος, αυτό συμβαίνει μόνο στην αρχική εμβρυϊκή περίοδο²¹³.

Τα λιπαρά οξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση των λιπιδίων από τα πνευμονοκύτταρα εξασφαλίζονται είτε σαν ελεύθερα λιπαρά οξέα από την κυκλοφορία, είτε από την υδρόλυση των τρακυλογλυκερολών που περιέχονται στις λιποπρωτεΐνες του ορού. Τα πνευμονοκύτταρα περιέχουν τη λιποπρωτεϊνική λιπάση που καταλύει αυτή την υδρόλυση. Ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες φαίνεται ότι διευκολύνουν την πρόσληψη των λιπαρών οξέων από τα πνευμονοκύτταρα²¹⁴. Τα πνευμονοκύτταρα έχουν επίσης τη δυνατότητα σύνθεσης λιπαρών οξέων de novo²¹⁵. Στη σύνθεση αυτή το προτιμώμενο υπόστρωμα είναι το γαλακτικό και όχι η γλυκόζη. Η σχετική σημασία των διαφορετικών πηγών των λιπαρών οξέων δεν είναι αποσαφηνισμένη και η ποσοτική συμμετοχή κάθε πηγής εξαρτάται από την ηλικία και τη διατροφική κατάσταση.

Ο σχηματισμός του φωσφατιδικού οξέος είναι το πρώτο βήμα για τη σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI).

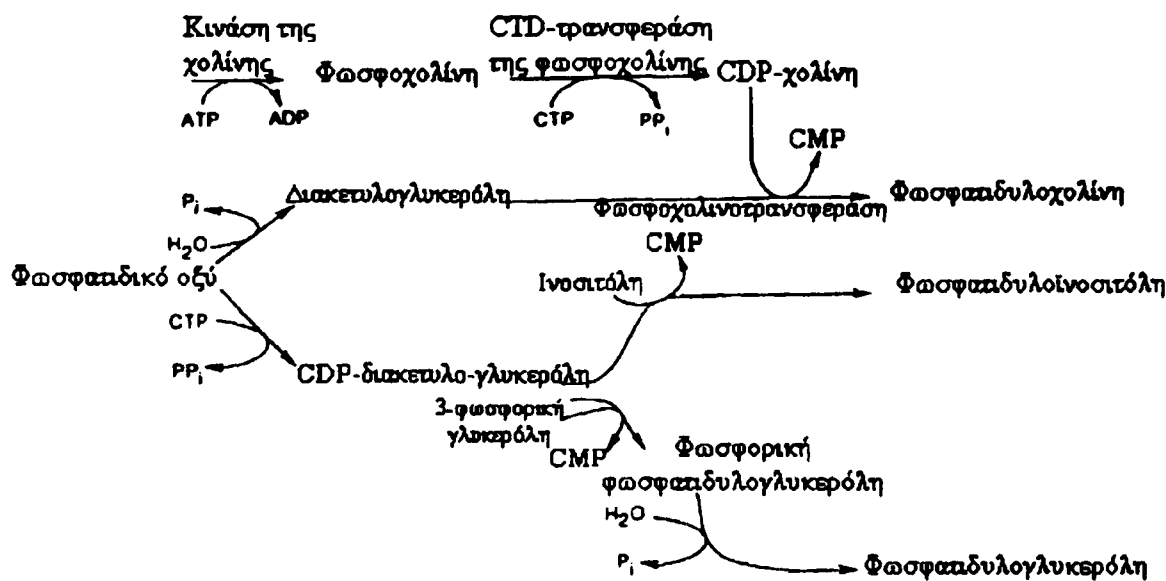


Σχήμα 2.2. Σύνθεση φωσφατιδικού οξέος.



Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.2 υπάρχουν δύο οδοί σύνθεσης του φωσφατιδικού οξέος. Η μία αφορά την ακυλίωση της φωσφορικής διυδροξυακετόνης και στη συνέχεια την αναγωγή και ακυλίωση του προϊόντος που προκύπτει. Η οδός αυτή αποδίδει το 60% του φωσφατιδικού οξέος. Η άλλη οδός, που απεικονίζεται στο κάτω μέρος του σχήματος, αφορά τη διπλή ακυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης από ακετυλοτρανσφεράσες που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των πνευμονοκυττάρων²¹⁶.

Το φωσφατιδικό οξύ αντιδρά με χολίνη για το σχηματισμό φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Η χολίνη που απαιτείται προέρχεται από την κυκλοφορία και πηγή της είναι η δίαιτα²¹⁷. Τα πνευμονοκύτταρα φαίνεται ότι μπορούν να συσσωρεύουν χολίνη²¹⁸. Η χολίνη μέσω της κινάσης της χολίνης, ενός κυτοσολικού ενζύμου των τύπου II κυττάρων, μετατρέπεται σε φωσφοχολίνη. Η φωσφοχολίνη μετατρέπεται σε CDP-χολίνη, με τη δράση της CDPχολίνη-φωσφοχολινοτρανσφεράσης. Το ένζυμο αυτό φαίνεται να είναι αυτό που καθορίζει το ρυθμό σύνθεσης της CDP-χολίνης και κατ' επέκταση της PC. Η μυο-ινοσιτόλη που απαιτείται για το σχηματισμό της PI συντίθεται από διάφορους ιστούς, αλλά ορισμένες φορές χρειάζονται επιπλέον ποσότητες από τη διατροφή και η χορήγησή της συνδυάστηκε με αυξημένη επιβίωση σε πρόωρα νεογνά με αναπνευστική δυσχέρεια²¹⁹. Στο σχήμα 2.3 απεικονίζεται η σύνθεση PC, PI και PG.



Σχήμα 2.3. Σύνθεση PC, PI και PG.



Η υδρόλυση του φωσφατιδικού οξέος σε διακυλογλυκερόλη από τη φωσφατιδική φωσφατάση είναι το πρώτο βήμα για τη σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης. Αν και έχουν απομονωθεί αρκετές μορφές του ενζύμου στον πνευμονικό ιστό, η μορφή που εμπλέκεται στην πνευμονική σύνθεση PC είναι εξαρτώμενη από το μαγνήσιο και συνδεδεμένη με το ενδοπλασματικό δίκτυο²²⁰.

Όταν στη θέση sn-1 και στη θέση sn-2 του φωσφατιδικού οξέος έχουμε παλμιτικό οξύ τότε έχουμε άμεση de-νovo σύνθεση δυαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης (DPPC). Επειδή μόνο 30% των μορίων του φωσφατιδικού οξέος που συντίθεται έχουν δύο παλμιτικές αλυσίδες, η de-νovo σύνθεση DPPC αφορά το 25-45% της συνολικής σύνθεσης. Η υπόλοιπη ποσότητα της DPPC παράγεται με ανάπλαση (remodeling) των μορίων της PC που περιλαμβάνουν παλμιτικό στη sn-1 θέση του σκελετού της γλυκερόλης και κάποιο ακόρεστο ακύλιο στη sn-2 θέση. Το remodeling περιλαμβάνει αρχικά την απομάκρυνση του ακυλίου από την sn-2 θέση με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂. Η προκύπτουσα 1-παλμιτοϋλο-λυσωφωσφατιδυλοχολίνη επανακυκλώνεται με παλμιτοϋλο-CoA με την ακυλοτρανσφεράση της λυσωφωσφατιδυλοχολίνης. Ο εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης, που αφορά την αντίδραση δύο μορίων λυσωφωσφατιδυλοχολίνης με τη δημιουργία ενός μορίου DPPC και ενός μορίου φωσφοχολίνης, δεν φαίνεται να έχει σημαντική ποσοτική συμμετοχή στον πνεύμονα.

Φυσιολογία του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Η ελαστική επαναφορά του πνεύμονα, δηλαδή η φυσιολογική ιδιότητα του πνευμονικού παρεγχύματος να επιστρέφει σε ένα συγκεκριμένο όγκο μετά την υπερδιάτασή του σαν ένα υπερδιατεταμένο ελατήριο, είχε αρχικά αποδοθεί στις ελαστικές ιδιότητες του πνευμονικού ιστού. Το 1929 ο von Neergaard (138) διαπίστωσε ότι η ελαστικότητα ενός πνεύμονα γεμάτου με νερό και βουτηγμένου σε νερό, ήταν πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη στον αέρα. Το σωστό συμπέρασμά του ήταν ότι ένα μέρος της ελαστικής επαναφοράς οφειλόταν στην επιφανειακή τάση της τεράστιας σε έκταση μεσόφασης (interface) αέρα-νερού, που επενδύει τις κυψελίδες.

Η επιφανειακή τάση σε μια μεσόφαση αέρα-νερού παράγει δυνάμεις που τείνουν να μειώσουν την επιφάνεια της μεσόφασης. Έτσι η πίεση στο εσωτερικό μιας



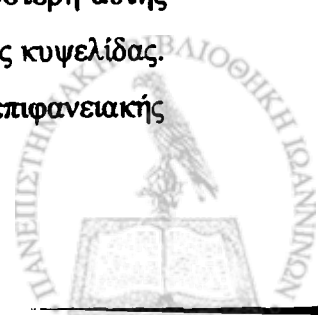
φυσαλίδας είναι πάντα μεγαλύτερη από την περιβάλλουσα πίεση. Οι κυψελίδες μπορεί να θεωρηθούν ότι συμπεριφέρονται σαν φυσαλίδες, παρά το ότι ο κυψελιδικός αέρας συνδέεται μέσω των αεραγωγών με το περιβάλλον. Η πίεση μέσα στη φυσαλίδα καθορίζεται με βάση το νόμο του Laplace

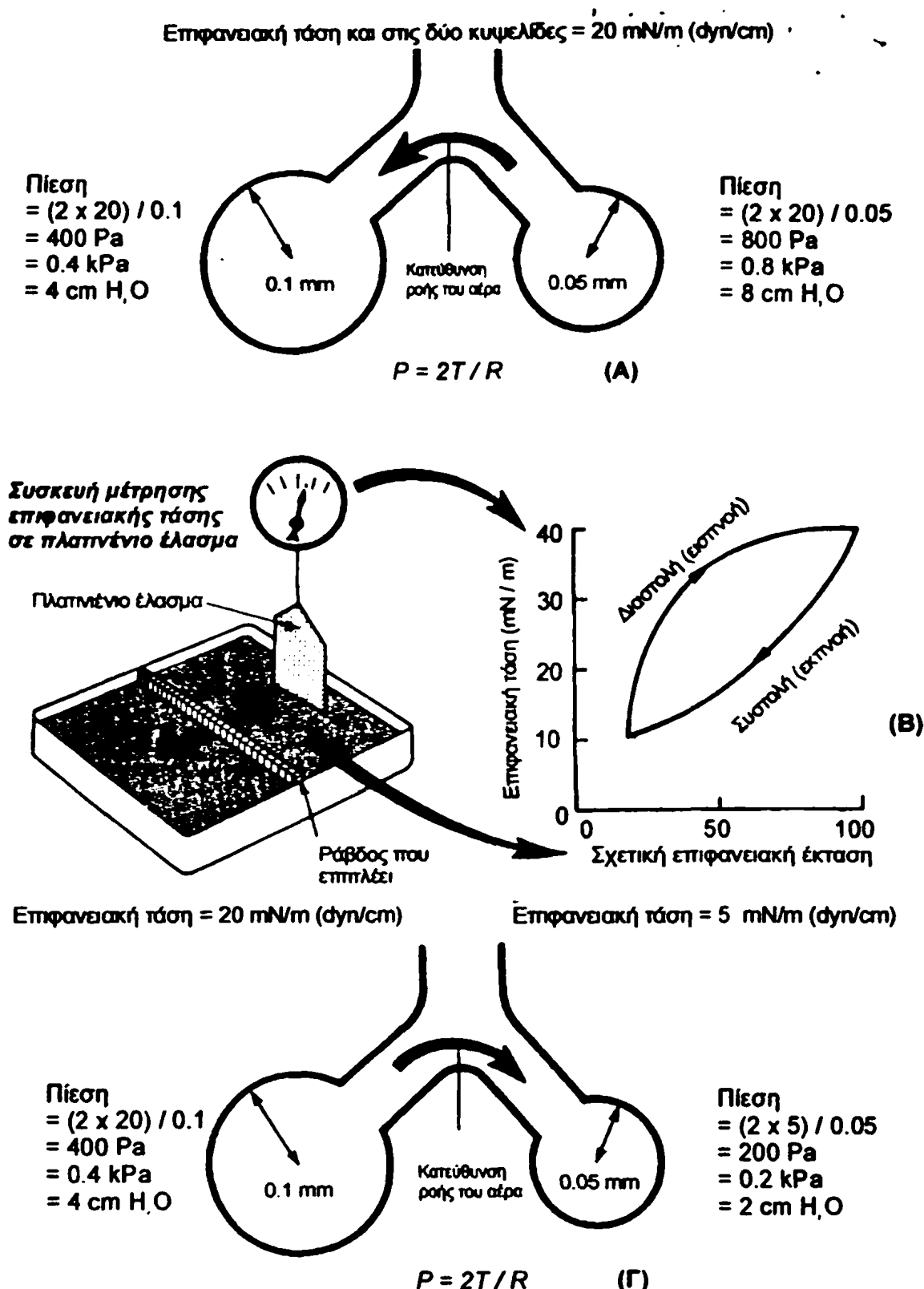
$$P=2T/R$$

όπου P η πίεση μέσα στην κυψελίδα (dyn/cm^2), T η επιφανειακή τάση του υγρού (dyn/cm) και R η ακτίνα της φυσαλίδας (cm). Στις αντίστοιχες μονάδες του διεθνούς συστήματος (SI) η πίεση μετριέται σε Pa, η απόσταση σε m και η επιφανειακή τάση σε mN/m , που αντιστοιχεί σε dyn/cm . Στο σχήμα 2.4²²¹ απεικονίζεται μια τυπική κυψελίδα ακτίνας 0.1mm. Αν το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες ήταν νερό (επιφανειακή τάση 72mN/m ή dyn/cm) η πίεση στο εσωτερικό της κυψελίδας θα ήταν 1,44 kPa και ο πνεύμονας θα ήταν εξαιρετικά δύσκαμπτος (stiff), μια και θα απαιτούνταν η ανάπτυξη πολύ μεγάλων πιέσεων για τη διακίνηση του αναπνεόμενου όγκου. Προκειμένου οι πιέσεις που αναπτύσσονται μέσα στην κυψελίδα να είναι μέσα στο φάσμα των πιέσεων στις οποίες κινείται το αναπνευστικό σύστημα, θα πρέπει το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες έχει επιφανειακή τάση 20-40mN/m και κατά συνέπεια η πίεση στην αντίστοιχη κυψελίδα είναι 0,4-0,8kPa.

Η ανάγκη παρουσίας ενός υγρού με μεταβαλλόμενη επιφανειακή τάση, που επενδύει τις κυψελίδες, φαίνεται στο πρώτο μέρος του σχήματος. Αν οι δύο κυψελίδες έχουν την ίδια επιφανειακή τάση και η μία έχει τη μισή ακτίνα από την άλλη, τότε η πίεση που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της μικρότερης είναι διπλάσια από την πίεση που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της μεγαλύτερης. Σαν αποτέλεσμα της διαφοράς πίεσης υπάρχει μετακίνηση αέρα από την μικρότερη προς τη μεγαλύτερη κυψελίδα, με συνέπεια τη διόγκωση της μεγαλύτερης, τη συρρίκνωση της μικρότερης και την αύξηση της αστάθειας των αεροφόρων κοιλοτήτων. Στην περίπτωση αυτή, οι συσταλτικές δυνάμεις που θα προκαλούσε το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες θα ήταν μεγαλύτερες στην εκπνοή (μικρός όγκος πνεύμονα) και μικρότερες στην εισπνοή (μεγάλος όγκος πνεύμονα), μια κατάσταση εντελώς αντίθετη με αυτή που πραγματικά συμβαίνει.

Με βάση το παραπάνω μοντέλο, οι ιδιότητες του υγρού που επαλείφει τις κυψελίδες θα πρέπει να περιλαμβάνουν τα εξής: επιφανειακή τάση μικρότερη αυτής του νερού, αλλά και μεταβλητότητα της τιμής ανάλογα με την έκταση της κυψελίδας. Οι ιδιότητες αυτές επαληθεύονται από την απευθείας μέτρηση της επιφανειακής





Σχήμα 2.4. Α: Πιέσεις σε δύο κυψελίδες διαφορετικού μεγέθους με όμοια επιφανειακή τάση. Η κατεύθυνση της ροής του αέρα είναι από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη. Β: Μεταβολή της επιφανειακής τάσης συναρτήσει της επιφάνειας. Γ: Πιέσεις σε δύο κυψελίδες διαφορετικού μεγέθους με διαφορετική επιφανειακή τάση. Η κατεύθυνση της ροής του αέρα είναι από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη. (Από το βιβλίο του JF Nunn, 'Applied Physiology', Butterworth-Heinemann Ltd, 1993)

τάσης του κυψελιδικού εκπλύματος. Στο δεύτερο μέρος του σχήματος 2.4 φαίνεται η μεταβολή της επιφανειακής τάσης του κυψελιδικού εκπλύματος σε σχέση με την επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια της αύξησης της επιφάνειας (έκπτυξης) η επιφανειακή τάση αυξάνεται σε επίπεδα παραπλήσια με αυτά του πλάσματος (40mN/m), ενώ κατά τη διάρκεια της μείωσης της επιφάνειας η επιφανειακή τάση μειώνεται (20mN/m) σε επίπεδα πολύ μικρότερα της επιφανειακής τάσης άλλων σωματικών υγρών.

Οι συνέπειες αυτών των μεταβολών φαίνονται στο τρίτο μέρος του σχήματος, όπου λόγω της διαφορετικής επιφανειακής τάσης η πίεση στη μικρότερη κυψελίδα είναι μικρότερη από την πίεση στη μεγαλύτερη κυψελίδα και η ροή αέρα έχει την κατεύθυνση της εξισορρόπησης του όγκου των κυψελίδων. Συνολικά μια παρόμοια συμπεριφορά εκδηλώνεται με μείωση της πίεσης επαναφοράς όταν μειώνεται ο όγκος του πνεύμονα και αντίστοιχα αύξηση όταν αυξάνεται ο αντίστοιχος όγκος του πνεύμονα, συμπεριφορά που εξασφαλίζει τη σταθερότητα του πνεύμονα.

Οι λειτουργίες του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν απασχολήσει έντονα τους φυσιολόγους, μια και φαίνεται ότι η εξελικτική ιστορία του surfactant έχει ηλικία τουλάχιστον 400 εκατομμυρίων ετών. Η λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι συνδεδεμένη με την αναπνοή αέρα και έχει διαπιστωθεί ακόμη και σε πρωτόγονα ψάρια που ανέπνεαν αέρα²². Η μελέτη των surfactant πολλών σπονδυλωτών οργανισμών, κυρίως των μη θηλαστικών, εντοπίζει πολύ χαμηλά ποσοστά DPPC και καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η κύρια λειτουργία τους δεν είναι η σταθεροποίηση των αεραγωγών (αντι-ατελεκτατική δράση), αλλά η αποφυγή της προσκόλλησης διαφόρων μορίων στο κυψελιδικό επιθήλιο (anti-adherent ή anti-glue δράση), καθώς και η ρύθμιση της διακίνησης των υγρών (αντιοιδηματική δράση).

Οι παραπάνω δράσεις έχουν παρατηρηθεί και στον άνθρωπο. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, τόσο στους μικρούς αεραγωγούς όσο και στις κυψελίδες, φαίνεται ότι παρεμποδίζει την προσκόλληση διαφόρων μικροοργανισμών και αλλεργιογόνων στο κυψελιδικό επιθήλιο, συμμετέχοντας έτσι στον αμυντικό σύστημα του πνεύμονα. Οι δύο αποπρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, η SP-A και η SP-D, συνεισφέρουν στην άμυνα του πνεύμονα με τους τρόπους που αναφέρονται παραπάνω.

Η επίδραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη διακίνηση υγρών διαμέσου του κυψελιδικού επιθηλίου είναι αρκετά σύνθετη και εξετάζεται στο κεφάλαιο 'Πνευμονικό οίδημα προκαλούμενο από τον αναπνευστήρα'. Η χορήγηση ουσιών με απορρυπαντική δράση που καταστρέφουν τη φυσιολογική λειτουργία του

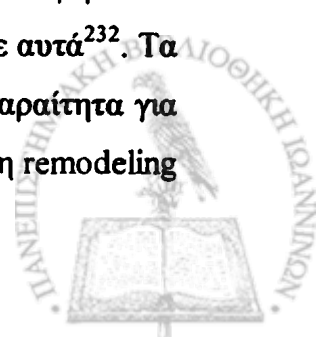
επιφανειοδραστικού παράγοντα συνδυάζεται με αύξηση του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος (extravascular lung water)²²³. Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε τόσο σε πρόωρα νεογνά²²⁴, όσο και σε πειραματόζωα που γεννήθηκαν πρόωρα²²⁵.

Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελεί μια εξαιρετικά σύνθετη διαδικασία, πολλές πλευρές του οποίου παραμένουν ακόμη σκοτεινές. Συνολικά αυτός περιλαμβάνει α)τη σύνθεση, β)την ενδοκυττάρια μεταφορά, γ)τη συσκευασία στα πολυστιβαδωτά σωματίδια, δ)την κίνηση των πολυστιβαδωτών σωματίων προς τη μεμβράνη των τύπου II κυττάρων, ε)την εξωκύτωση, στ)την απορρόφηση στη μεσόφαση αέρα-υγρού, ζ)το διαχωρισμό συγκεκριμένων συστατικών κατά τη συμπίεση στη μεσόφαση αέρα-υγρού, η)την επαναπρόσληψη εξωκυττάριου υλικού, θ)την ενδοκυττάρια επεξεργασία του και τέλος ι)την επανέκκριση του ανακυκλωμένου υλικού.

Η σύνθεση όλων των φωσφολιπιδίων αυξάνεται προς το τέλος της εγκυμοσύνης και η αύξηση αυτή αποτελεί αποτέλεσμα της επαγωγής όλων των ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση. Ενδογενή γλυκοκορτικοειδή και θυρεοειδικές ορμόνες είναι οι κύριοι ορμονικοί υπεύθυνοι της αυξημένης σύνθεσης και η κιτιδυλοτρανσφεράση είναι το κρίσιμο ένζυμο-στόχος²²⁶. Το ένζυμο αυτό, που καταλύει την μετατροπή της φωσφοχολίνης σε CDP-χολίνη, που είναι το κρίσιμο βήμα για τη σύνθεση της PC, μετατρέπεται από την ανενεργό μορφή που βρίσκεται στο κυτοσόλιο, στην ενεργό μορφή στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πειράματα με ιχνοθετημένη χολίνη²²⁷, μέτρηση των αποθεμάτων χολίνης και των μεταβολιτών της²²⁸, αλλά και μελέτες που δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα σύνθεσης PC συσχετίζονται με αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου²²⁹, αποδεικνύουν ότι η ουσιαστική ρύθμιση της σύνθεσης της PC πραγματοποιείται μέσω αυτού του ενζύμου. Κάτω από ειδικές συνθήκες, η ακυλ-τρανσφεράση της 3-φωσφορικής-γλυκερόλης²³⁰ και η κινάση της χολίνης²³¹ μπορεί να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση της PC.

Τα φωσφολιπίδια συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρονται με ειδικές πρωτεΐνες στα πολυστιβαδωτά σωματίδια ή ενσωματώνονται σε αυτά²³². Τα πολυστιβαδωτά σωματίδια στερούνται των ενζύμων εκείνων που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων, τόσο όσον αφορά τη *de novo* όσο και τη remodeling

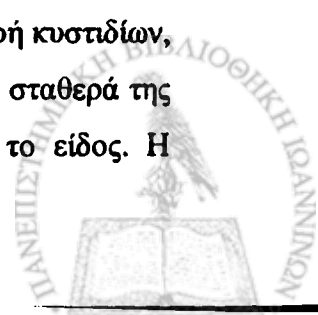


οδό. Η συσκευασία στα πολυστιβαδωτά σωμάτια δεν είναι μια απλή αποθηκευτική διαδικασία. Περιλαμβάνει τον ποιοτικό εμπλουτισμό των λιπιδίων, λόγω της υδρόλυσης των ακόρεστων λιπαρών που καταλύεται από τις φωσφολιπάσες²³³.

Η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα γίνεται με εξωκύτωση των πολυστιβαδωτών σωματίων με τη συμμετοχή μικροσωληνίσκων και μικρονηματίων. Ο μηχανισμός έκκρισης, όπως και ο τρόπος κίνησης των πολυστιβαδωτών σωματίων προς τη μεμβράνη των τύπου II κυττάρων, παραμένουν εν πολλοίς αδιευκρίνιστοι. Η πυροδότηση της έκκρισης, ίσως λόγω της σημασίας της για την επιβίωση των οργανισμών, ελέγχεται από πολλούς και ανεξάρτητους μεταξύ τους μηχανισμούς²³⁴. Επιπρόσθετα συνυπάρχει ένας ομοιοστατικός μηχανισμός μέσω του οποίου η διφωσφατιδυλοχολίνη και η SP-A μπορούν να αναστείλουν την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα *in vitro*²³⁵. *In vivo* η έκκριση διεγείρεται από τον υπεραερισμό, ακόμη και από μόνο μια βαθιά εισπνοή. Ο βιοχημικός μηχανισμός αυτού του φυσιολογικά πολύ σημαντικού τρόπου διέγερσης δεν έχει ξεκαθαρισθεί. Η SP-A μπορεί να εκκρίνεται και ανεξάρτητα από τα πολυστιβαδωτά σωμάτια, ενώ το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και με την SP-D²³⁶.

Τα πολυστιβαδωτά σωμάτια που εκκρίνονται στον κυψελιδικό χώρο, μετατρέπονται σε σωληνώδη μυελίνη (tubular myelin) πριν να πάρουν την τελική μορφή της διπλοστιβάδας. Η SP-A συμμετέχει σε αυτήν τη μετατροπή, όπως αναφέρεται παραπάνω. Ο σχηματισμός της διπλοστιβάδας και η συνεχής συστολή και διαστολή εμπλουτίζουν σε κορεσμένα λιπαρά οξέα τη διπλοστιβάδα, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται τα ακόρεστα. Στις διαδικασίες αυτές σημαντικός είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Η απορρόφηση των φωσφολιπιδίων στη μεσόφαση αέρα-υγρού μπορεί πλέον να μελετηθεί, αλλά και να απεικονισθεί με τη βοήθεια νέων τεχνικών που αναφέρονται στη συνέχεια. Η επαναλαμβανόμενη διαστολή και συστολή στη μεσόφαση αέρα-υγρού προκαλεί το διαχωρισμό συγκεκριμένων συστατικών και την είσοδο άλλων. Τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά και η χοληστερόλη και η τριακυλογλυκερόλη που βρίσκονται στον κυψελιδικό χώρο, επαναπροσλαμβάνονται μερικά από τα τύπου II κύτταρα. Τα λιπίδια αυτά, που αποτελούν δομικά υλικά για την επανασύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα όπως αναφέρεται παραπάνω, βρίσκονται συνήθως με τη μορφή κυστιδίων, στα οποία περιλαμβάνονται ελάχιστες ή καθόλου πρωτεΐνες. Η χρονική σταθερά της ανακύκλωσης ποικίλει ανάλογα με το λιπίδιο, τη θερμοκρασία και το είδος. Η



ενδοτραχειακή χορήγηση σημασμένων λιπιδίων και η εμφάνισή τους μετά στα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα βοήθησε στον καθορισμό του χρόνου, αλλά και της καμπύλης κάθαρσης των λιπιδίων αυτών²³⁷. Φαίνεται ότι τα φωσφολιπίδια απομακρύνονται από τις κυψελίδες κάθε 5-10 ώρες και η αποτελεσματικότητα αυτού του μηχανισμού ποικίλει από 23%²³⁸ έως 85%²³⁹ ανάλογα με την εργασία. Τα φωσφολιπίδια που επανεισέρχονται στα πνευμονοκύτταρα είτε ενώνονται σαν κυστίδια με τα πολυστιβαδωτά σωματίδια, είτε αποδομούνται από τα λυσοσώματα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Απεικονιστική μελέτη του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών την τελευταία δεκαετία βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό τη γνώση μας για τη δομή και τη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τεχνικές βασισμένες στον φθορισμό έχουν επιτρέψει την άμεση επισκόπηση των μεταβολών που υφίσταται ένα film DPPC στη μεσόφαση αέρα-υγρού, επιβεβαιώνοντας ή απορρίπτοντας με αυτόν τον τρόπο τις προηγούμενες θεωρίες που βασίζονταν σε έμμεσα στοιχεία. Κατά τη διάρκεια της συμπίεσης του film, τα λιπίδια διαμορφώνουν μια δομή σαν gel, ενώ η περαιτέρω συμπίεση τους δίνει χαρακτηριστικά στερεού. Οι φάσεις αυτές δεν είναι διακριτές μεταξύ τους και μπορεί να συνυπάρχουν. Οι συμπιεσμένες αυτές δομές έχουν συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ανάλογα με τη λιπιδική σύνθεση του film. Ο Pierre Giles DeGennes (Nobel 1991 για τις μελέτες του στο "Soft Matter") θεωρεί ότι ο διαφορετικός προσανατολισμός και στροφή των διαφόρων μορίων κατά τη "συσκευασία" του δίνει στο film τη δομή "υγρού-κρυστάλλου"²⁴⁰.

Μελέτες με σημασμένα λιπιδικά film επιβεβαιώνουν την ικανότητα της ακόρεστης PC να διευκολύνει την επανέκπτυξη της "συσκευασμένης" DPPC, επιβεβαιώνοντας τα έμμεσα στοιχεία ότι τα μόρια της DPPC, αλλά και της PG παρουσία ιόντων ασβεστίου, "βγαίνουν" από το film όταν αυτό συμπιέζεται²⁴¹. Η "έξοδος" αυτή, αλλά και η "συμπίεση" των λιπιδίων στο μικρότερο δυνατό χώρο, στοιχείο που συνδέεται άμεσα με τις αποπρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, καθορίζει την αναπτυσσόμενη επιφανειακή τάση. Η άμεση απεικόνιση της δομής του film παρέσφερεί απαντήσεις για το ρόλο των διαφόρων μορίων και μπορεί να καθοδηγήσει τη σύνθεση νέων μορφών surfactants.



Το βέβαιο είναι ότι στον κυψελιδικό χώρο συνυπάρχουν ταυτόχρονα 4 τουλάχιστον μορφές surfactant: τα πολυστιβαδωτά σωματίδια, η σωληνώδης μυελίνη, η λιποπρωτεϊνική διπλοστιβάδα και μικρά κυστίδια. Η ανάκτηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα περιλαμβάνει όπως είναι φυσικό όλες τις παραπάνω μορφές. Οι διαφορικές φυγοκεντρήσεις μπορούν εν μέρει να διαχωρίσουν αυτό το υλικό. Οι βαριές μορφές έχουν καλή επιφανειοδραστική δράση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και θεωρείται ότι κατά κύριο λόγο περιέχουν σωληνώδη μυελίνη. Στις ελαφρές μορφές αντιπροσωπεύονται κατά κύριο λόγο τα μικρά κυστίδια και η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες είναι πολύ περιορισμένη. Οι ελαφρές μορφές έχουν μειωμένη επιφανειοδραστική ικανότητα. Οι βαριές μορφές μπορεί να μετατραπούν σε ελαφρές μορφές μετά την επίδραση πρωτεασών και ταυτόχρονη διαστολή και συστολή της επιφάνειάς τους.

Επιφανειοδραστικός παράγοντας και βρογχοκυψελιδική έκπλυση

Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (bronchoalveolar lavage, BAL) αποτελεί το μοναδικό τρόπο ανάκτησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα που βρίσκεται στον κυψελιδικό χώρο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι αεροφόρες κοιλότητες στις οποίες γίνεται η έκπλυση πλημμυρίζουν από φυσιολογικό ορό. Η διαδικασία αυτή διαταράσσει τη βιοφυσική και βιοχημική ισορροπία του μικροπεριβάλλοντός τους, με αποτέλεσμα στο υγρό που ανακτάται να εμφανίζονται, εκτός από τις φυσιολογικές μορφές του επιφανειοδραστικού παράγοντα που αναφέρονται παραπάνω και μορφές που *in vivo* διαχωρίζονται και δεν συνυπάρχουν. Επίσης η διαταραχή αυτής της ισορροπίας, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση με το διάμεσο χώρο, δυσκολεύει εξαιρετικά τον ακριβή καθορισμό του όγκου του υγρού που επαλείφει τις κυψελίδες της εκπλυόμενης περιοχής. Η προσπάθεια χρησιμοποίησης διαφόρων ουσιών σαν δεικτών διάλυσης για τον καθορισμό του όγκου, όπως η αλβουμίνη²⁴² ή η ουρία²⁴³, δεν απέδωσε ουσιαστικά αποτελέσματα²⁴⁴. Ο όγκος του εγχυόμενου υγρού που ανακτάται είναι συνήθως 40-70%²⁴⁵.

Εκτός από τις περιπτώσεις που χρειάζεται εντοπισμένη έκπλυση, το BAL λαμβάνεται συνήθως από το δεξιό μέσο λοβό ή τη γλωσσίδα. Το βρογχοσκόπιο ενσφηνώνεται σε έναν τμηματικό ή υποτμηματικό βρόγχο, κατά συνέπεια η έκπλυση αφορά 15-18 γενιές βρόγχων. Η περιοχή αυτή αφορά το 1,5-3% της κυψελιδικής επιφάνειας των πνευμόνων και αντιστοιχεί σε ένα περίπου εκατομμύριο κυψελίδες. Η



έκπλυση γίνεται με διαδοχικές εγχύσεις ποσοτήτων φυσιολογικού ορού. Ο συνολικός όγκος έγχυσης παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις (40-300ml) μεταξύ των διαφόρων ερευνητών και όπως και ο αριθμός των δόσεων θα πρέπει να καθορίζεται με ακρίβεια κατά την παρουσίαση του πρωτοκόλλου. Η ανάκτηση του υγρού μπορεί να γίνει είτε με εφαρμογή ήπιας μηχανικής αναρρόφησης (25-100 mmHg), είτε χειροκίνητα αναρροφώντας τη σύριγγα έγχυσης. Και στις δύο περιπτώσεις η εφαρμογή έντονα αρνητικής πίεσης πρέπει να αποφεύγεται, μια και μπορεί να προκαλέσει σύμπτωση των τοιχωμάτων του αεραγωγού περιφερικά του σημείου ενσφήνωσης, παρεμποδίζοντας την αναρρόφηση.

Συνήθως το πρώτο δείγμα θεωρείται ότι αφορά την έκπλυση του βρογχικού βλεννογόνου, με αποτέλεσμα να αναμένεται αυξημένη παρουσία επιθηλιακών κυττάρων και πολυμορφοπύρηνων καθώς και μειωμένα μακροφάγα. Η έκπλυση με 4 δόσεις των 60ml σε υγιείς μη καπνιστές έδειξε ότι η αναλογία των κυψελιδικών κυττάρων ήταν κοινή και στα τέσσερα δείγματα²⁴⁶, αλλά άλλοι ερευνητές^{247,248} επισημαίνουν ότι σε καπνιστές ή σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από έντονη φλεγμονή των βρόγχων, το πρώτο έκπλυμα πρέπει να εξετάζεται ξεχωριστά. Επειδή δεν υπάρχει πλήρης σύμπτωση απόψεων καλό θα είναι να καθορίζεται αν στην ανάλυση του εκπλυόμενου υγρού περιλαμβάνεται το πρώτο δείγμα ή όχι. Επίσης θα πρέπει να καθορίζεται με λεπτομέρεια η διαδικασία χειρισμού του δείγματος (τρόποι διαχωρισμού των κυττάρων, χειρισμός του υπερκειμένου, διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, κ.λ.π.), μια και στο σημείο αυτό δεν υπάρχει πλήρης ομοφωνία, αλλά γενικές τάσεις.

Η έλλειψη κοινής μεθοδολογίας, η μεγάλη διακύμανση στους εκπλυόμενους όγκους, αλλά και η έλλειψη μεγάλης έκτασης κλινικών ερευνών δεν επιτρέπουν τη διατύπωση φυσιολογικών ή αναμενόμενων τιμών ακόμη και για τους υγιείς ενήλικες. Έτσι κάθε μελέτη χρησιμοποιεί και τη δική της ομάδα ελέγχου. Η γενική τάση είναι ότι η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλογλυκερόλη αποτελούν το 80% των φωσφολιπιδίων του υπερκειμένου, ενώ οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελούν το 10% των ολικών πρωτεϊνών. Μεγάλη διακύμανση παρατηρείται και κατά τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, ενώ σε εξέλιξη βρίσκεται μια μεγάλη πολυκεντρική ευρωπαϊκή μελέτη ελέγχου ποιότητας (quality control) των κέντρων που χρησιμοποιούν μετρητές επιφανειακής τάσης (bubble surfactometer)²⁴⁹.

Αντικρουόμενα είναι επίσης τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση 'υγιών' καπνιστών. Αρχικές μελέτες²⁵⁰ διαπίστωσαν

μειωμένα επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων, που συνδυάζονταν όμως και με επιστροφή μειωμένων όγκων έκλυσης, τα οποία επέστρεφαν σε 'φυσιολογικά' επίπεδα μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Άλλες μελέτες όμως στη συνέχεια έδειξαν φυσιολογικά²⁵¹ ή και αυξημένα επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων²⁵². Η αναλογία των φωσφολιπιδίων δεν φαίνεται να παρουσιάζει μείζονες μεταβολές. Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A και SP-D ήταν μειωμένες²⁵³, στοιχείο συμβατό με την αυξημένη επίπτωση αναπνευστικών λοιμώξεων στους καπνιστές. Επίσης μειωμένη φαίνεται να είναι και η επιφανειακή τάση²⁵⁴.

Οι διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη διάρκεια της οξείας πνευμονικής βλάβης και του ARDS έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τόσο σε κλινικό, όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Ήδη από το 1967 ο Ashbaugh²⁵⁵ στο κλασσικό του άρθρο συνέδεσε τις μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα με την παθοφυσιολογία του ARDS, ενώ από το 1982 ο Hallman²⁵⁶ είχε περιγράψει δομικές και λειτουργικές διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε ασθενείς με ARDS. Οι διαταραχές αυτές συνδέθηκαν με τη διαταραχή της μηχανικής του πνεύμονα και της ανταλλαγής αερίων.

Σε μια προοπτική προτυποποιημένη μελέτη αξιολόγησης της εξέλιξης των βιοχημικών παραμέτρων του BAL σε ασθενείς με ARDS που έκανε η ομάδα μας, διαπιστώθηκαν ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα, που εξελίσσονταν καθώς το ARDS περνούσε από την πρώιμη, στην ενδιάμεση και όψιμη φάση²⁵⁷. Εκτός από τη σταδιακά μειούμενη ποσότητα των ολικών φωσφολιπιδίων, διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού της φωσφατιδυλοχολίνης και της φωσφατιδυλογλυκερόλης, με αντίστοιχη αύξηση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, της σφιγγομυελίνης και της φωσφατιδυλοσερίνης. Επίσης διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού των φωσφολιπιδίων που απομονώθηκαν στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύουν τα μεγάλα συσσωματώματα (large aggregates, LAs), που επιδεικνύουν καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Τα ευρήματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά άλλων ερευνητών όπως του Guenther (μειωμένα ολικά φωσφολιπίδια, μειωμένα LAs, μειωμένη φωσφατιδυλοχολίνη)²⁵⁸ και του Gregory (μειωμένα ολικά φωσφολιπίδια, μειωμένα LAs, παθολογικό profile φωσφολιπιδίων)²⁵⁹.

Η αιτία της οξείας πνευμονικής βλάβης δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τις ποιοτικές διαταραχές των φωσφολιπιδίων, όπως διαπιστώθηκε σε ασθενείς με ARDS προκληθέν από σήψη²⁶⁰ ή πολλαπλά τραύματα²⁶¹. Η εμφάνιση των

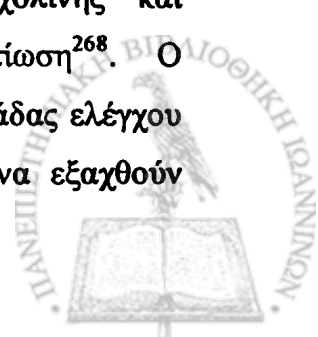
διαταραχών του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της οξείας πνευμονικής βλάβης φαίνεται ότι γίνεται αρκετά γρήγορα, όπως δείχνουν πρόσφατες εργαστηριακές²⁶², αλλά και κλινικές²⁶³ μελέτες. Από τη στιγμή που οι διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελούν σημαντικό στοιχείο της παθοφυσιολογίας του ARDS, ο χρόνος εμφάνισης και η βαρύτητα τους αποκτούν ιδιαίτερη σημασία, μια και η αποτροπή τους θα μπορούσε να επηρεάσει θετικά την εξέλιξη της οξείας πνευμονικής βλάβης, όπως συζητείται στη συνέχεια.

Κλινική εμπειρία στη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Η χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει επιχειρηθεί σε πολλές κλινικές οντότητες. Στη συνέχεια ακολουθεί μια σύντομη ανασκόπηση των κλινικών μελετών και αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά τα νεογνά, η χορήγηση surfactant θεωρείται θεραπεία επιλογής στο σύνδρομο της αναπνευστικής δυσχέρειας. Η ερώτηση για το χρόνο χορήγησης στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας έχει απαντηθεί με τον απλούστερο τρόπο: όσο γρηγορότερα γίνεται μετά τη σταθεροποίηση του νεογνού²⁶⁴. Τα μη διασωληνωμένα νεογνά με αυξανόμενες ανάγκες σε οξυγόνο φαίνεται ότι ωφελούνται από τη διασωλήνωση και τη χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα, που ακολουθείται από την αποσωλήνωση μόλις αρχίσει η κλινική βελτίωση²⁶⁵. Η χορήγηση surfactant έχει επιχειρηθεί σε πολλές άλλες καταστάσεις όπως η βρογχολίτιδα, η ανεπάρκεια της SP-A, η εισρόφηση μηκωνίου ή η βαριά πνευμονία, χωρίς όμως να έχει αποδείξει τη χρησιμότητά της σε μεγάλες κλινικές μελέτες.

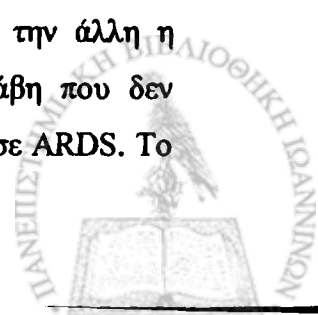
Όσον αφορά την οξεία πνευμονική βλάβη των ενηλίκων και το ARDS η χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει μπει στη δεύτερη δεκαετία, αλλά η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη. Οι πρώτες αναφορές συνοδεύτηκαν με ενθαρρυντικά αποτελέσματα²⁶⁶, αλλά η συνέχεια δεν ήταν ανάλογη. Η χορήγηση νεφελοποιημένου συνθετικού surfactant (Exosurf) δεν επηρέασε σημαντικά την επιβίωση, τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού και την πνευμονική λειτουργία²⁶⁷, ενώ και η χορήγηση νεφελοποιημένου μίγματος φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλογλυκερόλης δεν συνοδεύτηκε από ανάλογη βελτίωση²⁶⁸. Ο περιπτωσιακός χαρακτήρας των παραπάνω μελετών και η έλλειψη ομάδας ελέγχου οδήγησε στη διενέργεια προτυποποιημένων ερευνών, προκειμένου να εξαχθούν



ασφαλέστερα συμπεράσματα. Ο Weg²⁶⁹ μελέτησε 51 ασθενείς με ARDS προκληθέν από σήψη, οι μισοί εκ των οποίων έλαβαν εισπνεόμενο surfactant με διάφορα σχήματα, χωρίς να επιδειχθεί κάποια σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου. Στη μεγαλύτερη έως σήμερα πολυκεντρική προτυποποιημένη έρευνα μελετήθηκαν 725 ασθενείς με προκληθέν από σήψη ARDS²⁷⁰. Οι μισοί από αυτούς πήραν εισπνεόμενο συνθετικό surfactant και οι άλλοι μισοί placebo. Δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στην επιβίωση, στη διάρκεια νοσηλείας, στη διάρκεια του μηχανικού αερισμού ή κάποια άλλη φυσιολογική παράμετρο. Σε μια άλλη προτυποποιημένη μελέτη 59 ασθενών με ARDS, η ενδοτραχειακή έγχυση φυσικού βοείου surfactant (έως 4 δόσεις των 100mg/kg) προκάλεσε σημαντική μείωση της μίγματος του χορηγούμενου οξυγόνου 5 ημέρες μετά από την ενδοτραχειακή του χορήγηση και η θνητότητα έδειξε μια πτωτική τάση (19% αντί 44% στην ομάδα ελέγχου)²⁷¹.

Η διαπιστωμένη διαταραχή του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην οξεία πνευμονική βλάβη και το ARDS καθιστά την εξωγενή χορήγηση surfactant μια πολύ ελκυστική θεωρητική επιλογή. Η επιλογή αυτή όμως συνοδεύεται από αρκετά αναπάντητα ερωτήματα. Ποια είναι η ιδανική μορφή τού επιφανειοδραστικού παράγοντα και η δοσολογία του; Υπερέχουν οι φυσικές μορφές, που περιέχουν μεγαλύτερο φάσμα λιπιδίων και τις ειδικές πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, των συνθετικών που δεν περιέχουν καθόλου πρωτεΐνες; Αν και θεωρείται ότι η παρουσία των SP-B και SP-C παρεμποδίζει την αναστολή του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τις πρωτεΐνες του πλάσματος, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελούν στόχο συνεχούς πρωτεόλυσης από την ελαστάση των ουδετερόφιλων²⁷², οπότε η παρουσία τους να μην είναι τόσο σημαντική όσο φανταζόμαστε. Από την άλλη αν και μέχρι τώρα οι μεταanalύσεις δεν είχαν δείξει εμφανή υπεροχή των συνθετικών ή των φυσικών surfactant²⁷³, μια πρόσφατη μεγάλη έρευνα σε 212 νεογνά²⁷⁴, που συνέκρινε ένα φυσικό και ένα τεχνητό surfactant σε νεογνά με αναπνευστική δυσχέρεια διακόπηκε λόγω μεγάλης διαφοράς στην επιβίωση υπέρ του φυσικού (χοίρειου).

Ένα άλλο θέμα αφορά τον τρόπο χορήγησης. Αν και η βιβλιογραφία τοποθετείται υπέρ της έγχυσης και όχι της νεφελοποίησης²⁷⁵, οι σχετικά μεγάλοι όγκοι υγρών που απαιτούνται για την έγχυση μπορεί να επηρεάσουν τη μηχανική των πνευμόνων, αλλά κυρίως συνδέονται με πολύ υψηλό κόστος. Από την άλλη η νεφελοποίηση εφαρμοζόμενη σε ασθενείς με οξεία πνευμονική βλάβη που δεν αερίζονται μηχανικά, μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη της τελευταίας σε ARDS. Το



υψηλό κόστος καθιστά επιτακτική την αναγνώριση των ασθενών με ARDS που έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες ωφέλειας από τη χορήγηση του surfactant. Η μεταανάλυση των μελετών δείχνει ότι μόνο 50% των ασθενών με ARDS ανταποκρίνεται στη χορήγηση, κατά συνέπεια η διευκρίνιση των χαρακτηριστικών αυτής της ομάδας είναι επιβεβλημένη, προκειμένου να καθορισθούν οι συστάσεις χορήγησης. Συμπερασματικά η εξωγενής χορήγηση surfactant, αν και πολλά υποσχόμενη, απέχει ακόμη από το να θεωρηθεί μέρος της συμβατικής θεραπείας της οξείας πνευμονικής βλάβης και του ARDS.

Η εξωγενής χορήγηση surfactant έχει επιχειρηθεί και σε μια σειρά πνευμονικών παθήσεων στους ενήλικες^{276,277}. Η χορήγηση βοείου surfactant (120mg) σε ασθενείς με μετρίου ως σοβαρού βαθμού κυστική ίνωση, σε διπλή τυφλή μελέτη, δεν συνοδεύτηκε από βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας ή της οξυγόνωσης²⁷⁸, ενώ και μετά από καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις δεν παρατηρήθηκαν εντυπωσιακά αποτελέσματα²⁷⁹.

Η μελλοντική κατεύθυνση είναι η ανάπτυξη surfactant που θα έχουν καλύτερες επιφανειοδραστικές ιδιότητες και θα είναι πιο φθηνά, έτσι ώστε να είναι δυνατή η χορήγηση επαρκών ποσοτήτων στους πνεύμονες των ενηλίκων. Η πρώτη γενιά των χορηγούμενων surfactant περιλάμβανε είτε τα εκχυλίσματα βοείου surfactant (Surfacten, Survanta, Infasurf, Alveofact, Curosurf), είτε συνθετικά μίγματα φωσφατιδυλοχολίνης που δεν περιείχαν πρωτεΐνες (Exosurf). Η μελλοντική γενιά αφορά surfactant με καθορισμένα λιπίδια και υδρόφοβα πεπτίδια ή πρωτεΐνες και ήδη τα πρώτα προϊόντα της νέας γενιάς αποτελούν αντικείμενο κλινικών δοκιμών.

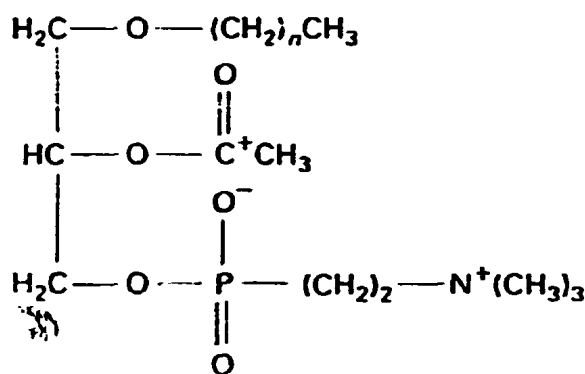


Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων

Platelet-Activating Factor (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) είναι το κοινό όνομα της 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-σπ-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης, ενός φωσφολιπιδίου που δρα σαν μεσολαβητής τόσο ενδοκυττάρια, όσο και μεταξύ των κυττάρων. Ο PAF περιγράφηκε αρχικά σαν μια ουσία που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα βασεόφιλα²⁸⁰, ενώ αρκετά αργότερα διαπιστώθηκε η χημική του δομή²⁸¹ και η δράση του στα αιμοπετάλια²⁸². Έκτοτε υπήρξε μια πραγματική έκρηξη των γνώσεων για τον PAF, τον τρόπο δράσης του και την αναστολή της, καθώς και για όλο το σύστημα των τροποποιημένων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων. Σήμερα είναι γνωστό ότι ο PAF παράγεται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων, που περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα πολυμορφοπύρρηνα, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μαστοκύτταρα και τα σπερματοζωάρια, ενώ έχει απομονωθεί σε αρκετούς ιστούς και όργανα (πίνακας 3.1). Ο PAF δρα σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις (10^{-12} M έως 10^{-9} M), συνδέεται με ειδικό υποδοχέα, παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών δράσεων, ενώ η ουσιαστική συμμετοχή του έχει διαπιστωθεί και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις.

Η οξειδωτική προσβολή των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μορίων με δομή και δράση παρόμοια με αυτήν του PAF. Τα μόρια αυτά (PAF-like lipids), που έχουν πολλά κοινά σημεία με τις προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια, δρουν και μέσω των υποδοχέων του PAF, ενώ υδρολύονται από τις PAF ακετυλοϋδρολάσες. Η συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία διαφόρων νόσων αποδεικνύεται εξαιρετικά σημαντική, ενώ εξίσου σημαντική είναι και η αλληλεπίδρασή τους με το σύστημα του PAF.



$n = 15 \text{ or } 17$

Σχήμα 3.1. Χημικός τύπος του PAF.



Πίνακας 3.1. Οι βιολογικές δράσεις του PAF.

<u>Κύτταρο ή σύστημα</u>	<u>Φυσιολογικός ρόλος</u>
Αιμοπετάλια	Ενεργοποίηση, συσσώρευση, έκκριση κοκκίων
Πολυμορφοπύρρηνα	Χημειοταξία, συσσώρευση, παραγωγή O_2^- , προσκόλληση
Ηωσινόφιλα	Χημειοταξία, έκκριση κοκκίων, παραγωγή λευκοτριενίων
Μονοκύτταρα/Μακροφάγα	Συσσώρευση, παραγωγή O_2^- , παραγωγή κυτοκινών
Λεμφοκύτταρα	Αναστολή παραγωγής IL-2
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Αύξηση διαπερατότητας, προσκόλληση ουδετεροφίλων
Λείες μυικές ίνες	Ανάπτυξη, σύσπαση
Βρογχικός βλεννογόνος	Βρογχόσπασμος, συσσώρευση ηωσινοφίλων
Καρδιά	Επίδραση στο ρυθμό και στην καρδιακή παροχή
Αγγεία	Επίδραση στον αγγειακό τόνο
Ήπαρ	Γλυκογονόλυση
Νεφροί	Αύξηση σπειραματικής διήθησης
Νευρικό σύστημα	Απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών
Μήτρα	Σύσπαση
Ωοθήκες	Ωοποίηση
Αμνιακή μεμβράνη	Παραγωγή PGE_2
Εμβρυικός πνεύμονας	Ωρίμανση
Οστεοκλάστες	Επίδραση στο κυτοσολικό ελεύθερο Ca^{++}



Σύνθεση του PAF

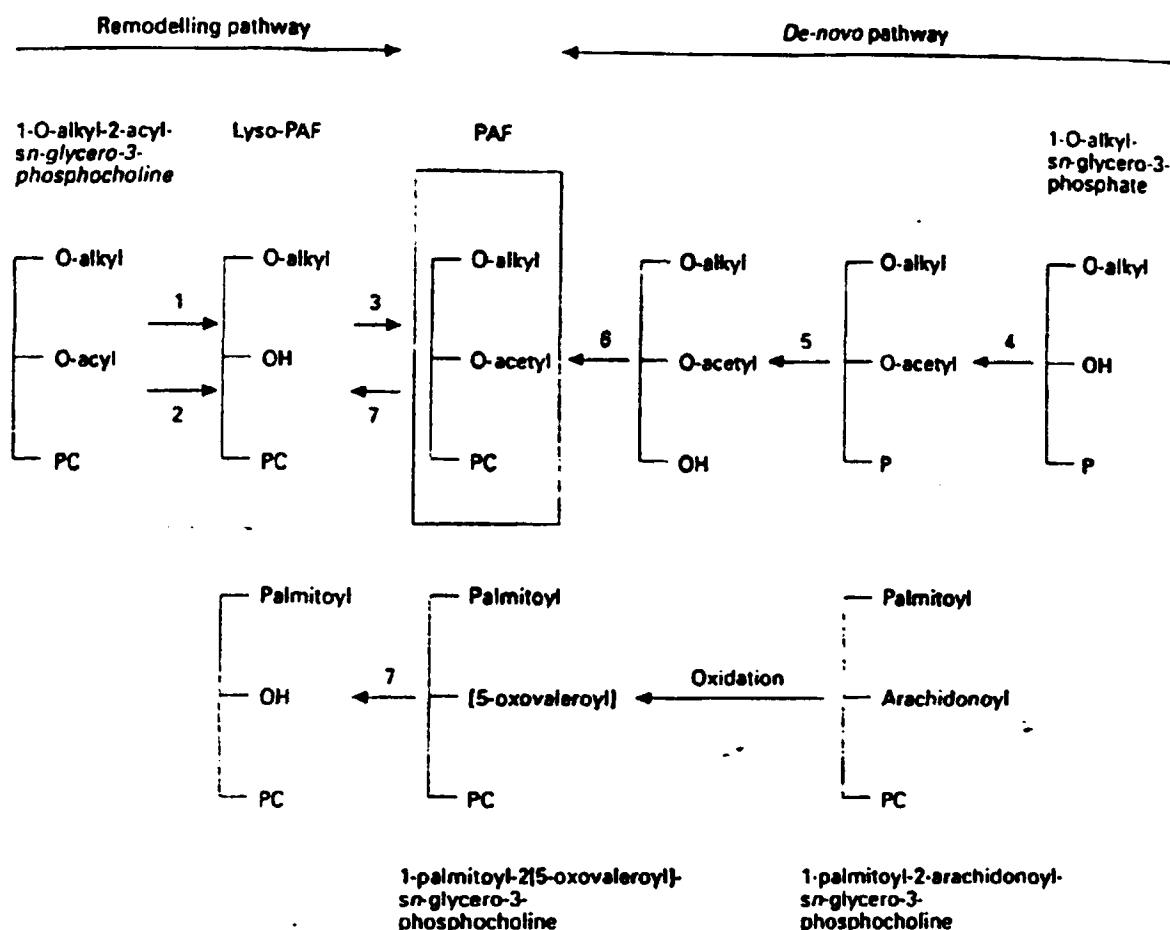
Η σύνθεση του PAF γίνεται μέσω δύο διαφορετικών ενζυμικών οδών που απεικονίζονται στο σχήμα 3.2. Η πρώτη οδός αναφέρεται σαν remodeling pathway (πορεία ανάπλασης) και η δεύτερη σαν de novo pathway (εξ αρχής πορεία).

Κατά την πορεία ανάπλασης η δράση της φωσφολιπάσης A_2 στην 1-O-αλκυλ-2-λυσω-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη υδρολύει τον εστερικό δεσμό με λιπαρό οξύ στη sn-2 θέση και παράγει το 1-O-αλκυλ-2-λυσω-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PAF). Το ίδιο αποτέλεσμα παράγεται και από τη δράση της ανεξάρτητης από το συνένζυμο-A τρανσακυλάσης. Ο lyso-PAF ακετυλιώνεται από μια ειδική ακετυλοτρανφεράση για να σχηματίσει το μόριο του PAF. Η αντίθετη αντίδραση (μετατροπή του PAF σε lyso-PAF) υδρολύεται από ένα ειδικό ένζυμο (PAF-ακετυλοϋδρολάση), αποτελώντας την οδό αποδόμησης του PAF.

Η σύνθεση του PAF με την πορεία ανάπλασης δεν γίνεται με συνεχή τρόπο, αλλά μόνο όταν τα κύτταρα διεγείρονται από τα κατάλληλα ερεθίσματα. Η συγκεκριμένη οδός φαίνεται ότι είναι η κύρια οδός σύνθεσης στα διεγερμένα πολυμορφοπύρρηνα, στα μονοπύρρηνα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στις φλεγμονώδεις και αλλεργικές αντιδράσεις. Ο PAF που συντίθεται με τη συγκεκριμένη οδό εκκρίνεται στην υγρή εξωκυττάρια φάση από τα μονοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα. Αντίθετα ο PAF που συντίθεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταφέρεται στη μεμβράνη και παραμένει στην επιφάνεια του κυττάρου. Στη θέση αυτή δρα σα μεσολαβητής μεταξύ των κυττάρων (juxtacrine system), ενεργοποιώντας τα πολυμορφοπύρρηνα. Οι μηχανισμοί που καθορίζουν την έκκριση του PAF δεν έχουν ξεκαθαρισθεί πλήρως²⁸³.

Η de novo πορεία ξεκινά με την ακετυλίωση της sn-2 θέσης του 1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος, συνεχίζεται με την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στην sn-3 θέση και την αντικατάστασή του από φωσφοχολίνη (σχήμα 3.2). Η de novo οδός θεωρείται ότι εξασφαλίζει τη συνεχή σύνθεση του PAF σε ιστούς όπως οι νεφροί και ο εγκέφαλος παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση.





Σχήμα 3.2. Σύνθεση και αποδόμηση του PAF και ενός οξειδωμένου φωσφολιπιδίου με παρόμοιες (PAF-like) ιδιότητες. Τα ένζυμα που καταλύουν την κάθε αντίδραση είναι: (1) φωσφολιπάση A_2 , (2) ανεξάρτητη από το συνένζυμο A τρانشακυλάση, (3) ακετυλοσυνενζυμο-A-λυσο-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (PAF-ακετυλτρανσφεράση), (4) 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-ακετυλοσυνένζυμο-A-ακετυλοτρανσφεράση, (5) φωσφοϋδρολάση, (6) CDP-φωσφοχολινوترανσφεράση, (7) PAF ακετυλοϋδρολάση. Στο δεύτερο μέρος του σχήματος η οξείδωση της 1-παλμιτοϋλ-2-αραχιδονυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης παράγει ένα οξειδωμένο, βιοενεργό, PAF-like φωσφολιπίδιο (1-παλμιτοϋλ-2-[5-οξοβαλεροϋλ]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη). Τα φωσφολιπίδια αυτά δεν παράγονται από μια ενζυμική οδό υποκειμένη σε ρύθμιση, αλλά αποτελούν κατά κανόνα προϊόντα οξειδωτικής προσβολής των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών. Τόσο ο PAF, όσο και τα PAF-like οξειδωμένα φωσφολιπίδια αποδομούνται από ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας PAF-ακετυλοϋδρολάσες²⁸⁴.

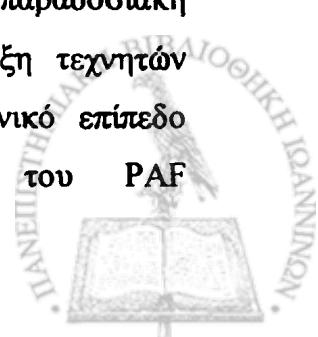
Υποδοχέας του PAF και ανταγωνιστές

Η δράση του PAF πραγματοποιείται με τη σύνδεση του μορίου του με μια ειδική πρωτεΐνη-υποδοχέα²⁸⁵. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1²⁸⁶. Η ανάλυση της δομής της δείχνει ότι ανήκει στην οικογένεια των σερπεντινών και προκειμένου να αποκτήσει την τεταρτοταγή δομή της διαπερνά 7 φορές την κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα μέσω των G πρωτεϊνών, προκαλεί υδρόλυση της GTP, που με τη σειρά της σαν ενδοκυττάριος μεσολαβητής πυροδοτεί μια σειρά αντιδράσεων, όπως η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και άλλων κινασών, μέσω των οποίων ασκείται η βιολογική δράση του PAF.

Τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα β-λεμφοκύτταρα φαίνεται να εκφράζουν με συνεχή τρόπο τον υποδοχέα του PAF στην επιφάνειά τους²⁸⁷. Η ρύθμιση του αριθμού των υποδοχέων τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης του PAF. Η INF-γ αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα²⁸⁸, όπως και ο TNF-α²⁸⁹, ενώ αντίθετα φαίνεται ότι δρα η αύξηση του ενδοκυττάριου c-AMP²⁹⁰. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνεται και σε γονιδιακό επίπεδο. Σε λείες μυϊκές ίνες από πνευμονική αρτηρία η υπερέκταση (stretch) των κυττάρων οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα²⁹¹, κατατάσσοντάς το στη μεγάλη ομάδα των 'μηχανο-ευαίσθητων' γονιδίων.

Εκτός από το εξωκυττάριο PAF, πολλοί τύποι κυττάρων περιέχουν σημαντικές ποσότητες PAF στο κυτοσόλιό τους, όπου το φωσφολιπίδιο δρα σαν δεύτερος μεταφορέας μηνύματος. Το κατά πόσον οι υποδοχείς του PAF υπάρχουν και ενδοκυττάρια αποτελεί ένα αμφισβητούμενο ζήτημα, αν και πρόσφατα πειραματικά δεδομένα²⁹² υποστηρίζουν και την ενδοκυττάρια παρουσία τους.

Πολλές ουσίες ανταγωνίζονται τον PAF για τη σύνδεση με τον υποδοχέα του. Κάποιοι από τους ανταγωνιστές του PAF παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με το μόριο του PAF, ενώ άλλοι επιδεικνύουν έντονα ανταγωνιστική δράση, αν και δομικά παρουσιάζουν αρκετές διαφορές. Μερικοί ανταγωνιστές του PAF είναι φυσικές ουσίες και ορισμένοι έχουν απομονωθεί στα βότανα που χρησιμοποιεί η παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για την αντιμετώπιση του άσθματος. Η ανάπτυξη τεχνητών ανταγωνιστών του PAF χρονολογείται από δεκαετίας και σε κλινικό επίπεδο πρωτοδοκιμάστηκαν στο άσθμα²⁹³. Έκτοτε ανταγωνιστές του PAF

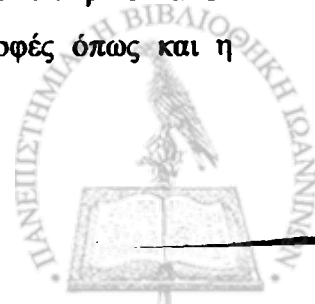


χρησιμοποιήθηκαν σε δερματικές²⁹⁴, νεφρικές²⁹⁵, αιματολογικές²⁹⁶, γαστρεντερικές²⁹⁷, ρευματολογικές²⁹⁸ και νευρολογικές²⁹⁹ νόσους, χωρίς όμως να έχει επιβληθεί η χρησιμότητά τους με διπλές τυφλές μελέτες. Η χρησιμοποίηση των ανταγωνιστών του PAF στο χώρο της Εντατικής Θεραπείας άρχισε το 1994 με τη μεγάλη πολυκεντρική μελέτη φάσης III του Dhainaut (³⁰⁰), σε 262 ασθενείς με σήψη από Gram αρνητικά βακτήρια και ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά τη νοσηρότητα και τη θνητότητα. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν όμως από μεγαλύτερες και καλύτερα σχεδιασμένες έρευνες^{301,302,303} που ακολούθησαν, που απέτυχαν να δείξουν την κλινική αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών του PAF στη σήψη. Η χρησιμότητα των ανταγωνιστών στο ARDS αποτελεί αντικείμενο μιας μεγάλης πολυκεντρικής μελέτης (φάσης III) που οργανώνει το ARDSnet και βρίσκεται σε εξέλιξη (Νοέμβριος 2000) με ενθαρρυντικά αρχικά αποτελέσματα.

PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AcH)

Οι PAF-ακετυλοϋδρολάσες αποτελούν μια υπόομάδα των φωσφολιπασών A_2 . Οι φωσφολιπάσες A_2 είναι ειδικά ένζυμα για την υδρόλυση των μικρού μήκους ακυλικών ομάδων στη sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων. Το κύριο υπόστρωμα των PAF-AcH είναι ο PAF, του οποίου υδrolύουν την ακετυλική ομάδα στη θέση sn-2, παράγοντας lyso-PAF (σχήμα 3.2). Εκτός από τον PAF οι PAF-AcH υδrolύουν και παρόμοια με τον PAF (PAF-like) φωσφολιπίδια, όταν στη θέση sn-2 υπάρχουν μικρές ακυλικές ομάδες (μήκους ως 6 ατόμων άνθρακα). Οι PAF-AcH ανήκουν στις σερινο-εξαρτώμενες υδρολάσες, που δεν απαιτούν Ca για τη δράση τους, σημείο που τις διαχωρίζει από τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες. Η υδρόλυση του υποστρώματος αφορά κατά κύριο λόγο τα φωσφολιπίδια που βρίσκονται στην υγρή φάση³⁰⁴. Η ιδιότητα αυτή εξηγεί και την ειδικότητα για φωσφολιπίδια με μικρές sn-2 αλυσίδες, που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα στο νερό. Επίσης εξηγεί τη μεγάλη πτώση της ενζυμικής δραστηριότητας, όσο αυξάνει το μήκος της sn-1 αλυσίδας.

Υπάρχουν δύο διαφορετικές δεξαμενές PAF-AcH, μια ενδοκυττάρια και μια εξωκυττάρια. Οι δύο δεξαμενές και οι αντίστοιχες ενζυμικές μορφές παρουσιάζουν αρκετές βιοχημικές διαφορές³⁰⁵. Ενδοκυττάριας μορφής έχουν απομονωθεί στα ερυθροκύτταρα³⁰⁶, στο ήπαρ, στα νεφρά³⁰⁷ και στον εγκέφαλο³⁰⁸ και διακρίνονται σε δύο ισομορφές (I και II)³⁰⁹. Και οι δύο ενδοκυττάριας ισομορφές όπως και η



εξωκυττάρια μορφή εμπεριέχουν στην καταλυτική περιοχή τους είτε το πενταπεπτίδιο Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly, είτε το Gly-Xaa-Ser-Xaa-Val³¹⁰.

Η εξωκυττάρια μορφή της PAF-AcH βρίσκεται στο πλάσμα, αλλά και σε άλλα βιολογικά υγρά. Η PAF-AcH του πλάσματος απομονώθηκε, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε πλήρως το 1995³¹¹. Φαίνεται ότι η PAF-AcH του πλάσματος συνδέεται μόνο με χαμηλής και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL και HDL)³¹², χωρίς να συνδέεται με άλλα συστατικά του πλάσματος. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 45kD, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα. Καλλιέργειες ανθρώπινων μακροφάγων³¹³, αλλά και της ανθρώπινης ηπατικής κυτταρικής σειράς HEP G2³¹⁴ έδειξαν ότι συνθέτουν και εκκρίνουν PAF-AcH όμοια με αυτή του πλάσματος. Η έκκριση της PAF-AcH στην ηπατική σειρά διεγείρεται από τον PAF και αναστέλλεται από τα οιστρογόνα³¹⁵ και την HDL³¹⁶. Αντίστοιχα η σύνθεση και η έκκριση από τα μακροφάγα αναστέλλεται από τους πολυσακχαρίτες, τον TNF και την IL-1, ενώ επηρεάζεται και από την INF- γ ³¹⁷. Η σχέση μεταξύ PAF και PAF-AcH που συντίθεται και εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα καθορίζει την ισορροπία μεταξύ προφλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους δράσης και αποτελέσματος. Στοιχεία από πρόσφατα πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι η προσθήκη PAF-AcH μειώνει σημαντικά τη βλάβη από επαναιμάτωση (reperfusion injury) στο μυοκάρδιο³¹⁸ και στον πνεύμονα³¹⁹, γεγονός που εφόσον επιβεβαιωθεί σε κλινικό επίπεδο μπορεί να διευκολύνει τον ανοσολογικό χειρισμό των ασθενών.

Τα επίπεδα της PAF-AcH έχουν βρεθεί επηρεασμένα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Μειωμένη έχει βρεθεί η δραστικότητα (activity) της PAF-AcH μεταξύ άλλων στη σήψη³²⁰, τον ενεργό συστηματικό ερυθματώδη λύκο (321), στο παιδικό άσθμα³²² και στη νεκρωτική εντεροκολίτιδα³²³. Η μειωμένη δραστικότητα έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας σε πολυτραυματίες³²⁴. Αντίθετα αυξημένη έχει βρεθεί η δραστικότητα στην κακοήγη υπέρταση³²⁵, σε ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο³²⁶, στο σακχαρώδη διαβήτη³²⁷, σε ρευματοειδή αρθρίτιδα³²⁸, καθώς και σε υγιείς καπνιστές³²⁹. Τέλος αυξημένα επίπεδα PAF-AcH απομονώθηκαν από την ομάδα μας στο βρογχοκυψελιδικό έκλυμα ασθενών με ARDS, υδροστατικό πνευμονικό οίδημα καθώς και στην πρόωπη φάση της πνευμονικής εμβολής.



Μηχανισμοί ελέγχου της βιολογικής δράσης του PAF και οξειδωμένα φωσφολιπίδια

Οι μηχανισμοί ελέγχου της βιολογικής δράσης του PAF είναι πολλοί και αλληλοσυνδεόμενοι. Περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της σύνθεσης αλλά και της ενεργότητας του υποδοχέα, τη ρύθμιση της σύνθεσης του PAF, αλλά και την αποδόμησή του από τις ακετυλοϋδρολάσες. Όλα τα παραπάνω στάδια έχουν αποτελέσει στόχους θεραπευτικής παρέμβασης, που δεν έχει όμως συνοδευτεί από τα προσδοκώμενα αποτελέσματα.

Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια που υπάρχουν στην κυκλοφορία και δρουν μέσω του υποδοχέα του PAF αποτελούν μια μεγάλη και ανομοιογενή ομάδα ουσιών, που παράγονται μετά από οξειδωτική προσβολή των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων³³⁰. Εργαστηριακά έχειδειχθεί, ότι η οξείδωση μεμβρανικών φωσφολιπιδίων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τέτοιων φωσφολιπιδίων³³¹, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα μπορεί να έχει και η οξειδωτική προσβολή της κυκλοφορούσας LDL³³². Οξειδωμένα τροποποιημένα φωσφολιπίδια έχουν απομονωθεί σε εγκεφαλικό ιστό³³³, ενώ υπάρχουν σημαντικά στοιχεία για το ρόλο τους στην αθηρογένεση³³⁴, στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μπορούν να παράγονται και *in vivo* όταν υπάρχουν συνθήκες οξειδωτικής προσβολής.

Δύο είναι τα σημαντικά στοιχεία που καθορίζουν τη δράση τους. Το πρώτο είναι ότι η παραγωγή τους δεν αποτελεί προϊόν προκαθορισμένων ενζυμικών οδών, αλλά αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών. Το δεύτερο είναι ότι αν και η δράση αυτών των φωσφολιπιδίων υπολείπεται της δράσης του PAF, η παρατεταμένη ή η έντονη οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκαλέσει παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αυτών των φωσφολιπιδίων σε τοπικό επίπεδο. Η μεγάλη αυτή παραγωγή μπορεί να έχει τοπικά εξαιρετικά σημαντική δράση. Όταν η συστηματική χορήγηση ανταγωνιστών του υποδοχέα του PAF συνοδεύεται από χαμηλές συγκεντρώσεις σε τοπικό επίπεδο, μπορεί να αδυνατεί να αναστείλει τοπικά τη δράση τους. Η παραπάνω εξήγηση έχει προταθεί για τη σχετική αποτυχία των κλινικών μελετών στην επίτευξη σημαντικού αποτελέσματος.



PAF και οξεία πνευμονική βλάβη

Η σύνδεση του PAF και της οξείας πνευμονικής βλάβης έχει δύο πλευρές. Η πρώτη αφορά τη συμμετοχή του PAF στην παθογένεση της οξείας πνευμονικής βλάβης και η δεύτερη τη χρησιμοποίησή του σα δείκτη βαρύτητας και παρακολούθησής της. Η μέτρηση των επιπέδων του PAF γίνεται τόσο στο αίμα όσο και στο BAL.

Η συμμετοχή του PAF στην πρόκληση της οξείας πνευμονικής βλάβης τεκμηριώθηκε με αρκετές πειραματικές εργασίες. Η χορήγηση συνθετικού PAF σε απομονωμένους πνεύμονες χοίρων, που αρδεύονταν από ορρό, συνοδεύτηκε από αύξηση του εξωαγγειακού πνευμονικού ύδατος και ανάπτυξη πνευμονικού οιδήματος³³⁵. Η ενδοφλέβια χορήγηση PAF σε πρόβατα συνοδεύτηκε από αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας στους πνεύμονες³³⁶, καθώς και αύξηση της ροής λέμφου (αλλά και των πρωτεϊνών της σε σχέση με το πλάσμα) από τους πνεύμονες³³⁷. Η ενδοφλέβια χορήγηση συνθετικού PAF σε κουνέλια συνοδεύτηκε από συστηματική ουδετεροπενία και συσσώρευση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία³³⁸. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ενδοτοξίνης σε ποντίκια συνοδεύτηκε από αύξηση του PAF στην κυκλοφορία, αλλά όχι στο BAL³³⁹. Στην ίδια εργασία η προηγηθείσα χορήγηση ανταγωνιστών του PAF συνοδεύτηκε από μεγάλη μείωση του πνευμονικού οιδήματος που προκαλεί η χορήγηση ενδοτοξίνης.

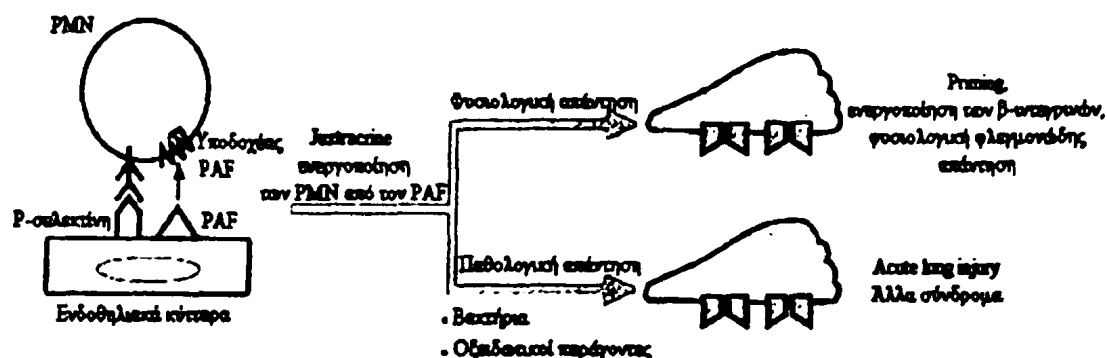
Ο συμβατικός μηχανικός αερισμός συνδέθηκε με αυξημένα επίπεδα PAF (αλλά και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής καθώς και πολυμορφοπύρηνων) στο BAL κουνελιών, σε σχέση με κουνέλια που αερίστηκαν με αερισμό υψηλής συχνότητας, δείχνοντας ότι μπορεί να αποτελέσει δείκτη της προκαλούμενης από το συμβατικό αερισμό βλάβης⁸³. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα συνοδεύτηκαν από κλινικά στοιχεία ανίχνευσης PAF στο BAL ασθενών με ARDS³⁴⁰, αλλά και ασθενών με σηπτικό shock και τραύμα³⁴¹. Η ομάδα μας κατέγραψε στο BAL τις μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην πρώιμη, την ενδιάμεση και την όψιμη φάση του ARDS, δείχνοντας μεγάλη αύξηση του PAF και της PAF-AcH στην πρώιμη φάση και μικρότερη στις επόμενες²⁵⁷. Η πιστοποίηση της συμμετοχής του PAF στην παθογένεση του ARDS οδήγησε στο σχεδιασμό ερευνών αναστολής της βιολογικής δράσης του PAF με τη χορήγηση ανταγωνιστών, με αποτελέσματα που αναφέρονται παραπάνω.



Σε μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα εργασία ο Nagase διερεύνησε το ρόλο του PAF και του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του, σε ένα μοντέλο πνευμονικής βλάβης από εισρρόφηση σε ποντίκια³⁴². Τα ποντίκια στα οποία υπερεκφραζόταν το γονίδιο του υποδοχέα εκδήλωσαν σημαντικά βαρύτερη πνευμονική βλάβη, μεγάλου βαθμού πνευμονικό οίδημα και εξαιρετικά διαταραγμένη ανταλλαγή αερίων, σε σχέση με αυτά που είχαν φυσιολογική έκφραση του υποδοχέα. Επιπλέον ποντίκια στα οποία είχε προσβληθεί γενετικά το γονίδιο του υποδοχέα του PAF, είχαν πολύ μικρότερη πνευμονική βλάβη, μικρού βαθμού πνευμονικό οίδημα και ελάχιστα επηρεασμένη ανταλλαγή αερίων. Ο αριθμός και η λειτουργικότητα των πολυμορφοπύρηνων δεν βρέθηκε επηρεασμένη σε καμία από τις 3 ομάδες, στοιχείο που δείχνει τη σημασία της δράσης του PAF, αλλά και των PAF-like φωσφολιπιδίων, στην πρόκληση της οξείας πνευμονικής βλάβης. Επίσης υποδεικνύει μια μελλοντική θεραπευτική πιθανότητα αντιμετώπισής της, με βάση το μοντέλο που αναπτύσσεται στη συνέχεια.

Τα στοιχεία του Nagase έρχονται να επιβεβαιώσουν παλαιότερες υποθέσεις για τον τρόπο πρόκλησης της βλάβης και τη συμμετοχή τού PAF σε αυτή³⁴³. Σε πρώτο χρόνο (σχήμα 3.3) τα πολυμορφοπύρρηνα συνδέονται με τη P-selectin ή άλλες σελεκτίνες της κυτταρικής επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή δεν προκαλεί (ή προκαλεί μερική) ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων, που χρειάζονται και ένα δεύτερο ερέθισμα προκειμένου να ενεργοποιηθούν και να απελευθερώσουν τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τις δραστικές ρίζες και τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ο PAF που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ή οξειδωμένα φωσφολιπίδια με παρόμοια δράση) μπορεί να αποτελέσει αυτό το δεύτερο ερέθισμα που ενεργοποιεί τα πολυμορφοπύρρηνα. Παρόμοια δράση δεύτερου ερεθίσματος έχει επιδείξει η IL-8³⁴⁴. Το μοντέλο αυτό των δύο βημάτων περιγράφεται σαν juxtacrine signalling. Εξηγεί γιατί ιδιαίτερα χαμηλές συστηματικές συγκεντρώσεις του μεσολαβητή, μπορεί να συνοδεύονται από έντονα φλεγμονώδη αντίδραση σε τοπικό επίπεδο. Ο τρόπος αυτός μεταφοράς του μηνύματος συμβάλλει στην άμυνα, αλλά όταν εκτρέπεται ή δυσλειτουργεί μπορεί να οδηγήσει σε οξεία πνευμονική βλάβη. Εξηγεί επίσης και γιατί η συστηματική χορήγηση είτε ουσιών που διασπούν τους μεσολαβητές όπως οι ακετυλοϋδρολάσες, είτε ανταγωνιστών των υποδοχέων τους, λόγω αδυναμίας επίτευξης επαρκών συγκεντρώσεων στο χώρο μεταξύ των εμπλεκόμενων κυττάρων, δεν μπορεί να ελέγξει αποτελεσματικά τη φλεγμονή. Στην περίπτωση αυτή η γονιδιακή προσέγγιση ίσως αποτελέσει τον

καταλληλότερο τρόπο ελέγχου της τοπικής ανοσολογικής ισορροπίας, που αποτελεί και το κύριο ζητούμενο στην παθοφυσιολογία της οξείας πνευμονικής βλάβης.



Σχήμα 3.3. Ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων (PMN) από τον PAF (juxtacrine signalling). Ο PAF που παρουσιάζεται στην επιφάνεια των προσβεβλημένων από κάποιο ερέθισμα ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποιεί τα πολυμορφοπύρηννα, που συνδέονται στην ενδοθηλιακή επιφάνεια με την P-selectin. Το μήνυμα της ενεργοποίησης, μέσω του υποδοχέα του PAF, προκαλεί την απελευθέρωση ενζύμων, ριζών οξυγόνου και το πλήρες φάσμα της αντίδρασης που συνεπάγεται η ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων. Φυσιολογικά αυτή η σύνδεση των δύο βημάτων και η μεταφορά του μηνύματος συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού. Η ίδια διαδικασία όμως, όταν για διάφορους λόγους εκτρέπεται ή ελέγχεται πλημμελώς, μπορεί να προκαλέσει οξεία πνευμονική βλάβη ή άλλα σύνδρομα που συνδέονται με φλεγμονώδη προσβολή των ιστών και βλάβη του οργανισμού.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των διαταραχών που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός σε πνευμονικό παρέγχυμα χωρίς προηγούμενη παθολογία. Η διερεύνηση αυτή έγινε με τον επανειλημμένο προσδιορισμό διαφόρων βιοχημικών και κυτταρικών παραμέτρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (bronchoalveolar lavage, BAL) σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο. Ασθενείς, που κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων της μελέτης παρουσίασαν πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα και ατελεκτασία, αποτέλεσαν ιδιαίτερες υποομάδες και μελετήθηκαν ξεχωριστά. Σε όλους τους ασθενείς μελετήθηκαν οι μεταβολές της ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης, οι ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα, η παρουσία φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), σε συνδυασμό με τις μεταβολές των αντίστοιχων ενζύμων, καθώς και οι αυξομειώσεις των κυτταρικών πληθυσμών. Τέλος εξετάστηκε η συσχέτισή τους με διάφορες κλινικές παραμέτρους, όπως η οξυγόνωση και η ενδοτικότητα.



Ειδικό μέρος: Υλικά και μέθοδοι

Πρωτόκολλο μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίπτωσης του παρατεταμένου μηχανικού αερισμού στις βιοχημικές και κυτταρικές παραμέτρους του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Η μελέτη αφορούσε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο, που εισήχθησαν στο διάστημα 1995-1999 στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη ήταν:

- Καλή οξυγόνωση κατά την εισαγωγή στο μηχανικό αερισμό ($PaO_2/FiO_2 > 300$)
- Ακτινογραφία θώρακα χωρίς παθολογικά ευρήματα
- Απουσία καρδιοπνευμονικής νόσου
- Προβλεπόμενη διάρκεια μηχανικού αερισμού μεγαλύτερη των δύο εβδομάδων

Μετά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ και τη σταθεροποίησή τους οι ασθενείς υποβάλλονταν σε ινσοπτική βρογχοσκόπηση και βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Το διάστημα μεταξύ της διασωλήνωσης και της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης ήταν μικρότερο των 36 ωρών. Το διάστημα αυτό ποίκιλε από 6-36 ώρες και η μέση τιμή ήταν 16 ώρες. 61 ασθενείς (45 άνδρες και 16 γυναίκες) εκπλήρωναν τα κριτήρια εισόδου και εισήλθαν στη μελέτη.

Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε νέα βρογχοκυψελιδική έκπλυση στο τέλος της πρώτης εβδομάδας του μηχανικού αερισμού, η οποία επαναλαμβανόταν και στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας του μηχανικού αερισμού, εφόσον στο διάστημα αυτό δεν είχε παρατηρηθεί καμία μείζων επιπλοκή από το αναπνευστικό. Έτσι οι ασθενείς που στο διάστημα της μελέτης δεν παρουσίασαν καμία επιπλοκή από το αναπνευστικό με βάση τα τρέχοντα κλινικά κριτήρια, είχαν 3 διαδοχικά βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (1^ο: 1ο 48ωρο, 2^ο: τέλος πρώτης εβδομάδας, 3^ο: τέλος δεύτερης εβδομάδας) και αποτελούν την κύρια υποομάδα των ασθενών της παρούσας μελέτης (υποομάδα 1). 22 συνολικά ασθενείς ανήκουν στη συγκεκριμένη υποομάδα και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

Οι ασθενείς, στους οποίους οποιαδήποτε στιγμή στο διάστημα της μελέτης τέθηκε υπόνοια πνευμονίας στον αναπνευστήρα, υποβλήθηκαν σε βρογχοκυψελιδική



έκπλυση, προκειμένου να τεκμηριωθεί η διάγνωση. Κριτήρια διάγνωσης της πνευμονίας στον αναπνευστήρα αποτελούσαν τα ακόλουθα

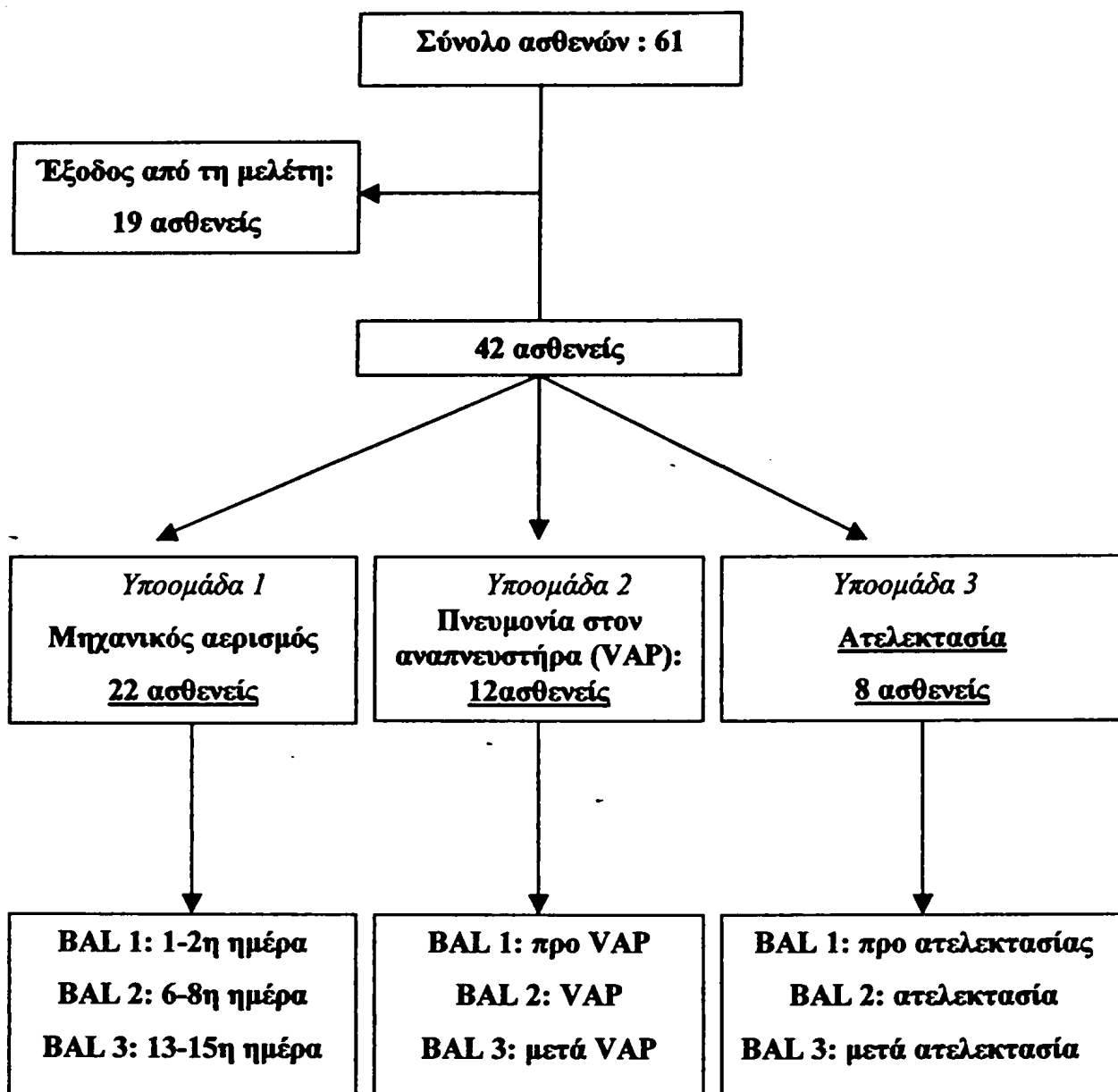
- Σκίαση στην ακτινογραφία θώρακα συμβατή με πνευμονία
- Πυρετός και αυξημένα λευκά
- Ποσοτική καλλιέργεια του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος με απομόνωση μικροβίων σε αριθμό $>10^4$ cfu/ml

Οι συγκεκριμένοι ασθενείς υποβλήθηκαν σε νέα βρογχοκυψελιδική έκπλυση μετά την αποδρομή της πνευμονίας στο βρογχοπνευμονικό τμήμα που έπασχε και αποτελούν μια δεύτερη υποομάδα στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Οι ασθενείς της συγκεκριμένης υποομάδας έχουν υποβληθεί συνολικά σε 3 τουλάχιστον βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις (μία ή δύο πριν την πιθανολόγηση της πνευμονίας, μία κατά τη διάγνωση της και μία μετά την αποδρομή της) (υποομάδα 2). 12 συνολικά ασθενείς ανήκουν στη συγκεκριμένη υποομάδα και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Οι ασθενείς, οι οποίοι οποιαδήποτε στιγμή στο διάστημα της μελέτης παρουσίασαν ατελεκτασία που δεν λύθηκε με τα συνήθη μέσα (αλλαγή θέσεων, φυσικοθεραπεία) και απαιτούσε βρογχοσκοπική λύση, υποβλήθηκαν ταυτόχρονα με τη βρογχοσκοπική λύση και σε βρογχοκυψελιδική έκπλυση, η οποία επαναλήφθηκε στο ίδιο βρογχοπνευμονικό τμήμα 48-72 ώρες μετά τη λύση της. Οι ασθενείς αυτοί αποτέλεσαν μια τρίτη υποομάδα στα πλαίσια της παρούσας μελέτης (υποομάδα 3). Και οι ασθενείς της συγκεκριμένης υποομάδας έχουν υποβληθεί συνολικά σε 3 τουλάχιστον βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις (μία ή δύο πριν τη διαπίστωση της ατελεκτασίας, μία κατά τη λύση της και μία 48-72 ώρες μετά). 8 συνολικά ασθενείς ανήκουν στη συγκεκριμένη υποομάδα και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

Ασθενείς στους οποίους διακόπηκε ο μηχανικός αερισμός πριν τη συμπλήρωση 15 ημερών μηχανικού αερισμού εξήλθαν του πρωτοκόλλου. Εξήλθαν επίσης οι ασθενείς που παρουσίασαν έκπτωση της καρδιακής λειτουργίας, καρδιογενές πνευμονικό οίδημα, πνευμονική εμβολή ή αποβίωσαν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τέλος εξήλθαν οι ασθενείς των προαναφερθεισών υποομάδων, στους οποίους για τεχνικούς λόγους δεν κατέστη δυνατή η ολοκλήρωση της μελέτης. 19 συνολικά ασθενείς εξήλθαν της μελέτης για τους παραπάνω λόγους. Το διάγραμμα ροής των ασθενών παρουσιάζεται στο σχήμα 4.1.





Σχ 4.1. Διάγραμμα ροής των ασθενών της μελέτης



Δημογραφικά στοιχεία ασθενών

Πίνακας 4.1. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών της υποομάδας 1.

A/a	Ηλικία	Φύλο	Πάθηση	PaO_2 / FiO_2	Crs
1	36	Γ	Κ/Σ	370	75
2	61	A	Κ/Σ	340	70
3	72	A	TET	335	64
4	50	A	AEE	382	72
5	35	A	Κ/Σ	380	73
6	17	Γ	Κ/Σ	415	75
7	43	A	NM	335	70
8	71	A	AEE	330	62
9	40	A	Κ/Σ	370	65
10	65	A	AEE	320	64
11	62	A	TET	355	65
12	39	Γ	ΔΗΛ	384	68
13	56	A	AEE	330	63
14	49	Γ	AEE	338	62
15	72	Γ	NM	310	56
16	58	A	Κ/Σ	340	59
17	68	A	AEE	340	61
18	24	A	Κ/Σ	412	75
19	34	A	Κ/Σ	420	74
20	19	A	Κ/Σ	400	72
21	62	Γ	Κ/Σ	330	58
22	48	A	Κ/Σ	365	67
MO	49,1			359,1	66,8
SD	16,7			31,9	5,8

A=άνδρας, Γ=Γυναίκα, Κ/Σ=Κρανιοεγκεφαλική κάκωση και/ή κάκωση σπονδυλικής στήλης, AEE=Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, NM=Νευρομυϊκή πάθηση, ΔΗΛ=Δηλητηρίαση, TET=Τέτανος, Crs=Ενδοτικότητα αναπνευστικού συστήματος.



Πίνακας 4.2. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών της υποομάδας 2 (πνευμονία στον αναπνευστήρα-VAP).

A/a	Ηλικία	Φύλο	Ημέρα ΜΑ	Πάθηση
1	42	A	6	Κ/Σ
2	50	Γ	5	ΔΗΛ
3	18	A	10	Κ/Σ
4	70	A	6	ΑΕΕ
5	75	A	5	ΑΕΕ
6	16	A	11	Κ/Σ
7	61	A	8	NM
8	22	A	5	Κ/Σ
9	45	A	9	Κ/Σ
10	69	Γ	10	ΑΕΕ
11	50	A	7	Κ/Σ
12	70	A	6	ΑΕΕ
MO	49		7,33	
SD	21,2		2,19	

Πίνακας 4.3. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών της υποομάδας 3 (ατελεκτασία).

A/a	Ηλικία	Φύλο	Ημέρα ΜΑ	Πάθηση
1	62	A	5	NM
2	45	A	8	Κ/Σ
3	58	Γ	9	NM
4	75	A	6	ΑΕΕ
5	19	Γ	7	Κ/Σ
6	74	A	11	ΑΕΕ
7	68	A	12	ΑΕΕ
8	34	Γ	9	Κ/Σ
MO	54,4		8,4	
SD	20,1		2,4	

Η ημέρα ΜΑ αντιστοιχεί στην ημέρα του μηχανικού αερισμού, στην οποία έγινε η διάγνωση της πνευμονίας στον αναπνευστήρα ή της ατελεκτασίας.



Κλινικές μετρήσεις

Όλοι οι ασθενείς της μελέτης νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Οι ασθενείς ήταν διασωληνωμένοι από το στόμα (ή στην πορεία τραχειοστομημένοι) με σωλήνα με αεροθάλαμο και αερίζονταν με αναπνευστήρα Siemens (Siemens 300 ή 900C Servo, Solna, Sweden). Το μοντέλο αερισμού ήταν είτε ελεγχόμενης πίεσης (pressure control mode), είτε ελεγχόμενου όγκου (volume control mode), είτε υποστήριξης πίεσης (pressure support mode). Οι ασθενείς αερίζονταν με τις παρακάτω παραμέτρους:

- συχνότητα (frequency): 10-18 αναπνοές/min
- αναπνεόμενο όγκο (tidal volume): 9-13 ml/kg ΣΒ
- τελοεκπνευστική πίεση (PEEP): 3-5 cmH₂O.

Οι ασθενείς είχαν συνεχή καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, της αρτηριακής πίεσης, του οξυαιμοσφαιρικού κορεσμού και των πύσεων των αεραγωγών. Τις πρώτες ημέρες της νοσηλείας τους γινόταν και καταγραφή του τελοεκπνευστικού διοξειδίου τους.

Η τιμή του PaCO₂ διατηρούνταν μεταξύ 35-42 mmHg εκτός από τις περιπτώσεις που οι κλινικές συνθήκες (ενδοκράνια υπέρταση) επέβαλλαν ελαφρά χαμηλότερες και στην περίπτωση αυτή το PaCO₂ ποτέ δεν έπεσε κάτω από 32mmHg. Η τελοεκπνευστική πίεση παύσης (P_{plateau}) ήταν πάντα μικρότερη από 25 cmH₂O. Έγινε προσπάθεια να είναι πάντα σταθερή η κλίση του εισπνευστικού σκέλους της πίεσης των αεραγωγών, ώστε να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η επι- και αποστράτευση των κυψελίδων κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού.

Πριν από κάθε βρογχοκυψελιδική έκπλυση, όπως και δύο ώρες μετά, λαμβάνονταν αέρια αίματος και γινόταν υπολογισμός της ενδοτικότητας του αναπνευστικού συστήματος. Η ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος (C_{rs}) υπολογίστηκε με το τύπο

$$C_{rs} = V_T / P_{plateau} - \text{ολική PEEP}$$

όπου V_T ο αναπνεόμενος όγκος και P_{plateau} η τελοεκπνευστική πίεση παύσης.

Όλες οι μετρήσεις και οι παρεμβάσεις έγιναν με τη συγκατάθεση των στενότερων συγγενών των ασθενών.



Διαδικασία λήψης και επεξεργασίας του BAL

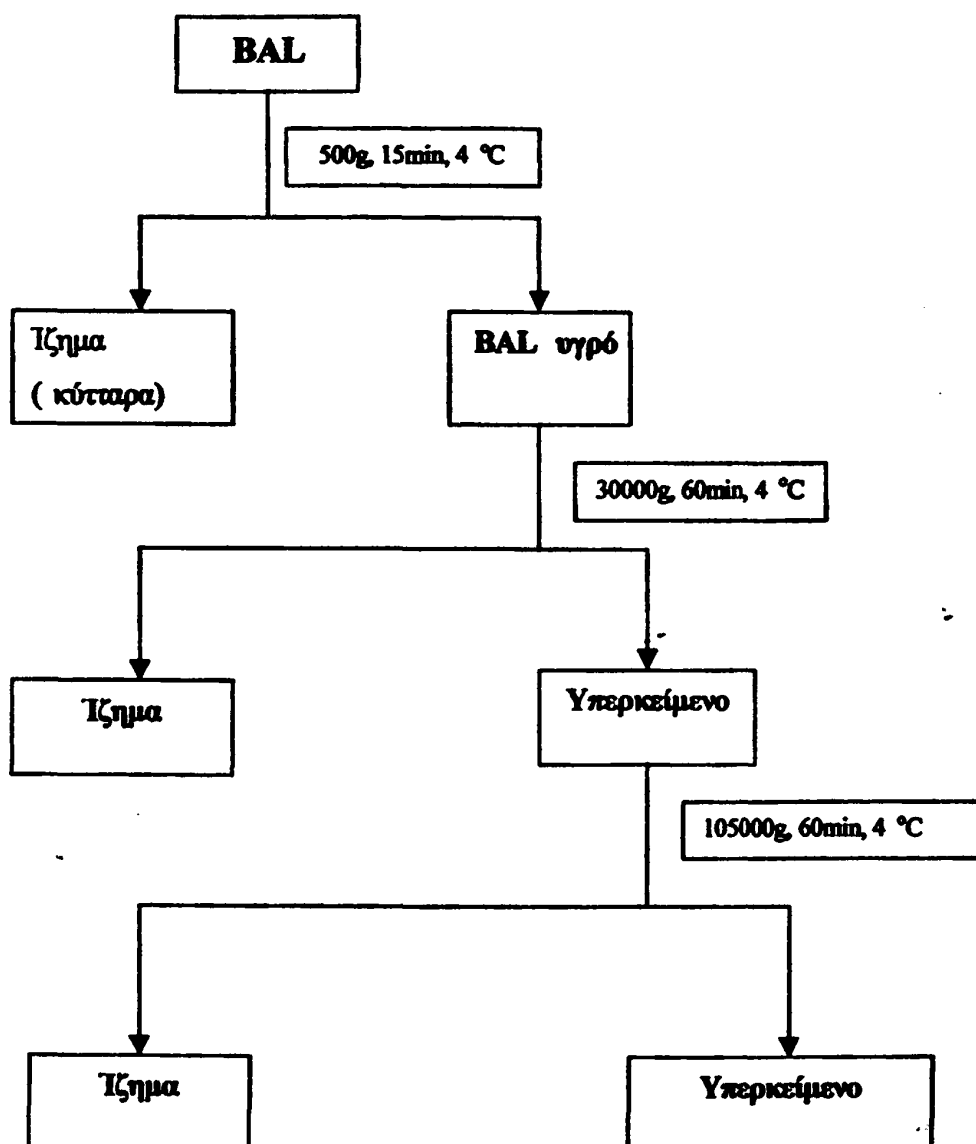
Η λήψη του BAL έγινε με ινδοπτικό βρογχοσκόπιο. Το βρογχοσκόπιο εισερχόταν στον τραχειοσωλήνα μέσω ενός ειδικού υποδοχέα (swivel adapter), που επέτρεπε την ταυτόχρονη χορήγηση μηχανικού αερισμού κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης. Οι ασθενείς κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης αερίζονταν με ελεγχόμενο τρόπο (control mode ventilation), με 100% οξυγόνο, ενώ η PEEP αφαιρούνταν ή ελαττωνόταν ώστε να αποφευχθεί η auto-PEEP. Οι ασθενείς καταστέλλονταν με μιδαζολάμη και μυοχαλαρώνονταν με ατρακούριο. Δεν χρησιμοποιήθηκαν τοπικά αναισθητικά. Κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης παρακολουθούνταν η καρδιακή συχνότητα, η αρτηριακή πίεση, ο οξυαιμοσφαιρινικός κορεσμός και οι πιέσεις των αεραγωγών. Η τραχεία αναρροφούνταν πριν την εισαγωγή του βρογχοσκοπίου, ενώ μία ώρα πριν τη διαδικασία ο ρινογαστρικός σωλήνας παροχετευόταν.

Η άκρη του βρογχοσκοπίου ενσφηνωνόταν στο τμηματικό ή υποτμηματικό βρόγχο του του δεξιού μέσου λοβού ή της γλωσσίδας. Στην περίπτωση που υπήρχε εντοπισμένη βλάβη (πνευμονία ή ατελεκτασία) η ενσφήνωση γινόταν στο αντίστοιχο τμήμα. 6 δείγματα φυσιολογικού ορού 20 ml το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου, εγχύονταν από το κανάλι εργασίας του βρογχοσκοπίου. Το πρώτο δείγμα που αναρροφούνταν, θεωρούνταν ότι αφορά βρογχική έκπλυση και στελνόταν για μικροβιολογικό έλεγχο. Το υπόλοιπο συλλεγόταν σε παγωμένους σωλήνες, προκειμένου να αποφευχθεί η αποδόμηση του PAF από την PAF-ακετυλοϋδρολάση.

Στο εργαστήριο το BAL διηθούνταν από αποστειρωμένη γάζα προκειμένου να απομακρυνθεί η βλέννη. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 500xg, στους 4°C, για 15 min σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sorvall RC-5B, Dupont, Canada) για να καθιζήσουν τα κύτταρα (ίζημα) (Σχ. 2). Τμήμα του παραπάνω υπερκειμένου φυγοκεντρούνταν στα 30000xg, στους 4°C, για 90 min σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το ίζημα των 30000xg διαλυόταν σε μικρό όγκο φυσιολογικού ορού και φυλασσόταν στους -20°C μέχρι να γίνουν οι αναλύσεις του ολικού λιπιδικού φωσφόρου και των ολικών πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Το υπερκείμενο των 30000xg φυγοκεντρούνταν στα 105000xg, στους 4°C, για 60 min (Beckman L5-65B με



κεφαλή SW41). Το ίζημα επεξεργαζόταν με τον προαναφερθέντα τρόπο και το υπερκείμενο φυλασσόταν στους -20°C .



Σχήμα 4.2. Διάγραμμα των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων του BAL

Εργαστηριακές μέθοδοι

Α.Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών του BAL με τη μέθοδο Lowry (για 40-200 μg πρωτεΐνης)

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες αρχικά δεσμεύονται με τα ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Folin & phenol (φωσφο-μολυβδαϊνικό-φωσφο-βολφραμικό αντιδραστήριο) το οποίο ανάγεται από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών- Cu^{2+} , με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανού χρώματος που απορροφά στα 750 nm³⁴⁵.

Αντιδραστήρια

- NaOH (M.B.: 40, Merck)
- Na_2CO_3 (M.B.: 105.99, Fluka)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (M.B.: 249.68, Fluka)
- Κιτρικό νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.B.: 294.10, Merck)
- Αντιδραστήριο φαινόλης (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, 100 g, A-9647, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1 N NaOH

4 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 0.5 N NaOH

2 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 2 % Na_2CO_3

20 g Na_2CO_3 διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 1 lt. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 1 % κιτρικού νατρίου

1.139 g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.



Διάλυμα 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1 % κιτρικό νάτριο

0.5 g CuSO_4 διαλύονται σε 100 ml διαλύματος 1 % κιτρικού νατρίου. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Μίγμα διαλυμάτων 2 % Na_2CO_3 και 0.5 % CuSO_4 σε αναλογία 50:1

Σε 50 ml διαλύματος 2 % Na_2CO_3 προστίθεται 1 ml διαλύματος 0.5% CuSO_4 . Το μίγμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πρότυπο διάλυμα BSA 200 $\mu\text{g/ml}$ σε 0.5 N NaOH

20 mg BSA διαλύονται σε 100 ml 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για λίγες ώρες μέχρι να διαλυθεί η BSA. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες και διατηρείται στους -20 °C.

Αντιδραστήριο φαινόλης

Ορισμένος όγκος αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu αναμιγνύεται με ίσο όγκο H_2O . Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική πορεία**Πρότυπη καμπύλη**

Προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml προτύπου διαλύματος BSA 200 $\mu\text{g/ml}$ (0-200 μg BSA αντίστοιχα) σε 5 πλαστικούς σωλήνες και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με 0.5 N NaOH.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL (από λίγα μl έως 500 μl το μέγιστο) μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα. Στο σωλήνα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με διάλυμα 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 60 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 5 ml μίγματος 2 % Na_2CO_3 και 0.5 % CuSO_4 . Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml αντιδραστηρίου φαινόλης και αμέσως ακολουθεί ανάδευση. Σχηματίζεται κυανού χρώμα και μετά από 30 min γίνεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων στα 750 nm, σε γυάλινη κυψελίδα.



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε πρωτεΐνες, κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία της μορφής $y = ax + b$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεϊνών), βάσει της οποίας υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματός μας. Τέλος γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά ml δείγματος BAL.

B.Προσδιορισμός αλβουμίνης στο BAL με τη μέθοδο της βρωμοκρεσόλης (BCG) (για 50 έως 300 μg αλβουμίνης)

Αρχή της μεθόδου

Το μόριο της αλβουμίνης τείνει να δεσμεύεται ισχυρώς με ανιοντικά έντονα χρωμοφόρα μόρια, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Το σύμπλοκο αλβουμίνης-χρωμοφόρων μορίων έχει διαφορετικό χρώμα από την ελεύθερη χρωμόφορο ουσία και μπορεί να ανιχνευθεί παρουσία περίσσειας αυτής. Έτσι, το πράσινο της βρωμοκρεσόλης δεσμεύεται με αλβουμίνη και το πράσινο σύμπλοκο που προκύπτει ανιχνεύεται με φωτομέτρηση στα 628 nm³⁴⁶.

Αντιδραστήρια

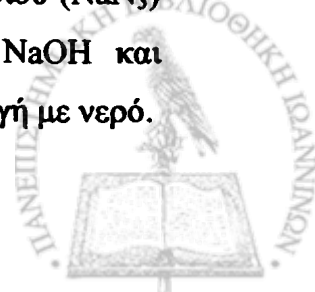
- Φυσιολογικός ορός (Sterile sodium chloride 0.9%, Cooper Hellas)
- Κιτρικό οξύ (M. B.: 192.13, Merck)
- Αζίδιο του Νατρίου (NaN_3 , M. B.: 65.01, Sigma)
- Πράσινο της βρωμοκρεσόλης (Bromocresol green, 3',3'',5',5''-Tetrabromo-m-cresolsulfonephthalein, M. B.: 720, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M κιτρικού οξέος, pH 4.2

Διαλύουμε 19.213 g κιτρικού οξέος και 100 mg αζιδίου του νατρίου (NaN_3) ως συντηρητικό, σε 800ml νερό. Ρυθμίζουμε το pH με 0.25 M NaOH και μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη του 1 lt συμπληρώνοντας ως τη χαραγή με νερό.

Διάλυμα 0.6 mM βρωμοκρεσόλης



Ζυγίζουμε 432 mg βρωμοκρεσόλης και 100 mg οξιδίου του νατρίου. Διαλύουμε πρώτα σε 10 ml 0.1 M NaOH και μετά με νερό σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου ως τη χαραγή.

Διάλυμα βρωμοκρεσόλης έτοιμο για χρήση (BCG)

Αναμιγνύουμε 1 όγκο του παραπάνω πυκνού διαλύματος βρωμοκρεσόλης με 3 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος 0.1 M και ρυθμίζουμε το pH στο 4.2 (αν είναι υψηλό, διορθώνουμε με κιτρικό οξύ).

Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml αλβουμίνης ορρού βοός (BSA)

Ζυγίζουμε 200 mg αλβουμίνης και τα διαλύουμε σε 10 ml φυσιολογικού ορρού. Το διάλυμα αφήνεται προς μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να διαλυθεί πλήρως η BSA. Κατόπιν αραιώνουμε 1ml από το διάλυμα προσθέτοντας 9 ml φυσιολογικού ορρού και αναδεύουμε. Το έτοιμο προς χρήση τελικό διάλυμα διαμοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες, σε ποσότητες του 1 ml και φυλάσσεται στους -20 °C.

Πειραματική πορεία

Επεξεργασία του BAL

Ο μέγιστος όγκος δείγματος που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο είναι 200 μl. Πριν όμως γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλβουμίνης στο BAL, πρέπει να είναι γνωστή η περιεκτικότητα αυτού σε ολικές πρωτεΐνες (μέθοδος Lowry). Σε περίπτωση πολύ χαμηλής περιεκτικότητας σε ολικές πρωτεΐνες, το διάλυμα πρέπει να συμπυκνωθεί, προκειμένου η περιεκτικότητά του σε αλβουμίνη να βρίσκεται μεταξύ των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Στη συνέχεια γίνεται ένας υπολογισμός του όγκου του BAL που πρέπει να συμπυκνωθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι ο μέγιστος όγκος BAL συμπυκνωμένου ή μη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη μέθοδο δεν μπορεί να ξεπερνάει τα 200 μl.

Έγινε λοιπόν χρήση του παρακάτω τύπου για την εύρεση του όγκου BAL που πρέπει να συμπυκνωθεί:

$$V = \frac{100 \cdot m_a}{\Pi \cdot m_n}$$

όπου:



V,	ο ζητούμενος όγκος BAL που θα συμπυκνωθεί
m_a,	τα μg αλβουμίνης που ανιχνεύει η μέθοδος (π. χ. 150 μg, που βρίσκονται στη μέση της γραμμικής περιοχής ανίχνευσης)
m_π,	τα μg των ολικών πρωτεϊνών που περιέχονται σε 1 ml δείγματος BAL, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry
Π,	το % ποσοστό της αλβουμίνης επί των ολικών πρωτεϊνών του BAL που συνήθως έχει το BAL (Έγιναν αρχικά πειράματα σε πολλά και διαφορετικά δείγματα BAL, από τα οποία υπολογίστηκε ότι η αλβουμίνη κατέχει σε μέσο όρο το 25 % περίπου των ολικών πρωτεϊνών)

Εάν, $V \leq 200$ μl, το BAL δεν συμπυκνώνεται αλλά χρησιμοποιείται ως έχει.

Συμπύκνωση BAL

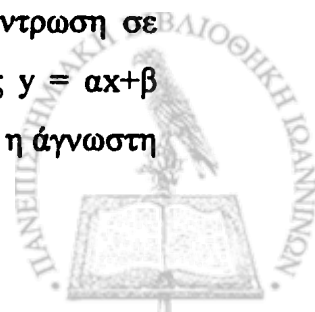
Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιούνται πλαστικά φίλτρα Centricon-3 με μεμβράνη polycarbonate (Amicon), cut off 3000 M.B. Η μέγιστη χωρητικότητα αυτών είναι 2.5 ml. Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε φυγόκεντρο Sorval, κεφαλής σταθερής γωνίας, με μέγιστη φυγοκεντρική δύναμη 7500 g, μέχρι τελικού όγκου 200 μl ή λιγότερο, στους 4 °C (συνήθως 1 ώρα περίπου).

Κατεργασία προτύπων και δειγμάτων

Σε πλαστικές κυψελίδες προσθέτουμε 1 ml αντιδραστηρίου βαφής (διάλυμα βρωμοκρεσόλης BCG έτοιμο για χρήση). Για τη σειρά των προτύπων προστίθενται 0, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 μl προτύπου διαλύματος 2 mg/ml BSA (0-300 μg BSA αντίστοιχα), ενώ για το άγνωστο δείγμα προσθέτουμε 200 μl ή λιγότερο BAL συμπυκνωμένο ή μη. Τέλος, συμπληρώνουμε με φυσιολογικό ορό σε τελικό όγκο 1.2ml. Ανακινούμε προσεκτικά τις κυψελίδες και μετά από πάροδο 10 min φωτομετρούμε στα 628 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία της μορφής $y = ax + b$ (απορρόφηση συναρτήσει μg αλβουμίνης), βάση της οποίας υπολογίζεται η άγνωστη



συγκέντρωση της αλβουμίνης του δείγματός μας. Τέλος γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης σε μg αλβουμίνης ανά ml δείγματος BAL.

Γ.Εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Bligh-Dyer

Αρχή της μεθόδου

Με το σχηματισμό κατάλληλης πολικότητας συστήματος διαλυτών επιτυγχάνεται η απελευθέρωση των λιπιδίων του μίγματος αντίδρασης. Στο διφασικό σύστημα, τα λιπίδια κατανέμονται στην χλωροφορμική φάση ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση³⁴⁷.

Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M. B.: 119.38, Labscan)
- Μεθανόλη (CH_3OH , M. B.: 32.04, Labscan)

Πειραματική πορεία

Σε όγκο 1 ml μίγματος αντίδρασης περιέχονται το φθορίζον υπόστρωμα της φωσφατιδυλοχολίνης, δείγμα BAL καθώς και τα προϊόντα της αντίδρασης. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 50 μl 2 N HCl. Η εκχύλιση των λιπιδίων του μίγματος γίνεται στη συνέχεια με την προσθήκη 2.2 ml διαλύματος μεθανόλης-χλωροφορμίου (1:1) έτσι ώστε η τελική αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-υδατικού διαλύματος να είναι 1:1:0.9. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα Vortex για 1 min. Αφού φυγοκεντρηθεί για 10 min σε 3000 στροφές για να διαχωριστούν οι φάσεις, παραλαμβάνεται με γυάλινη πυέττα pasteur η χλωροφορμική φάση (κατώτερη) και τοποθετείται σε καθαρό γυάλινο σωλήνα.

Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά με την προσθήκη επιπλέον 1.1 ml χλωροφορμίου στο υδατομεθανολικό μέρος. Μετά από ισχυρή ανάδευση για 1 min το μίγμα φυγοκεντρείται ξανά για διαχωρισμό των φάσεων και συλλέγεται ξανά η χλωροφορμική φάση. Οι δύο χλωροφορμικές φάσεις, οι οποίες περιέχουν τα λιπίδια ενώνονται.



• Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων επιτυγχάνεται με τη διαφορετική μετατόπιση του κάθε λιπιδίου στην επιστρωμένη με πυριτικό οξύ πλάκα TLC, κυρίως ανάλογα με την πολικότητα των λιπιδίων και του μίγματος διαλυτών που χρησιμοποιείται.

Υλικά

- Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 20 cm x 20 cm και πάχους 250 μm (Silica gel 60A, K6, Whatman)
- Θάλαμοι χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm
- NaOH (M.B.: 40, Merck)
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M. B.: 119.38, Labscan)
- Μεθανόλη (MeOH, M. B.: 32.04, Labscan)
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M. B.: 60.053, Carlo Erba Reagenti)
- Πρότυπα λιπίδια του εμπορίου: PC, λυσο-PC, Sph, PE, PG, PS, PI
- TNS [[2-p-toluidinyl-naphthylene-6-sulfonate], M. B.: 351.5, Sigma]
- Trizma hydrochlorica, [[[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 157.6, Sigma] ή Trizma base, [[Tris(hydroxymethyl)aminomethane], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 121.1, Sigma]

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1 N NaOH

4 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 50 mM Trizma hydrochlorica

Ζυγίζονται 788 mg trizma hydrochlorica και διαλύονται σε 100 ml νερού.

Διάλυμα 1 mM TNS

Ζυγίζονται 36 mg TNS και διαλύονται σε 100 ml διαλύματος 50 mM Tris-HCl ή σε 100 ml 50 mM Trizma base. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 με διάλυμα 1 N HCl αν χρησιμοποιήσουμε Trizma base ή με διάλυμα 1 N NaOH αν χρησιμοποιήσουμε Tris-HCl. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.



Πειραματική πορεία

Τοποθέτηση δειγμάτων

Χωρίζουμε τις πλάκες TLC σε παράλληλες, λωρίδες, πλάτους αναλόγου της ποσότητας των λιπιδίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε, συνήθως 1-2 cm. Στις ακραίες λωρίδες τοποθετούμε τα πρότυπα λιπίδια και στις υπόλοιπες τα δείγματα. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης σε ρεύμα N_2 , τα λιπίδια διαλύονται σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (80 μ l) και τοποθετούνται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας pasteur στην πλάκα TLC για να διαχωριστούν. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά για ποσοτική παραλαβή των λιπιδίων.

Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων

Η πλάκα αναπτύσσεται σε κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (65:35:7, v/v). Αφήνεται να αναπτυχθεί, μέχρι το μέτωπο των διαλυτών να φτάσει ένα εκατοστό περίπου κάτω από την κορυφή της πλάκας. Στη συνέχεια στεγνώνουμε την πλάκα με θερμό αέρα για μερικά λεπτά.

Διαχωρισμός ουδετέρων λιπιδίων

Η ανάπτυξη της πλάκας γίνεται σε θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-οξικού οξέος σε αναλογία (95:5:1) για 45 min περίπου και η πλάκα στεγνώνεται όπως πριν.

Εμφάνιση λιπιδίων

Τα φθορίζοντα NBD-λιπίδια μετά τον διαχωρισμό τους είναι ορατά από το κίτρινο χρώμα τους. Οι ζώνες τους όμως εμφανίζονται πιο έντονες στο υπεριώδες φως. Η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα TNS και οι περιοχές των υπολοίπων μη φθοριζόντων λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως.



Δ.Προσδιορισμός λιπιδικού φωσφόρου

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου των φωσφολιπιδίων σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση με υπερχλωρικό οξύ. Στη συνέχεια με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφορομολυβδαινικό, το οποίο τέλος ανάγεται από το αμινοναφθοσουλφονικό οξύ (ANSA) σε κυανού του φωσφομολυβδαινίου, με θέρμανση, σε όξινο περιβάλλον³⁴⁸. Το κυανούν σύμπλοκο που παράγεται φωτομετρείται στα 820 nm.

Αντιδραστήρια

- HClO_4 70 % (M. B.:100.46, Fluca)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, M. B.: 1235.86, Merck)
- NaHSO_3 (M. B.:104.06, Mallinckrodt)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (M. B.:190, Ferak)
- Na_2SO_3 (M. B.:126.04, Fluca)
- 1-αμινο-2-ναφθολο-4-σουλφονικό οξύ (ANSA, M. B.:239.2, Sigma)
- KH_2PO_4 (M. B.:136.09, Merck)
- Οξικός αιθυλεστέρας $(\text{CH}_3\text{OOC}_2\text{H}_5)$, M. B.:88.11, Labscan)

Διαλύματα εργασίας

Πρότυπο διάλυμα φωσφορικού 5 μg /ml

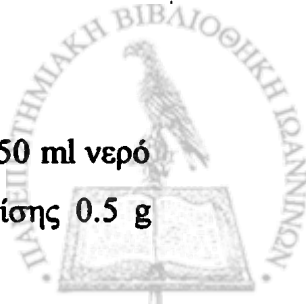
Ποσότητα KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105 °C επί μία ώρα και τοποθετείται σε ξηραντήρα. Στη συνέχεια ζυγίζονται 2.202 mg και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

0.4 % μολυβδαινικό αμμώνιο

Διαλύονται 2.125 g ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου σε νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα αμινοναφθοσουλφονικού οξέος (ANSA)

Διαλύονται 30 g NaHSO_3 (ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 6 g Na_2SO_3 σε 250 ml νερό υπό ελαφρά θέρμανση και ανάδευση. Στο διάλυμα αυτό διαλύονται επίσης 0.5 g



1,2,4-αμινο-ναφθοσουλφονικό οξύ (ANSA). Αν σε 3 ώρες σχηματιστεί ίζημα το διάλυμα διηθείται και διατηρείται στους 4 °C.

Αντιδραστήριο ANSA

Αναμιγνύονται 4 ml του διαλύματος ANSA με 6 ml απεσταγμένο νερό.

✱ Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

i) Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου λιπιδικού εκχυλίσματος

Πειραματική πορεία

Κατεργασία δείγματος

Ποσότητα εκχυλίσματος λιπιδίων περιεκτικότητας από 1-5 μg P μεταφέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα rytex, όπου εξατμίζονται οι διαλύτες σε ρεύμα N₂. Προστίθεται 0.5 ml 70 % HClO₄ και ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170-180 °C για 5 ώρες. Μετά την καύση το δείγμα αφήνεται να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml H₂O.

Πρότυπα δείγματα

Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες rytex προστίθενται, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml (0-5 μg φωσφόρου) προτύπου διαλύματος φωσφόρου 5 μg/ml και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO₄.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου. Με συνεχή ανάδευση προστίθεται 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA και στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Αφού οι σωλήνες ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου, το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί φωτομετρείται στα 820 nm σε γυάλινη κυψελίδα.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Σχηματίζεται γραφική παράσταση των απορροφήσεων των προτύπων διαλυμάτων συναρτήσει της ποσότητας φωσφόρου που περιέχουν σε μg. Χαράσσεται



η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα σημεία και υπολογίζεται η εξίσωσή της που είναι της μορφής $y = ax + \beta$. Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα αυτών σε φωσφόρο. Τέλος, τα αποτελέσματα ανάγονται σε $\mu\text{g P/ml}$ δείγματος BAL.

ii) Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC

Πειραματική πορεία

Πρότυπα δείγματα

Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex προστίθενται, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 ml (0-5 μg φωσφόρου) προτύπου διαλύματος φωσφόρου 5 $\mu\text{g/ml}$ και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO_4 .

Προετοιμασία δειγμάτων

Περιοχές του πυριτικού οξέος της πλάκας που περιέχουν φωσφολυτίδια καθώς και τμήματα αναλόγου μεγέθους που χρησιμοποιούνται για τυφλά, αποξύνονται και μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες pyrex. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml διαλύματος 70 % HClO_4 .

Επεξεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170-180 °C για 5 ώρες. Μετά την καύση τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml H_2O . Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου, με συνεχή ανάδευση 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA και θέρμανση σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 5 ml οξικού αιθυλεστέρα. Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται να ηρεμήσουν. Διαχωρίζονται δύο φάσεις με το χρώμα να έχει εκχυλιστεί στην οργανική φάση του οξικού μεθυλεστέρα (ανώτερη). Παραλαμβάνεται προσεκτικά με πιπέτα pasteur σε γυάλινη κυψελίδα και φωτομετρείται στη συνέχεια στα 780 nm.



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται όπως και πριν. Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των περιοχών του πυριτικού οξέος της πλάκας σε μg φωσφόρου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων.

Παρατηρήσεις

Όλα τα γυάλινα σκεύη πλένονται πριν χρησιμοποιηθούν με χρωμοθειικό οξύ ή με 1 % νιτρικό οξύ. Αυτό γίνεται διότι τα απορρυπαντικά περιέχουν φωσφορικά άλατα και αφήνουν στα τοιχώματα των γυάλινων σκευών ποσότητα φωσφόρου ικανή πολλές φορές να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Ε.Βιολογικός προσδιορισμός του PAF σε BAL, με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Αντιδραστήρια

- EGTA (Ethylene glycol bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid, M. B.: 380.4, Serva)
- EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, M. B.: 372.2, Sigma)
- Ζελατίνη (Merck)
- KCl (M.B.: 74.56, Ferak)
- NaCl (M.B.: 58.44, Merck)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (M.B.: 203.31, Fluka)
- $NaHCO_3$ (M. B.: 84.01, Merck)
- Γλυκόζη (M. B.: 136.09, Fluka)
- Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη (Egicalm)
- Οξαλικό αμμώνιο $((NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O)$, M. B.: 142.11, Mallinckrodt)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (M.B.: 147, Sigma)
- Φωσφοκρεατίνη ($C_4H_8N_3O_5P \cdot Na_2$ (N-[imino (phosphonoamino) methyl]-N-methylglycine) ή CP, M.B.: 255.1, Sigma)
- Κινάση της φωσφοκρεατίνης (creatine phosphokinase ή CPK, 17500 units, 310 units/mg, Sigma)
- PAF (O 1270, C_{16} , MB: 523.7, O 1355, C_{18} , MB: 551.8, Bachem)

Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 0.2 M EDTA σε φυσιολογικό ορό, που χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό

7.4440 g EDTA·(Na) και 0.9 g NaCl διαλύονται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.



Διάλυμα 0.2 M EGTA

7.6080 g EGTA διαλύονται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 10 % ζελατίνης

5 g ζελατίνης διαλύονται σε περίπου 40 ml H_2O . Το διάλυμα αναδεύεται ήπια με θέρμανση μέχρι να διαλυθεί η ζελατίνη πλήρως. Αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με H_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης των αιμοπεταλίων, pH 6.5

195 mg KCl, 212.5 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 8 g NaCl, 1.0150 g $NaHCO_3$, 1 ml διαλύματος 0.2 M EGTA, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος ζελατίνης 10 % διαλύονται σε 1 lt H_2O . Ρυθμίζεται το pH στο 6.5 με μικρή ποσότητα HCl. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 80 ml και διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 0.1 M ακετυλοσαλικυλικού

16.2 mg ακετυλοσαλικυλικού διαλύονται σε 500 μl φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα 1 % οξαλικού αμμωνίου

1 g οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 0.2 M φωσφοκρεατίνης (CP)

Διαλύονται 134.4 mg της ουσίας σε 2 ml φυσιολογικό ορρό. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 200 μl, τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CPK) 10 units/μl

58 mg (17500 units) CPK διαλύονται σε 1.75 ml φυσιολογικό ορρό. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 40 μl, τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και διατηρείται στους -20 °C.



Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)

Χειρισμός του πειραματόζωου

Το κουνέλι τοποθετείται σε ειδική παγίδα με τέτοιο τρόπο ώστε να προεξέχει το κεφάλι του. Στη συνέχεια, το τρίχωμα της περιοχής του αυτιού από όπου πρόκειται να γίνει η λήψη του αίματος, ξυρίζεται με κοινό ξυράφι. Η περιοχή αυτή μετά καθαρίζεται με οινόπνευμα. Τέλος, χρησιμοποιείται ξυλόλιο με κινήσεις τριβής πάνω σε αυτή την περιοχή, το οποίο αυξάνει την αιμάτωση και δρα και ως τοπικό αναισθητικό.

Συλλογή του αίματος

Από την κεντρική φλέβα του αυτιού των κουνελιών, συλλέγονται με βελόνες 21G 40 ml αίματος, σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml, ο οποίος περιέχει 1 ml 0.2 M EDTA ως αντιπηκτικό. Το αίμα αναδεύεται ήπια. Μετά το πέρας της λήψης το αυτί του κουνελιού πιέζεται ώστε να σταματήσει η ροή του αίματος και στη συνέχεια εκπλένεται με αιθυλική αλκοόλη και με σαπωνοδιάλυμα. Τέλος σκουπίζεται προσεκτικά. Από κάθε αιμοληψία παραλαμβάνονται τελικά περίπου 3-10 ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων συγκέντρωσης 2.5×10^9 αιμοπετάλια/ml.

1^η φυγοκέντρηση: παραλαβή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP)

Παραλαμβάνεται το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα με φυγοκέντρηση του αίματος σε 375 x g για 20 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε φυγόκεντρο χωρίς φρένο. Το υπερκείμενο (πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP)), μεταφέρεται με πλαστική αυτόματη πιπέτα σε καθαρό πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml.

2^η φυγοκέντρηση: παραλαβή ιζήματος αιμοπεταλίων

Το PRP φυγοκεντρείται σε 1400 x g για 15 min. Το υπερκείμενο (πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια, PPP) αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται προσεκτικά σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5, με πλαστική αυτόματη πιπέτα. Στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 40 ml με το ρυθμιστικό

διάλυμα έκπλυσης, pH 6.5. Στα 40 ml του εναιωρήματος προστίθενται 40 μl διαλύματος 0.1 M ασπιρίνης για αναστολή της κυκλοξυγονάσης και αφήνεται για 15 min.

Μέτρηση των αιμοπεταλίων

Κατά τη διάρκεια της επώασης του εναιωρήματος με το ακετυλοσαλικυλικό γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων: 100 μl εναιωρήματος αιμοπεταλίων προστίθενται σε 1.9 ml διαλύματος 1 % οξαλικού αμμωνίου (αραίωση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια με αυτόματη πιπέτα. 10 μl δείγματος τοποθετούνται με πιπέττα και στις δύο πλευρές του αιματοκυτομέτρου (Newbauer), πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί γυάλινη καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 30 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με κοινό οπτικό μικροσκόπιο (Olympus) του οποίου το σύστημα Abbé βρίσκεται στην κατώτερη θέση του, χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης x 40. Τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν μικρά διαθλαστικά σωμάτια που διακρίνονται εύκολα. Γίνεται μέτρηση των αιμοπεταλίων 5 τετραγώνων (80 μικρά) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου. Το συνολικό άθροισμα (Σ_A) αν πολλαπλασιαστεί επί 1000 δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος. Στη συνέχεια γίνεται υπολογισμός με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$$V = \sum_A \frac{0.04}{2.5}$$

Το αποτέλεσμα της παραπάνω εξίσωσης αντιστοιχεί στον όγκο (V σε ml) που πρέπει να επαναιωρηθούν τα αιμοπετάλια έτσι ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 2.5×10^9 αιμοπετάλια/ml.

3^η φυγοκέντρηση: ρύθμιση συγκέντρωσης αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια απομονώνονται με φυγοκέντρηση σε 1400 x g για 15 min. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται στον υπολογισμένο από την παραπάνω εξίσωση όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5.



Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PAF των δειγμάτων επιτυγχάνεται με μέτρηση του βαθμού συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων PAF. Η συσσώρευση έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του φωτός διαμέσου της μάζας του ελαιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετριέται σε ειδικό νεφελόμετρο³⁴⁹.

Τα αιμοπετάλια που χρησιμοποιούνται κατεργάζονται με ασπιρίνη, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και έκκριση του TXA_2 , καθώς και με σύστημα CP/CPK, ώστε να απομακρύνεται το εκκρινόμενο κατά την ενεργοποίηση ADP, το οποίο επίσης συσσωρεύει τα αιμοπετάλια.

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode με ζελατίνη και ασβέστιο, 2.6 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 7.6 mM Tris-HCl, 1.3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l γλυκόζη, 0.25 % ζελατίνη και pH 7.4

Διαλύονται 195 mg KCl, 212.5 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 g NaCl, 1.21 g Tris-HCl, 191 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος 10 % ζελατίνης, σε νερό τελικού όγκου 1 lt. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 40 ml και διατηρείται στους -20°C .

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης αιμοπεταλίων, pH 7.4

Σε 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tyrode με ζελατίνη και ασβέστιο, pH 7.4, προστίθενται 200 μl διαλύματος 0.2 M CP (τελική συγκέντρωση 1 mM) και 40 μl διαλύματος CPK 10 units/μl (τελική συγκέντρωση 10 units/ml). Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA

250 mg BSA διαλύονται σε 100 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .



Πρότυπα διαλύματα PAF

1^ο διάλυμα PAF

Διαλύονται 10 mg PAF σε 10 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1). Προκύπτει διάλυμα 1 mg/ml, ή 1.91×10^{-3} M PAF (C_{16}) και 1.8×10^{-3} M PAF (C_{18}). Γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου σε 2 δείγματα των 30 μl.

Α' αραίωση PAF

Αραιώνονται 250 μl του προηγούμενου διαλύματος σε 25 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) σε ογκομετρική φιάλη. Προκύπτει διάλυμα 10 μg/ml ή 1.91×10^{-5} M PAF (C_{16}) και 1.8×10^{-5} M PAF (C_{18}). Γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου σε 2 δείγματα των 4 ml.

Β' αραίωση PAF

Αραιώνονται 100 μl του προηγούμενου διαλύματος (1 μg PAF) σε 10 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα. Προκύπτει διάλυμα 0.1 ng/μl ή 100 pg/μl.

Διάλυμα εργασίας PAF, 5 και 10 pg/μl:

Από το προηγούμενο διάλυμα παραλαμβάνονται 50 και 100 μl αντίστοιχα, εξατμίζονται προσεκτικά μέχρι ξηρού και αναδιαλύονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Για να διαλυθεί επαρκώς ο PAF, γίνεται επώαση του μίγματος για τουλάχιστον 15 min, στους 37 °C. Στη συνέχεια το διάλυμα διαμοιράζεται σε erpendorf και φυλάσσεται στους -20 °C.

Παρατηρήσεις

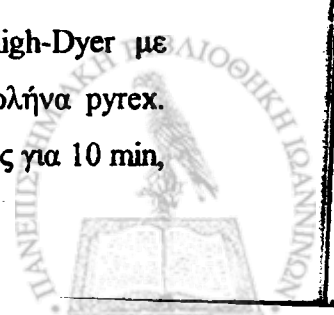
Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να πλυθούν με άλκαλι, μετά με σαπούνι, ξέπλυμα με νερό, νιτρικό οξύ, ξανά νερό και τέλος με απεσταγμένο νερό. Στα πώματα τοποθετείται αλουμινόχαρτο για την αποφυγή ρύπανσης αυτών με PAF.

Πειραματική πορεία

• Επεξεργασία δειγμάτων

Εκχύλιση των λιπιδίων του BAL

Ποσότητα δείγματος BAL ίση με 9 ml εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer με προσθήκη 10 ml μεθανόλης και 10 ml χλωροφορμίου σε γυάλινο σωλήνα pyrex. Αφού γίνει ανάδευση για 1 min το μίγμα φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 10 min,



έτσι ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση και η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη επιπλέον 10 ml χλωροφορμίου στην υδατομεθανολική φάση. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα ενώνονται και εξατμίζονται σε ρεύμα N_2 .

TLC

Το λιπιδικό υπόλειμμα που βρίσκεται στον γυάλινο σωλήνα επαναδιαλύεται δύο ή τρεις φορές σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (100 μ l) και τοποθετείται σε πλάκα TLC ποσοτικά (Silica gel 60, 20 x 20 cm, Merck). Στην πλάκα τοποθετούνται, επίσης, πρότυπα διαλύματα λιπιδίων: PC, λυσο-PC, σφιγγομυελίνης. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (65:35:7, v/v). Αφήνεται για ανάπτυξη για 50-60 min περίπου. Αφού εξατμιστούν οι διαλύτες από την πλάκα, αυτή ψεκάζεται με διάλυμα TNS και οι περιοχές των λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως.

Εκχύλιση του PAF

Η περιοχή του λιπιδίου του δείγματος, που αντιστοιχεί στο R_f του προτύπου διαλύματος PAF και μεταξύ των R_f της σφιγγομυελίνης και της λυσο-PC, αποξύνεται, τοποθετείται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και το πυριτικό οξύ εκχυλίζεται με 1.9 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία 1:2:0.8. Γίνεται ανάδευση για 1 min, φυγοκέντρηση σε 3000 στροφές για 10 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό γυάλινο σωλήνα. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά. Τα εκχυλίσματα ενώνονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα στον οποίο προστίθενται 1 ml χλωροφορμίου και 1 ml νερού. Το διφασικό σύστημα που δημιουργείται αναδεύεται για 1 min και φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 10 min. Η οργανική φάση παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέτα pasteur και στην υδατομεθανολική φάση προστίθεται επιπλέον 1 ml χλωροφορμίου. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση, φυγοκέντρηση και συλλογή της χλωροφορμικής φάσης. Οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις περιέχουν τον PAF. Ο διαλύτης εξατμίζεται σχολαστικά σε ρεύμα N_2 . Τέλος, ο PAF διαλυτοποιείται σε μικρή ποσότητα (50-100 μ l) διαλύματος 2.5 mg BSA /ml, στους 37 °C, για 15 min.



- **Ρύθμιση του συσσωρευόμετρου**

Η θερμοκρασία της κυψελίδας του οργάνου (CHRONO-LOG) ρυθμίζεται στους 37 °C. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα αιμοπετάλια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ρυθμίσεις οργάνου

Ρυθμίζουμε το 90 % της κλίμακας του καταγραφικού, προσθέτοντας σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και με το κουμπί με ένδειξη PPP (platelet poor plasma) ρυθμίζεται το όργανο έτσι ώστε η γραφίδα του καταγραφικού να δείχνει το 90% της κλίμακας.

Ρυθμίζουμε το 10 % της κλίμακας του καταγραφικού προσθέτοντας σε άλλη γυάλινη κυψελίδα που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4 και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και με το κουμπί με την ένδειξη PRP (platelet rich plasma) ρυθμίζεται το όργανο έτσι ώστε η γραφίδα του καταγραφικού να δείχνει το 10 % της κλίμακας.

- **Πρότυπη καμπύλη/Προσδιορισμός του EC₅₀**

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προστίθενται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 1 min. Στη συνέχεια προστίθενται αυξανόμενοι όγκοι (μερικά μl) των προτύπων διαλυμάτων PAF (C16:0) και καταγράφονται οι συσσωρεύσεις. Αν το λιπίδιο είναι διαλυμένο σε 60 % αιθανόλη δεν μπορούμε να υπερβούμε τα 10 μl. Αν είναι διαλυμένο σε BSA δεν υπάρχει περιορισμός όγκου αρκεί να μη μεταβάλλεται σημαντικά ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Δοκιμάζονται ποσότητες προτύπου διαλύματος PAF από 10 pg ως 50 pg, ώστε να βρεθεί η περιοχή γραμμικής απόκρισης η οποία ποικίλει ανάλογα με το πειραματόζωο. Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέσο της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς είναι η ημίσεια αποτελεσματική συγκέντρωση (effective concentration, EC₅₀). Ρυθμίζουμε ώστε οι τιμές να βρίσκονται γύρω στο EC₅₀ για να είναι αξιόπιστες.



- **Μέτρηση των δειγμάτων**

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προσθέτονται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, και 100 μl του εναωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο. Στη συνέχεια προστίθενται διάφοροι όγκοι των δειγμάτων και καταγράφονται οι συσσωρεύσεις.

- **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Σχεδιάζεται γράφημα το οποίο περιέχει τις συσσωρεύσεις (ύψος καμπύλης συσσώρευσης σε mm) συναρτήσει των ποσοτήτων PAF (pg). Αυτή είναι η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει σιγμοειδή μορφή. Αξιόπιστοι υπολογισμοί γίνονται μόνο όταν οι συσσωρεύσεις που προκαλούν τα δείγματα αντιστοιχούν στη γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης. Τέλος, βάση της πρότυπης καμπύλης γίνεται ο υπολογισμός των περιεκτικοτήτων των δειγμάτων BAL σε PAF και η αναγωγή των αποτελεσμάτων σε pg PAF/9 ml δείγματος BAL.

Στ.Ραδιομετρικός προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση των σημασμένων με τρίτιο [^3H] οξικών ομάδων που απελευθερώνονται μετά την επώαση του [^3H]-PAF με την πηγή του ενζύμου PAF-AcH που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το BAL και ο ανθρώπινος ορρός αίματος. Ο διαχωρισμός του μη υδρολυμένου [^3H]-PAF από τις ελεύθερες οξικές ομάδες γίνεται με καταβύθιση του συμπλόκου HSA-[^3H]-PAF με τριγλωροξικό οξύ (TCA).

Αντιδραστήρια

- NaCl (M. B.:58.44, Merck)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M. B.: 137.99, Merck)



- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M. B.: 177.99, Merck)
- Τολουόλιο (C_7H_8 , M. B.: 92.14, Labscan)
- Απορρυπαντικό Triton X-100, (M. B.: 646.37, Merck)
- POPOP (M. B.: 364.4, [1,4-bis[5-Phenyl-2-oxazolyl]benzene; 2,2'-p-Phenylene-bis[5-phenyloxazole]], Sigma)
- PPO (M. B.: 221.3, 2,5-Diphenyloxazole, Sigma)
- Αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human serum albumin, HSA, Sigma)
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA, M.B.: 163.39, Sigma)
- PAF (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, M. B.: 523.7, Bachem)
- [^3H]PAF: 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine-[acetyl-1- ^3H]; (NET-910 M. B.: 523.7, ειδική ραδιενέργεια: 7.1 Ci/mmol, 0.014 $\mu\text{mol/ml}$, 0.074 mg/ml, New England)

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4

Ζυγίζονται 8.16 g NaCl, 1.38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 1.7795 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Διαλύονται με νερό σε τελικό όγκο 1 lt. Ρυθμίζεται το pH στα 7.4, μοιράζεται σε πλαστικά φιαλίδια και φυλάσσεται στους -20°C .

Διάλυμα HSA/PBS, 1 mg/ml, pH 7.4

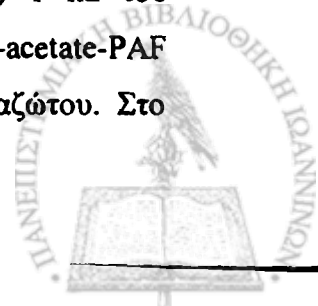
Ζυγίζονται 25 mg HSA και διαλύονται σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Η HSA (human serum albumin) διαλύεται με ήπια ανάδευση και χαμηλή θερμοκρασία σε 10 ml PBS και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 25 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C . Οι ποσότητες που απαιτούνται παραλαμβάνονται με αποστειρωμένη σύριγγα, χωρίς να ανοίγεται το φιαλίδιο. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί BSA αντί HSA, αν τα δείγματα δεν είναι ανθρώπινα.

Διάλυμα 1.8 mM PAF

Ζυγίζονται 9.524 mg PAF (16), και διαλύονται σε 10 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) v/v. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C .

Διάλυμα [^3H]-acetate-PAF 20 μM σε HSA/PBS

Παραλαμβάνονται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα (των 15 ml) 1 ml του διαλύματος PAF 1.8 mM και 100 μl του ραδιενεργού διαλύματος [^3H]-acetate-PAF 1.4×10^{-5} M. Οι προηγούμενες ποσότητες εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου. Στο



σωλήνα τοποθετούνται 9 ml διαλύματος HSA/PBS και το διάλυμα αφήνεται σε υδρόλουτρο 37 °C, υπό περιοδική και ήπια ανάδευση για 15 min τουλάχιστον προς πλήρη διαλυτοποίηση του PAF. Ειδική ραδιενέργεια διαλύματος (SA): περίπου 5×10^4 cpm/nmole.

Διάλυμα 20 % (w/v) τριχλωροξικού οξέος

Ζυγίζονται 20 g TCA και διαλύονται σε 100 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4 °C.

Πειραματική διαδικασία

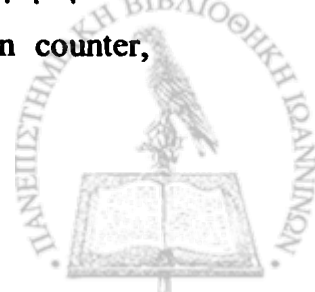
Ετοιμάζονται 4 σειρές πλαστικών σωλήνων πολυπροπυλενίου erpendorf του 1 ml. Ετοιμάζεται παγόλουτρο στο οποίο τοποθετούνται οι 3 σειρές των σωλήνων (erpendorf). Σε κάθε σωλήνα που βρίσκεται στο παγόλουτρο, τοποθετούνται 50 μl διαλύματος 20 % TCA. Η μία σειρά χρησιμοποιείται για τα αρνητικά control, ενώ οι άλλες δύο για τα διπλά δείγματα.

Σε υδρόλουτρο 37 °C τοποθετούμε την πηγή του ενζύμου (BAL ή αραιωμένος ορρός 1:50) και το διάλυμα [^3H]-PAF/HSA/PBS. Παραμένουν για 10 min για να αποκτήσουν την κατάλληλη θερμοκρασία και αναδεύονται.

Στο υδρόλουτρο τοποθετούμε την 4^η σειρά των σωλήνων erpendorf. Στον σωλήνα αυτό αναμιγνύονται ίσοι όγκοι της πηγής του ενζύμου με το σημασμένο διάλυμα PAF (χρόνος μηδέν), συνήθως από 100 μl, και αναδεύονται.

Στον κατάλληλο χρόνο επώασης (t), συνήθως 20 min για το BAL, παραλαμβάνονται μετά από ανάδευση 50 μl (δύο διπλά δείγματα για κάθε σωληνάκι για στατιστική) και μεταφέρονται στο παγόλουτρο, σε αντίστοιχους σωλήνες (erpendorf) που περιέχουν TCA.

Οι σωλήνες παραμένουν στο παγόλουτρο για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται σε φυγόκεντρο ειδική για σωλήνες erpendorf, στις 12000 στροφές για 2 min. Παραλαμβάνονται προσεκτικά από το υπερκείμενο 50 μl και τοποθετούνται σε ειδικό πλαστικό σωλήνα (vial) για μέτρηση ραδιενέργειας, όπου στη συνέχεια προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού και αφού γίνει ανάδευση, ο σωλήνας τοποθετείται σε μεγαλύτερο γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Η μέτρηση των κρούσεων γίνεται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counter, Packard).



Θετικό control (T): 25 μl του μίγματος αντίδρασης από το erpendorf τοποθετούνται στο vial για μέτρηση ραδιενέργειας. (Η ποσότητα ραδιενέργειας αντιστοιχεί στην ποσότητα αυτής που μετριέται τελικά στο δείγμα).

Αρνητικό control (C): 25 μl πηγής του ενζύμου τοποθετούνται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 50 μl TCA και αναδεύεται. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 μl του διαλύματος [³H]-PAF/HSA/PBS. Το δείγμα φυγοκεντρείται κατά τα γνωστά και παραλαμβάνονται από το υπερκείμενο 50 μl για μέτρηση ραδιενέργειας. (Η ποσότητα ραδιενέργειας που μετριέται αντιστοιχεί σε 12.5 μl του αρχικού διαλύματος [³H]-PAF/HSA/PBS).

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η ενεργότητα της PAF-AcH σε nmoles/ml/min (S) υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$S = \frac{\text{cpm}_{\text{δείγματος}} - C \cdot K}{t \cdot SA}$$

όπου:

S,	Ενεργότητα PAF-AcH (nmol/ml/min)
SA,	Ειδική ραδιενέργεια διαλύματος [³ H]-PAF/HSA/PBS (cpm/nmol) (τα cpm που αντιστοιχούν σε 10 μl του διαλύματος [³ H]-PAF/HSA/PBS αντιστοιχούν σε 0.2 nmoles PAF)
Cpm δείγματος	cpm των 50 μl κάθε δείγματος μετά την φυγοκέντρηση
C,	Αρνητικό control (cpm των 50 μl του τυφλού δείγματος)
t,	Χρόνος επώασης (min)
K,	Συντελεστής αραίωσης δείγματος. Για BAL: K = 80, (=1000/12.5)



Αποτελέσματα

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κλινικών και εργαστηριακών μετρήσεων των ασθενών της μελέτης. Παρουσιάζονται κατά σειρά τα αποτελέσματα της υποομάδας του μηχανικού αερισμού (22 ασθενείς), της υποομάδας της πνευμονίας στον αναπνευστήρα (12 ασθενείς) και της υποομάδας της ατελεκτασίας (8 ασθενείς). Για την ευκολότερη παρακολούθηση των αποτελεσμάτων οι υποομάδες αυτές θα παρουσιάζονται σαν ομάδα 1, 2, και 3 αντίστοιχα στη συνέχεια.

Σε κάθε ομάδα παρουσιάζονται αρχικά τα στοιχεία που αφορούν τις μεταβολές της ανταλλαγής των αερίων και της μηχανικής του αναπνευστικού συστήματος. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος: ολικές πρωτεΐνες και αλβουμίνη, ολικά φωσφολιπίδια, είδη φωσφολιπιδίων, PAF και PAF-AcH, καθώς και οι διαφορικές φυγοκεντρήσεις των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.



Ομάδα 1-Μηχανικός αερισμός

Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών της ομάδας παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1. Οι παρακάτω τιμές αντιστοιχούν στις μετρήσεις που προηγήθηκαν του αντίστοιχου BAL. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 2 ώρες μετά τη διενέργεια του BAL, χωρίς να παρατηρηθούν διαφορές. Οι τιμές παρουσιάζονται σαν μέσος όρος και σταθερή απόκλιση (SD).

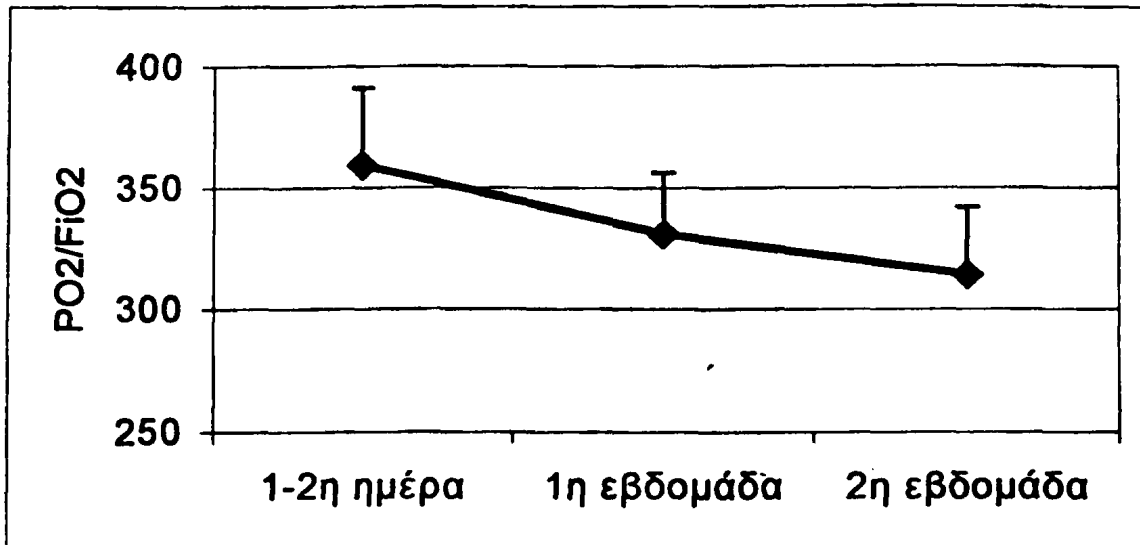
	1-2 ημέρα	1η εβδομάδα	2η εβδομάδα
PO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	359±31	331±25	314±28*
pH	7,44±0,06	7,42±0,04	7,45±0,07
PCO ₂ (mmHg)	37±5	40±3	39±5
Crs (ml/cmH ₂ O)	66±6	61±5	57±5*
Vt (ml/KΣΒ)	11±2	9±1	9±2
Ppl (cm H ₂ O)	20±3	21±5	22±4
PEEP (cmH ₂ O)	3±2	5±2	5±1

Πίνακας 5.1. Ανταλλαγή των αερίων και μηχανική του αναπνευστικού συστήματος στην ομάδα 1 (μηχανικός αερισμός). Crs: ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος, Vt: αναπνεόμενος όγκος (υπολογιζόμενος σε ml ανά kgρ σωματικού βάρους), Ppl: τελοεισπνευστική πίεση παύσης, PEEP: θετική τελοεκπνευστική πίεση. *:στατιστικά σημαντική διαφορά με την πρώτη μέτρηση (1-2η ημέρα).

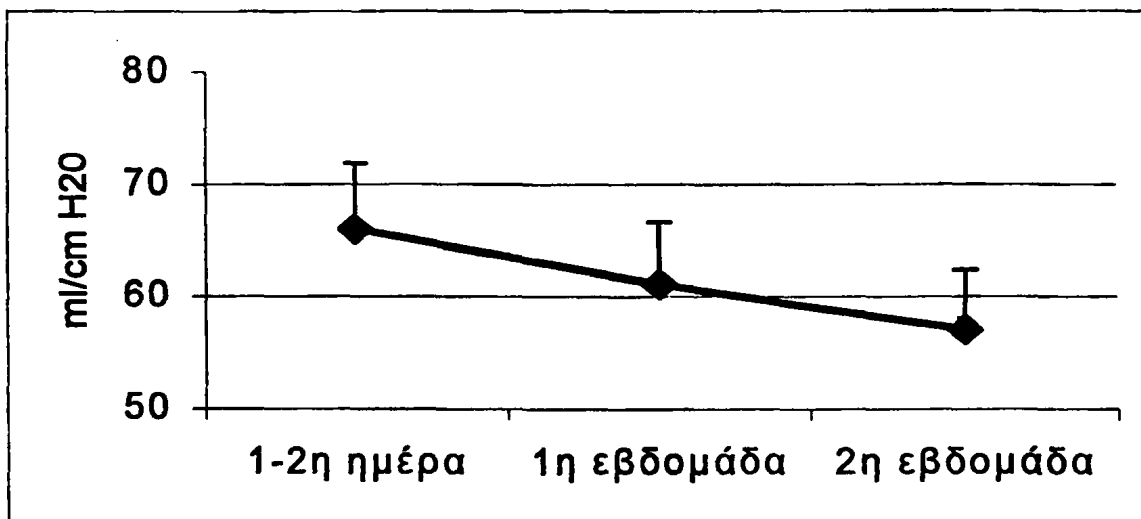
Η οξυγόνωση και η ενδοτικότητα παρουσίασαν μια πτωτική τάση την πρώτη εβδομάδα, η οποία συνεχίστηκε τη δεύτερη εβδομάδα. Η πτώση τη δεύτερη εβδομάδα ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις αρχικές τιμές ($p=0.05$). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο pH και το PCO₂. Δεν υπήρχε διαφορά στο χορηγούμενο αναπνεόμενο όγκο και τη χορηγούμενη θετική τελοεκπνευστική πίεση. Η τελοεισπνευστική πίεση παύσης (Ppl) παρουσίασε μια μικρή μη στατιστικά



σημαντική αύξηση, οι τιμές της όμως σε όλη τη διάρκεια της μελέτης ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές που θεωρούνται βλαπτικές για το πνευμονικό παρέγχυμα.



Σχήμα 5.1. Μεταβολή της οξυγόνωσης της ομάδας 1.



Σχήμα 5.2. Μεταβολή της ενδοτικότητας του αναπνευστικού συστήματος της ομάδας 1.



Ομάδα 1- Ολικές πρωτεΐνες

Οι ολικές πρωτεΐνες αυξήθηκαν από $148 \pm 62 \mu\text{g/ml}$ στο αρχικό BAL σε $381 \pm 288 \mu\text{g/ml}$ στο BAL της πρώτης εβδομάδας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$). Στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας οι ολικές πρωτεΐνες παρουσίασαν μια μικρή πτώση ($353 \pm 215 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την πρώτη εβδομάδα. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας. Αντίθετα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) μεταξύ των τιμών του αρχικού δείγματος (1-2η ημέρα) και της δεύτερης εβδομάδας. Στον πίνακα 5.2 και στο σχήμα 5.3 απεικονίζονται οι μεταβολές των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης του BAL στους ασθενείς της ομάδας 1.

	1-2η ημέρα	1η εβδομάδα	2η εβδομάδα
Ολικές πρωτεΐνες (μg/ml)	148 ± 62	$381 \pm 288^*$	$353 \pm 215^*$
Αλβουμίνη (μg/ml)	40 ± 19	$131 \pm 95^*$	$118 \pm 67^*$
Αλβουμίνη/Ολικές πρωτεΐνες	28%	34%	33%

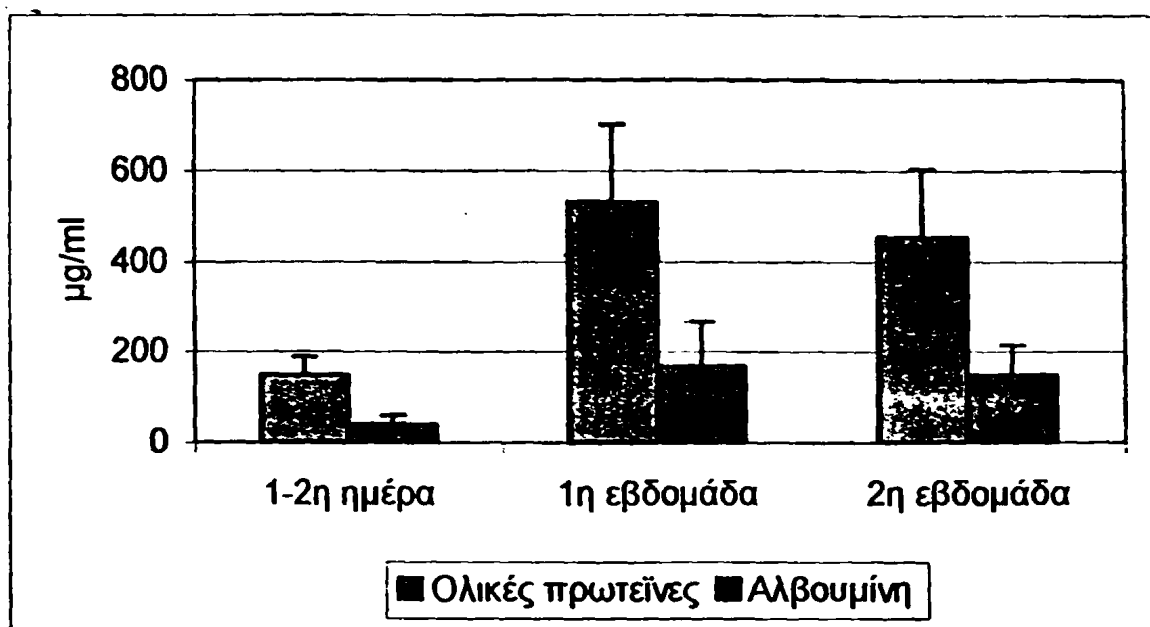
Πίνακας 5.2. Ολικές πρωτεΐνες και αλβουμίνη στους ασθενείς της ομάδας 1. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος και των υπολοίπων.



Ομάδα 1- Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη ακολούθησε παρόμοια συμπεριφορά με τις ολικές πρωτεΐνες. Αυξήθηκε από $40 \pm 19 \mu\text{g/ml}$ στο αρχικό BAL, σε $131 \pm 95 \mu\text{g/ml}$ στο BAL της πρώτης εβδομάδας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$). Στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας η αλβουμίνη παρουσίασε μια μικρή πτώση ($118 \pm 67 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την πρώτη εβδομάδα. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας. Αντίθετα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) μεταξύ των τιμών του αρχικού δείγματος (1-2η ημέρα) και της δεύτερης εβδομάδας.

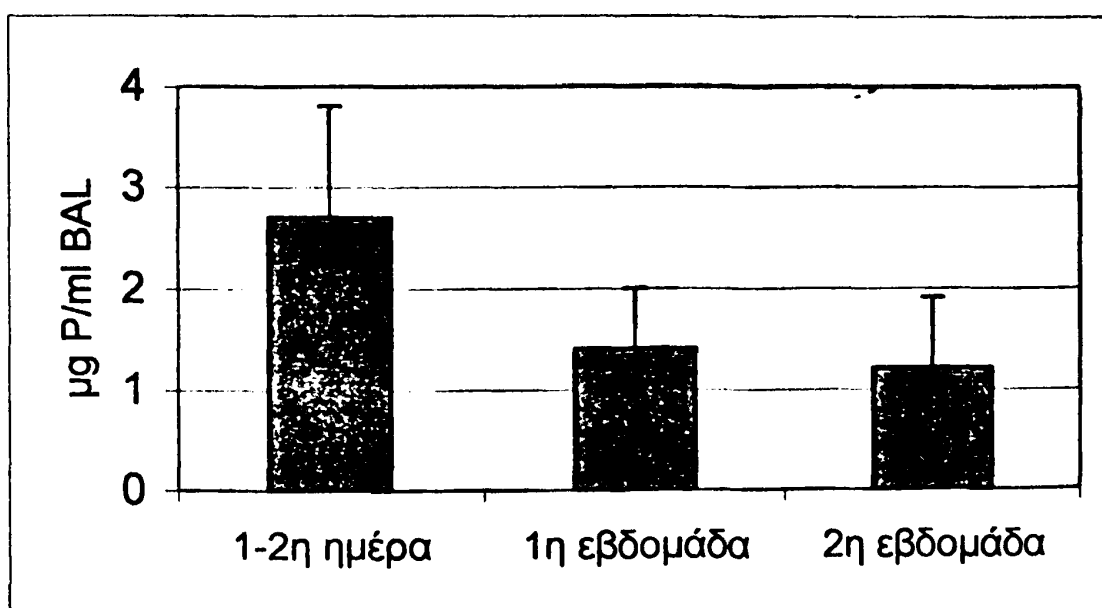
Ο λόγος αλβουμίνης προς ολικές πρωτεΐνες ήταν 28% στο πρώτο δείγμα (1-2η ημέρα), 34% στο δεύτερο και 33% στο τρίτο δείγμα.



Σχήμα 5.3. Μεταβολή των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης της ομάδας 1.

Ομάδα 1- Ολικά φωσφολιπίδια

Τα ολικά φωσφολιπίδια παρουσίαζαν μια συνεχή πτώση, που απεικονίζεται στο σχήμα 5.4. Τα ολικά φωσφολιπίδια μειώθηκαν από $2,7 \pm 1,1$ $\mu\text{g P/ml BAL}$ στο αρχικό δείγμα σε $1,4 \pm 0,6$ $\mu\text{g P/ml BAL}$ στο BAL της πρώτης εβδομάδας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$). Στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας τα ολικά φωσφολιπίδια συνέχισαν την πτωτική τους πορεία και βρέθηκαν στα $1,2 \pm 0,7$ $\mu\text{g P/ml BAL}$. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας. Αντίθετα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) μεταξύ των τιμών του αρχικού δείγματος (1-2η ημέρα) και της δεύτερης εβδομάδας.



Σχήμα 5.4. Ολικά φωσφολιπίδια στην ομάδα 1.

Ομάδα 1- Είδη φωσφολιπιδίων

Εκτός από τη ποσοτική μείωση των φωσφολιπιδίων παρατηρήθηκαν και σημαντικές ποιοτικές μεταβολές, που απεικονίζονται στον πίνακα 5.3 και στο σχήμα 5.5.

	1-2η ημέρα	1η εβδομάδα	2η εβδομάδα
Ολικά φωσφολιπίδια (μg P/ml BAL)	2,7±1,1	1,4±0,6*	1,2±0,7*
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), % των ολικών λιπιδίων	71±5	56±6*	60±8*
Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), % των λιπιδίων	10±3	6±1*	6±2*
Σφιγγομυελίνη (SM), % των ολικών λιπιδίων	6±1	17±3*	16±4*
Φωσφατιδυλοεθανολαμίνη (PE), % των λιπιδίων	4±1	6±2*	5±1*
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS), % των ολικών λιπιδίων	4±2	6±1*	6±1*
Φωσφατιδυλοϊνositόλη (PI), % των λιπιδίων	5±2	7±2*	7±2*
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, % των λιπιδίων	0	2±1	0

Πίνακας 5.3. Μεταβολές των φωσφολιπιδίων στην ομάδα 1. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων.

Η φωσφατιδυλοχολίνη παρουσίασε σημαντική μείωση στο τέλος της πρώτης εβδομάδας του μηχανικού αερισμού (56%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (71%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p<0,001$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης φάνηκε να σταθεροποιείται τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (60%).

Η φωσφατιδυλογλυκερόλη παρουσίασε επίσης μείωση μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (10%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p<0,001$). Το ποσοστό της



φωσφατιδυλογλυκερόλης παρέμεινε σταθερό τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (6%).

Αντίθετα η σφιγγομυελίνη παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά από μία εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (17%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (6%). Η * διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$). Η δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή του ποσοστού της σφιγγομυελίνης (16%).

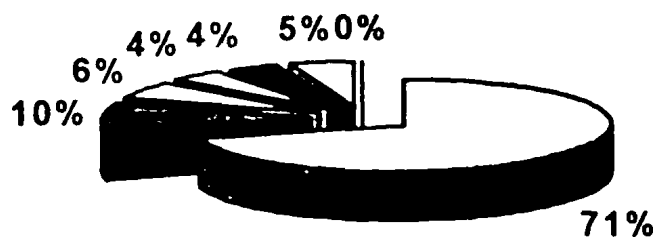
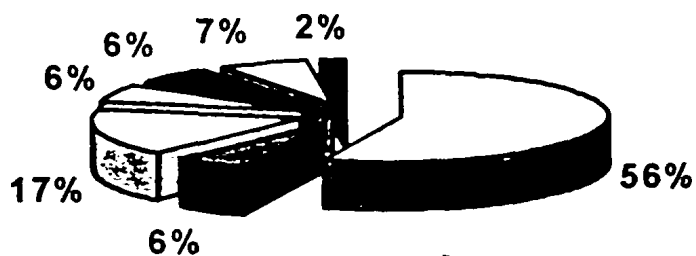
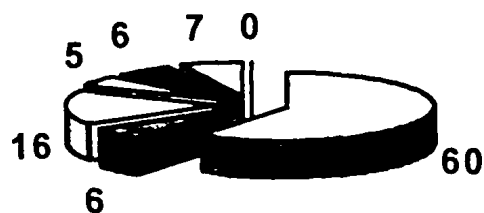
Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη παρουσίασε αύξηση μετά από μία εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (4%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή του ποσοστού της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (5%).

Ανάλογη ήταν και η μεταβολή της φωσφατιδυλοσερίνης η οποία παρουσίασε μια σχετική αύξηση την πρώτη εβδομάδα (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (4%) ($p < 0,01$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοσερίνης παρέμεινε σταθερό τη δεύτερη εβδομάδα.

Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη αυξήθηκε μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού (7%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (5%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη παρέμεινε σταθερή κατά τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (7%).

Δεν ανιχνεύθηκε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη στο αρχικό BAL, ενώ ανιχνεύθηκε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 2% στο BAL που έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας.



1-2η ημέρα1η εβδομάδα2η εβδομάδα

□ PC ■ PG □ SM □ PE ■ PS □ PI ■ lysoPC

Σχήμα 5.5. Είδη φωσφολιπιδίων στην ομάδα 1.



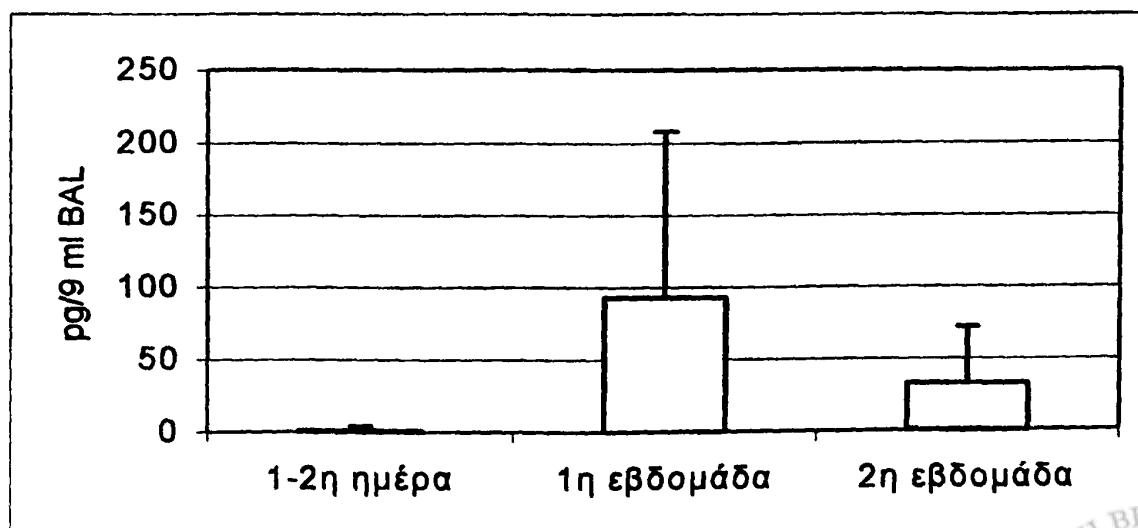
Ομάδα 1- PAF

Ο PAF δεν ανιχνεύθηκε ουσιαστικά στο πρώτο BAL, ενώ βρέθηκε πολύ αυξημένος στο BAL που έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας ($p<0,0001$). Στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας, η τιμή του παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την πρώτη εβδομάδα ($p<0,001$), αλλά εξακολουθούσε να βρίσκεται πολύ ψηλότερα σε σχέση με το δείγμα του πρώτου 48ωρου ($p<0,0001$). (σχ. 5.6).

Στον πίνακα 5.4 απεικονίζονται οι μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 1.

	1-2η ημέρα	1η εβδομάδα	2η εβδομάδα
PAF (pg/9m BAL)	1±3	93±115*	33±39*+
PAF-AcH (nmol PAF/ml BAL/min)	0.05±0.02	0.56±0.15*	0.13±0.06*+

Πίνακας 5.4. Μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 1. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων, ενώ με σταυρό η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δεύτερου και του τρίτου δείγματος.



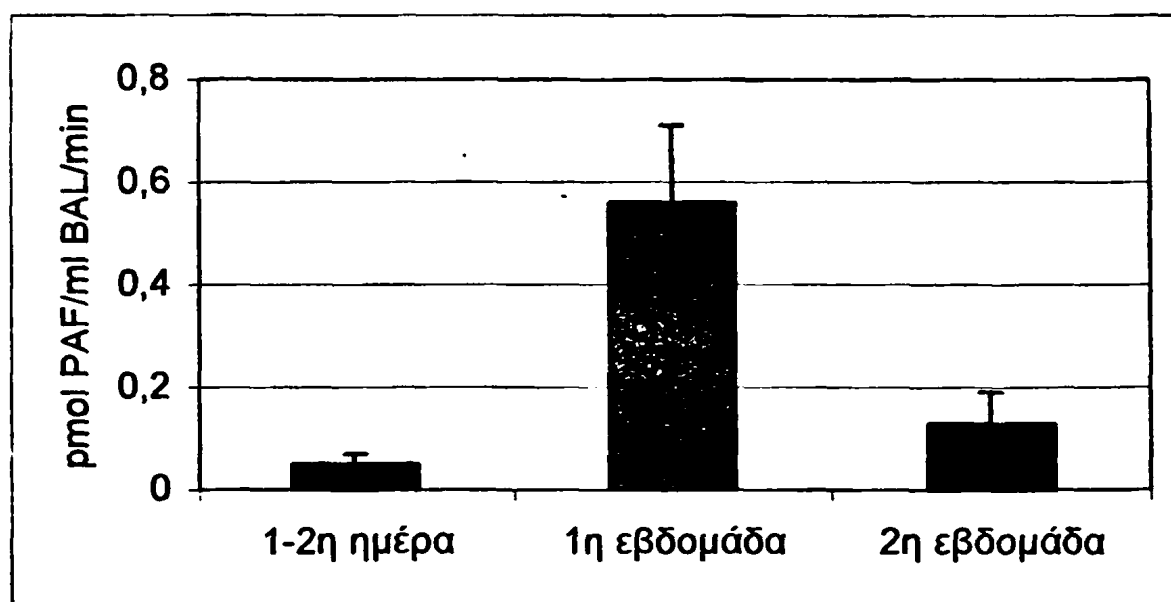
Σχήμα 5.6. Μεταβολές του PAF στην ομάδα 1.



Ομάδα 1- PAF AcH

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση ακολούθησε μεταβολή ανάλογη με αυτήν του PAF (Πίνακας 5.4). Παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο δεύτερο δείγμα σε σχέση με το αρχικό ($p < 0,0001$) και μια σχετική μείωση στο τρίτο δείγμα. Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το δεύτερο δείγμα ($p < 0,001$), αλλά εξακολουθούσε να είναι σημαντικά ψηλότερη σε σχέση με το πρώτο δείγμα ($p < 0,0001$) (σχήμα 5.7).

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση δεν απαιτούσε ιόντα ασβεστίου για τη δράση της και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 10mM EDTA. Δεν απενεργοποιήθηκε από το *p*-βρωμοφαινακυλο-βρωμίδιο, έναν συνήθη αναστολέα της φωσφολιπάσης A_2 και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία περίσσειας φωσφατιδυλοχολίνης ($0,5 \times 10^{-4} M$). Κατά συνέπεια διαφοροποιείται από την τυπική φωσφολιπάση A_2 και χαρακτηρίζεται σαν ειδική για PAF.



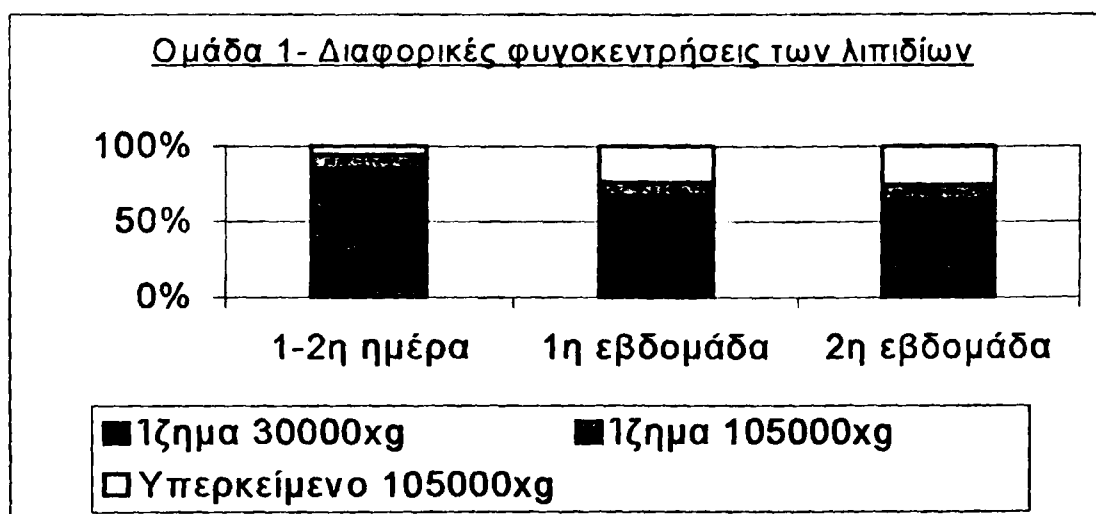
Σχήμα 5.7. Μεταβολές της ενεργότητας της PAF-AcH στην ομάδα 1.

Ομάδα 1- Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/Ολικά φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύουν το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο BAL της πρώτης εβδομάδας σε σχέση με το αρχικό ($p<0,01$). Στο BAL της δεύτερης εβδομάδας παρατηρήθηκε μια μικρή επιπλέον, μη στατιστικά σημαντική, μείωση σε σχέση με το BAL της πρώτης εβδομάδας.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	85,1±13,4	9,5±1,8	5,7±1,1
1η εβδομάδα	66±14,2*	8,9±2,1	23,4±6,5*
2η εβδομάδα	63±12,2*	9,4±1,8	25,2±7,7*

Πίνακας 5.5. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 1 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων.



Σχήμα 5.8. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 1.

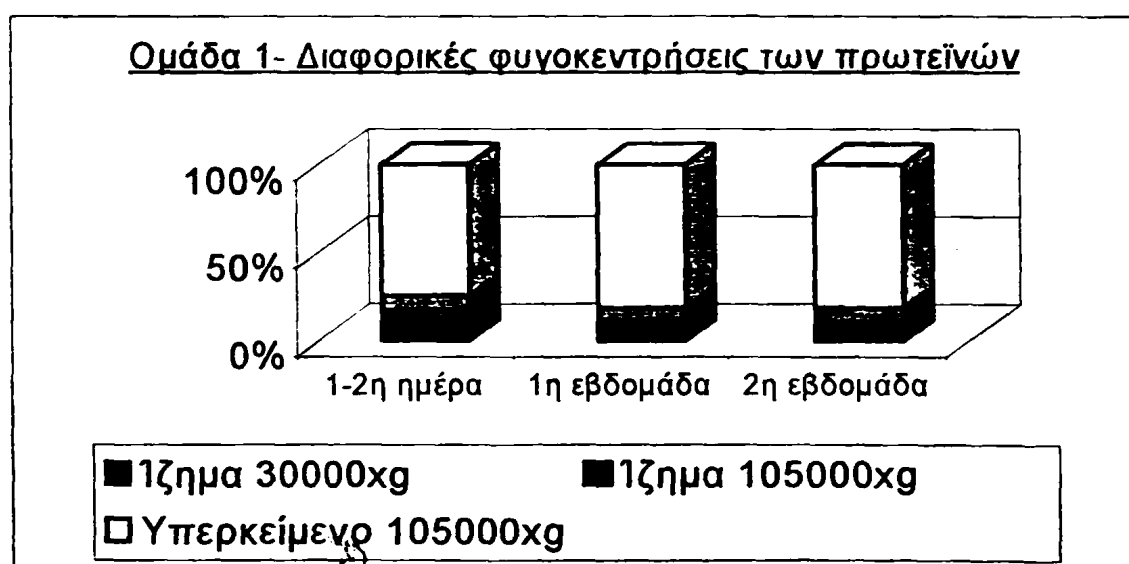


Ομάδα 1- Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες

Στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), οι πρωτεΐνες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο BAL της πρώτης εβδομάδας σε σχέση με το αρχικό ($p < 0,05$). Στο BAL της δεύτερης εβδομάδας παρατηρήθηκε μια μικρή επιπλέον, μη στατιστικά σημαντική, μείωση σε σχέση με το BAL της πρώτης εβδομάδας.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	17,2±3,3	8,1±1,3	74,3±12,5
1η εβδομάδα	11,2±2,2*	7,2±1,1	80,7±15,3
2η εβδομάδα	10,1±2,4*	8±2,6	79,3±12,8

Πίνακας 5.6. Κατανομή των πρωτεϊνών στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 1 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων.



Σχήμα 5.9. Κατανομή των πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 1.

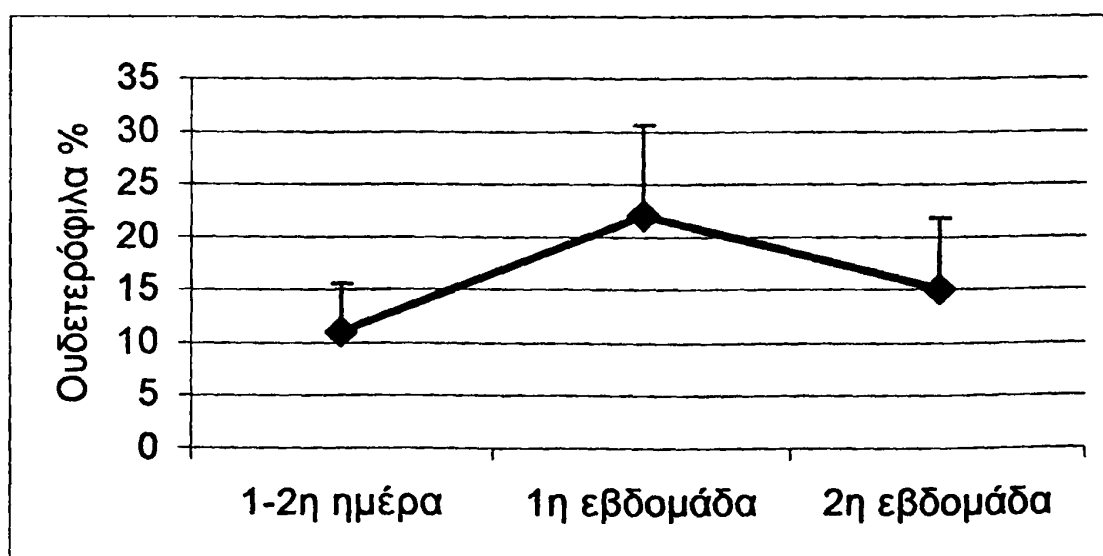


Ομάδα 1-Κύτταρα

Ο ολικός αριθμός των κυττάρων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαδοχικών BAL και παρουσιάζεται στον πίνακα 5.7. Αντίθετα σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών. Τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασαν μια μικρή μείωση την πρώτη εβδομάδα, αλλά επανήλθαν τη δεύτερη εβδομάδα. Τα ποσοστό των ουδετεροφίλων παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση την πρώτη εβδομάδα σε σχέση με το ποσοστό του πρώτου 48ωρου ($p<0,01$). Τη δεύτερη εβδομάδα το ποσοστό αυτό παρουσίασε μείωση, αλλά εξακολουθούσε να είναι αυξημένο σε σχέση με το αρχικό δείγμα (σχήμα 5.10).

	1-2η ημέρα	1η εβδομάδα	2η εβδομάδα
Ολικά κύτταρα (x1000)	184±38	195±43	189±55
Κυψελιδικά μακροφάγα (%)	83±9	71±11	77±16
Ουδετερόφιλα (%)	11±4,5	22±8,6*	15±6,8

Πίνακας 5.7. Ολικά κύτταρα και υποπληθυσμοί στην ομάδα 1.



Σχήμα 5.10. Μεταβολή του ποσοστού των ουδετεροφίλων στην ομάδα 1.



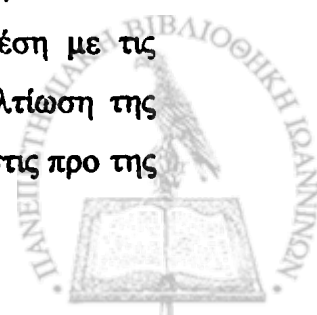
Ομάδα 2-Πνευμονία στον αναπνευστήρα (VAP)

Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών της ομάδας παρουσιάζονται στον πίνακα 5.8. Οι παρακάτω τιμές αντιστοιχούν στις μετρήσεις που προηγήθηκαν του αντίστοιχου BAL. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 2 ώρες μετά τη διενέργεια του BAL, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές. Οι τιμές παρουσιάζονται σαν μέσος όρος και σταθερή απόκλιση (SD).

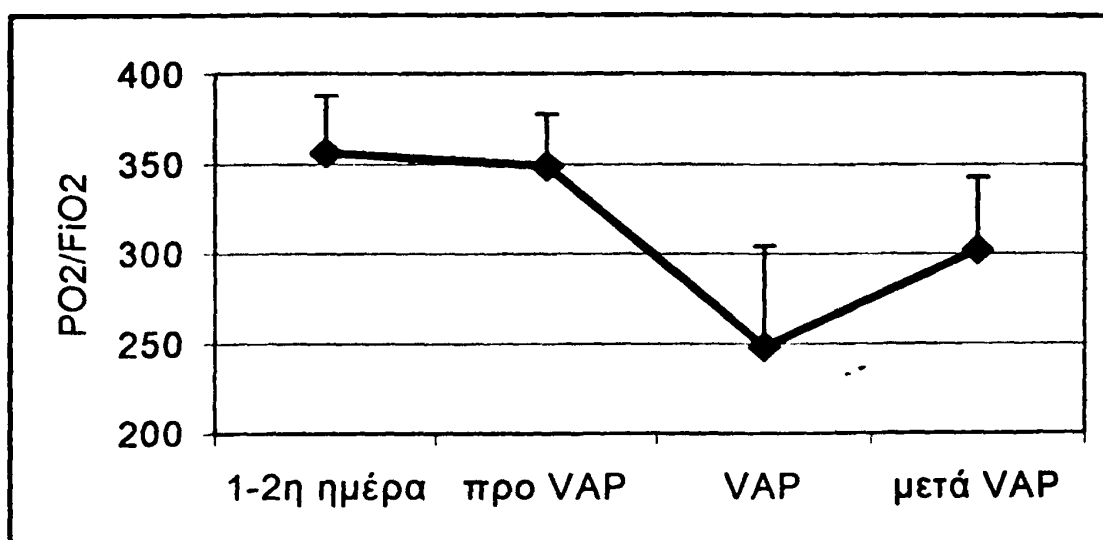
	1-2η ημέρα	προ VAP	VAP	μετά VAP
PO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	356±32	348±29	247±56*	302±40*#
pH	7,45±0,04	7,42±0,02	7,48±0,05	7,46±0,05
PCO ₂ (mmHg)	36±3	38±4	40±5	38±2
Crs (ml/cmH ₂ O)	66±6	63±5	51±7*	57±6*#
Vt (ml/KΣΒ)	11±2	11±3	10±4	9±2
Ppl (cm H ₂ O)	18±4	20±5	26±4*	19±3
PEEP (cmH ₂ O)	3±2	3±2	7±3	4±2

Πίνακας 5.8. Ανταλλαγή των αερίων και μηχανική του αναπνευστικού συστήματος στην ομάδα 2 (πνευμονία στον αναπνευστήρα). Crs: ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος, Vi: αναπνεόμενος όγκος (υπολογιζόμενος σε ml ανά kgτ σωματικού βάρους), Ppl: τελοεισπνευστική πίεση παύσης, PEEP: θετική τελοεκπνευστική πίεση. *:στατιστικά σημαντική διαφορά με την μέτρηση που προηγήθηκε της πνευμονίας (προ VAP). #:στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέτρησης της πνευμονίας (VAP) και μετά την πνευμονία (μετά VAP).

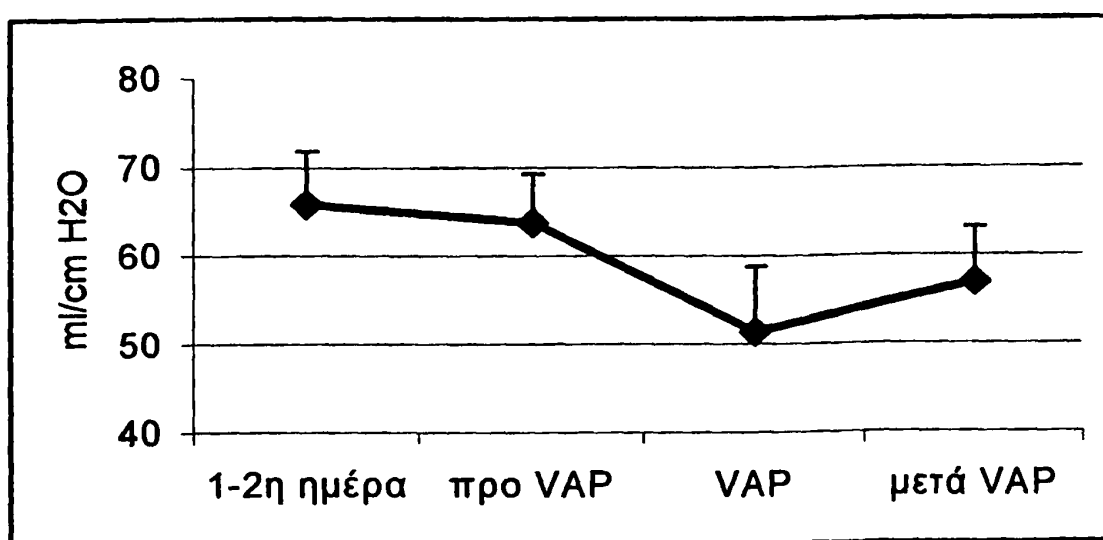
Η οξυγόνωση ($p=0.001$) και η ενδοτικότητα ($p=0.01$) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική πτώση κατά τη διάρκεια της πνευμονίας σε σχέση με τις προηγούμενες τιμές. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από βελτίωση της οξυγόνωσης και της ενδοτικότητας, οι οποίες όμως δεν είχαν επιστρέψει στις προ της



πνευμονίας τιμές τους, όταν πραγματοποιήθηκε το τελευταίο BAL. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο pH και το PCO_2 . Δεν υπήρχε διαφορά στο χορηγούμενο αναπνεόμενο όγκο. Η τελοεισπνευστική πίεση παύσης (P_{pl}) παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια της πνευμονίας ($p=0.05$), οι τιμές της όμως σε όλη τη διάρκεια της μελέτης ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές που θεωρούνται βλαπτικές για το πνευμονικό παρέγχυμα. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από υποχώρηση της τελοεισπνευστικής πίεσης στις προηγούμενες τιμές της.



Σχήμα 5.11. Μεταβολή της οξυγόνωσης της ομάδας 2.



Σχήμα 5.12. Μεταβολή της ενδοτικότητας στην ομάδα 2.



Ομάδα 2-Ολικές πρωτεΐνες

Οι ολικές πρωτεΐνες αυξήθηκαν από $231 \pm 173 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που προηγήθηκε της πνευμονίας σε $1425 \pm 1288 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που ελήφθη κατά τη διάγνωση της πνευμονίας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$). Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των ολικών πρωτεϊνών ($247 \pm 81 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την πνευμονία ($p < 0.01$). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών πριν την πνευμονία και μετά την αποδρομή της. Οι τιμές πριν την πνευμονία αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δειγμάτων που προηγήθηκαν της πνευμονίας και αφορούν τα BAL που έγιναν είτε στο πρώτο 48ωρο (7 ασθενείς), είτε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας (5 ασθενείς). Στον πίνακα 5.9 και στο σχήμα 5.12 απεικονίζονται οι μεταβολές των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης του BAL στους ασθενείς της ομάδας 2.

	1-2η ημέρα	προ VAP	VAP	μετά VAP
Ολικές πρωτεΐνες ($\mu\text{g/ml}$)	$177 \pm 58^*$	$231 \pm 173^*$	1425 ± 1288	$247 \pm 81^*$
Αλβουμίνη ($\mu\text{g/ml}$)	$55 \pm 17^*$	$61 \pm 28^*$	424 ± 301	$81 \pm 40^*$
Αλβουμίνη/Ολικές πρωτεΐνες	27 ± 3	27 ± 4	30 ± 4	33 ± 4

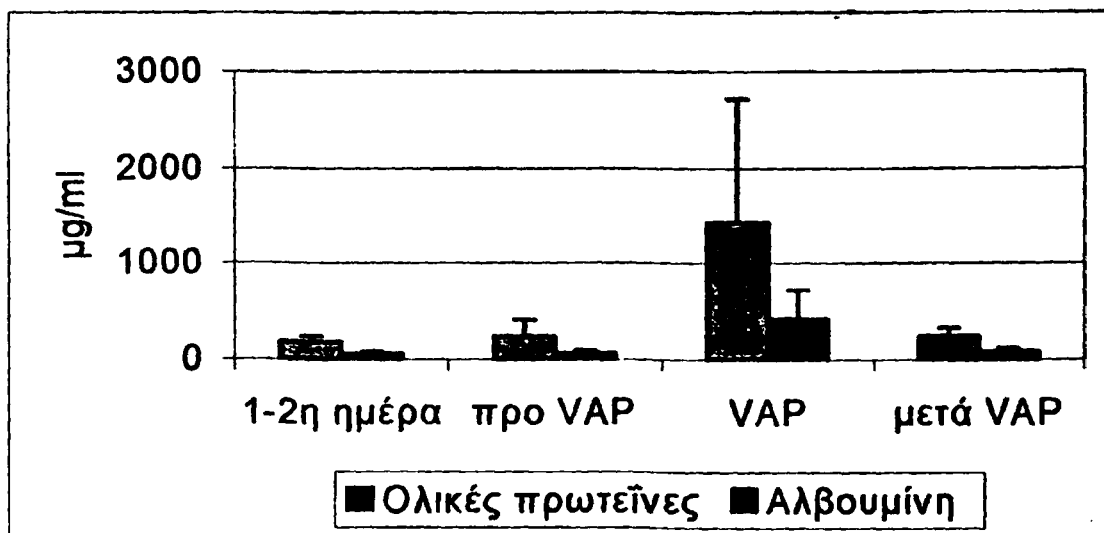
Πίνακας 5.9. Ολικές πρωτεΐνες και αλβουμίνη στους ασθενείς της ομάδας 2. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δείγματος που αντιστοιχεί στην πνευμονία και των υπολοίπων.



Ομάδα 2-Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη ακολούθησε παρόμοια συμπεριφορά με τις ολικές πρωτεΐνες. Η αλβουμίνη αυξήθηκε από $61 \pm 28 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που προηγήθηκε της πνευμονίας σε $424 \pm 301 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που ελήφθη κατά τη διάγνωση της πνευμονίας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$). Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της αλβουμίνης ($81 \pm 40 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την πνευμονία ($p < 0.01$). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της αλβουμίνης πριν την πνευμονία και μετά την αποδρομή της.

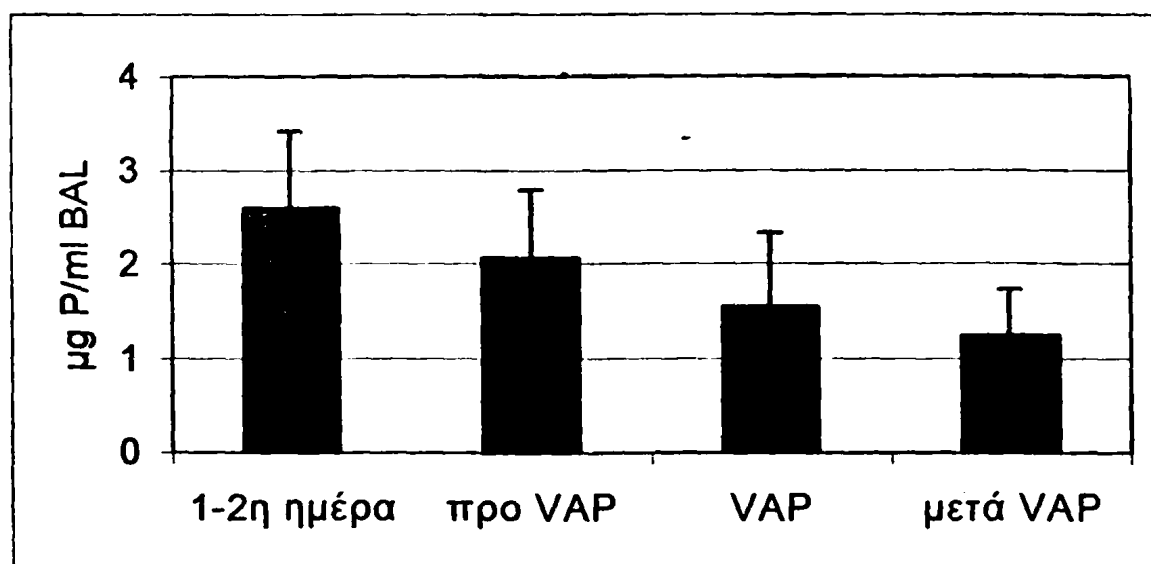
Ο λόγος αλβουμίνης προς ολικές πρωτεΐνες ήταν 27% πριν την πνευμονία, 30% κατά την πνευμονία και 33% μετά την πνευμονία.



Σχ. 5.13. Μεταβολή των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης της ομάδας 2.

Ομάδα 2- Ολικά φωσφολιπίδια

Τα ολικά φωσφολιπίδια παρουσίασαν μια συνεχή πτώση κατά τη διάρκεια της πνευμονίας, που απεικονίζεται στο σχήμα 5.14. Τα ολικά φωσφολιπίδια μειώθηκαν από $2,06 \pm 0,73$ $\mu\text{g P/ml BAL}$ στο δείγμα πριν την πνευμονία σε $1,54 \pm 0,6$ $\mu\text{g P/ml}$ στο BAL κατά τη διάγνωση της πνευμονίας. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$). Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από περαιτέρω μείωση των ολικών φωσφολιπιδίων ($1,24 \pm 0,49$ $\mu\text{g P/ml}$) σε σχέση με την πνευμονία (μη στατιστικά σημαντική διαφορά). Αντίθετα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ολικά φωσφολιπίδια πριν την πνευμονία και μετά την αποδρομή της ($p < 0,05$). Οι τιμές πριν την πνευμονία αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δειγμάτων που προηγήθηκαν αυτού της διάγνωσης της πνευμονίας και αφορούν τα BAL που έγιναν είτε στο πρώτο 48ωρο (7 ασθενείς), είτε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας (5 ασθενείς), ανάλογα με το χρόνο εμφάνισης της πνευμονίας.



Σχήμα 5.14. Ολικά φωσφολιπίδια στην ομάδα 2.

Ομάδα 2- Είδη φωσφολιπιδίων

Η πνευμονία στον αναπνευστήρα συνοδεύτηκε από σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5.10.

	1-2η ημέρα	προ VAP	VAP	μετά VAP
Ολικά φωσφολιπίδια ($\mu\text{g P/ml BAL}$)	2.6 $\pm$ 0.8	2.06 $\pm$ 0.73#	1.54 $\pm$ 0.79#	1.24 $\pm$ 0.49#*
Φωσφατιδυλογχολίνη (PC), % των ολικών λιπιδίων	70 $\pm$ 12	66 $\pm$ 7	54 $\pm$ 6#*	59 $\pm$ 8#*
Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), % των λιπιδίων	8.5 $\pm$ 2.1	8 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2#*	6 $\pm$ 1#*
Σφιγγομυελίνη (SM), % των ολικών λιπιδίων	5.2 $\pm$ 1.3	9 $\pm$ 5	19 $\pm$ 6#*	15 $\pm$ 4#*
Φωσφατιδυλοεθανολαμίνη (PE), % των λιπιδίων	4 $\pm$ 1.2	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2#*	6 $\pm$ 1#*
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS), % των ολικών λιπιδίων	5.1 $\pm$ 1.4	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2
Φωσφατιδυλοϊνositόλη (PI), % των λιπιδίων	5.1 $\pm$ 1.3	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1#*	7 $\pm$ 2#*
Λυσο-φωσφατιδυλογχολίνη, % των λιπιδίων	0	0	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1+

Πίνακας 5.10. Μεταβολές των φωσφολιπιδίων στην ομάδα 2. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με # υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων ($p < 0,05$), με * η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δείγματος πριν την πνευμονία (προ VAP) και των υπολοίπων ($p < 0,05$) και με + η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δείγματος που αντιστοιχεί στην πνευμονία (VAP) και των υπολοίπων ($p < 0,05$).

Η φωσφατιδυλογχολίνη παρουσίασε σημαντική μείωση στο τέλος της πρώτης εβδομάδας του μηχανικού αερισμού (56%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (71%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλογχολίνης φάνηκε να σταθεροποιείται τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (60%).

Η φωσφατιδυλογλυκερόλη παρουσίασε επίσης μείωση μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (10%). Η διαφορά



αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης παρέμεινε σταθερό τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (6%).

Αντίθετα η σφιγγομυελίνη παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά από μία εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (17%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (6%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$). Η δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή του ποσοστού της σφιγγομυελίνης (16%).

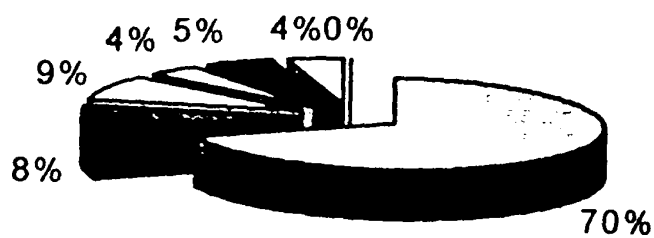
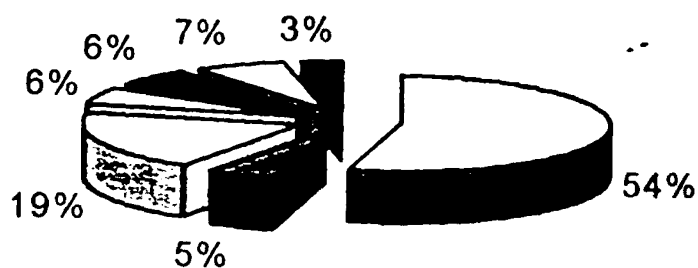
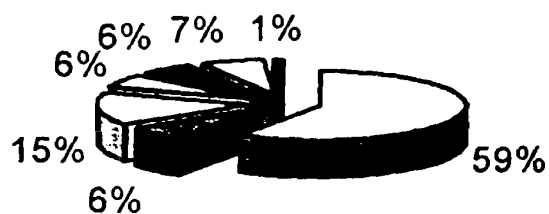
Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη παρουσίασε αύξηση μετά από μία εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (4%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή του ποσοστού της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (5%).

Ανάλογη ήταν και η μεταβολή της φωσφατιδυλοσερίνης η οποία παρουσίασε μια σχετική αύξηση την πρώτη εβδομάδα (6%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (4%) ($p < 0,01$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοσερίνης παρέμεινε σταθερό τη δεύτερη εβδομάδα.

Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη αυξήθηκε μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού (7%) σε σχέση με το αρχικό δείγμα (5%). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη παρέμεινε σταθερή κατά τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού (7%).

Δεν ανιχνεύθηκε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη στο αρχικό BAL, ενώ ανιχνεύθηκε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 2% στο BAL που έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας.



προ VAPVAPΜετά VAP

□ PC ■ PG □ SM □ PE ■ PS □ PI ■ lysoPC

Σχήμα 5.15. Είδη φωσφολιπιδίων στην ομάδα 2.



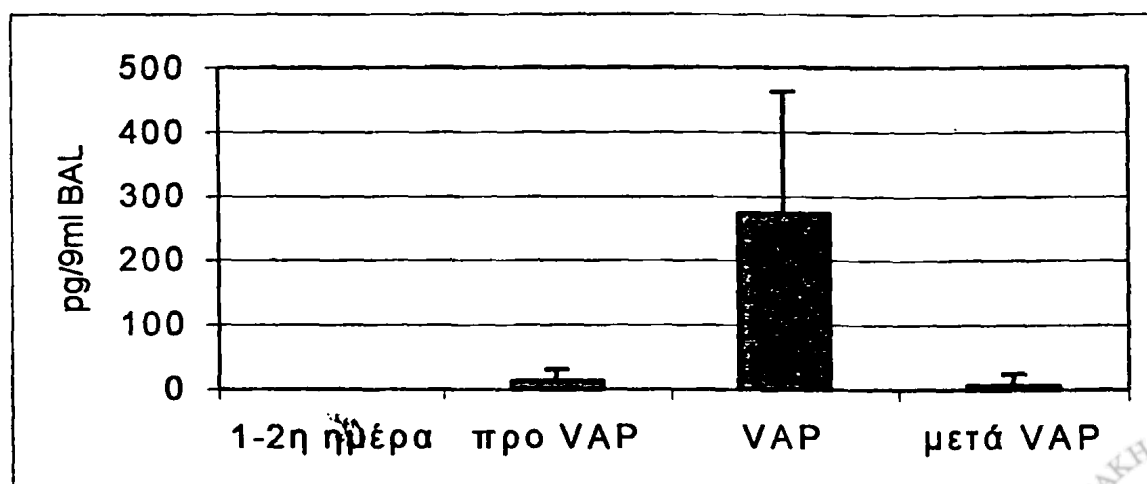
Ομάδα 2-PAF

Ο PAF δεν ανιχνεύθηκε στο BAL του πρώτου 48ωρου και ανιχνεύθηκε σε πολύ μικρές ποσότητες (12 ± 19 pg/9ml BAL) στο BAL που προηγήθηκε της πνευμονίας. Αντίθετα βρέθηκε πολύ αυξημένος (272 ± 192 pg/9ml BAL) στο BAL που έγινε με τη διάγνωση της πνευμονίας ($p < 0,001$). Μετά την αποδρομή της η τιμή του (6 ± 19 pg/9ml BAL) παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,0001$) (σχ. 5.16).

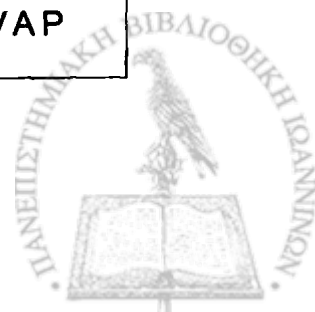
Στον πίνακα 5.11 απεικονίζονται οι μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 2.

	1-2η ημέρα	προ VAP	VAP	μετά VAP
PAF (pg/9m BAL)	0	$12 \pm 19\#$	$272 \pm 192\#*$	$6 \pm 19+$
PAF-AcH (nmol PAF/ml BAL/min)	$0,06 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,06$	$1,79 \pm 1,62\#*$	$0,46 \pm 0,21\#*+$

Πίνακας 5.11. Μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 2. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με # υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων, με * η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος πριν την πνευμονία (προ VAP) και των υπολοίπων και με + η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος που αντιστοιχεί στην πνευμονία (VAP) και των υπολοίπων.



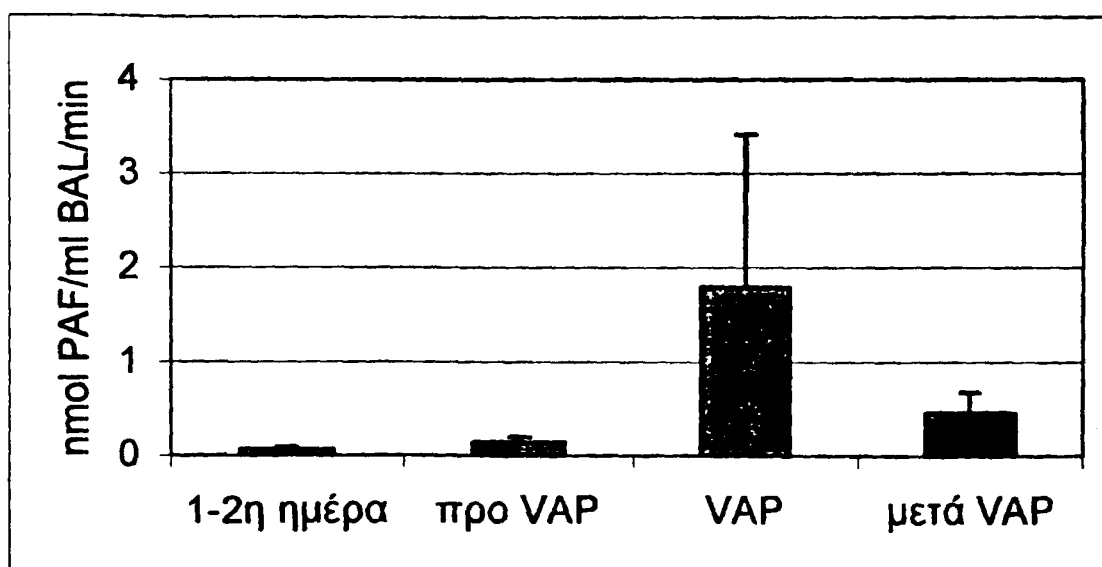
Σχήμα 5.16. Μεταβολές του PAF στην ομάδα 2.



Ομάδα 2- PAF AcH

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση ακολούθησε μεταβολή ανάλογη με αυτήν του PAF (Πίνακας 5.11). Η ενεργότητά της παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο δείγμα της πνευμονίας ($1,79 \pm 1,62$ nmol PAF/ml BAL/min) σε σχέση με το δείγμα που προηγήθηκε ($0,14 \pm 0,06$ nmol PAF/ml BAL/min) ($p < 0,001$) και μείωση στο δείγμα που ακολούθησε την αποδρομή της πνευμονίας ($0,46 \pm 0,21$ nmol PAF/ml BAL/min). Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το δείγμα της πνευμονίας ($p < 0,001$) (σχήμα 5.17).

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση δεν απαιτούσε ιόντα ασβεστίου για τη δράση της και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 10mM EDTA. Δεν απενεργοποιήθηκε από το ρ -βρωμοφαινακυλο-βρωμίδιο, έναν συνήθη αναστολέα της φωσφολιπάσης A_2 και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία περίσσειας φωσφατιδυλοχολίνης ($0,5 \times 10^{-4}$ M). Κατά συνέπεια διαφοροποιείται από την τυπική φωσφολιπάση A_2 και χαρακτηρίζεται σαν ειδική για PAF.



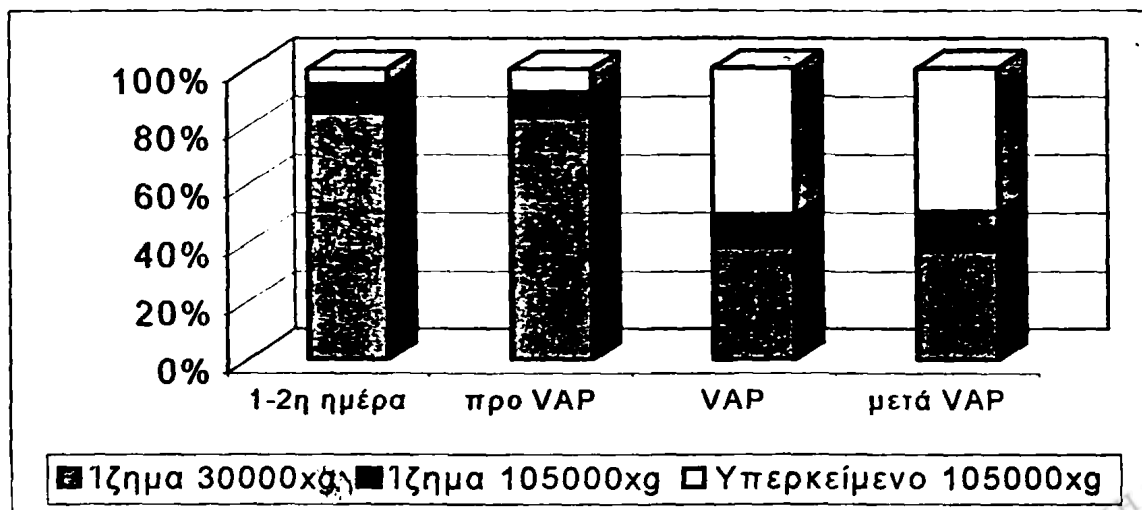
Σχήμα 5.17. Μεταβολές της ενεργότητας της PAF-AcH στην ομάδα 2.

Ομάδα 2-Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύουν το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο BAL της πνευμονίας σε σχέση με αυτό που προηγήθηκε ($p<0,01$). Στο BAL μετά την πνευμονία η μείωση αυτή επέμενε.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	83,6±16,2	9,8±2,3	5,2±1,5
προ VAP	79,5±16,2	8,6±1,4	7,4±1,8
VAP	38,3±12,6*	10,9±1,1	49,5±15,8*
μετά VAP	35,6±11*	12,9±3,1	46,8±14,8*

Πίνακας 5.12. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 2 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος που προηγήθηκε της πνευμονίας(προ VAP) και των υπολοίπων.



Σχήμα 5.18. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 2.

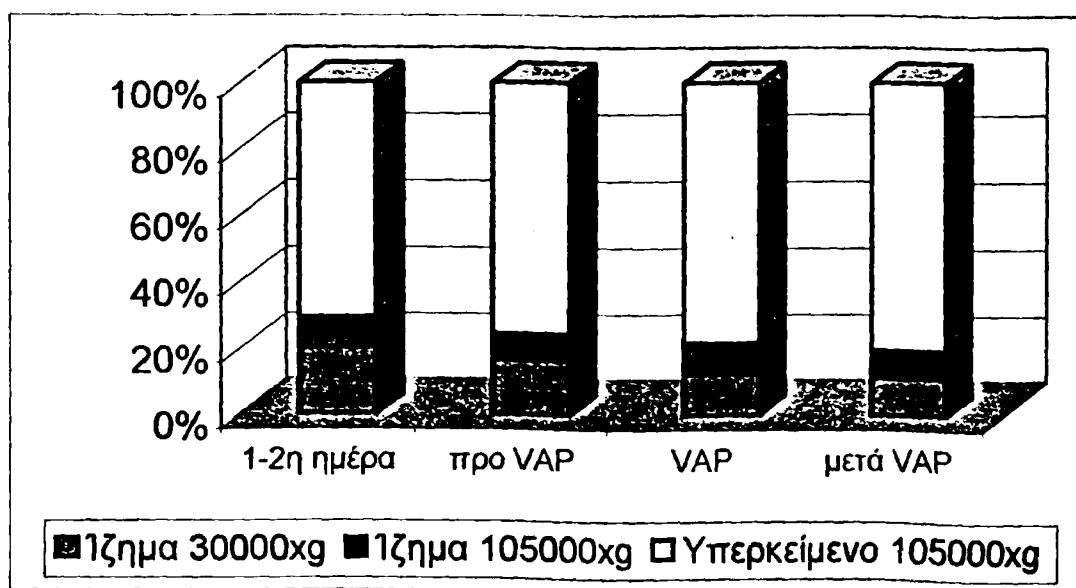


Ομάδα 2-Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες

Στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), οι πρωτεΐνες παρουσίασαν μείωση στο BAL της πνευμονίας σε σχέση με αυτό που προηγήθηκε. Στο BAL μετά την πνευμονία συνεχίστηκε η μείωση αυτή.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	19,6±3,7	8,8±1,1	68,7±15,5
προ VAP	15,7±2,9	7,9±1,8	72,8±20,2
VAP	12,3±1,2	9,1±1	77,2±15,4
μετά VAP	11,2±1,8	8,2±1,1	79,6±17,9

Πίνακας 5.13. Κατανομή των πρωτεϊνών στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 2 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση.



Σχήμα 5.19. Κατανομή των πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 2.



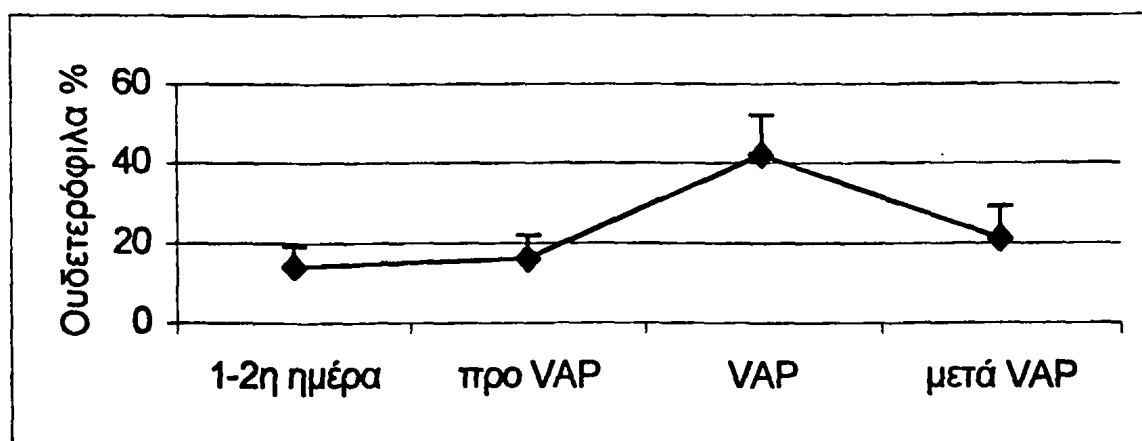
Ομάδα 2-Κύτταρα

Ο ολικός αριθμός των κυττάρων στο BAL παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια της VAP ($p<0,001$) και παρουσιάζεται στον πίνακα 5.14. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από μείωση του ολικού αριθμού στα προηγούμενα επίπεδα.

Σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν και μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών. Τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασαν μείωση κατά τη διάρκεια της πνευμονίας, αλλά επανήλθαν στα προηγούμενα επίπεδα μετά την αποδρομή της πνευμονίας. Τα ποσοστό των ουδετερόφιλων παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια της πνευμονίας ($p<0,001$). Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από μείωση του ποσοστού στα προηγούμενα επίπεδα (σχήμα 5.20).

	1-2η ημέρα	προ VAP	VAP	μετά VAP
Ολικά κύτταρα (x1000)	178±42	184±31	426±175	210±76
Κυψελιδικά μακροφάγα (%)	83±7	79±9	56±14	77±10
Ουδετερόφιλα (%)	14±5	16±6	42±10	21±8

Πίνακας 5.14. Ολικά κύτταρα και υποπληθυσμοί στην ομάδα 2.



Σχήμα 5.20. Μεταβολή του ποσοστού των ουδετερόφιλων στην ομάδα 2.



Ομάδα 3- Ατελεκτασία

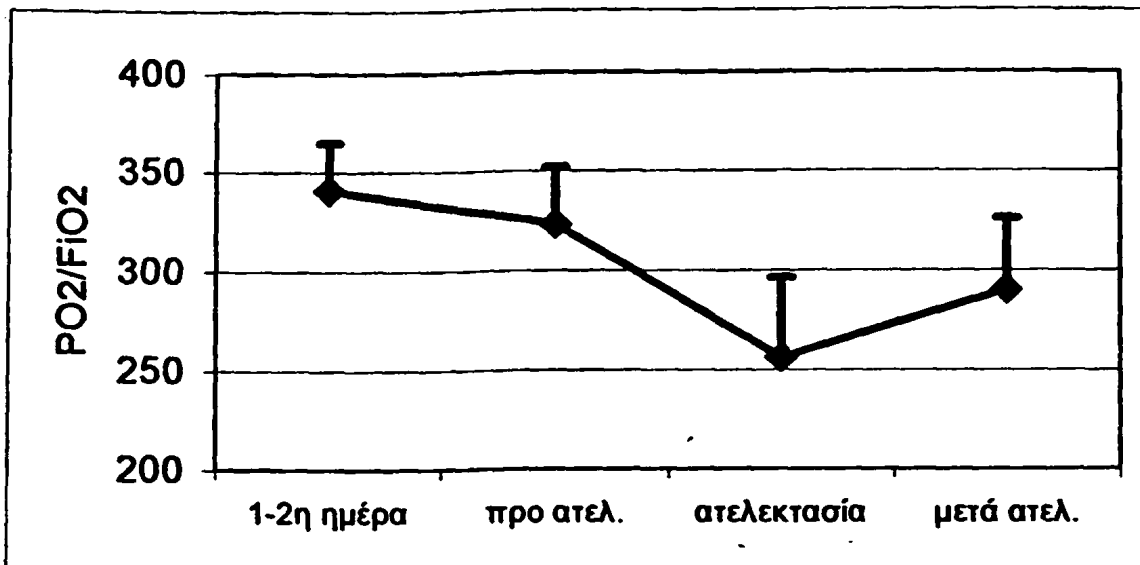
Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών της ομάδας 3 παρουσιάζονται στον πίνακα 5.15. Οι παρακάτω τιμές αντιστοιχούν στις μετρήσεις που προηγήθηκαν του αντίστοιχου BAL. Οι τιμές παρουσιάζονται σαν μέσος όρος και σταθερή απόκλιση (SD). Οι τιμές πριν την ατελεκτασία αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δειγμάτων που προηγήθηκαν της ατελεκτασίας. Σε 3 ασθενείς αφορούν BAL που έγινε στο πρώτο 48ωρο και σε 5 ασθενείς BAL που έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας.

		προ		μετά
	1-2η ημέρα	ατελεκτασίας	ατελεκτασία	ατελεκτασία
PO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	341±23	323±29	256±40	290±36
pH	7.42±0,06	7.44±0,05	7.40±0.07	7.46±0,04
PCO ₂ (mmHg)	38±2	37±4	43±6	38±3
Crs (ml/cmH ₂ O)	62±4	59±5	49±6	55±5
Vt (ml/KΣΒ)	10±2	10±4	9±4	10±2
Ppl (cm H ₂ O)	18±4	20±5	24±4	21±3
PEEP (cmH ₂ O)	3±2	4±2	7±3	5±2

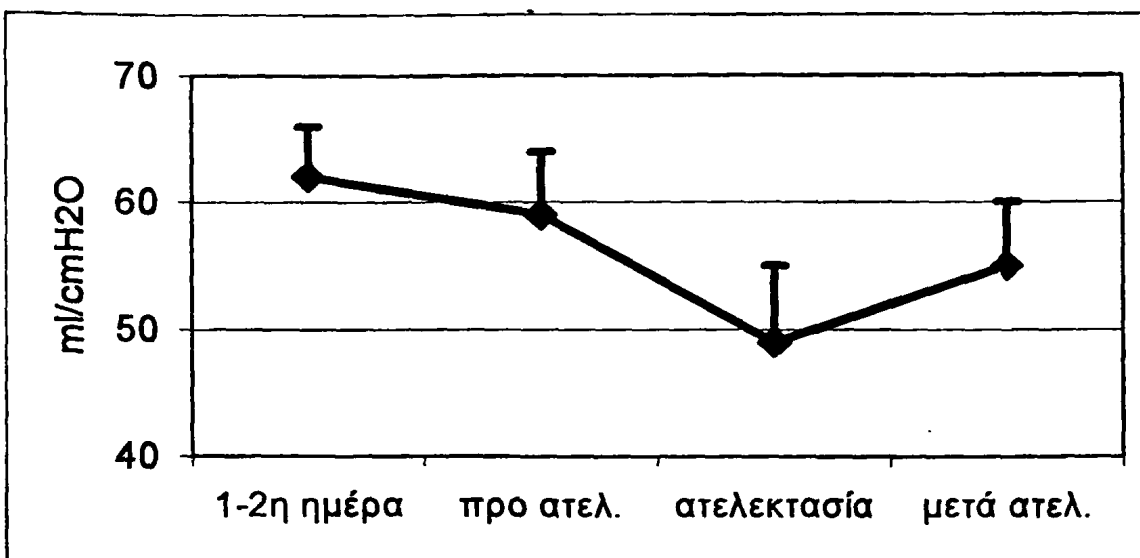
Πίνακας 5.15. Ανταλλαγή των αερίων και μηχανική του αναπνευστικού συστήματος στην ομάδα 3 (ατελεκτασία). Crs: ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος, Vi: αναπνεόμενος όγκος (υπολογιζόμενος σε ml ανά kgρ σωματικού βάρους), Ppl: τελοεισπνευστική πίεση παύσης, PEEP: θετική τελοεκπνευστική πίεση.

Η οξυγόνωση ($p=0.001$) και η ενδοτικότητα ($p=0.01$) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική πτώση κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας σε σχέση με τις τιμές που προηγήθηκαν. Η λύση της ατελεκτασίας συνοδεύτηκε από βελτίωση της οξυγόνωσης και της ενδοτικότητας, οι οποίες όμως δεν είχαν επιστρέψει στις προ της ατελεκτασίας τιμές τους μετά από 48 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο pH και το PCO₂. Δεν υπήρχε διαφορά στο χορηγούμενο αναπνεόμενο όγκο. Η τελοεισπνευστική πίεση παύσης (Ppl) παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας, η οποία υποχώρησε μετά τη λύση της ατελεκτασίας. Σε όλην τη

διάρκεια της μελέτης οι τιμές της P_{PI} ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές που θεωρούνται βλαπτικές για το πνευμονικό παρέγχυμα.



Σχήμα 5.21. Μεταβολή της οξυγόνωσης της ομάδας 3.



Σχήμα 5.22. Μεταβολή της ενδοτικότητας της ομάδας 3.

Ομάδα 3-Ολικές πρωτεΐνες

Οι ολικές πρωτεΐνες αυξήθηκαν από $148 \pm 44 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που προηγήθηκε της ατελεκτασίας σε $624 \pm 350 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που ελήφθη κατά την ατελεκτασία. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$). Η λύση της ατελεκτασίας συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των ολικών πρωτεϊνών ($278 \pm 89 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την ατελεκτασία ($p < 0.01$). Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των ολικών πρωτεϊνών πριν την ατελεκτασία και 48 ώρες μετά τη λύση της ($p < 0.01$). Οι τιμές πριν την ατελεκτασία αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δειγμάτων που προηγήθηκαν της ατελεκτασίας. Σε 3 ασθενείς αφορούν BAL που έγινε στο πρώτο 48ωρο και σε 5 ασθενείς BAL που έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας. Στον πίνακα 5.16 και στο σχήμα 5.23 απεικονίζονται οι μεταβολές των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης του BAL στους ασθενείς της ομάδας 3.

		προ		μετά
	1-2η ημέρα	ατελεκτασίας	ατελεκτασία	ατελεκτασία
Ολικές πρωτεΐνες ($\mu\text{g/ml}$)	166 ± 53	148 ± 44	$624 \pm 350\#*$	$278 \pm 89*+$
Αλβουμίνη ($\mu\text{g/ml}$)	51 ± 18	48 ± 10	$218 \pm 118\#*$	$89 \pm 48*+$
Αλβουμίνη/Ολικές πρωτεΐνες	31	33	35	32

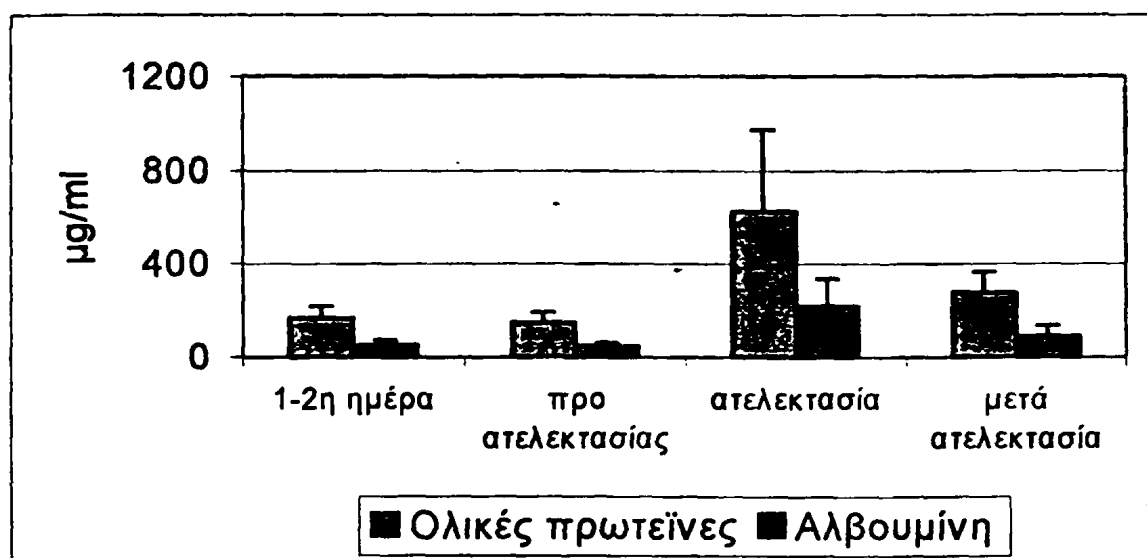
Πίνακας 5.16. Ολικές πρωτεΐνες και αλβουμίνη στους ασθενείς της ομάδας 3. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με # υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων, με * η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος πριν την ατελεκτασία και των υπολοίπων και με + η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος που αντιστοιχεί στην ατελεκτασία και των υπολοίπων.



Ομάδα 3-Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη ακολούθησε παρόμοια συμπεριφορά με τις ολικές πρωτεΐνες. Η αλβουμίνη αυξήθηκε από $48 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που προηγήθηκε της ατελεκτασίας σε $218 \pm 118 \mu\text{g/ml}$ στο BAL που ελήφθη κατά την ατελεκτασία. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$). Η λύση της ατελεκτασίας και το BAL που ακολούθησε μετά από 48 ώρες συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της αλβουμίνης ($89 \pm 48 \mu\text{g/ml}$) σε σχέση με την ατελεκτασία ($p < 0.01$). Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της αλβουμίνης πριν την ατελεκτασία και 48 ώρες μετά τη λύση της ($p < 0.01$).

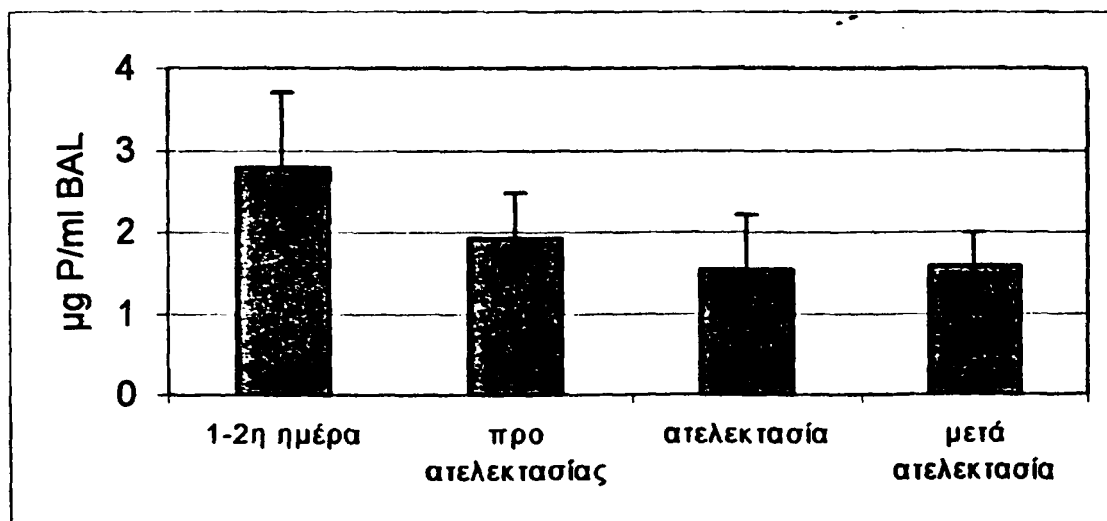
Ο λόγος αλβουμίνης προς ολικές πρωτεΐνες ήταν 33% πριν την ατελεκτασία, 35% κατά την ατελεκτασία και 32% μετά την ατελεκτασία.



Σχήμα 5.23. Μεταβολή των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης της ομάδας 3.

Ομάδα 3- Ολικά φωσφολιπίδια

Τα ολικά φωσφολιπίδια κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας απεικονίζονται στο σχήμα 5.24. Τα ολικά φωσφολιπίδια μειώθηκαν από $1,92 \pm 0,56$ $\mu\text{g P/ml BAL}$ στο δείγμα πριν την ατελεκτασία σε $1,53 \pm 0,68$ $\mu\text{g P/ml}$ στο BAL της ατελεκτασίας. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Υπενθυμίζεται ότι οι τιμές πριν την ατελεκτασία αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δειγμάτων που προηγήθηκαν της ατελεκτασίας και αφορούν 3 ασθενείς στους οποίους BAL έγινε στο πρώτο 48ωρο και 5 ασθενείς στους οποίους BAL έγινε στο τέλος της πρώτης εβδομάδας. Η λύση της ατελεκτασίας δεν συνοδεύτηκε από σημαντική μεταβολή των ολικών φωσφολιπιδίων ($1,57 \pm 0,42$ $\mu\text{g P/ml}$) σε σχέση με την ατελεκτασία ($1,53 \pm 0,68$ $\mu\text{g P/ml}$). Επίσης δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ολικά φωσφολιπίδια πριν την ατελεκτασία και μετά τη λύση της.



Σχήμα 5.24. Ολικά φωσφολιπίδια στην ομάδα 3.

Ομάδα 3- Είδη φωσφολιπιδίων

Η ατελεκτασία συνοδεύτηκε από σημαντικές ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5.17.

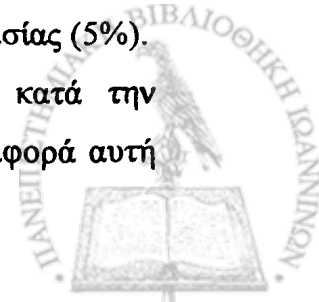
	1-2η ημέρα	προ ατελεκτασίας	ατελεκτασία	μετά ατελεκτασία
Ολικά φωσφολιπίδια (μg P/ml BAL)	2,8±0,9	1,92±0,56#	1,53±0,68#	1,57±0,42
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), % των ολικών λιπιδίων	68±12	61±5	55±7#	58±6
Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), % των λιπιδίων	8±2	7±2	5±2	6±3
Σφιγγομυελίνη (SM), % των ολικών λιπιδίων	6±2	10±4#	19±6#*	15±2#*
Φωσφατιδυλοεθανολαμίνη (PE), % των λιπιδίων	4±1	5±1	6±1#	6±2#
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS), % των ολικών λιπιδίων	5±2	6±4	6±2	6±2
Φωσφατιδυλοϊνositόλη (PI), % των λιπιδίων	5±1	5±1	7±2#*	7±1#*
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, % των λιπιδίων	0	0	2±2	2±1

Πίνακας 5.17. Μεταβολές των φωσφολιπιδίων στην ομάδα 3. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με # υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του πρώτου δείγματος (1-2η ημέρα) και των υπολοίπων ($p < 0,05$) και με * η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δείγματος πριν την ατελεκτασία και των υπολοίπων ($p < 0,05$).

Η φωσφατιδυλοχολίνη παρουσίασε μείωση στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία (55%) σε σχέση με το BAL που προηγήθηκε (61%). Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης δεν μεταβλήθηκε ιδιαίτερα μετά τη λύση της ατελεκτασίας (58%).

Η φωσφατιδυλογλυκερόλη παρουσίασε επίσης μείωση στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία (5%) σε σχέση με το BAL που προηγήθηκε (7%). Το ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης δεν μεταβλήθηκε μετά τη λύση της ατελεκτασίας (5%).

Η σφιγγομυελίνη παρουσίασε αύξηση στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία (19%) σε σχέση με το BAL που προηγήθηκε (10%). Η διαφορά αυτή



ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,01$). Η λύση της ατελεκτασίας συνοδεύτηκε από μείωση του ποσοστού της σφιγγομυελίνης (15%).

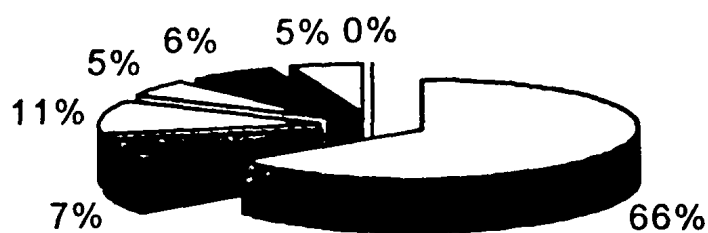
Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή πριν, κατά και μετά τη λύση της ατελεκτασίας. Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη ήταν 5% πριν, 6% κατά και μετά τη λύση της ατελεκτασίας αντίστοιχα. Ανάλογα η φωσφατιδυλοσερίνη ήταν 6% πριν, κατά και μετά τη λύση της ατελεκτασίας αντίστοιχα.

Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη παρουσίασε αύξηση στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία (7%) σε σχέση με το BAL που προηγήθηκε (5%). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης δεν μεταβλήθηκε μετά τη λύση της ατελεκτασίας (7%).

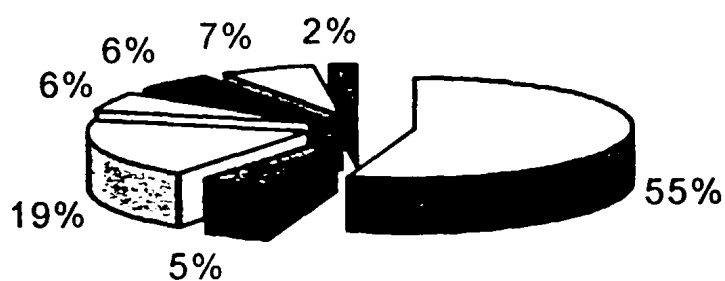
Δεν ανιχνεύθηκε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη στο BAL πριν την ατελεκτασία, ενώ ανιχνεύθηκε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 2% στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία και 48 ώρες μετά.



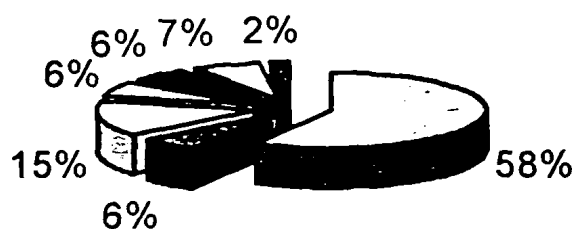
Προ ατελεκτασίας



Ατελεκτασία



Μετά ατελεκτασία



□ PC ■ PG □ SM □ PE ■ PS □ PI ■ lysoPC

Σχήμα 5.25. Είδη φωσφολιπιδίων στην ομάδα 3.

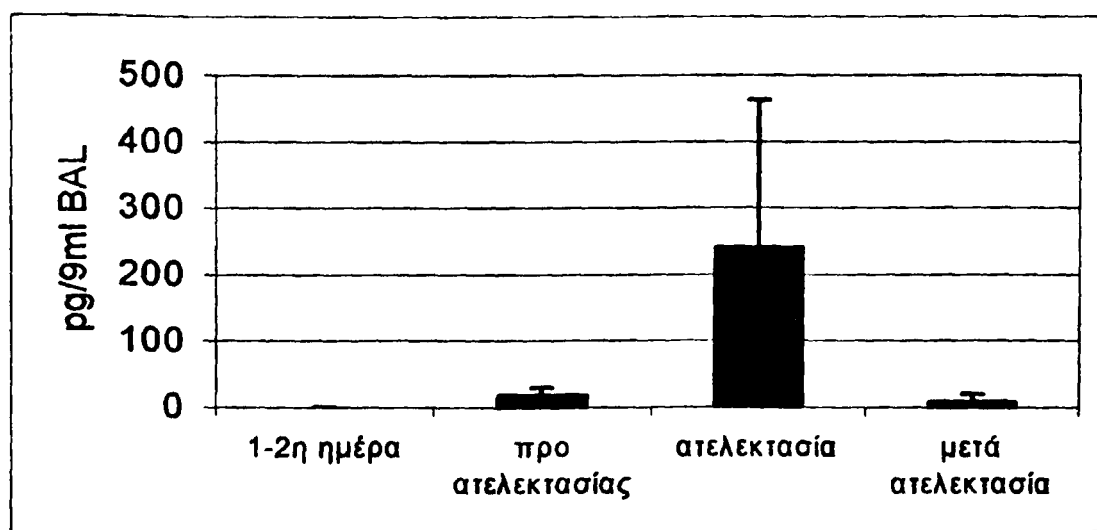


Ομάδα 3-PAF

Ο PAF δεν ανιχνεύθηκε στο BAL του πρώτου 48ωρου και ανιχνεύθηκε σε πολύ μικρές ποσότητες (18 ± 12 pg/9ml BAL) στο BAL που προηγήθηκε της ατελεκτασίας. Αντίθετα βρέθηκε πολύ αυξημένος (240 ± 223 pg/9ml BAL) στο BAL που έγινε κατά την ατελεκτασία και η διαφορά με την προ ατελεκτασίας τιμή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$). Μετά τη λύση της ατελεκτασίας ο PAF (8 ± 12 pg/9ml BAL) παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μείωση σε σχέση με την ατελεκτασία ($p < 0,0001$) (σχ. 5.26). Στον πίνακα 5.18 απεικονίζονται οι μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 3.

	1-2η ημέρα	προ ατελεκτασίας	ατελεκτασία	μετά ατελεκτασία
PAF (pg/9m BAL)	0	18 ± 12	$240 \pm 223^*$	$8 \pm 12^+$
PAF-AcH (nmol PAF/ml BAL/min)	$0,06 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,43^*$	$0,11 \pm 0,07^{*+}$

Πίνακας 5.18. Μεταβολές του PAF και της PAF-AcH στην ομάδα 3. Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση. Με * υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος πριν την ατελεκτασία και των υπολοίπων και με + η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος που αντιστοιχεί στην ατελεκτασία και των υπολοίπων.



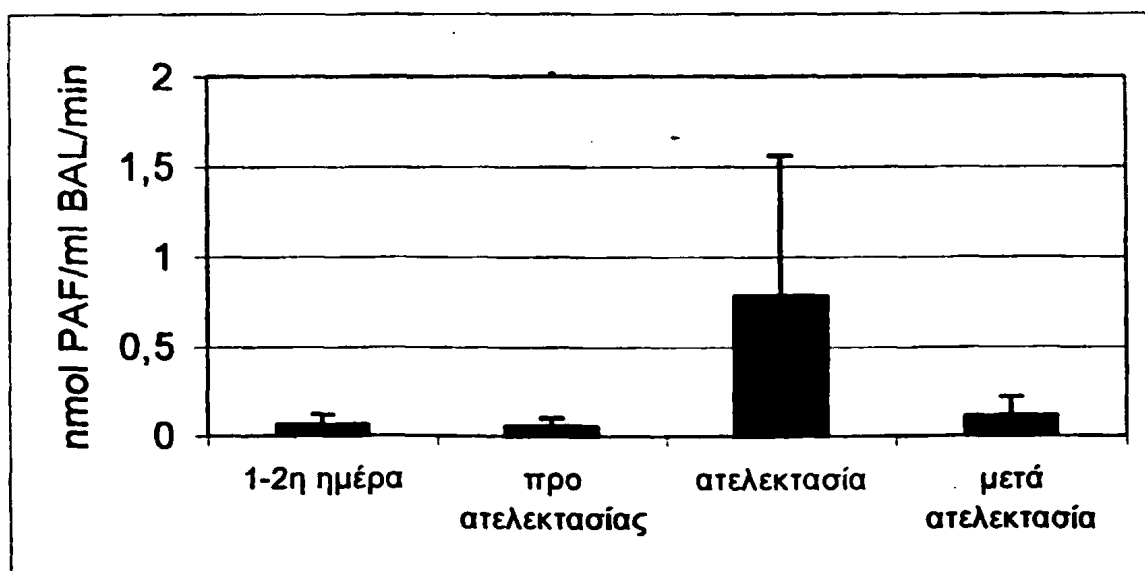
Σχήμα 5.26. Μεταβολές του PAF στην ομάδα 3.



Ομάδα 3- PAF AcH

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση ακολούθησε μεταβολή ανάλογη με αυτήν του PAF (Πίνακας 5.18). Η ενεργότητά της παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο δείγμα της ατελεκτασίας ($0,78 \pm 0,043$ nmol PAF/ml BAL/min) σε σχέση με το δείγμα που προηγήθηκε ($0,05 \pm 0,02$ nmol PAF/ml BAL/min) ($p < 0,001$). Η λύση της ατελεκτασίας συνοδεύτηκε από μείωση της στο δείγμα που ακολούθησε ($0,11 \pm 0,07$ nmol PAF/ml BAL/min). Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το δείγμα της ατελεκτασίας ($p < 0,001$) (σχήμα 5.27).

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση δεν απαιτούσε ιόντα ασβεστίου για τη δράση της και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 10mM EDTA. Δεν απενεργοποιήθηκε από το *p*-βρωμοφαινακυλο-βρωμίδιο, έναν συνήθη αναστολέα της φωσφολυάσης A_2 και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία περίσσειας φωσφατιδυλοχολίνης ($0,5 \times 10^{-4} M$). Κατά συνέπεια διαφοροποιείται από την τυπική φωσφολυάση A_2 και χαρακτηρίζεται σαν ειδική για PAF.



Σχήμα 5.27. Μεταβολές της ενεργότητας της PAF-AcH στην ομάδα 3.

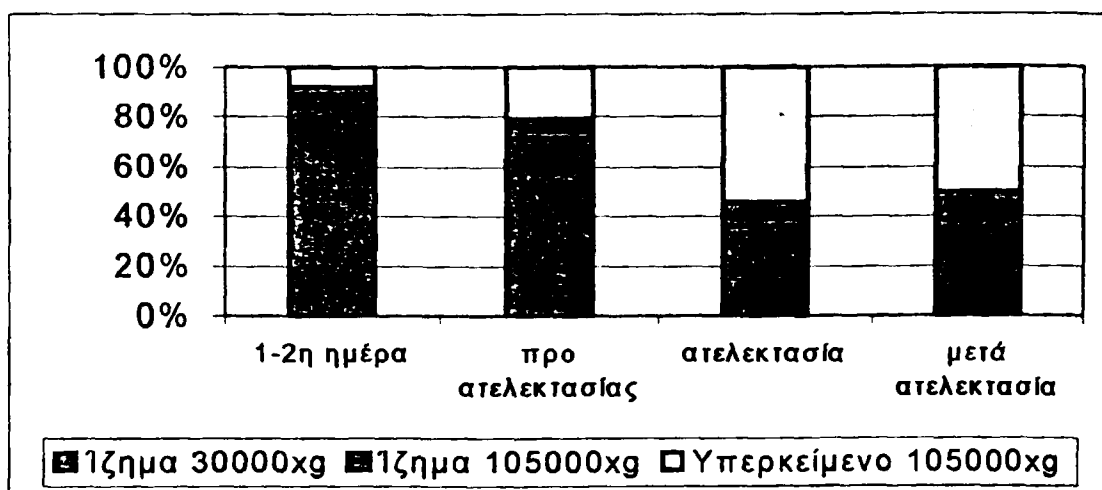


Ομάδα 3-Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύουν το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο BAL της ατελεκτασίας σε σχέση με αυτό που προηγήθηκε ($p<0,001$). Στο BAL μετά την ατελεκτασία η μείωση αυτή επέμενε.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	85,1±14,7	8,5±1,6	8,3±1,8
προ ατελεκτασίας	69,4±16,6	7,6±1,2	20,4±5,8
ατελεκτασία	35,5±14,7*	10±2,5	53,5±17,5*
μετά ατελεκτασία	38,1±7,9*	10,9±2,4	49,8±19,8*

Πίνακας 5.19. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 3 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο ± σταθερή απόκλιση. Με αστερίσκο υποσημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των τιμών του δείγματος που προηγήθηκε της ατελεκτασίας και των υπολοίπων.



Σχήμα 5.28. Κατανομή των φωσφολιπιδίων στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 3.

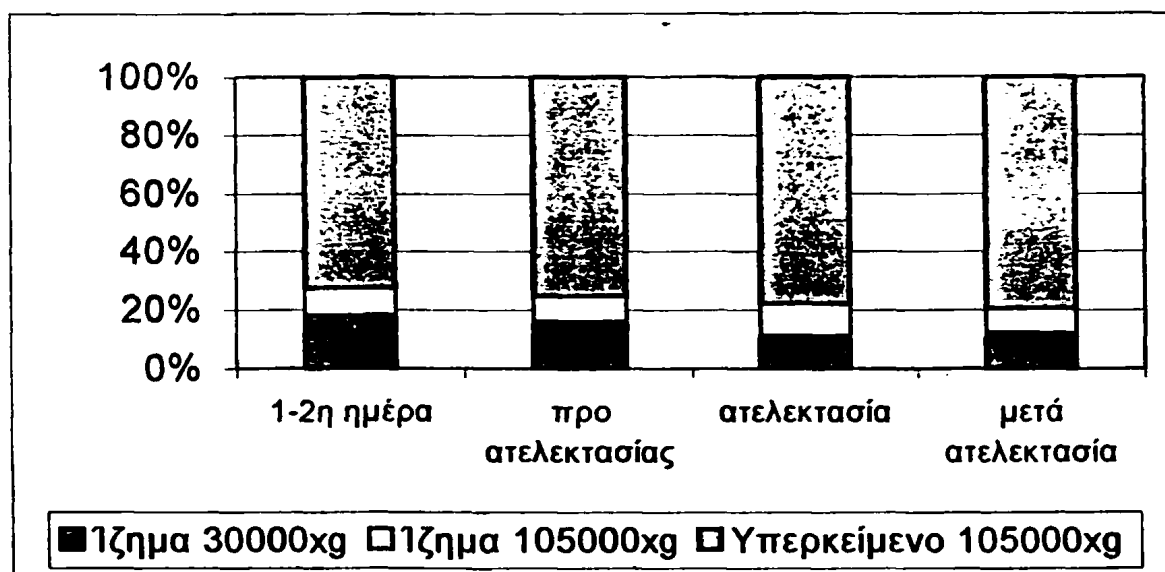


Ομάδα 3-Διαφορικές φυγοκεντρήσεις/πρωτεΐνες

Στο ίζημα των 30000xg, που αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες (μεγάλα συσσωματώματα), οι πρωτεΐνες παρουσίασαν μείωση στο BAL της ατελεκτασίας σε σχέση με αυτό που προηγήθηκε ($p < 0,01$). Στο BAL μετά την ατελεκτασία υπήρχε μια μικρή, μη στατιστικά σημαντική, αύξηση.

	Ίζημα	Ίζημα	Υπερκείμενο
	30000xg	105000xg	105000xg
1-2η ημέρα	17,5±3,9	9,5±1,6	70,4±18,8
προ ατελεκτασίας	15,9±3,7	8,3±2,8	74,4±17
ατελεκτασία	10,9±1,4	10,5±1,9	75,4±14,8
μετά ατελεκτασία	11,9±2,5	8,5±1,7	79,2±21,2

Πίνακας 5.20. Κατανομή των πρωτεϊνών στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις στην ομάδα 3 (ποσοστό επί των ολικών). Οι τιμές αφορούν το μέσο όρο $\pm$ σταθερή απόκλιση.



Σχήμα 5.29. Κατανομή των πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων στην ομάδα 3.



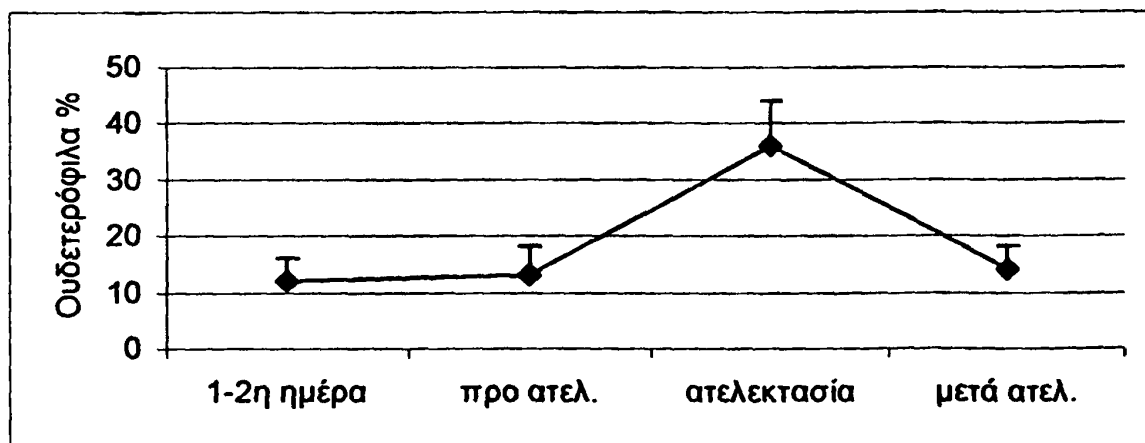
Ομάδα 3-Κύτταρα

Ο ολικός αριθμός των κυττάρων στο BAL παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την τιμή που προηγήθηκε της ατελεκτασίας ($p<0,01$). Η λύση της ατελεκτασίας συνοδεύτηκε από σχετική μείωση του ολικού αριθμού.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασαν μείωση κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας, αλλά επανήλθαν στα προηγούμενα επίπεδα 48 ώρες μετά τη λύση της. Τα ποσοστό των ουδετερόφιλων παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια της ατελεκτασίας ($p<0,001$). Η λύση της συνοδεύτηκε από μείωση του ποσοστού των ουδετεροφίλων στο BAL που έγινε μετά από 48 ώρες (σχήμα 5.30).

	1-2η ημέρα	προ ατελ.	ατελεκτασία	μετά ατελ.
Ολικά κύτταρα ($\times 1000$)	186 $\pm$ 35	191 $\pm$ 48	295 $\pm$ 89	207 $\pm$ 52
Κυψελιδικά μακροφάγα (%)	85 $\pm$ 6	82 $\pm$ 9	61 $\pm$ 12	80 $\pm$ 8
Ουδετερόφιλα (%)	12 $\pm$ 4	13 $\pm$ 5	36 $\pm$ 8	14 $\pm$ 4

Πίνακας 5.21. Ολικά κύτταρα και υποπληθυσμοί στην ομάδα 3.



Σχήμα 5.30. Μεταβολή του ποσοστού των ουδετερόφιλων στην ομάδα 3.



Συζήτηση

Τα κύρια συμπεράσματα της μελέτης συνοψίζονται στη σύνδεση του παρατεταμένου μηχανικού αερισμού ασθενών χωρίς προηγούμενη καρδιοπνευμονική νόσο με τα παρακάτω ευρήματα:

- Αύξηση των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης στο BAL
- Συνεχή μείωση των ολικών φωσφολιπιδίων καθόλη τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού, συνοδευόμενη από ποιοτικές μεταβολές στη σύνθεσή τους και στις διαφορικές φυγοκεντρήσεις
- Αύξηση φλεγμονωδών δεικτών, όπως ο PAF, ενζύμων, όπως η PAF-AcH, καθώς και του ποσοστού των ουδετερόφιλων
- Μικρή επιδείνωση της οξυγόνωσης και της ενδοτικότητας του αναπνευστικού συστήματος
- Υψηλή συχνότητα επιπλοκών, όπως η συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονία (VAP) και η ατελεκτασία. Οι επιπλοκές αυτές συνδέονται με σημαντικές μεταβολές των βιοχημικών παραμέτρων του BAL.

Στη συνέχεια συζητούνται αναλυτικά τα ευρήματα στην ομάδα του μηχανικού αερισμού (ομάδα 1) και συνοπτικότερα τα ευρήματα στις άλλες δύο ομάδες (VAP-ομάδα 2 και ατελεκτασία-ομάδα 3).

Μηχανικός αερισμός-Ομάδα 1

Κλινικοί δείκτες: Ανταλλαγή αερίων και μηχανική του αναπνευστικού συστήματος

Η οξυγόνωση των ασθενών της ομάδας 1, υπολογιζόμενη με το δείκτη PaO_2/FiO_2 , παρουσίασε μια ελαφρά πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σχεδόν όμως στο σύνολο των μετρήσεων η τιμή PaO_2/FiO_2 ήταν >300 mmHg ακόμη και μετά από δύο εβδομάδες μηχανικού αερισμού. Τα 300 mmHg χρησιμοποιήθηκαν επειδή είναι το όριο που καθορίζει την υποξαιμία στα συστήματα ποσοτικοποίησης της οξείας πνευμονικής βλάβης. Η επίδραση του μηχανικού αερισμού στην οξυγόνωση ασθενών χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο έχει αναγνωρισθεί από τα πρώτα χρόνια εκτεταμένης εφαρμογής του μηχανικού αερισμού και ο Sladen ήταν ο πρώτος που

αναφέρθηκε σε αυτό ήδη από το 1968¹⁸. Συνήθως όμως η επίδραση αυτή δεν είναι κλινικά σημαντική όταν αφορά ασθενείς χωρίς προηγούμενη πνευμονική βλάβη.

Ανάλογη μεταβολή με την οξυγόνωση επέδειξε και η ενδοτικότητα. Οι πιέσεις που απαιτήθηκαν για τον αερισμό των ασθενών δεν παρουσίασαν κλινικά σημαντικές μεταβολές και ήταν μόνιμα, σημαντικά χαμηλότερες από τις τιμές που θεωρούνται τραυματικές για το πνευμονικό παρέγχυμα. Ο χορηγούμενος αναπνεόμενος όγκος (9ml/kg) θεωρείται ασφαλής. Η μικρή αύξηση του αναπνεόμενου όγκου το πρώτο 48ωρο οφείλεται στη φύση ορισμένων περιστατικών, που απαιτούσε ένα σχετικό υπεραερισμό (πάντα όμως με $PCO_2 > 35 \text{ mmHg}$) για τον έλεγχο της ενδοκράνιας υπέρτασης.

Μεταβολές των πρωτεϊνών: μηχανικός αερισμός και πνευμονικό οίδημα

Οι ολικές πρωτεΐνες στο BAL βρέθηκαν αυξημένες μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού, σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών παρέμειναν υψηλά και κατά τη δεύτερη εβδομάδα του μηχανικού αερισμού. Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες. Η αύξηση της διαπερατότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης, η αυξημένη παρουσία πρωτεϊνών που συνεπάγεται μια φλεγμονώδης αντίδραση και η συμπύκνωση του υγρού που βρίσκεται στις κυψελίδες από το φυσιολογικό κυψελιδικό επιθήλιο^{59,350} θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτά τα αυξημένα επίπεδα. Η αδυναμία προσδιορισμού αξιόπιστων δεικτών διάλυσης στο BAL για τον καθορισμό του όγκου του υγρού που επαλείφει τις κυψελίδες^{242,243,244}, καθιστά αδύνατο τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του παραπάνω όγκου και δυσκολεύει την εξακρίβωση της συμμετοχής καθενός από τους παραπάνω παράγοντες. Ανεξάρτητα όμως από την αιτιολογία, η εύρεση αυξημένων επιπέδων ολικών πρωτεϊνών στο BAL συνεπάγεται αυξημένη ποσότητα υγρού στις κυψελίδες και κατά συνέπεια κάποιας μορφής πνευμονικό οίδημα.

Ο μηχανικός αερισμός προκαλεί διάμεσο και κυψελιδικό οίδημα σε ζωικά μοντέλα και τα πειραματικά στοιχεία που το υποστηρίζουν αναφέρονται στο κεφάλαιο 'Πνευμονικό οίδημα προκαλούμενο από τον αναπνευστήρα'. Το οίδημα αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο σε αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης και πολύ λιγότερο σε αυξημένη διήθηση. Η χρονική του διαδρομή εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του παρεχόμενου αερισμού (πίεση, όγκος, συχνότητα), τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού και το μέγεθος του ζώου¹⁰⁶.

Η ανάπτυξη πνευμονικού οιδήματος σε ζώα με μέγεθος συγκρίσιμο με του ανθρώπου, με σχετικά χαμηλές πιέσεις, απαιτεί τουλάχιστον 48 ώρες μηχανικού αερισμού⁵⁸. Δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία που να περιγράφουν τη χρονική εξέλιξη της αντίδρασης του φυσιολογικού ανθρώπινου πνευμονικού παρεγχύματος στο μηχανικό αερισμό.

Οι διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβάλλουν στη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος στο VILI. Αυξημένη επιθηλιακή διαπερατότητα έχει διαπιστωθεί σε κουνέλια³⁵¹ και σε σκυλιά³⁵² μετά από χορήγηση νεφελοποιημένου απορρυπαντικού και αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης η αύξηση της επιφανειακής τάσης μειώνοντας την υδροστατική πίεση στο εξωτερικό των τριχοειδών, αυξάνει τη διατοιχωματική πίεση και τη διήθηση, ενώ ταυτόχρονα αυξάνοντας την ακτινωτή έλξη στο τοίχωμα των πνευμονικών τριχοειδών αυξάνει και την ενδοθηλιακή διαπερατότητα³⁵³. Επιπλέον η παρουσία πρωτεϊνούχου υγρού στις κυψελίδες, αδρανοποιώντας τον επιφανειοδραστικό παράγοντα, επιτείνει το φαύλο κύκλο. Οι ασθενείς της μελέτης είχαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όπως φαίνεται από τη μειωμένη ποσότητα των ολικών φωσφολιπιδίων, τη μεταβολή της αναλογίας τους και τη μείωση των μεγάλων συσσωματωμάτων (large aggregates). Οι μεταβολές αυτές μπορεί να συμμετείχαν στη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος.

Οι ασθενείς της συγκεκριμένης ομάδας είχαν αυξημένα επίπεδα ολικών πρωτεϊνών στο τέλος της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας, ενώ την ίδια στιγμή υπήρχαν σημεία φλεγμονώδους αντίδρασης στις κυψελίδες, όπως υψηλά επίπεδα PAF και ποσοστά ουδετερόφιλων, κυρίως στο δείγμα της πρώτης και λιγότερο στο δείγμα της δεύτερης εβδομάδας. Η φλεγμονώδης αντίδραση και οι συνέπειές της στο τοπικό μικροπεριβάλλον μπορεί να συνέβαλαν στην αύξηση των ολικών πρωτεϊνών.

Κανείς δεν μπορεί να ισχυριστεί με απόλυτο τρόπο ότι οι πνεύμονες των ασθενών που εισήλθαν στη μελέτη ήταν εντελώς φυσιολογικοί. Παρόλα αυτά η καλή οξυγόνωση, η φυσιολογική ακτινογραφία και η απουσία ιστορικού παλαιάς ή πρόσφατης νοσολογίας από το θώρακα, καθιστούν τους πνεύμονες των συγκεκριμένων ασθενών ότι πλησιέστερο στο 'φυσιολογικό' για το περιβάλλον της ΜΕΘ, με βάση την καθημερινή κλινική πρακτική. Η πιθανότητα να έχει προκληθεί ένα ήπιο πνευμονικό οίδημα, σαν συνέπεια της κατάστασης που οδήγησε τους ασθενείς αυτούς στη ΜΕΘ, αν και απομακρυσμένη, δεν μπορεί να αποκλειστεί. Τα

νευρολογικά και νευροχειρουργικά περιστατικά, που αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών της μελέτης, θα μπορούσαν για παράδειγμα να συνδεθούν με νευρογενές πνευμονικό οίδημα, μια αμφιλεγόμενη κλινική οντότητα, που αποδίδεται σε αυξημένη τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα και εμφανίζεται πολύ σύντομα (στο πρώτο 48ωρο) μετά την προσβολή του νευρικού συστήματος³⁵⁴. Αν συνέβαινε βέβαια κάτι τέτοιο, θα επηρέαζε πολύ περισσότερο τις ολικές πρωτεΐνες του πρώτου δείγματος (πρώτο 48ωρο) σε σχέση με το δεύτερο (τέλος πρώτης εβδομάδας). Κατά συνέπεια η ενδεχόμενη ύπαρξη νευρογενούς πνευμονικού οιδήματος επηρεάζοντας κατά κύριο λόγο τις τιμές του πρώτου δείγματος, μειώνει τις διαφορές και τις στατιστικές σημαντικότητες που καταγράφηκαν μεταξύ του πρώτου δείγματος και των υπολοίπων και επί απουσίας της οι παρατηρηθείσες διαφορές θα ήταν ακόμη μεγαλύτερες.

Μεταβολές των λιπιδίων

Τα ολικά φωσφολιπίδια παρουσίασαν πτώση και η πτώση αυτή διαπιστώθηκε σε όλους τους ασθενείς. Η πτώση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί είτε σε μια αρχική αύξηση της παραγωγής και/ή της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα λόγω του υπεραερισμού και της υπερδιάτασης, είτε στη μείωση της παραγωγής και/ή της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα λόγω του μηχανικού αερισμού, είτε και τα δύο.

Η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελεί ένα σύνθετο μηχανισμό, ελεγχόμενο από διαφορετικούς ανεξάρτητους παράγοντες. Ο υπεραερισμός αποτελεί ένα ισχυρό ερέθισμα για την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όπως έχει δείχθει σε πλήθος πειραματικών μοντέλων^{355,356}. Έχει δείχθει ότι αρκεί μία μόνο βαθιά αναπνοή για να προκληθεί μια παροδική υπερέκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα³⁵⁷. Μερικοί ασθενείς της συγκεκριμένης ομάδας υπερεαερίσθηκαν αρχικά στα πλαίσια της αντιμετώπισης του βασικού τους νοσήματος. Αν και οι τιμές του PaCO_2 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου BAL (37 και 40 mmHg αντίστοιχα), δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα υπε παραγωγής ή υπερέκκρισης από τον αρχικό υπεραερισμό. Πρόσφατες μελέτες³⁵⁸ έδειξαν ότι ο μηχανικός αερισμός, ακόμη και με συνθήκες που θεωρούνται φιλικές για το πνευμονικό παρέγχυμα (αναπνεόμενος όγκος: 7 ml/kg, PEEP: 3 cmH₂O), συνοδεύεται αρχικά με ποσοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων, αλλά και των μεγάλων συσσωματωμάτων

με τις καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, που αυξάνονταν κατά το πρώτο δώρο του μηχανικού αερισμού. Ο μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλέσει ακόμη και μέσα σε ελάχιστο χρόνο μείωση του mRNA της SPC, της μοναδικής πρωτεΐνης του επιφανειοδραστικού παράγοντα που εκφράζεται αποκλειστικά στα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα, αλλά και των υπολοίπων πρωτεϊνών, στοιχείο που συνηγορεί για τη βλαπτική επίδραση του μηχανικού αερισμού στα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα³⁵⁷. Η επίδραση αυτή εξηγεί, τουλάχιστον μερικά, την πτωτική πορεία των φωσφολιπιδίων μετά την αρχική περίοδο.

Αν και η διατροφική κατάσταση δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα¹⁶¹, η πλήρης διατροφική υποστήριξη των ασθενών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους ελαχιστοποιεί το ενδεχόμενο να οφείλεται σε διατροφικούς λόγους η παρατηρηθείσα πτώση των φωσφολιπιδίων. Τα εβδομαδιαία διαλείμματα μεταξύ των διαδοχικών BAL, υπερβαίνουν κατά πολύ το χρονικό κύκλο του επιφανειοδραστικού παράγοντα στις κυψελίδες³⁵⁹ και αποκλείουν την πιθανότητα ανάκτησης ελαττωμένων ποσοτήτων φωσφολιπιδίων, λόγω των επαναλαμβανόμενων εκπλύσεων.

Τα ολικά φωσφολιπίδια έχουν μελετηθεί σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς με ARDS^{256, 257, 258, 259, 260}, πνευμονία²⁵⁸ και καρδιογενές πνευμονικό οίδημα^{258, 360}, αλλά ποτέ σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο. Τα ολικά φωσφολιπίδια βρέθηκαν μειωμένα σε όλες τις παραπάνω μελέτες, αλλά η μείωση αυτή αποδόθηκε πάντα στην υποκείμενη νόσο, αγνοώντας την πιθανή συμβολή του μηχανικού αερισμού.

Εκτός από τις ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων έχουν καταγραφεί σε προηγούμενες κλινικές μελέτες^{257, 258, 359}. Τα κύρια ευρήματα της μελέτης μας ήταν τα μειωμένα ποσοστά της PC και PG, με ταυτόχρονη αύξηση της SM και PI. Από τη στιγμή που το κύριο ποσοστό της επιφανειοδραστικής ικανότητας οφείλεται στην PC, η σημαντική μείωση του ποσοστού της συνεπάγεται σημαντικές παθοφυσιολογικές μεταβολές, γεγονός που έχει πιστοποιηθεί και σε κλινικές μελέτες³⁶¹. Η σχέση των δύο όξινων φωσφολιπιδίων PG και PI θεωρείται δείκτης ωριμότητας και διαφοροποίησης των τύπου II κυψελιδικών κυττάρων. Η μείωση του λόγου PG/PI, δείχνει ότι κατά τη διάρκεια της μελέτης τα κύτταρα αυτά αντέδρασαν να εκτέθηκαν σε κάποιο βλαπτικό ερέθισμα.

Το μειωμένο ποσοστό των φωσφολιπιδίων που απομονώθηκαν στο ίζημα των 30000xg (μεγάλα συσσωματώματα-large aggregates), σε συνδυασμό με τις ποσοτικές

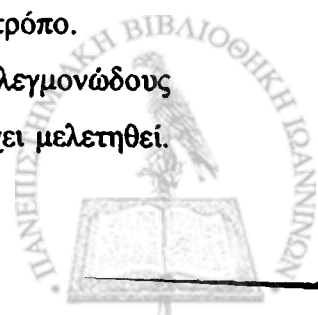
και ποιοτικές διαταραχές που προαναφέρθηκαν, προσφέρει μια καλή εξήγηση για το υψηλό ποσοστό ατελεκτασίας και πνευμονίας στον αναπνευστήρα που αναδείχτηκε όχι μόνο στη συγκεκριμένη μελέτη, αλλά αποτελεί και καθημερινή κλινική διαπίστωση. Το αυξημένο ποσοστό μικρών συσσωματωμάτων έχει συνδυασθεί με διαταραγμένες επιφανειοδραστικές ιδιότητες και επιδεινωμένη πνευμονική λειτουργία³⁶², ενώ η σχέση ενεργών και ανενεργών μορφών του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει προταθεί σαν ένα από τα πρωιμότερα σημεία οξείας πνευμονικής βλάβης³⁶³. Τέλος η αυξημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, αλλά και της αλβουμίνης, μαζί με το συνοδό οίδημα προκαλούν αναστολή του επιφανειοδραστικού παράγοντα, που είναι πολύ εντονότερη όταν η συγκέντρωση του του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι χαμηλή³⁶⁴.

Μεταβολές των δεικτών της φλεγμονώδους αντίδρασης

Ο PAF δεν ανιχνεύθηκε στο αρχικό BAL, αλλά ανιχνεύθηκε στο δεύτερο και το τρίτο BAL. Τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAF-AcH στο πλάσμα, η οποία υδρολύει αμέσως τον PAF, συνηγορούν στην τοπική παράγωγή του PAF στον πνευμονικό ιστό και αποκλείουν την πιθανότητα απομακρυσμένης σύνθεσης του PAF και μεταφοράς του. Η παράλληλη μεταβολή της ενεργότητας της PAF-AcH στο BAL και των επιπέδων του PAF συνηγορούν περαιτέρω την τοπική παραγωγή και έλεγχο του PAF. Τα επίπεδα του PAF στο BAL έχουν βρεθεί αυξημένα σε πειραματόζωα που αερίζονταν με συμβατικό τρόπο, σε σχέση με αυτά που αερίζονταν με υψηλή συχνότητα που θεωρείται ότι προσφέρει αυξημένη προστασία σε σχέση με το συμβατικό μηχανικό αερισμό⁸³, ενώ ο μηχανικός αερισμός έχει βρεθεί ότι προκαλεί αύξηση των φλεγμονωδών μεσολαβητών στο BAL, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται συνθήκες φιλικές προς το πνευμονικό παρέγχυμα⁸⁷.

Ανάλογη μεταβολή με τον PAF ακολούθησε και το ποσοστό των ουδετερόφιλων, ενώ ο συνολικός αριθμός των κυττάρων δεν μεταβλήθηκε. Η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών δεν εκδήλωσε κάποια διαταραχή από το πνευμονικό παρέγχυμα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Μη εμφανείς κλινικά καταστάσεις, όπως για παράδειγμα οι μικροεισρροφήσεις και οι μικροατελεκτασίες, θα μπορούσαν να πυροδοτήσουν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε για την αποφυγή τους, η οποία βέβαια δεν μπορεί να εξασφαλισθεί με απόλυτο τρόπο.

Η συμμετοχή του μηχανικού αερισμού στην πυροδότηση της φλεγμονώδους αντίδρασης στο φυσιολογικό ανθρώπινο πνευμονικό παρέγχυμα δεν έχει μελετηθεί.



Τα αυξημένα επίπεδα PAF και ουδετερόφιλων, οι διαταραχές της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας, η έλλειψη μιας σημαντικής κλινικής κατάστασης που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτή την αντίδραση συντηγούν για τη συμμετοχή του μηχανικού αερισμού στην πυροδότηση φλεγμονώδους αντίδρασης.

Πνευμονία στον αναπνευστήρα (VAP)

Η νοσοκομειακή πνευμονία είναι η δεύτερη πιο συχνή νοσοκομειακή λοίμωξη και μαζί με τις λοιμώξεις της αιματικής ροής έχει τη μεγαλύτερη θνητότητα απ' όλες τις νοσοκομειακές λοιμώξεις. Η νοσοκομειακή πνευμονία στους μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς (ventilator associated pneumonia - VAP) θεωρείται πλέον μια ξεχωριστή κλινική οντότητα και αποτελεί την πιο συχνή νοσοκομειακή λοίμωξη στους μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς που νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας³⁶⁵. Η επίπτωσή της ποικίλει από 9 έως 68% και η θνητότητά της από 33 έως 71% ανάλογα με τη μελέτη³⁶⁶. Παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η διάρκεια του μηχανικού αερισμού, η ηλικία, η ύπτια θέση, η παρουσία ρινογαστρικού σωλήνα, η φτωχή στοματική υγιεινή, η ανοσοκαταστολή και οι παραρρινοκολπίτιδες. Η διάγνωση και η διερεύνησή της, καθώς και η αναγκαιότητα χρησιμοποίησης επεμβατικών μεθόδων διερεύνησής της έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης συζήτησης την περασμένη δεκαετία³⁶⁷.

Περίπου 30% των ασθενών της μελέτης (12/42) ανέπτυξαν VAP κατά τη διάρκεια της μελέτης. Το σχετικά υψηλό αυτό ποσοστό εξηγείται από τη σύνθεση του δείγματος των ασθενών, οι οποίοι στη μεγάλη πλειοψηφία τους ήταν ασθενείς με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις και παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η Cook υπολόγισε ότι οι μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς με τραύμα είχαν πενταπλάσια πιθανότητα ανάπτυξης VAP σε σχέση με τους υπόλοιπους μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς, ενώ ο αντίστοιχος σχετικός κίνδυνος για τους ασθενείς με βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος ήταν 3,4³⁶⁸.

Ο αποικισμός του τραχειοβρογχικού δένδρου με δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελεί το πρώτο βήμα στην παθογένεση της VAP. Μόνο ένα μικρό όμως ποσοστό των αποικισμένων ασθενών θα αναπτύξει VAP και η μετάβαση από τον αποικισμό στη λοίμωξη παραμένει ένα θέμα με πολλές αδιευκρίνιστες πλευρές^{369, 370}. Η ποσότητα αλλά και η παθογένεια του μικροβιακού ενοφθαλμίσματος και οι συνθήκες του τοπικού μικροπεριβάλλοντος αποτελούν τα κρίσιμα μεγέθη για την εξέλιξη του αποικισμού σε λοίμωξη. Έτσι η κλινική εικόνα της VAP μπορεί να

ποικίλει από μία ήπια εικόνα σε μια βαριά κατάσταση που μπορεί να εξελιχθεί σε ARDS και σηπτικό shock.

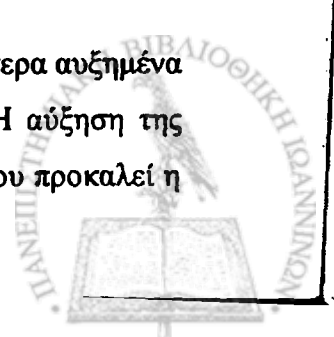
Στη μελέτη δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών που ανέπτυξαν VAP (ομάδα 2) και αυτών που δεν ανέπτυξαν (ομάδα 1), όσον αφορά την ηλικία, τη βαρύτητα της βλάβης που τους οδήγησε στη ΜΕΘ (severity score), τη χορήγηση αντιβιοτικών, καταστολής ή μυοχάλασης, όπως επίσης και γαστροπροστασίας. Δεν υπήρχε επίσης διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στον τρόπο χειρισμού του αεραγωγού (τύπος και μέγεθος τραχειοσωλήνα, χρόνος τραχειοστομίας, συχνότητα ανναρροφήσεων). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες έχουν θεωρηθεί ότι μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη VAP. Το μικρό μέγεθος της μελέτης είναι βέβαια απαγορευτικό για την προσπάθεια ανάδειξης συσχετίσεων και παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη VAP.

Όλες οι περιπτώσεις VAP αναπτύχθηκαν μετά την πέμπτη μέρα του μηχανικού αερισμού και τα μικρόβια που απομονώθηκαν ήταν Gram αρνητικά σε 9 περιπτώσεις και Staphylococcus σε 3 περιπτώσεις. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης της VAP ήταν 7,3 ημέρες μετά την έναρξη του μηχανικού αερισμού. Η σχετικά καθυστερημένη χρονική εμφάνιση μπορεί να οφείλεται στο ότι η μελέτη περιέλαβε μόνο ασθενείς χωρίς προηγούμενη καρδιοπνευμονική νόσο και με 'φυσιολογική' ακτινογραφία θώρακα κατά την εισαγωγή τους, ενώ δεν περιέλαβε ασθενείς με παρατηρημένη εισρρόφηση ή άλλη οξεία ή χρόνια πνευμονική προσβολή.

Δεν υπήρχε κάποια βιοχημική παράμετρος από αυτές που μελετήθηκαν, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επαρκή στατιστική σημαντικότητα για την πρόβλεψη της ανάπτυξης VAP. Ο μηχανικός αερισμός συνοδεύτηκε από αύξηση των πρωτεϊνών και ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην ομάδα των ασθενών που δεν παρουσίασαν καμία επιπλοκή κατά τη διάρκεια της μελέτης (ομάδα 1). Οι συνθήκες αυτές (παρουσία υγρού στις κυψελίδες και μερική αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα που συμμετέχει στο τοπικό αμυντικό σύστημα του πνεύμονα) δημιουργούν ένα τοπικό περιβάλλον, που ευνοεί την ανάπτυξη της VAP.

Μεταβολές των πρωτεϊνών

Τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης ήταν ιδιαίτερα αυξημένα κατά τη διάρκεια της VAP σε σχέση με το BAL που προηγήθηκε. Η αύξηση της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας και η φλεγμονώδης αντίδραση που προκαλεί η



λοίμωξη αποτελούν τις πιθανές αιτίες της αύξησης. Τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της VAP ήταν συγκρίσιμα με αυτά που παρατηρήσαμε στους ασθενείς με ARDS (1425, 2255 και 1050 μg/ml σε VAP, πρώιμη και ενδιάμεση φάση ARDS αντίστοιχα)²⁵⁷. Η παρουσία υγρού στις κυψελίδες θεωρείται ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη VAP αλλά στο BAL που προηγήθηκε της πνευμονίας οι ασθενείς που ανέπτυξαν VAP είχαν συγκρίσιμα επίπεδα ολικών πρωτεϊνών με αυτούς που δεν ανέπτυξαν (ομάδα 1), αλλά αερίζονταν μηχανικά. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από υποχώρηση των τιμών των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης στα επίπεδα που προηγήθηκαν της πνευμονίας, δείχνοντας ότι η τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα επανέρχεται μετά την αποδρομή της τοπικής φλεγμονής.

Μεταβολές των λιπιδίων

Η ανάπτυξη VAP συνοδεύτηκε από χαμηλά ολικά φωσφολιπίδια. Η πνευμονία έχει συνδεθεί με ποσοτική μείωση των φωσφολιπιδίων και τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με ευρήματα άλλων μελετών που έδειξαν μειωμένα φωσφολιπίδια στη μετακτινική πνευμονίτιδα³⁷¹, στη βακτηριακή πνευμονία³⁷², στην πνευμονία σε ανοσοκατασταλμένους³⁷³, αλλά και σε ασθενείς με πνευμονία που απαιτήσε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής²⁵⁸. Η μείωση των ολικών φωσφολιπιδίων επέμενε και στο BAL που ακολούθησε την κλινική αποδρομή της πνευμονίας.

Εκτός από τις ποσοτικές διαπιστώθηκαν και σημαντικές ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων. Τα μεγάλα συσσωματώματα (large aggregates), τα οποία αντιπροσωπεύουν το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με τις καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες και απομονώνονται στο κλάσμα των 30000xg, παρουσίασαν μεγάλη μείωση κατά τη διάρκεια της VAP και η μείωση αυτή επέμενε και στο BAL που ακολούθησε. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού των φωσφολιπιδίων που σχετίζονται με επαρκή επιφανειοδραστική ικανότητα (PC, PG), με αντίστοιχη αύξηση της SM και της PI. Το στοιχείο αυτό, σε συνδυασμό και με την επιμονή των ποσοτικών διαταραχών που παρατηρήθηκαν, δείχνει ότι απαιτείται αρκετός χρόνος για την αποκατάσταση της βλάβης των κυψελιδικών κυττάρων που προκαλεί η πνευμονία.

Ένα άλλο εύρημα ήταν και τα λυσοφωσφολιπίδια (lyso-PC) που ανιχνεύθηκαν κατά τη διάρκεια της VAP. Τα λυσοφωσφολιπίδια αυτά, που αποτελούν αποτέλεσμα της δράσης της φωσφολιπάσης A₂ στα φωσφολιπίδια, μπορεί να ασκούν άμεση βλαπτική δράση στο κυψελιδικό επιθήλιο και φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο

στην οξεία πνευμονική βλάβη³⁷⁴. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από μείωση του ποσοστού των λυσοφωσφολιπιδίων.

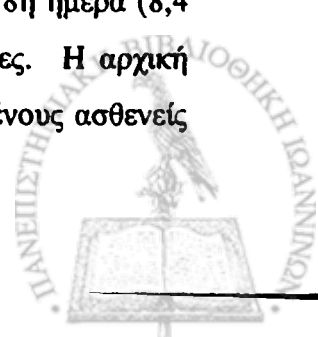
Μεταβολές των δεικτών της φλεγμονώδους αντίδρασης

Η VAP συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση του PAF, του ολικού αριθμού των κυττάρων και του ποσοστού των ουδετεροφίλων. Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι συμβατά με τα ευρήματα άλλων μελετών που έδειξαν αυξημένα ολικά κύτταρα, και ποσοστό ουδετεροφίλων²⁵⁸, ενώ αυξημένοι μεσολαβητές της φλεγμονής έχουν απομονωθεί στο BAL ασθενών με VAP³⁷⁵. Η αποδρομή της πνευμονίας συνοδεύτηκε από μείωση όλων των παραπάνω δεικτών.

Ατελεκτασία

Η ατελεκτασία είναι ένα από τα πιο συχνά προβλήματα που αντιμετωπίζει ένας μηχανικά αεριζόμενος ασθενής. Η σημασία του προβλήματος αναγνωρίστηκε από την αρχική περίοδο εφαρμογής της μηχανικής αναπνοής¹⁸. Τόσο η μόνιμη σύγκλειση, όσο και η επανειλημμένη διάνοιξη και σύγκλειση σε κάθε αναπνοή, συνδυάζονται με αυξημένη πιθανότητα βλάβης από τη μηχανική αναπνοή ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται φυσιολογικοί όγκοι και πιέσεις, όπως συζητιέται στο κεφάλαιο του ατελεκτατικού τραύματος. Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται με το χρόνο και με την ποσοτική και ποιοτική αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα^{62,63}. Οι ασθενείς της μελέτης δεν αερίζονταν με χαμηλούς όγκους, ενώ χειρισμοί επιστράτευσης των κυψελίδων γίνονταν σε τακτική βάση προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ατελεκτασίας. Οι χαμηλοί πνευμονικοί όγκοι και η χαμηλή κυψελιδική επιφάνεια στην οποία επαλείφεται ο επιφανειοδραστικός παράγοντας κατά το τέλος της εκπνοής³⁷⁶, όπως και η απώλεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στους αεραγωγούς³⁷⁷, έχουν συνδυασθεί με αδρανοποίησή του.

Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η σταδιακή μεταβολή των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων προκαλεί και μια καθυστερημένη εμφάνιση των ατελεκτασιών, οι οποίες μπορεί για ένα διάστημα να είναι κλινικά και ακτινολογικά σιωπηλές, μέχρι να εκδηλωθούν σαν τμηματικές και λοβαίες ατελεκτασίες. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης τμηματικής ή λοβαίας ατελεκτασίας ήταν μετά την 8η ημέρα (8,4 ημέρες), ενώ κανένα επεισόδιο δεν εμφανίστηκε τις 4 πρώτες ημέρες. Η αρχική έλλειψη παθολογίας από το αναπνευστικό σύστημα στους συγκεκριμένους ασθενείς



αποτελεί ίσως άλλον έναν παράγοντα που εξηγεί την καθυστερημένη εμφάνιση των ατελεκτασιών.

Μεταβολές των πρωτεϊνών

Οι ασθενείς της μελέτης είχαν αυξημένα επίπεδα ολικών πρωτεϊνών και αλβουμίνης στο BAL που έγινε κατά τη λύση της ατελεκτασίας. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα που δείχνουν ότι η επανέκπτυξη ατελεκτατικών περιοχών μπορεί να προκαλέσει τοπικό οίδημα από αυξημένη διαβατότητα³⁷⁸. Η λύση της ατελεκτασίας και το BAL που ακολούθησε μετά από 48 ώρες έδειξε σημαντική υποχώρηση των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης, που σηματοδοτεί σημαντική απορρόφηση του οίδηματικού υγρού.

Μεταβολές των λιπιδίων

Η ατελεκτασία συνδυάστηκε με σημαντικές ποσοτικές αλλά κυρίως ποιοτικές διαταραχές των φωσφολιπιδίων με μείωση της PC και της PG και αύξηση της SM και της PI. Το ποσοστό των φωσφολιπιδίων στο ίζημα των 30000xg (μεγάλα συσσωματώματα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες) ήταν πολύ χαμηλό στο BAL που έγινε για τη λύση της ατελεκτασίας, αλλά και σε αυτό που ακολούθησε σε 48 ώρες (αν και σε μικρότερο βαθμό). Η επιμονή των ποιοτικών και των ποσοτικών διαταραχών των φωσφολιπιδίων 48 ώρες μετά από τη λύση της ατελεκτασίας είναι συμβατή με τη μεγάλη συχνότητα υποτροπών από την οποία συνοδεύονται οι ατελεκτασίες στους μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς.

Μεταβολές των δεικτών της φλεγμονώδους αντίδρασης

Το BAL που ακολούθησε τη βρογχοσκοπική λύση της ατελεκτασίας αποκάλυψε σημεία έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης στις κυψελίδες, όπως αυξημένα επίπεδα PAF, αυξημένο αριθμό ολικών κυττάρων αλλά και αυξημένο ποσοστό ουδετεροφύλων. Τα σημεία αυτά είχαν υποχωρήσει σε σημαντικό βαθμό 48 ώρες μετά από τη λύση της ατελεκτασίας. Αν και υπάρχουν αρκετά πειραματικά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η παρατεταμένη επαφή των επιθηλιακών επιφανειών των κυψελίδων μπορεί να πυροδοτήσει φλεγμονώδη αντίδραση³⁷⁹, η πιθανότητα να συμβάλλει η επαναιμάτωση στη φλεγμονώδη αντίδραση δεν μπορεί να αποκλειστεί.



Συμπεράσματα

Η εφαρμογή του μηχανικού αερισμού σε παθολογικό παρέγχυμα έχει δείξει ότι αυξάνει την έκταση της βλάβης και καθυστερεί την αποκατάστασή της, σε πειραματικά μοντέλα. Η μελέτη αυτή αξιολόγησε την επίπτωση του μηχανικού αερισμού στις βιοχημικές και κυτταρικές παραμέτρους του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος σε ασθενείς σε ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο.

Η μελέτη αυτή, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραματικών μελετών σε ζώα, επιβεβαιώνει ότι ο μηχανικός αερισμός προκαλεί σημαντικές μεταβολές στο BAL, ακόμη και όταν εφαρμόζεται σε υγιές πνευμονικό παρέγχυμα. Διαπιστώθηκαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα, μεταβολές της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας και σημεία τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, έγιναν με χρήση συνθηκών μηχανικού αερισμού που θεωρούνται ασφαλείς. Ο αναπνεόμενος όγκος, η PEEP και οι πιέσεις των αεραγωγών δεν υπερέβησαν τιμές που θα μπορούσαν να θεωρηθούν τραυματικές για το πνευμονικό παρέγχυμα. Κατά τη διάρκεια της μελέτης η οξυγόνωση και η ενδοτικότητα παρουσίασαν μια πτωτική τάση. Αν και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών είναι αρκετά δύσκολη σε κλινικό επίπεδο, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη δυνητικά βλαπτική επίδραση του μηχανικού αερισμού και αναδεικνύουν το θέμα της έγκαιρης διάγνωσης και παρακολούθησης του VALI, καθώς και της ανάπτυξης μεθόδων που θα μπορούσαν να το αποτρέψουν.

Οι μεταβολές που έδειξε η μελέτη (πνευμονικό οίδημα, αδρανοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, τοπική φλεγμονώδης αντίδραση) προδιαθέτουν στην ανάπτυξη επιπλοκών όπως η VAP και η ατελεκτασία, οι οποίες επιδεινώνουν περαιτέρω την οξυγόνωση και την ενδοτικότητα. Οι μεταβολές που καταγράφηκαν εξηγούν, τουλάχιστον εν μέρει, την υψηλή επίπτωση των επιπλοκών αυτών στους μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς. Η πιθανή επίδρασή τους στο τελικό αποτέλεσμα είναι δύσκολο να καθορισθεί και απαιτούνται μεγάλες μελέτες για να καθορίσουν τη σημασία τους σε κλινικό επίπεδο.



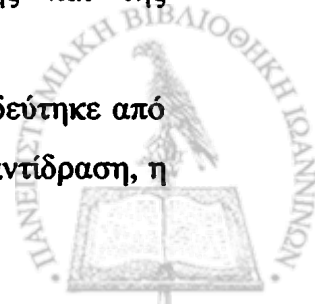
Περίληψη

Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του μηχανικού αερισμού στις βιοχημικές παραμέτρους του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο.

61 μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς εισήλθαν αρχικά στη μελέτη, εφόσον είχαν φυσιολογική ακτινογραφία θώρακα, καλή οξυγόνωση ($PaO_2/FiO_2 > 300$) και προβλεπόμενη διάρκεια μηχανικής υποστήριξης μεγαλύτερη από 2 εβδομάδες. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε BAL τις πρώτες 48 ώρες. Η διάρκεια της μελέτης ήταν δύο εβδομάδες και 19 ασθενείς δεν την ολοκλήρωσαν για διάφορους λόγους. Οι ασθενείς εκείνοι (22/42), οι οποίοι κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν παρουσίασαν κάποια επιπλοκή από το αναπνευστικό σύστημα, υποβλήθηκαν πάλι σε BAL στο τέλος της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας του μηχανικού αερισμού (ομάδα 1). Οι ασθενείς εκείνοι (12/42) οι οποίοι κατά τη διάρκεια της μελέτης παρουσίασαν πνευμονία συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα (VAP), υποβλήθηκαν σε BAL για τη διάγνωση της πνευμονίας, καθώς και μετά τη θεραπεία της (ομάδα 2). Τέλος οι ασθενείς που κατά τη διάρκεια της μελέτης παρουσίασαν ατελεκτασία (8/42), η οποία απαιτούσε βρογχοσκοπική λύση, υποβλήθηκαν σε BAL κατά τη λύση της ατελεκτασίας, το οποίο επαναλήφθηκε 48 ώρες μετά στο ίδιο βρογχοπνευμονικό τμήμα (ομάδα 3).

Οι ολικές πρωτεΐνες και η αλβουμίνη, ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων, φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως ο PAF, ένζυμα όπως η PAF-AcH και κύτταρα μελετήθηκαν στο BAL. Στην ομάδα 1 οι ολικές πρωτεΐνες και η αλβουμίνη βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες μετά από μία εβδομάδα μηχανικού αερισμού και η αύξηση αυτή συνέχισε και τη δεύτερη εβδομάδα. Τα ολικά φωσφολιπίδια παρουσίασαν σημαντική πτώση στο τέλος της πρώτης εβδομάδας και η πτώση αυτή συνεχίστηκε και τη δεύτερη εβδομάδα. Η πτώση αυτή συνοδεύτηκε από σημαντικές ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων, τόσο την πρώτη, όσο και τη δεύτερη εβδομάδα σε σχέση με το αρχικό δείγμα. Φλεγμονώδεις δείκτες όπως ο PAF, η PAF-AcH και το ποσοστό των ουδετεροφύλων ήταν αυξημένοι στο τέλος της πρώτης εβδομάδας, αλλά υποχώρησαν μερικά στο τέλος της δεύτερης. Οι παραπάνω μεταβολές συνοδεύτηκαν από ελαφρά επιδείνωση της οξυγόνωσης και της ενδοτικότητας.

Η συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονία (ομάδα 2) συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των ολικών πρωτεϊνών και μια έντονη φλεγμονώδη αντίδραση, η



οποία υποχώρησε μετά την αποδρομή της πνευμονίας. Σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων παρατηρήθηκαν τόσο κατά τη διάρκεια, όσο και μετά την αποδρομή της πνευμονίας. Η ατελεκτασία (ομάδα 3) συνοδεύτηκε από τοπικό οίδημα και μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση, τα οποία υποχώρησαν μετά τη λύση της. Τόσο η VAP, όσο και η ατελεκτασία, επηρέασαν σημαντικά την οξυγόνωση.

Ο μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη, όπως έχει επιδειχθεί σε μια μεγάλη σειρά πειραματικών ζωικών μοντέλων. Πρόσφατες κλινικές έρευνες δείχνουν ότι ο τύπος του μηχανικού αερισμού μπορεί να έχει σημαντική συνεισφορά στη νοσηρότητα και στη θνητότητα στο ARDS, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο. Η παρούσα έρευνα δείχνει ότι ο μηχανικός αερισμός ασθενών χωρίς καρδιοπνευμονική νόσο, με συνθήκες που σήμερα θεωρούνται ασφαλείς, συνοδεύτηκε από σημαντικές μεταβολές του BAL. Οι μεταβολές αυτές εξηγούν σε ένα βαθμό την υψηλή επίπτωση επιπλοκών από το αναπνευστικό σύστημα που εμφανίζουν οι μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς και ενδεχόμενα αντιπροσωπεύουν και περιγράφουν κάποιες πλευρές της βλάβης που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός στο πνευμονικό παρέγχυμα.



The effect of mechanical ventilation on BALF properties in ventilated patients without lung disease

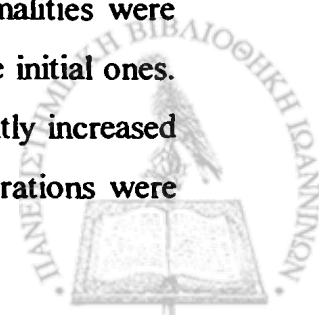
Hercules Tsangaris, MD

Summary

The objective of this study was to evaluate the effect of prolonged mechanical ventilation on the biochemical parameters of bronchoalveolar lavage (BAL), in mechanically ventilated patients without cardiopulmonary disease.

Sixty-one mechanically ventilated patients were initially included, if they had a negative chest X-ray, good oxygenation ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 300$), no history or sign of cardiothoracic disease and predicted duration of mechanical ventilation exceeding two weeks and they were subjected to an initial BAL during the first 48 hours. The duration of the study was two weeks, and 19 patients were excluded during the study for different reasons. Those patients (22 out of 42) still mechanically ventilated and not exhibiting any major pulmonary complication during the two week study period, were re-subjected to BAL at the end of the first and second week (group I). Patients who developed ventilator associated pneumonia (VAP) during the two week monitoring were subjected to BAL for the diagnosis of VAP and after its resolution. These patients (12/42) constituted a separate group (group II). Patients, who during the study period, exhibited atelectasis, which did not resolve and required bronchoscopy constituted a separate group (8/42) (group III). A BAL following the bronchoscopic lysis of atelectasis was performed in the involved bronchopulmonary segment, and was repeated 24-48h afterward.

Protein and albumin, total phospholipid and phospholipid profile, PAF and PAF-AcH, and cells recovered from each BAL were determined. In group I total BAL proteins and albumin were found significantly higher after one week of mechanical ventilation and this increase was evident after two weeks as well. BAL phospholipids exhibited a significant decrease after one week of mechanical ventilation and this decrease was continuing after two weeks. Qualitative surfactant abnormalities were demonstrated both in the first and second week samples compared to the initial ones. Inflammatory markers such as PAF, PAF-AcH and neutrophils significantly increased after one week, but partially remitted after two weeks. The above alterations were



accompanied with aggravation of oxygenation and compliance of the respiratory system.

VAP (group II) was associated with increased BAL proteins and a strong inflammatory reaction, which remitted after its resolution. Qualitative and quantitative surfactant abnormalities were observed both during and after VAP. Atelectasis (group III) was associated with a local edema, as well as a local inflammatory reaction, which subsided after its lysis. Both VAP and atelectasis significantly affected oxygenation.

Mechanical ventilation can induce lung injury as it has been demonstrated in animal models, while recent clinical studies imply that it can contribute to morbidity and mortality in ARDS. The current study reveals that the application of mechanical ventilation with the currently held approach, even in patients without lung disease, is associated with serious alterations of BALF properties. These alterations explain, to a degree, the high incidence of respiratory complications in mechanically ventilated patients and could represent some aspects of the injury that mechanical ventilation might cause to lung tissue.



Συντομογραφίες

ADP: διφωσφορική αδενοσίνη

ALI: οξεία πνευμονική βλάβη (acute lung injury)

AMP: μονοφωσφορική αδενοσίνη

ARDS: σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (acute respiratory distress syndrome)

BAL: βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage)

BCG: πράσινο της βρωμοκρεσόλης (bromocresol green)

BSA: αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)

CDP:κυτιδυλο-διφωσφορικό (cytidyl-diphosphate)

CRD: περιοχή αναγνώρισης των υδατανθράκων (carbohydrate recognition domaine)

Crs: ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος (compliance of respiratory system)

DPPC: διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (dipalmitoyl phosphatidylcholine)

DTPA: διεθυλο-τριαμινο-πενταοξικό οξύ (diethyl-triamino-pentaacetic acid)

EDTA: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine-tetraacetic acid)

FiO₂: μερική συγκέντρωση του οξυγόνου

FRC: λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα (functional residual capacity)

IL: ιντερλευκίνη

INF: ιντερφερόνη

LA: μεγάλα συσσωματώματα (large aggregates)

MIP: φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (macrophage inflammatory protein)

PAF: παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor)

PAF-AcH: PAF-ακετυλοϋδρολάση

PaO₂: μερική πίεση οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα

PaCO₂: μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα

PC: φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine)

PE: φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (phosphatidyl-ethanolamine)

PEEP: θετική τελοεκπνευστική πίεση (positive end expiratory pressure)

PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη (phosphatidylglycerol)

PI: φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (phosphatidylinositol)

Ppl: τελοεισπνευστική πίεση παύσης (Pplateau)

SI: διεθνές σύστημα

SM: σφιγγομυελίνη



SPA: πρωτεΐνη A του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant protein-A)

SPB: πρωτεΐνη B του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant protein-B)

SPC: πρωτεΐνη C του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant protein-C)

SPD: πρωτεΐνη D του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant protein-D)

TNF: παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor)

VAP: συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα πνευμονία (ventilator associated pneumonia)

VALI: πνευμονική βλάβη συνδεόμενη με τον αναπνευστήρα (ventilator associated lung injury)

VILI: πνευμονική βλάβη προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα (ventilator induced lung injury)



Βιβλιογραφία

- 1.Γαληνός. On the functions of parts of the human body. Daremberg C, translator. Paris: JB Bailliere,1954.
- 2.Vesalius A. De humani corporis fabrica. Basel: Oporinus 1543.
- 3.Baker AB. Artificial ventilation, the history of an idea. Med Hist 1971;15:336-351.
- 4.Morch ET. History of mechanical ventilation. In: Kirby RR, Smith RA, Desautels DA, editors. Mechanical ventilation. New York: Churchill Livingstone, 1985; 1-58.
- 5.Forthergill J. Observations on a case published in the last volume of the medical essays & c. of recovering a man dead in appearance, by distending the lungs with air. Philos Trans R Soc Lond 1745; 43:275-281.
- 6.Buchan W. Domestic medicine. London: W Strahan, 1760.
- 7.Lee RV. Cardiopulmonary resuscitation in the eighteenth century. J Hist Med 1972;27:418-433.
- 8.Leroy J. Recherches sur l' asphyxie. J Physiol Exp Pathol 1827;7:45.
- 9.Marcus S. Recherches relatives aux consequences de l' expiirpation experimentale des poumons. Gaz Med Paris 1881;52:695.
- 10.Heuer HJ. The development of lobectomy and pneumonectomy in man. J Thor Surg 1934;3:560-572.
- 11.Quenu, Longuet. Note sur quelques recherches experimentales concernat la chirurgie thoracique. C R Soc Biol Paris 1896;48:1007-1008.
- 12.Lassen HCA. A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. Lancet 1953;I:37-40.
- 13.Ibsen B. The anesthetist's viewpoint on the treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952. Proc R Soc Med 1954;47:72-74.
- 14.Eckman M, Barach B, Fox C, Rumcey CC, Somkin E, Barach AL. An appraisal of intermittent pressure breathing as a method of increasing altitude tolerance. J Aviat Med 1947;18:565-574.
- 15.Munck O, Kristensen HS, Lassen HCA. Mechanical ventilation for acute respiratory failure in diffuse chronic lung disease. Lancet 1961;i:66-67.



16. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med* 1994;20:225-232.
17. Greenfield LJ, Ebert PA, Benson DW. Effect of positive pressure ventilation on surface tension properties of lung extracts. *Anesthesiology* 1964;25:312-316.
18. Sladen A, Laver MB, Pontoppidan H. Pulmonary complications and water retention in prolonged mechanical ventilation. *N Engl J Med* 1968;110:556-565.
19. Nash G, Bowen JA, Langlinais PC. Respirator lung: a misnomer. *Arch Path* 1971;21:234-240.
20. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures: protection by positive end expiratory pressure. *Am Rev Resp Dis* 1974; 110: 556-565.
21. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressure produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:880-884.
22. Parker JC, Hernandez LA, Longenecker GL, Peevy K, Johnson W. Lung edema caused by high peak inspiratory pressures in dogs: role of increased microvascular filtration pressure and permeability. *Am Rev Respir Dis* 1990;142: 321-328.
23. John E, Ermocilla R, Golden J, Mc Devitt M, Cassady G. Effects of intermittent positive-pressure ventilation on lungs of normal rabbits. *Br J Exp Pathol* 1980;61:315-323.
24. Kolobow T, Moretti MP, Fumagalli R, Masceroni D, Prato P, Chen V, Joris M. Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. *Am Rev Resp Dis* 1987;135:312-315.
25. Faridy EE, Pernut S, Riley RL. Effects of ventilation on surface forces in excised dog lungs. *J Appl Physiol* 1966;21:1453-1462.
26. McClenahan JB, Urtnowski A. Effect of ventilation on surfactant and its turnover rate. *J Appl Physiol* 1967;23:215-220.
27. Albert RK, Lakshminarayan AS, Kirk W, Butler J. Lung inflation can cause pulmonary edema in zone I of in situ dog lungs. *J Appl Physiol* 1980;49:815-819.



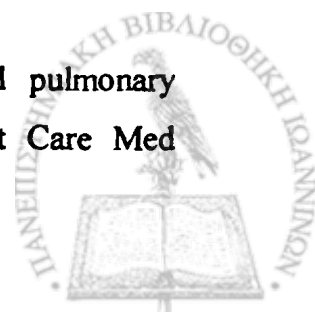
28. Pernutt S. Mechanical influences on water accumulation in the lungs. In AP Fishman and EM Renkin, editors. Pulmonary edema: Clinical Physiology Series. American Physiological Society Bethesda, MD. 1979:175-193.
29. Benjamin JJ, Murtagh PS, Proctor DF, Menkes HA, Permut S. Pulmonary vascular interdependence in excised dog lobes. *J Appl Physiol* 1974;37:887-894.
30. Iliff LD. Extra-alveolar vessels and edema development in excised dog lungs. *Circ Res* 1971;28:524-532.
31. Albert RK, Lakshminarayan AS, Huang TW, Butler J. Fluid leaks from extra-alveolar vessels in living dog lungs. *J Appl Physiol* 1978;44:759-762.
32. Caldini P, Leith JD, Brennan MJ. Effect of continuous positive pressure ventilation (CPPV) on edema formation in dog lung. *J Appl Physiol* 1975;39:672-679.
33. Hopewell PC. Failure of positive end-expiratory pressure to decrease lung water content in alloxan-induced pulmonary edema. *Am Rev Resp Dis* 1979;120:813-819.
34. Cooper JA, H Van Der Zee, BR Line, AB Malik. 1987. Relationship of end-expiratory pressure, lung volume, and 99mTc-DTPA clearance. *J Appl Physiol* 63:1586-1590.
35. O'Brodovich H, Coates G, Martin M. Effect of inspiratory resistance and PEEP on 99mTc-DTPA clearance. *J Appl Physiol* 1986;60:1461-1465.
36. Marks JD, Luce JM, Lazar NM, Wu JN, Lipavsky A, Murray JF. Effect of increases in lung volume on clearance of aerosolized solute from human lungs. *J Appl Physiol* 1985;59:1242-1248.
37. Nolop KB, Maxwell DL, Royston D, Hughes JMB. Effect of raised thoracic pressure and volume on 99mTc-DTPA clearance in humans. *J Appl Physiol* 1986;60:1493-1497.
38. Egan EA, Nelson RM, Oliver RE. Lung inflation and alveolar permeability to non-electrolytes in the adult sheep in vivo. *J Physiol* 1976;260:409-424.
39. Egan EA. Response of alveolar epithelial solute permeability to changes in lung inflation. *J Appl Physiol* 1980;49:1032-1036.
40. Egan EA. Lung inflation, lung solute permeability, and alveolar edema. *J Appl Physiol* 1982;53:121-125.
41. Kim KJ, Crandall ED. Effects of lung inflation on alveolar epithelial solute and water transport properties. *J Appl Physiol* 1982;52:1498-1505.



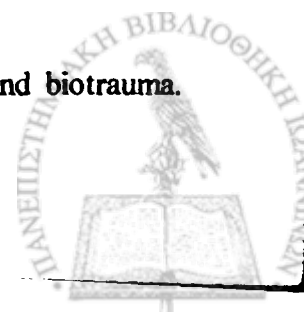
42. Dreyfuss D, P Soler, G Basset, G Saumon. High inflation pressure pulmonary edema: respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end expiratory pressure. *Am Rev Resp Dis* 1988;137:1159-1164.
43. Ramanathan R, Mason GR, Raj JU. Effect of mechanical ventilation and barotrauma on pulmonary clearance of 99mTcDTPA in lambs. *Pediatr Res* 1990;27:70-74.
44. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Spontaneous resolution of pulmonary edema caused by short periods of cyclic overinflation. *J Appl Physiol* 1992;72:2081-2089.
45. Julien M, Flick MR, Hoeffel JM, Murray JF. Accurate reference measurements for postmortem lung water. *J Appl Physiol* 1984;56:248-253.
46. Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974;54:678-811.
47. Tsuno K, Miura K, Takey M, Kolobow T, Morioka T. Histopathological pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Resp Dis* 1991;143:1115-1120.
48. John E, McDevitt M, Wilborn W, Cassady G. Ultrastructure of the lung after ventilation. *Br J Exp Pathol*. 1982;63:401-407.
49. Bachofen H, Schurch S, Michel RP, Weibel ER. Experimental hydrostatic pulmonary edema in rabbit lungs: morphology. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:989-996.
50. De Fouw DO, Berendsen PB. Morphological changes in isolated perfused dog lungs after acute hydrostatic edema. *Circ Res* 1978;43:72-82.
51. Behnia R, Molteni A, Waters CM, Panos RJ, Ward WF, Schnaper HW, Tsao CH. Early markers of ventilator induced lung injury in rats. *Ann Clin Lab Sci* 1996;26:437-450.
52. Macklin CC. Transport of air along sheaths of pulmonary blood vessels from alveoli to mediastinum. *Arch Intern Med* 1939;64:913-926.
53. Bouhuys A. Physiology and musical instruments. *Nature* 1969;221:1199-1204.
54. Slutsky AS. Consensus conference on mechanical ventilation. *Intens Care Med* 1994;20:64-79.
55. Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, Parker JC. Chest wall restriction limits high airway pressure induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* 1989;66:2364-2368.



56. Adkins WK, Hernandez LA, Coker PJ, Buchanan B, Parker JC. Age affects susceptibility to pulmonary barotrauma in rabbits. *Crit Care Med* 1991;19:390-393.
57. Carlton DP, Cummings JJ, Scheerer RG, Poulain FR, Bland RD. Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. *J Appl Physiol* 1990;69:577-583.
58. Tsuno K, Prato P, Kolobow T. Acute lung injury from mechanical ventilation at moderately high airway pressures. *J Appl Physiol* 1990;69:956-961.
59. Matthay MA, Landoldt CA, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from alveoli of anesthetized sheeps. *J Appl Physiol* 1982;53:96-104.
60. Robertson B, Van Golde L. Pulmonary surfactant. Amsterdam: Elsevier, 1984.
61. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 1970;28:596-608.
62. Taskar V, John J, Evander E, Wollmer P, Robertson B, Johnson B. Healthy lung tolerate repetitive collapse and reopening during short periods of mechanical ventilation. *Acta Anaesth Scand* 1995;39:370-376.
63. Taskar V, John J, Evander E, Robertson B, Johnson B. Surfactant dysfunction makes lung vulnerable to repetitive collapse and rexpansion. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;155:313-320.
64. Woo SW, Hedley-Whyte J. Macrophage accumulation and pulmonary edema due to thoracotomy and lung overinflation. *J. Appl. Physiol.* 1972;33:14-21.
65. Muscedere JG, Mullen JBM, Gan K, Slutsky SA. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1327-1334.
66. Bowton DL, Kong DL. High tidal volume ventilation produces increased lung water in oleic acid-injured rabbit lungs. *Crit Care Med* 1989;17:908-911.
67. Hernandez LA, Coker PJ, May S, Thompson AL, Parker JC. Mechanical ventilation increases microvascular permeability in oleic acid-injured lungs. *J Appl Physiol* 1990; 69:2057-2061.
68. Coker PJ, Hernandez LA, Peevy KJ, Adkins K, Parker JC. Increased sensitivity to mechanical ventilation after surfactant inactivation in young rabbit lungs. *Crit Care Med* 1992;20:635-640.
69. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Mechanical ventilation-induced pulmonary edema. Interaction with previous lung alterations. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151: 1568-1575.



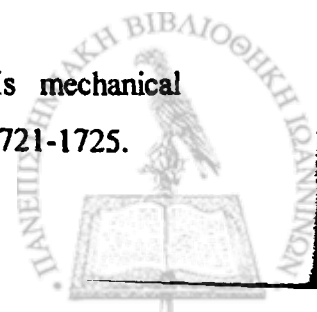
70. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. High volume ventilation produces more severe damage in previously injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;143: A251.
71. Sandhar BK, Niblett DJ, Argiras EP, Dunnill MS, Sykes MK. Effects of positive end-expiratory pressure on hyaline membrane formation in a rabbit model of the neonatal respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1988;14:538-546.
72. Sohma A, Brampton WJ, Dunnill MS, Sykes MK. Effect of ventilation with positive end-expiratory pressure on the development of lung damage in experimental acid aspiration pneumonia in the rabbit. *Intensive Care Med* 1992;18:112-117.
73. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Ravenscraft SA, Marini JJ. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997;25:16-27.
74. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med* 2000;28: 295-303.
75. Broccard AF, Hotchkiss JR, Kuwayama N, Olson DA, Jamál S, Wangenstein DO, Marini JJ. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1935-1942.
76. West JB, Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, Prediletto R. Stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 1991;70:1731-1742.
77. Fu Z, Costello ML, Tsukimoto K, Prediletto R, Elliott AR, Mathieu-Costello O, West JB. High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 1992;73:123-133.
78. Rippe B, Townsley M, Thigpen J, Parker JC, Korthuis RJ, Taylor AE. Effects of vascular pressure on the pulmonary microvasculature in isolated dog lungs. *J Appl Physiol* 1984;57:233-239.
79. Birks EK, Mathieu-Costello O, Fu Z, Tyler WS, West JB. Comparative aspects of the strength of pulmonary capillaries in rabbit, dog, and horse. *Respir Physiol* 1994;97:235-246.
80. Elliott AR, Fu Z, Tsukimoto K, Prediletto R, Mathieu-Costello O, West JB. Short-term reversibility of ultrastructural changes in pulmonary capillaries caused by stress failure. *J Appl Physiol* 1992;73:1150-1158.
81. Trenblay LN, Slutsky SA. Ventilator induced injury: barotrauma and biotrauma. *Proc Assoc Am Phys* 1998;110:482-488.



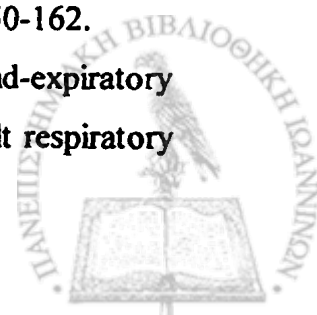
- 82.Kawano T, Mori S, Cybulski M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 1987;62: 27-33.
- 83.Imai Y, Kawano T, Miyasaka K, Takata M, Imai T, Okuyama K. Inflammatory chemical mediators during conventional ventilation and during high frequency oscillatory ventilation. *Am J Resp Crit Care Med* 1994;150:1550-1554.
- 84.Meredith KS, DeLemos RA, Coalson JJ, King RJ, Gerstmann DR, Kumar R, Kuehl TJ, Winter DC, Taylor A, Clark RH, Null DM. Role of lung injury in the pathogenesis of hyaline membrane disease in premature baboons. *J Appl Physiol* 1989;66:2150-2158.
- 85.Tremblay LN, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99:944-952.
- 86.Hubmayr RD, Limper AH, Burton SL, Vlahakis NE, Schroeder MA. Stretch causes IL-8 release from alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;155:A500.
- 87.Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Slutsky AS. Changes in cytokine expression secondary to injurious mechanical ventilation strategies in an ex vivo lung model. *Int Care Med* 1997;23(suppl 1):S3.
- 88.Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260:1124-1127.
- 89.Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N, Barakat AI. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 1997;59:527-549.
- 90.Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997;59:551-571.
- 91.Osol G. Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 1995;32:275-292.
- 92.Turner CH, Owan I, Takano Y. Mechanotransduction in bone: role of strain rate. *Am J Physiol* 1995;269:438-442.



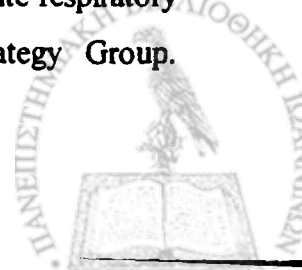
93. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 1995;73:349-365.
94. Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. *Mol Cell Biochem* 1991;104:57-60.
95. Ingberg D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:841-848.
96. Narimanbekov IO, Rozycki HJ. Effect of II-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-included lung injury in a rabbit model. *Exp Lung Res* 1995;21:239-254.
97. Takata M, Abe J, Tanaka H, Kitano Y, Doi S, Kohsaka T, Miyasaka K. Intraalveolar expression of tumor necrosis factor-alpha gene during conventional and high-frequency ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:272-279.
98. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998;275:L1040-1050.
99. Von Bethman AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller K, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:263-272.
100. Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:109-116.
101. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*. 1996;24:163-172.
102. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 1996;24:392-397.
103. Sessler CN, Bloomfield GL, Fowler AA. Current concepts of sepsis and acute lung injury. *Clin Chest Med* 1996;17:213-235.
104. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1721-1725.



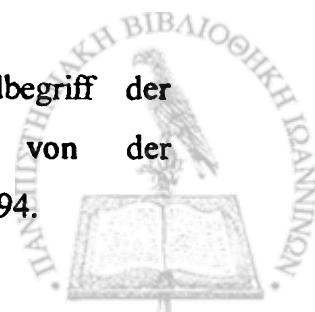
105. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:485-489.
106. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:294-323.
107. Douzinas EE, Tsidemiadou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, Sfyras D, Malagari K, Roussos C. The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:53-59.
108. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 1995;108:1303-1314.
109. Nahum A, Hoyt J, Schmitz L, Moody J, Shapiro R, Marini JJ. Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs. *Crit Care Med* 1997;25:1733-1743.
110. Dreyfuss D, Saumon G. Barotrauma is volutrauma, but which volume is the one responsible? *Intensive Care Med* 1992;18:139-41.
111. Gattinoni L, Pesenti A, Avalli L, Rossi F, Bombino M. Pressure-volume curve of total respiratory system in acute respiratory failure. Computed tomographic scan study. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:730-736.
112. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intens Care Med* 1990;16:372-377.
113. Suchyta MR, Clemmer TP, Orme JF Jr, Morris AH, Elliott CG. Increased survival of ARDS patients with severe hypoxemia. *Chest* 1991;99:951-955.
114. Slutsky AS. Consensus conference on mechanical ventilation--January 28-30, 1993 at Northbrook, Illinois, USA. Part I. European Society of Intensive Care Medicine, the ACCP and the SCCM. *Intensive Care Med*. 1994;20(1):64-79.
115. Slutsky AS. Consensus conference on mechanical ventilation--January 28-30, 1993 at Northbrook, Illinois, USA. Part 2. *Intensive Care Med* 1994;20:150-162.
116. Gattinoni L, Pelosi P, Crotti S, Valenza F. Effects of positive end-expiratory pressure on regional distribution of tidal volume and recruitment in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1807-1814.



- 117.Dambrosio M, Roupie E, Mollet JJ, Anglade MC, Vasile N, Lemaire F, Brochard L. Effects of positive end-expiratory pressure and different tidal volumes on alveolar recruitment and hyperinflation. *Anesthesiology* 1997;87:495-503.
- 118.Dreyfuss D, Saumon G. Should the lung be rested or recruited? The Charybdis and Scylla of ventilator management. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1066-1067.
- 119.Roupie E, Dambrosio M, Servillo G, Mentec H, el Atrous S, Beydon L, Brun-Buisson C, Lemaire F, Brochard L. Titration of tidal volume and induced hypercapnia in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:121-128.
- 120.Artigas A, Bernard GR, Carlet J, Dreyfuss D, Gattinoni L, Hudson L, Lamy M, Marini JJ, Matthay MA, Pinsky MR, Spragg R, Suter PM. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2. Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies and issues related to recovery and remodeling. *Intensive Care Med* 1998;24:378-398.
- 121.International consensus conferences in intensive care - medicine. Ventilator-associated lung injury in ARDS. American Thoracic Society, European Society of Intensive Care Medicine, Societe de Reanimation Langue Francaise. *Intensive Care Med* 1999;25:1444-1452.
- 122.Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:347-354.
- 123.Brochard L, Roudot-Thoraval F, Roupie E, Delclaux C, Chastre J, Fernandez-Mondejar E, Clementi E, Mancebo J, Factor P, Matamis D, Ranieri M, Blanch L, Rodi G, Mentec H, Dreyfuss D, Ferrer M, Brun-Buisson C, Tobin M, Lemaire F. Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. The Multicenter Trail Group on Tidal Volume reduction in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1831-1838.
- 124.Stewart TE, Meade MO, Cook DJ, Granton JT, Hodder RV, Lapinsky SE, Mazer CD, McLean RF, Rogovein TS, Schouten BD, Todd TR, Slutsky AS. Evaluation of a ventilation strategy to prevent barotrauma in patients at high risk for acute respiratory distress syndrome. Pressure- and Volume-Limited Ventilation Strategy Group. *N Engl J Med* 1998;338:355-361.



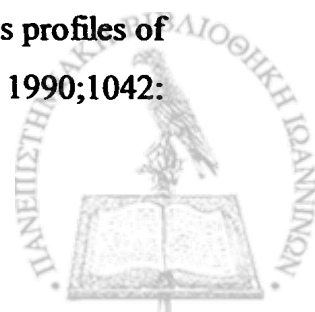
125. Brower RG, Shanholtz CB, Fessler HE, Shade DM, White P Jr, Wiener CM, Teeter JG, Dodd-o JM, Almog Y, Piantadosi S Prospective, randomized, controlled clinical trial comparing traditional versus reduced tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 1999;27:1492-1498.
126. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*. 2000;342:1301-1308.
127. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:54-61.
128. Priestley J. Experiments and observations on different kinds of air. Vol III, Johnson, London. 1775.
129. Hunter J. Proposals for the recovery of people apparently drowned. *Phil Trans* 1776;66:412-425.
130. Lavoisier AL. "Traite Elementaire de Chimie". Paris, 1789.
131. Lavoisier AL, Laplace PS. Memoire sur la chaleur. *Hist Acad Roy Sci (Paris)* 1784 ;355-408.
132. Laplace PS. Traite de Mecanique Celeste, 5 Vols, Crapelet, Courcier, Paris, 1798-1827.
133. Jorg E. Die Foetuslunge im gebornen Kinde. Gebhardt, Grima, 1835.
134. Virchow R. Ueber das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den thierischen Geweben. *Arch Pathol Anat* 1854;6:562.
135. Hochheim K. Uber einige Befunde in den Lungen von Neugeborenen und die Beziehung derselben zur Aspiration von Fructwasser. *Centralbl Pathol* 1903;14:537-538.
136. Farber S, Sweet LK. Amniotic sac contents in the lungs of infants. *Am J Dis Child* 1931;42:1372-1383.
137. Rayleigh JWS. On the theory of surface forces. I and II, *Philos Mag* 1890;30:285-298, 465-475.
138. Von Neergaard K. Neue Auffassungen ueber einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhangig von der Oberflachenspannung in den Alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 1929;66:373-394.



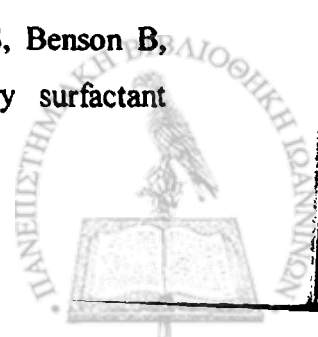
139. Macklin CC. Residual epithelial cells on the pulmonary alveolar walls of mammals. *Trans R Soc Can* 1946;40:93-111.
140. Macklin CC. The alveoli of the mammalian lung. An anatomical study with clinical correlations. *Proc Inst Med* 1950;18:78-95.
141. Macklin CC. The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet* 1954;1:1099-1104.
142. Radford Jr EP. Method for estimating respiratory surface area of mammalian lungs from their physical characteristics. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;87:58-61.
143. Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;95:170-172.
144. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517-523.
145. Thannhauser SJ, Benotti H, Boncoddio NF. Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmitoyl lecithin) from lung. its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues. *J Biol Chem* 1961;166:669-675.
146. Gluck L, Motoyama EK, Smits HL, Kulovich MV. The biochemical development of surface activity in mammalian lung. I. The surface-active phospholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus. *Pediatr Res* 1967;1:237-246.
147. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Benner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obst Gynecol* 1971;109:440-445.
148. Hallman M, Feldman B, Gluck L. The absence of phosphatidylglycerol in surfactant. *Pediatr Res* 1975;9:396A.
149. Jobe A, Gluck L. The biological half-life of lung lecithin at birth. *Pediatr Res* 1976;10:462A.
150. Gil J, Reiss OK. Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *J Cell Biol* 1973;58:152-171.
151. Williams MC. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J Cell Biol* 1977;72:260-277.
152. Enhorning G, Robertson B. Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 1972;50:55-66.



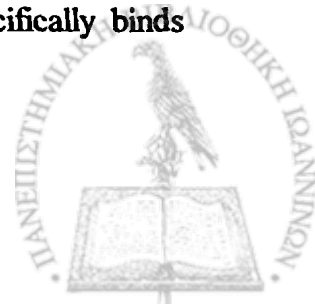
153. Fujiwara T, Chida S, Watabe YJ, Macta H, Morita T, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980;1:55-59.
154. Enhorning G, Shennan A, Possmayer F, Dunn M, Chen CP, Milligan J. Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1985;76:145-153.
155. Okano G, Akino T. Changes in the structural and metabolic heterogeneity of phosphatidylcholines in the developing rat lung. *BBA* 1978;523:373-384.
156. Gail DB, Steinkamp H, Masaro D.. Interspecies variation in lung lavage and tissue saturated phosphatidylcholine. *Resp Physiol* 1978;33:289-297.
157. Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Resp Dis* 1987;136:424-444.
158. Gail DB, Masaro GD, Masaro D. Influence of fasting on the lung. *J Appl Physiol* 1977;42:88-92.
159. Nakamura M, Kawamoto T, Akino T. Dietary regulation of dipalmitoyl phosphatidylcholine in the lung: effects of essential fatty acid deficiency. *BBA* 1980;620:24-36.
160. McMahon KE, Farrell PM. Effect of choline deficiency on lung phospholipid concentration in the rat. *J Nutr* 1986;116:936-943.
161. Brown LAS, Bliss AS, Longmore WJ. Effect of nutritional status on the lung surfactant system: food deprivation and caloric restriction. *Exp Lung Res* 1984;6:133-147.
162. Honda Y, Tsunematu K, Suzuki A, Akino T. Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung disease. *Lung* 1988 ;166:293-301.
163. Hallman M, Gluck L. Phosphatidylglycerol in lung surfactant. II Subcellular distribution and mechanism of biosynthesis in vitro. *BBA* 1975;409:172-191.
164. Egberts J, Beintema-Dubbeldam A, de Boers A. Phosphatidylinositol and not phosphatidylglycerol is the important minor phospholipid in rhesus-monkey surfactant. *BBA* 1987;919:90-92.
165. Hayashi H, Adachi M, Kataoka K, Sato H, Akino T. Molecular species profiles of acidic phospholipids in lung fractions of adult and perinatal rabbits. *BBA* 1990;1042:126-131.



- 166.Hallman M, Feldman BH, Kirkpatrick E, Gluck L. Absence of phosphatidylglycerol in respiratory distress syndrome in the newborns. *Pediatr Res* 1977;11:714-720.
- 167.Hallman M, Kulovich M, Kirkpatrick E, Sugarman RG, Gluck L. Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: incidences of lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1976;125:613-617.
- 168.McCormack FX, King TE, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Res Dis* 1991;144:160-166.
- 169.Honda Y, Kataoka K, Hayashi H, Takahashi H, Suzuki A, Akino T. Alterations of acidic phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Chim Acta* 1989;181:11-18.
- 170.Hallman M, Spragg R, Harell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 1982;70:673-683.
- 171.Liau DF, Barrett RC, Bell ALL, Ryan SF. Normal surface properties of phosphatidylglycerol-deficient surfactant from dog after acute lung injury. *J Lipid Res* 1985;26:1338-1344.
- 172.Rice WR, Sari VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JA. Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *BBA* 1989;1006:237-245.
- 173.Fleming BD, Keough KMW. Surface respreading after collapse of monolayers containing major lipids of pulmonary surfactant. *Chem Phys Lipids* 1988;49:555-568.
- 174.Tanaka Y, Takei T, Aiba T, Masuda K, Kiuchi A, Fujiwara T. Development of synthetic lung surfactants. *J Lipid Res* 1986;27:475-485.
- 175.Rustow B, Kolleck I, Guthmann F, Haupt R, Kunze D, Stevens P. Synthesis and secretion of plasmalogens by type II pneumocytes. *Biochem J* 1994;302:665-668.
- 176.King RJ, Clements JA. Surface active materials from dog lung I: method of isolation. II: composition and physiological correlations. III: thermal analysis. *Am J Physiol* 1972;223:707-714, 715-726, 727-733.
- 177.White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, Benson B, Cordell B. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* 1985;317:361-363.



- 178.Sano K, Fisher J, Mason RJ, Kuroki Y, Schilling J, Benson B, Voelker D. Isolation and sequence of a cDNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A). *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144:367-372.
- 179.Benson BJ, Hawgood S, Schilling J, Clements J, Damm D, Codell B, White RT. Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:6379-6383.
- 180.Boggaram V, Qing K, Mendelson CR. The major apoprotein of rabbit pulmonary surfactant. Elucidation of primary sequence and cyclic AMP and developmental regulation. *J Biol Chem* 1988;263:2939-2947.
- 181.Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defence system. *Immunol Today* 1994;15:67-74.
- 182.Boggaram V, Mendelson CR. Transcriptional regulation of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in rabbit fetal lung. *J Biol Chem* 1988;263:19060-19065.
- 183.Acarregui MJ, Snyder JM, Mitchell MD, Mendelson CR. Prostaglandins regulate surfactant protein A (SP-A) gene expression in human fetal lung in vitro. *Endocrinology* 1990;127:1105-1113.
- 184.Ballard PL, Liley HG, Gonzales LW, Odom MW, Ammann AJ, Benson BJ, White RT, Williams MC. Interferon-gamma and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1990;2:137-143.
- 185.Whitsett JA, Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C. Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on synthesis of surfactant associated protein in fetal lung. *J Biol Chem* 1987;262:7908-7913.
- 186.Snyder JM, Mendelson CR. Insulin inhibits the accumulation of the major lung surfactant apoprotein in human fetal lung explants maintained in vitro. *Endocrinology* 1987;120:1250-1257.
- 187.Liley HG, White RT, Benson BJ, Ballard PL. Glucocorticoids both stimulate and inhibit production of pulmonary surfactant protein A in fetal human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9096-9100.
- 188.Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1991;266:3068-3073.



189. Haagsman HP, Elfring RH, van Buel BL, Voorhout WF. The lung lectin surfactant protein A aggregates phospholipids vesicles via a novel mechanism. *Biochem J* 1991;275:273-276.
190. Voorhout WF, Veenedaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ. Surfactant protein A is localised at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1331-1336.
191. Suzuki F, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Resp Dis* 1989;140:75-81.
192. Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR. Human pulmonary surfactant protein A (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 1989;264:13923-13928.
193. Mc Neely TB, Coonrod JD. Aggregation and opsonization of type A but not type B Hemophilus influenzae by surfactant protein A. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1994;11:114-122.
194. Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper Schafer J. Lung surfactant protein A (SP-A) enhances serum-independent phagocytosis of bacteria by macrophages. *Eur J Cell Biol* 1991;57:95-100.
195. Gaynor C, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of virulent Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* 1994;155:5343-5351.
196. Zimmerman PE, Voelker DR, McCormack FX, Paulsrud JR, Martin WJ. 120kD surface glycoprotein of Pneumocystis carinii is a ligand for surfactant protein A. *J Clin Invest* 1992;89:143-149.
197. Benne CA, Kraijeveld CA, van Strijp JAG. Interactions of surfactant protein A with influenza viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis* 1995;171:335-341.
198. van Golde LMG. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defence against pathogens. *Biol Neonate* 1995;67:2-17.
199. Ikegami M, Korfhagen TR, Bruno MD, Whitsett JA, Jobe AH. Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *Am J Physiol* 1997;272:479-485.
200. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glaser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA.

Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9594-9599.

201. Le Vine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997;158:4336-4340.

202. Johansson J, Curstedt T, Jorvall H. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties and kringle similarities. *Biochemistry* 1991;30:6917-6921.

203. Hawgood S, Derrick M, Poulain F. Structure and properties of surfactant protein B. *BBA* 1998;1408(2-3):150-160.

204. Curstedt T, Jorvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P. Two hydrophobic lowmolecular mass protein fractions of pulmonary surfactant: characterization and biophysical activity. *Eur J Biochem* 1987;168:255-262.

205. Revak SD, Merritt TA, Degryse E, Stefani L, Courtney M, Hallman M, Cochrane CG. Use of human surfactant low molecular weight apoproteins in the reconstitution of surfactant biologic activity. *J Clin Invest* 1988;81:826-833.

206. Yu SH, Possmayer F. Role of bovine surfactant associated proteins in the surface active property of phospholipid mixtures. *BBA* 1990;1046:233-241.

207. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Resp Dis* 1989;140: 75-81.

208. Nogee LM, de Mello DM, Delner LP, Coltner HR. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1993;328:406-410.

209. Johanson J. Structure and properties of surfactant protein C. *BBA* 1998;1408 (2-3):161-172.

210. Holmskov U, Lawson P, Teisner B, Tornøe I, Willis AC, Morgan C, Koch C, Reid KB. Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein D binding molecule. *J Biol Chem* 1997;272:13743-13749.

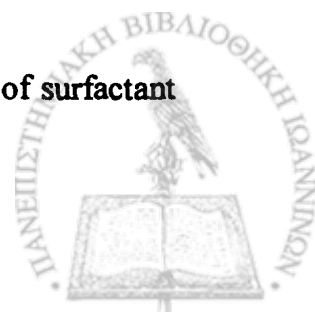
211. Reid KB. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *BBA* 1998;1408:290-295.



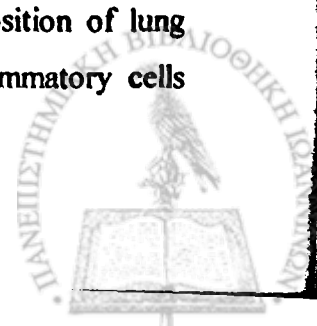
212. Batenburg JJ, Longmore JJ, van Golde LMG. The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture. *BBA* 1978;529:160-170.
213. Mimms LC, Zee P. Utilization of glycerol by the newborn mammalian lung. *Biol Neonate* 1971;18:356-362.
214. Maniscalco WM, Stremmel W, Heeney-Campbell M. Uptake of palmitic acid by rabbit alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1990;259:206-212.
215. Maniscalco WM, Finkelstein JN, Parkhurst AB. De novo fatty acid synthesis by freshly isolated alveolar type II epithelial cells. *BBA* 1983;751:462-469.
216. Batenburg JJ, Den Breejen JN, Yost RW, Haagsman HP, Van Golde LMG. Glycerol 3-phosphate acylation in microsomes of type II cells isolated from adult rat lungs. *BBA* 1986;878:301-309.
217. Zeisel SH. Dietary choline: biochemistry, physiology and pharmacology. *Ann Rev Nutr* 1981;1:95-121.
218. Fisher AB, Chander A, Dodia C, Reichester J, Kleinzeller-A. Choline transport by lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:455-462.
219. Hallman M, Bry K, Hoppu K, Lappi M, Pohjavuori M. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1992;326:1233-1239.
220. Walton PA, Possmayer F. The role of Mg-dependent phosphatidate phosphohydrolase in pulmonary glycerolipid biosynthesis. *BBA* 1984;796:364-372.
221. Nunn JF. *Nunn's Applied Respiratory Physiology*. Butterworth-Heinemann, 1993
222. Sullivan LC, Daniels CB, Phillips ID, Orgeig S, Whitsett JA. Conservation of surfactant protein A: evidence for a single origin for vertebrate pulmonary surfactant. *J Mol Evol* 1998;46:131-138.
223. Nieman GF, Bredenberg CE. High surface tension pulmonary edema induced by detergent aerosol. *J Appl Phys* 1985;58:129-136.
224. DeSa DJ. Pulmonary fluid content in infants with respiratory distress. *J Pathol* 1969;97:469-479.
225. Bland RD, Carlton DP, Scheerer RG, Cummings JJ, Chapman DL. Lung fluid balance in lambs before and after premature birth. *J Clin Invest* 1989;84:568-576.



226. Batenburg JJ, Hallman M. Developmental biochemistry of alveoli. In 'Pulmonary Physiology: Fetus, Newborn, Child and Adolescent' Lea & Febiger, Philadelphia, 1990;106-139.
227. Post M, Batenburg JJ, Schuurmans EAJM, Van Golde LMG. The rate limiting step in the biosynthesis of phosphatidylcholine by alveolar type II cells from adult rat lung. BBA 1982;712:390-394.
228. Post M, Batenburg JJ, Smith BT, Van Golde LMG. Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells. BBA 1984;795:552-557.
229. Post M, Van Golde LMG. Metabolic and developmental aspects of the pulmonary surfactant system. BBA 1988;947:249-286.
230. Haagsman HP, Schuurmans EAJM, Batenburg JJ, Van Golde LMG. Synthesis of phosphatidylcholine in ozone exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung. Is glycerolphosphate acyltransferase a rate-limiting enzyme? Exp Lung Res 1988;14:1-17.
231. Post M, Batenburg JJ, Smith BT, Van Golde LMG. The rate limiting reaction in phosphatidylcholine synthesis by alveolar type II cells isolated from fetal lung. BBA 1984;795:552-557.
232. Lumb RH. Phospholipid transfer protein in mammalian lung. Am J Physiol 1989;257:190-194.
233. Heath MF, Jacobson W. The nature of the phospholipases A of lung lamellar bodies. Pediatr Res 1980;14:846-847.
234. Mason RJ, Voelker DR. Regulatory mechanisms of surfactant secretion. BBA 1998;1408(2-3):226-240.
235. Suwabe A, Mason RJ, Smith D, Firestone JA, Browning MD, Voelker DR. Pulmonary surfactant secretion is regulated by the physical state of extracellular phosphatidylcholine. J Biol Chem 1992;267:19884-19890.
236. Rooney SA, Gobran LI, Umstead TM, Phelps DS. Secretion of surfactant protein A from rat type II pneumocytes. Am J Physiol 1993;265:586-590.
237. Hallman M, Epstein BL, Gluck L. Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbits. J Clin Invest 1981;68:742-751.
238. Jacobs HC, Ikegami M, Jobe AH, Berry DD, Jones S. Reutilization of surfactant phosphatidylcholine in adult rabbits. BBA 1985;837:77-84.



239. Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA. Precursor-product relationship between rabbit type II cells lamellar bodies and alveolar surface active material. Surfactant turnover time. BBA 1984;666:382-393.
240. DeGennes PG. Soft Matter (Nobel Lecture). Angew. Chemie 1992;31:842-845.
241. Nag K, Perez-Gil J, Ruano MLF, Worthman LD, Stewart J, Casals C, Keough KMW. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. Biophys J. 1998;74:2983-2985.
242. Low RB, Davis GS, Giancola MS. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and nonsmokers. Am Rev Respir Dis 1978;118:863-75.
243. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. J Appl Physiol 1986;60:532-538.
244. Von Wichert P, Joseph K, Muller B, Franck WM. Bronchoalveolar lavage. Quantitation of intraalveolar fluid? Am Rev Respir Dis 1993;147:148-152.
245. Costabel U. Atlas der bronchoalveolaren lavage. Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
246. Davis GS, Giancola MS, Costanza MC, Low RB. Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. Am Rev Respir Dis 1982;126:611-616.
247. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1987;135:250-263.
248. Dohn MN, Baughman RP. Effect of changing instilled volume for bronchoalveolar lavage in patients with interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis 1985;132:390-392.
249. Giese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. Eur Respir J 1999;13:1455-1476.
250. Finley TN, Ladman AJ. Low yield of pulmonary surfactant in cigarette smokers. N Engl J Med 1972;286:223-227.
251. Mancini NM, Bene MC, Gerard H, Chabot F, Faure G, Polu JM, Lesur O. Early effects of short-time cigarette smoking on the human lung: a study of bronchoalveolar lavage fluids. Lung 1993;171:277-291.
252. Hughes DA, Haslam PL. Effect of smoking on the lipid composition of lung lining fluid and relationship between immunostimulatory lipids, inflammatory cells



and foamy macrophages in extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 1990;3:1128-1139.

253.Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y, Akino T, Abe S. Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest* 1996;109:1006-1009.

254.Schmekel B, Bos JA, Khan AR, Wohlfart B, Lachmann B, Wollmer P. Integrity of the alveolar-capillary barrier and alveolar surfactant system in smokers. *Thorax* 1992;47:603-608.

255.Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-323.

256.Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982;70:673-683.

257.Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 1998;24:296-303.

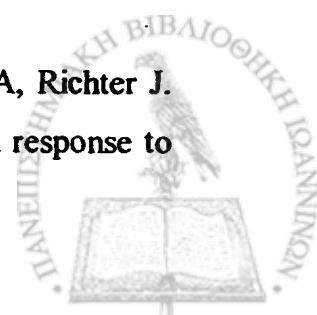
258.Guenther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:176-184.

259.Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3d, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88:1976-1981.

260.Pison U, Obertacke U, Brand M, Seeger W, Joka T, Bruch J, Schmit-Neuerburg KP. Altered pulmonary surfactant in uncomplicated and septicemia-complicated courses of acute respiratory failure. *J Trauma* 1990;30:19-26.

261.Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhof H, Schmit-Neuerburg KP. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1033-1039.

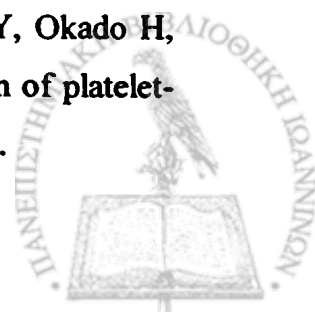
262.Fehrenbach H, Brasch F, Uhlig S, Weisser M, Stamme C, Wendel A, Richter J. Early alterations in intracellular and alveolar surfactant of the rat lung in response to endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1630-1639.



263. Raymonds K, Leuwer M, Haslam PL, Vangerow B, Ensink M, Tschorn H, Schurmann W, Husstedt H, Rueckoldt H, Piepenbrock S. Compositional, structural, and functional alterations in pulmonary surfactant in surgical patients after the early onset of systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:82-89.
264. Jobe AH. Which surfactant for treatment of respiratory-distress syndrome. *Lancet* 2000;355:1380-1381.
265. Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000510.
266. Richman PS, Spragg RG, Robertson B, Merritt TA. The adult respiratory distress syndrome: first trials with surfactant replacement. *Eur Respir J* 1989;2:109-111.
267. Heikenheimo M, Hynynen M, Rautiainen P, Anderson S. Successful treatment of ARDS with two doses of synthetic surfactant. *Chest* 1994;105:1263-1264.
268. Haslam PL, Hughes DA, Naughton PD, Baker CS. Surfactant replacement therapy in late-stage adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1994;343:1009-1011.
269. Weg JG, Balk RA, Tharratt RS, Jenkinson SG, Shah JB, Zaccardelli D, Horton J, Pattishall EN. Safety and potential efficacy of an aerosolized surfactant in human sepsis-induced adult respiratory distress syndrome. *JAMA* 1994;272:1433-1438.
270. Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS, Pattishall EN. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1417-1421.
271. Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;155:1309-1315.
272. Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1999;353:1232-1237.
273. Soll RF. Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD000144.



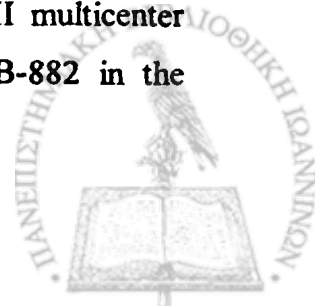
274. Ainsworth SB, Beresford MW, Milligan DW, Shaw NJ, Matthews JN, Fehton AC, Ward Platt MP. Pumactant and poractant alfa for treatment of respiratory distress syndrome in neonates born at 25-29 weeks' gestation: a randomised trial. *Lancet* 2000;355:1387-1392.
275. Soll RF. Prophylactic natural surfactant extract for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD000511.
276. Oetomo SB, Dorrepaal C, Bos H, Gerritsen J, van der Mark TW, Koeter GH, van Aalderen WM. Surfactant nebulization does not alter airflow obstruction and bronchial responsiveness to histamine in asthmatic children. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:1148-1152.
277. Anzueto A, Jubran A, Ohar JA, Pipette C, Rennard S, Colice G, Pattishall EN, Barrett J, Engle M, Perret KA, Rubin BK. Effects of aerosolized surfactant in patients with stable chronic bronchitis. *JAMA* 1997;278:1426-1431.
278. Giese M, Bufler P, Teller J, Reinhardt D. Nebulization of a bovine surfactant in cystic fibrosis: a pilot study. *Eur Respir J* 1997;10:1989-1997.
279. Macnaughton PD, Evans TW. The effect of exogenous surfactant therapy on lung function following cardiopulmonary bypass. *Chest* 1994;105:421-425.
280. Barbaro JF, Zvaifler NJ. Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:1245-1247.
281. Benveniste J, Le Couedic JP, Polonsky J, Tence M. Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature* 1977;269:170-171.
282. Benveniste J, Le Couedic JP, Kamoun P. Aggregation of human platelets by platelet-activating factor. *Lancet* 1975;1:344-345.
283. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* 1993;34:691-702.
284. Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995;238:5-20.
285. Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T, Shimizu T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 1991;349:342-346.



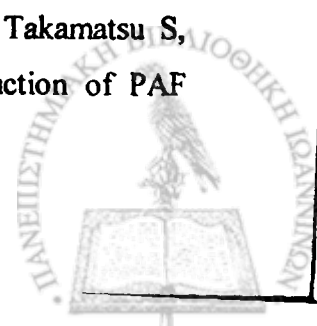
- 286.Kunz D, Gerard NP, Gerard C. The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. *J Biol Chem* 1992;267:9101-9106.
- 287.Muller E, Dagenais P, Alami N, Rola-Pleszczynski M. Identification and functional characterization of platelet-activating factor receptors in human leukocyte populations using polyclonal anti-peptide antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5818-5822.
- 288.Ouellet S, Muller E, Rola-Pleszczynski M. IFN-gamma up-regulates platelet-activating factor receptor gene expression in human monocytes. *J Immunol* 1994;152:5092-5099.
- 289.Dagenais P, Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Augmented expression of platelet-activating factor receptor gene by TNF-alpha through transcriptional activation in human monocytes. *J Leukoc Biol* 1997;61:106-112.
- 290.Thivierge M, Alami N, Muller E, de Brum-Fernandes AJ, Rola-Pleszczynski M. Transcriptional modulation of platelet-activating factor receptor gene expression by cyclic AMP. *J Biol Chem* 1993;268:17457-17462.
- 291.Chaqour B, Howard PS, Richards CF, Macarak EJ. Mechanical stretch induces platelet-activating factor receptor gene expression through the NF-kappaB transcription factor. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1345-1355.
- 292.Ihida K, Predescu D, Czekay RP, Palade GE. Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Sci* 1999;112:285-295.
- 293.Wilkens JH, Wilkens H, Uffmann J, Bovers J, Fabel H, Frolich JC. Effects of a PAF-antagonist (BN 52063) on bronchoconstriction and platelet activation during exercise induced asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1990;29:85-91.
- 294.Elbers ME, Gerritsen MJ, van de Kerkhof PC. The effect of topical application of the platelet-activating factor-antagonist, Ro 24-0238, in psoriasis vulgaris--a clinical and immunohistochemical study. *Clin Exp Dermatol* 1994;19:453-457.
- 295.Grino JM. BN 52021: a platelet activating factor antagonist for preventing post-transplant renal failure. A double-blind, randomized study. *Ann Intern Med* 1994;121:345-347.



296. Nathan N, Mercury P, Denizot Y, Cornu E, Laskar M, Arnoux B, Feiss P. Effects of the platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 on hematologic variables and blood loss during and after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1994;79:205-211.
297. Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995;82:1414-1420.
298. Hilliquin P, Guinot P, Chermat-Izard V, Puechal X, Menkes CJ. Treatment of rheumatoid arthritis with platelet activating factor antagonist BN 50730. *J Rheumatol* 1995;22:1651-1654.
299. Brochet B, Guinot P, Orgogozo JM, Confavreux C, Rumbach L, Lavergne V. Double blind placebo controlled multicentre study of ginkgolide B in treatment of acute exacerbations of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:360-362.
300. Dhainaut JF, Tenaillon A, Le Tulzo Y, Schlemmer B, Solet JP, Wolff M, Holzapfel L, Zeni F, Dreyfuss D, Mira JP. Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Crit Care Med* 1994;22:1720-1728.
301. Dhainaut JF, Tenaillon A, Hemmer M, Damas P, Le Tulzo Y, Radermacher P, Schaller MD, Sollet JP, Wolff M, Holzapfel L, Zeni F, Vedrinne JM, de Vathaire F, Gourlay ML, Guinot P, Mira JP. Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med* 1998;26:1963-1971.
302. Suputtamongkol Y, Intaranongpai S, Smith MD, Angus B, Chaowagul W, Permpikul C, Simpson JA, Leelarasamee A, Curtis L, White NJ. A double-blind placebo-controlled study of an infusion of lexipafant (Platelet-activating factor receptor antagonist) in patients with severe sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:693-696.
303. Vincent JL, Spapen H, Bakker J, Webster NR, Curtis L. Phase II multicenter clinical study of the platelet-activating factor receptor antagonist BB-882 in the treatment of sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:638-642.



- 304.Min JH, Jain MK, Wilder C, Paul L, Apitz-Castro R, Aspleaf DC, Gelb MH. Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase. *Biochemistry* 1999;38:12935-12942.
- 305.Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids* 1991;26:979-985.
- 306.Stafforini DM, Rollins EN, Prescott SM, McIntyre TM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* 1993;268:3857-65.
- 307.Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1996;271:33032-33038.
- 308.Hattori M, Arai H, Inoue K. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1993;268:18748-18753.
- 309.Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997;272:17895-17898.
- 310.Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:161-173.
- 311.Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995;374:549-553.
- 312.Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;262:4215-4222.
- 313.Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1989;264:8467-8470.
- 314.Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S, Takamatsu M. Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of PAF



acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2. *J Clin Invest* 1991;87:476-481.

315.Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Takamatsu S. Effect of 17 beta-estradiol on secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by HepG2 cells. *Metabolism* 1993;42:672-677.

316.Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Takamatsu S. High-density lipoprotein inhibits the production of platelet activating factor acetylhydrolase by HepG2 cells. *J Lab Clin Med* 1994;123:225-231.

317.Narahara H, Johnston JM. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor-acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:531-537.

318.Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, Kovacich JC, Canty TG Jr, Chi E, Pohlman TH, Verrier ED. Platelet-activating factor acetylhydrolase prevents myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1999;100(Suppl):365-368.

319.Kim JD, Baker CJ, Roberts RF, Darbinian SH, Marcus KA, Quardt SM, Starnes VA, Barr ML. Platelet activating factor acetylhydrolase decreases lung reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2000;70:423-428.

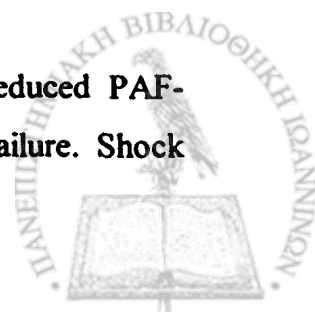
320.Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR. Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* 1994;22:204-212.

321.Tetta C, Bussolino F, Modena V, Montrucchio G, Segoloni G, Pescarmona G, Camussi G. Release of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91:244-256.

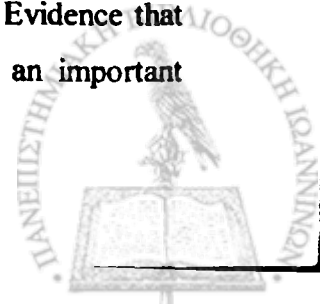
322.Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1988;82:1983-1991.

323.Caplan MS, Sun XM, Hseuh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;116:960-964.

324.Partrick DA, Moore EE, Moore FA, Biffl WL, Barnett CC. Reduced PAF-acetylhydrolase activity is associated with postinjury multiple organ failure. *Shock* 1997;7:170-174.



- 325.Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of the platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989;37:673-682.
- 326.Satoh K, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke* 1992;23:1090-1092.
- 327.Hofmann B, Ruhling K, Spangenberg P, Ostermann G. Enhanced degradation of platelet-activating factor in serum from diabetic patients. *Haemostasis* 1989;19:180-184.
- 328.Dulicoust A, Hilliquin P, Menkes CJ, Benveniste J, Arnoux B. Paf-acether acetylhydrolase activity is increased in patients with rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 1992;21:161-164.
- 329.Imaizumi T, Satoh K, Yoshida H, Kawamura Y, Hiramoto M, Koyanagi M, Takamatsu S, Takamatsu M. Activity of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase in plasma from healthy habitual cigarette smokers. *Heart Vessels* 1990;5:81-86.
- 330.Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem* 1992;267:15168-15175.
- 331.Smiley PL, Stremmler KE, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1991;266:11104-11110.
- 332.Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999;274:28395-28404.
- 333.Tanaka T, Minamino H, Umezaki S, Tsukatani H, Tokumura A. Formation of platelet-activating factor-like phospholipids by Fe²⁺/ascorbate/EDTA-induced lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1993;1166:264-274.
- 334.Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important



role in early atherogenesis : in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086. *Circ Res* 1999;85:311-318.

335.Hamasaki Y, Mojarad M, Saga T, Tai HH, Said SI. Platelet-activating factor raises airway and vascular pressures and induces edema in lungs perfused with platelet-free solution. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:742-746.

336.Burhop KE, Garcia JG, Selig WM, Lo SK, van der Zee H, Kaplan JE, Malik AB. Platelet-activating factor increases lung vascular permeability to protein. *J Appl Physiol* 1986;61:2210-2217.

337.Christman BW, Lefferts PL, King GA, Snapper JR. Role of circulating platelets and granulocytes in PAF-induced pulmonary dysfunction in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988;64:2033-2041.

338.Angle MJ, Pinckard RN, Showell HJ, McManus LM. Ontogeny of the responsiveness to intravenous platelet-activating factor. *Lab Invest* 1987;57:321-328.

339.Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987;79:1498-1509.

340.Matsumoto K, Taki F, Kondoh Y, Taniguchi H, Takagi K. Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19:509-515.

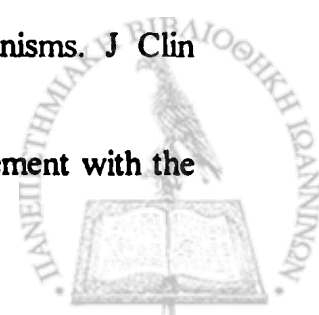
341.Sorensen J, Kald B, Tagesson C, Lindahl M. Platelet-activating factor and phospholipase A2 in patients with septic shock and trauma. *Intens Care Med* 1994;20:555-561.

342.Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 1999;104:1071-1076.

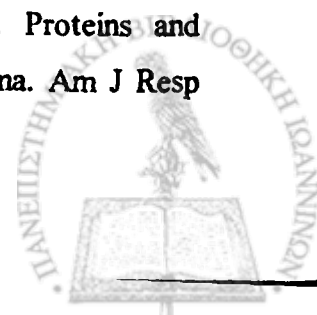
343.Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM, Topham MK, Weyrich AS, Whatley RE. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 1996;416:297-304.

344.Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 1995;96:107-116.

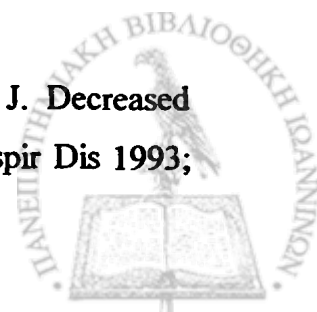
345.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.



- 346.Doumas BT, Biggs HG. Determination of serum albumin. In Cooper GA, editor. *Standard methods of Clinical Chemistry*. 1972; Academic Press , NY. 175.
- 347.Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
- 348.Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466-468.
- 349.Bossant MJ, Ninio E, Delautier D, Benveniste J. Bioassay of paf-acether by rabbit platelet aggregation. *Methods Enzymol* 1990;187:125-130.
- 350.Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1250-1257.
- 351.Jefferies AL, Kawano T, Mori S, Burger R. Effect of increased surface tension and assisted ventilation on 99mTc-DTPA clearance. *J Appl Physiol* 1988;64:562-568.
- 352.Nieman G, Ritter-Hrncirik C, Grossman Z, Witanowski L, Clark W, Bredenberg C. High alveolar surface tension increases clearance of technetium 99m diethylenetriamine-pentaacetic acid. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100:129-133.
- 353.Albert RK, Lakshminarayan S, Hildebrandt J, Kirk W, Butler J. Increased surface tension favors pulmonary edema formation in anesthetized dogs' lungs. *J Clin Invest* 1979;63:1015-1018.
- 354.Simon RP. Neurogenic pulmonary edema. *Neurol Clin* 1993;11:309-323.
- 355.Oyarzun MJ, Clements JA. Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators, and prostaglandins in the rabbit. *Am Rev Resp Dis* 1978;117:879-891.
- 356.Nicholas TE, Barr HA. The release of surfactant in rat lung by brief periods of hyperventilation. *Respir Physiol* 1983;52:69-83.
- 357.Nicholas TE, Power JH, Barr HA. The pulmonary consequences of a deep breath. *Respir Physiol* 1982;49:315-24.
- 358.Veldhuizen RA, Tremblay LN, Govindarajan A, van Rozendaal BA, Haagsman HP, Slutsky AS. Pulmonary surfactant is altered during mechanical ventilation of isolated rat lung. *Crit Care Med* 2000;28:2545-2551.
- 359.Van Golde LM, Batenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 1988;68:374-455.
- 360.Nakos G, Pneumatos J, Tsangaris I, Tellis C, Lekka M. Proteins and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pulmonary edema. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;155:945-951.



361. Bersten AD, Doyle IR, Davidson KG, Barr HA, Nicholas TE, Kermeen F. Surfactant composition reflects lung overinflation and arterial oxygenation in patients with acute lung injury. *Eur Respir J* 1998;12:301-308.
362. Veldhuizen RA, Marcou J, Yao LJ, McCaig L, Ito Y, Lewis JF. Alveolar surfactant aggregate conversion in ventilated normal and injured rabbits. *Am J Physiol* 1996;270:L152-158.
363. Lewis JF, Veldhuizen R, Possmayer F, Sibbald W, Whitsett J, Qanbar R, McCaig L. Altered alveolar surfactant is an early marker of acute lung injury in septic adult sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:123-130.
364. Holm BA, Enhorning G, Notter RH. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids* 1988;49:49-55.
365. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:428-442.
366. Bowton DL. Nosocomial pneumonia in the ICU-Year 2000 and beyond. *Chest* 1999;115 (3 Suppl):28S-33S.
367. Pittet D, Bonten MJ. Towards invasive diagnostic techniques as standard management of ventilator-associated pneumonia. *Lancet* 2000;356:874.
368. Cook D, Walter S, Cook R, Griffith L, Guyatt G, Leasa D, Jaeschke M, Brun-Buisson C. Incidence and risk factors for ventilator associated pneumonia in critically-ill patients. *Ann Intern Med* 1998;129:433-440.
369. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med*. 1972 Nov;77(5):701-6.
370. Bonten MJ, Bergmans DC, Ambergen AW, de Leeuw PW, van der Geest S, Stobberingh EE, Gaillard CA. Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1339-1346.
371. Hallman M, Maasilta P, Kivisaari L, Mattson K. Changes in surfactant in bronchoalveolar lavage fluid after hemithorax irradiation in patients with mesothelioma. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:998-1005.
372. Baughman RP, Sternberg RI, Hull W, Buchsbaum JA, Whitsett J. Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:653-657.



- 373.Hoffman AG, Lawrence MG, Ognibene FP, Suffredini AF, Lipschik GY, Kovacs JA, Masur H, Shelhamer JH. Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and pneumocystis carinii pneumonia. *Chest* 1992;102:1730-1736.
- 374.Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, Longacre S, Vargaftig BB, Bereziat G, Voelker DR, Wolf C, Touqui L. Generation of lysophospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 1998;102:1152-1160.
- 375.el-Ebiary M, Soler N, Monton C, Torres A. Markers of ventilator-associated pneumonia. *Clin Intensive Care* 1995;6:121-126.
- 376.Brown ES, Johnson RP, Clements JA. Pulmonary surface tension. *J Appl Physiol* 1959;14:717-720.
- 377.Faridy EE. Effect of ventilation on movement of surfactant in airways. *Respir Physiol* 1976;27:323-334.
- 378.Mahfood S, Hix WR, Aaron BL, Blaes P, Watson DC. Reexpansion pulmonary edema. *Ann Thorac Surg* 1988;45:340-345.
- 379.Sugiura M., P.R. McCulloch, S. Wren, R.H. Dawson, and A.B. Froese. 1994. Ventilator pattern influences neutrophil influx and activation in atelectasis-prone rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 77:1355-65.

