

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ  
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»*

**ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ  
ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ  
ΒΛΑΒΗ ΑΠΟ ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΑΕΡΙΣΜΟ  
(VILI) ΣΕ ΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

---

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΟΛΟΥΔΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Δημήτριο Γεωργόπουλο για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη του, την Αικατερίνη Βαπορίδη για την πολύτιμη βοήθεια της στο σχεδιασμό των πειραμάτων και την καθοριστική της συμβολή στην πραγματοποίηση αυτής της μελέτης. Επίσης ευχαριστώ τους Γεώργιο Πρινιαννάκη και Ευμορφία Κονδύλη από την Μ.Ε.Θ. του Πε.Πα.Γ.Ν.Η. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ειρήνη Μπιμπάκη και Χαράλαμπο Ψαρολογάκη για τη βοήθεια, την ευχάριστη συνεργασία και τη φιλία τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Ανδρέα Μαργιωρή και ειδικότερα τον κ. Χρήστο Τσατσάνη για το χρόνο, τη συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσέφερε. Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα τις Αριάδνη Ανδρουλιδάκη και Βάσω Ζαχαριουδάκη για την βοήθεια τους στο πειραματικό σκέλος της εργασίας.

Η μεταπτυχιακή αυτή διατριβή έγινε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διαγνωστική και Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου», θα ήθελα επομένως να ευχαριστήσω τον πρόεδρο Δημήτριο Μπούμπα, τον αντιπρόεδρο Βασίλειο Ζαννή, τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος και την άριστη γραμματειακή μας υποστήριξη (Μαίρη Αδαμάκη) για την υποστήριξή τους και την ευκαιρία που μου προσέφεραν να ασχοληθώ με αυτό το πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναστάσιο Κουτσόπουλο για την βοήθεια του στις ιστοπαθολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Τέλος Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Δημήτριο Καννέλη, Ιωάννη Λέρη και Μαρία Μουτάφη για την ηθική τους υποστήριξη και την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	2
ΠΕΡΙΛΥΨΗ.....	4
Στόχος .....	4
Πειραματικός σχεδιασμός.....	4
Μοντέλο οργανισμού .....	4
Πειραματικοί χειρισμοί .....	4
Μετρήσεις και κύρια αποτελέσματα .....	4
Συμπεράσματα .....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
Μηχανικός αερισμός.....	6
Πνευμονική βλάβη από μηχανικό αερισμό (VILI).....	6
Γενικά χαρακτηριστικά της VILI.....	6
Φλεγμονώδης απόκριση στον μηχανικό αερισμό .....	8
Επιφανειοδραστικός παράγοντας και VILI.....	11
Μηχανισμοί επαγωγής της VILI.....	12
Αναζητώντας τη χρυσή τομή των συνθηκών μηχανικού αερισμού για ελαχιστοποίηση της VILI .....	16
Στόχος της παρούσας εργασίας .....	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
Ζώα .....	19
Σχεδιασμός πειράματος .....	19
Μηχανική του αναπνευστικού συστήματος .....	21
Μέτρηση των αρτηριακών αερίων αίματος (ABGs).....	22
Καθορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα .....	22
Υλικά και Συσκευές.....	22
Μέθοδος.....	22
Καθορισμός της συγκέντρωσης της IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα .....	23

Ανάλυση στυπώματος κατά Western .....	24
Υλικά και Συσκευές.....	24
Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων .....	25
Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης .....	26
Μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη.....	28
Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη .....	28
Ιστοπαθολογική ανάλυση .....	29
Στατιστική ανάλυση .....	30
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην μηχανική των πνευμόνων ανάμεσα στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό και ούτε στα ζώα που υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες μηχανικού αερισμού. ....	33
Τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό παρουσίασαν αύξηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Η αύξηση ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες RR <sub>80</sub> VT <sub>12</sub> και RR <sub>160</sub> VT <sub>8</sub> .....	35
Η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες RR <sub>80</sub> VT <sub>12</sub> και RR <sub>160</sub> VT <sub>8</sub> , σε σύγκριση με τις ομάδες RR <sub>120</sub> VT <sub>10</sub> και RR <sub>160</sub> VT <sub>10</sub> . Στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό υγρό δεν ήταν ανιχνεύσιμη. ....	37
Η ιστοπαθολογική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι ο μηχανικός αερισμός στις ομάδες RR <sub>80</sub> VT <sub>12</sub> και RR <sub>160</sub> VT <sub>8</sub> σχετίζεται με προστατευτική δράση ενάντια στην ανάπτυξη της VILI. ....	39
Η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 αυξήθηκε σε όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στην ομάδα RR <sub>80</sub> VT <sub>12</sub> η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. ....	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	45
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	51

## ΠΕΡΙΛΥΨΗ

### Στόχος

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της αναπνευστικής συχνότητας σε σταθερό PaCO<sub>2</sub> και συμβατικό όγκο αερισμού στην ανάπτυξη της βλάβης πνεύμονα επαγόμενη από μηχανικό αερισμό σε έναν φυσιολογικό πνεύμονα

### Πειραματικός σχεδιασμός

Προοπτική, τυχαιοποιημένη πειραματική μελέτη

### Μοντέλο οργανισμός

Ενήλικα αρσενικά C57BL/6 ποντίκια.

### Πειραματικοί χειρισμοί

Τέσσερις ομάδες αναισθητοποιημένων ποντικίων υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό με διαφορετική αναπνευστική συχνότητα (RR) και όγκο αερισμού (V<sub>T</sub>). Συνολικά υπήρχαν τέσσερις ομάδες, οι τρεις πρώτες ήταν RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub>, RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> όπου αριθμός που είναι δείκτης του RR δείχνει την αναπνευστική συχνότητα (σε αναπνοές ανά λεπτό) και ο δείκτης του VT των όγκο αερισμού (σε mL/kg), οι αλλαγές στον όγκο αερισμού ανάλογα με την τιμή της αναπνευστικής συχνότητας της ομάδες ήταν απαραίτητες για να επιτύχουμε φυσιολογικές τιμές PaCO<sub>2</sub>. Μία τέταρτη ομάδα υποβλήθηκε σε μηχανικό αερισμό σε αναπνευστική συχνότητα 160 αναπνοών ανά λεπτό και όγκο αερισμού 10 mL/kg με κατάλληλη ρύθμιση του νεκρού χώρου. Όλες οι ομάδες μηχανικού αερισμού υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό για 2 ώρες με θετική τελοεκπνευστική πίεση 1.5 cm H<sub>2</sub>O και 100% οξυγόνο. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν και με ζώα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό

### Μετρήσεις και κύρια αποτελέσματα

Τα αέρια αρτηριακού αίματος και οι στατικές καμπύλες πίεσης-όγκου δεν διέφεραν ανάμεσα στις ομάδες στο τέλος του πειράματος. Ανεξάρτητα από τις συνθήκες αερισμού, ο μηχανικός αερισμός συσχετίστηκε με αυξημένη συνολική συγκέντρωση

πρωτεϊνών και η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Ωστόσο η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών και η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη αύξηση στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, ο μηχανικός αερισμός συσχετίστηκε με ενεργοποίηση των κινασών AKT and ERK1/2, που είναι γνωστό ότι ενεργοποιούνται κατά την υπερδιάταση. Η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 ήταν μικρότερη στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Η ιστολογική βλάβη δε διέφερε σημαντικά στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub>, RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> και στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό, ωστόσο αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>.

### **Συμπεράσματα**

Ο μηχανικός αερισμός με συμβατικό όγκο αερισμού προκαλεί βλάβη σε φυσιολογικό πνεύμονα ακόμα και χωρίς να παρατηρηθούν μεταβολές στη μηχανική του αναπνευστικού συστήματος. Μείωση της συχνότητας αναπνοής όπως και του όγκου αερισμού δρα προστατευτικά για την ανάπτυξη βλάβης και φλεγμονής στον πνεύμονα.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Μηχανικός αερισμός

Ο μηχανικός αερισμός είναι ένας από τους ακρογωνιαίους λίθους της θεραπείας στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ.). Τα επίπεδα θνητότητας από το ALI και το ARDS (4) είναι περίπου 40 με 50 τοις εκατό (5-8). Από την πρώτη περιγραφή του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS = acute respiratory distress syndrome) το 1967 (9) και την πρώτη περιγραφή της αγωγής του ARDS με μηχανικό αερισμό το 1971 (10), η μόνη θεραπευτική παρέμβαση που έδειξε μία σημαντική μείωση στα ποσοστά θνητότητας των ασθενών με ARDS και σύνδρομο οξείας βλάβης πνεύμονα (ALI = acute lung injury) είναι μία προστατευτική για τον πνεύμονα στρατηγική μηχανικού αερισμού. Καμία φαρμακευτική παρέμβαση δεν έχει καταφέρει να μειώσει τα ποσοστά θνητότητας σε κλινικές μελέτες ευρείας κλίμακας (8).

### Πνευμονική βλάβη από μηχανικό αερισμό (VILI)

#### Γενικά χαρακτηριστικά της VILI

Παρόλο που ο μηχανικός αερισμός σώζει ζωές, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στον πνεύμονα είτε αυτός είναι υγιής είτε όχι, μία διεργασία που ονομάζεται πνευμονική βλάβη από μηχανικό αερισμό. Η πνευμονική βλάβη από μηχανικό αερισμό (VILI = ventilator-induced lung injury) αποδίδεται στην υπερδιάταση και τις στρεβλωτικές δυνάμεις που ασκούνται στα πνευμονοκύτταρα κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού (3).

## Βασικές έννοιες

### Σύνδρομο οξείας

αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και σύνδρομο οξείας βλάβης πνεύμονα (ALI):

*είναι μία σοβαρή αντίδραση σε διάφορες μορφές βλάβης του πνεύμονα.*

*Προκαλείται από διάχυτη κυψελιδική βλάβη και πνευμονικό οίδημα μη καρδιογενούς αιτιολογίας, που οδηγεί σε μειωμένη ανταλλαγή αερίων με ταυτόχρονη απελευθέρωση μεσολαβητών φλεγμονής που προκαλούν φλεγμονή, υποξαιμία και συχνά οδηγεί σε ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων. Μία πιο ήπια μορφή ονομάζεται σύνδρομο οξείας βλάβης πνεύμονα*

### Ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (MODS):

*είναι η παρουσία αλλαγμένης λειτουργίας οργάνων σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, σε σημείο που η ομοιόσταση του οργανισμού δε μπορεί να διατηρηθεί απουσία θεραπευτικής παρέμβασης. Συνήθως αφορά δύο ή περισσότερα συστήματα οργάνων*

Ο όγκος αερισμού ( $V_T$ : tidal volume) και η θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP: positive end expiratory pressure) αναγνωρίζονται σήμερα ως οι κύριοι παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη της πνευμονικής βλάβης από μηχανικό αερισμό (VILI).

Το 1974 οι Webb και Tierney έδειξαν ότι ο μηχανικός αερισμός με υψηλή κορυφή πίεσης αεραγωγών οδηγεί σε πνευμονικό οίδημα, ρήξη των κυψελίδων, διαρροή από τα τριχοειδή και θάνατο (11). Επιπλέον μελέτες αποκάλυψαν ότι ο τελοεισπνευστικός όγκος και όχι η τελοεισπνευστική πίεση ήταν ο κύριος παράγοντας της βλάβης (τραύμα από όγκο - volutrauma).

Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι το κυκλικό άνοιγμα και κατάρρευση των κυψελίδων, ακόμα και σε παρουσία χαμηλής εισπνευστικής πίεσης και όγκου, οδηγεί σε βλάβη στον πνεύμονα και δυσλειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα (12-14). Αυτό το τραύμα από ατελεκτασία (atelectrauma) μπορεί να εξασθενήσει με την αύξηση της θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (PEEP) (11, 15).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο μηχανικός αερισμός επάγει την έκφραση πνευμονικών κυτταροκινών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μία φλεγμονώδη αντίδραση επιδεινώνοντας την πνευμονική βλάβη (βιοτραύμα - biotrauma). Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση δεν περιορίζεται στους πνεύμονες αλλά επιστρατεύει τη συστηματική κυκλοφορία και δρα σε περιφερειακά τελικά όργανα, γεγονός το οποίο προσφέρει μία εξήγηση για την παρατήρηση ότι οι ασθενείς με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας δεν πεθαίνουν από

## Βασικές έννοιες (συνέχεια)

Μηχανικός αερισμός (MV): είναι μία μηχανική μέθοδος για να βοηθηθεί ή να αντικατασταθεί η αυτόβουλη αναπνοή όταν αυτή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί από τους ίδιους τους ασθενείς.

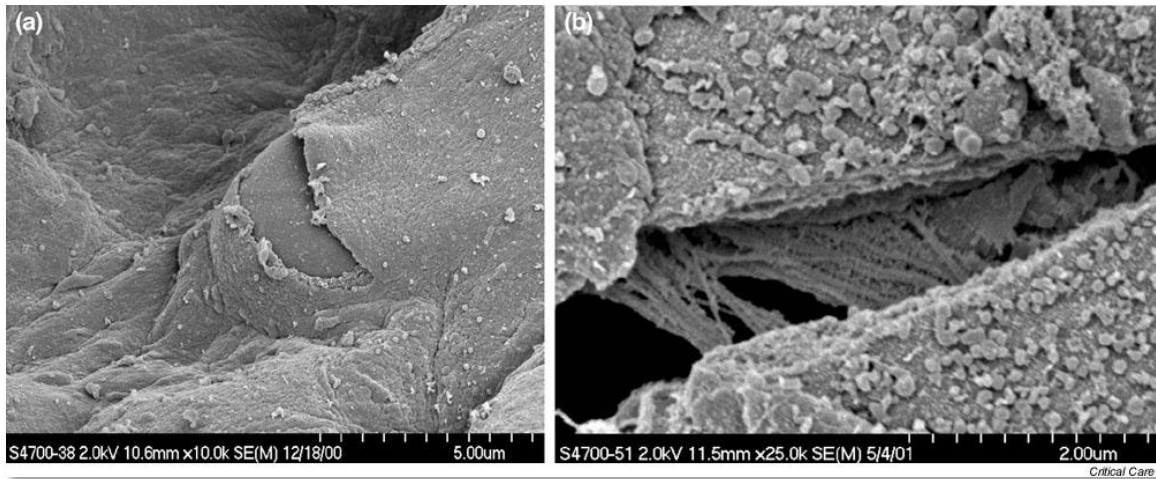
Πίεση αεραγωγών (Paw): είναι η θετική πίεση η οποία ασκείται στους αεραγωγούς του ασθενούς για να υπερπηδηθεί η αντίσταση του αναπνευστικού συστήματος και να επιτρέψει στον αέρα να εισέλθει στους αεραγωγούς και να οξυγονώσει τον πνεύμονα.

Όγκος αερισμού ( $V_T$ ): Ο όγκος αέρα ο οποίος εισέρχεται ή εξέρχεται κατά την αναπνοή.

Θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP): Εκφράζεται ως η επιπλέον πίεση (πάνω της ατμοσφαιρικής) στο τέλος του εκπνευστικού κύκλου.



αναπνευστική ανεπάρκεια αλλά από σύνδρομο ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων (MODS = Multiple Organ dysfunction syndrome) (16).

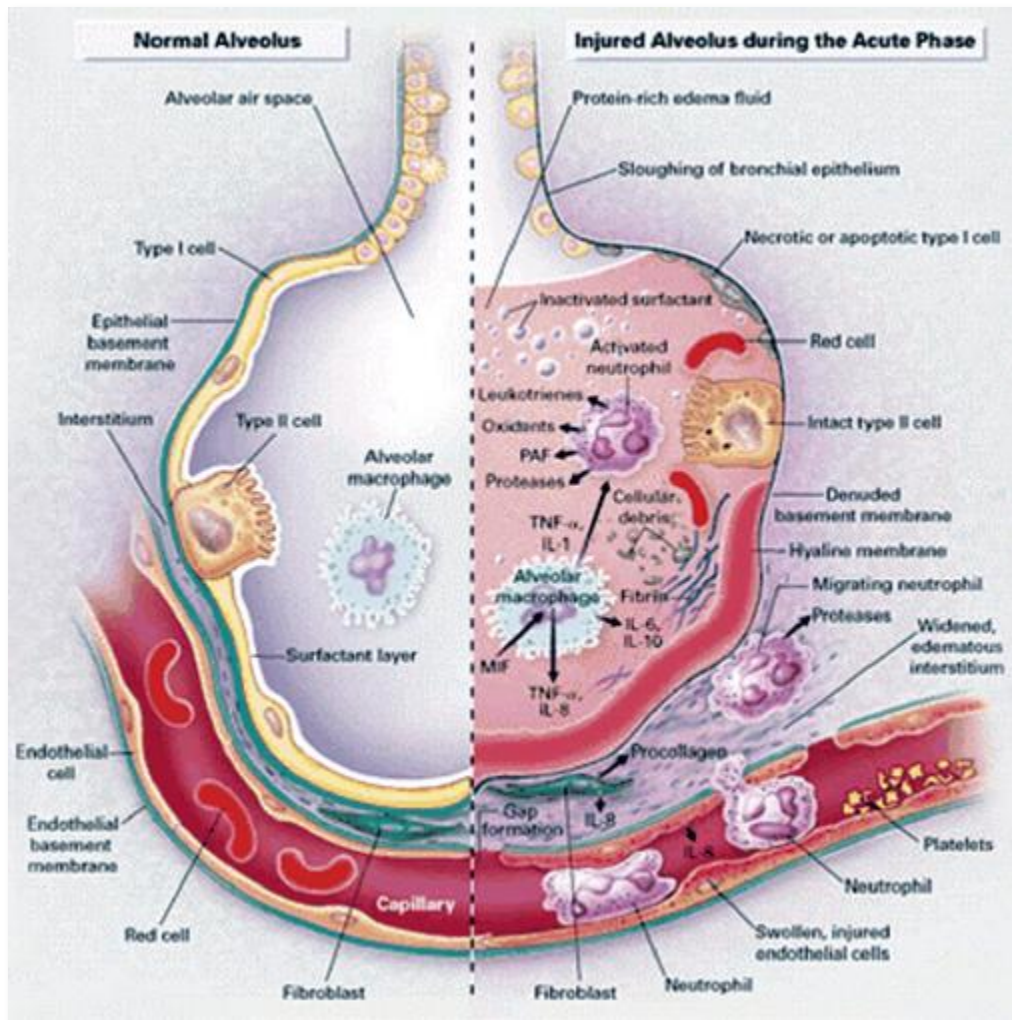


**Εικόνα 1** Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από πνεύμονα κουνελιού που υπέστη βλάβη από υψηλή εισπνευστική πίεση, χαμηλή θετική τελοεκπνευστική πίεση και υψηλή αγγειακή πίεση εισροής. (a) Ρήξη τριχοειδούς από μηχανικό στρες με εξαγγείωση ερυθροκυττάρου στα αρχικά στάδια (b) Σε μεγαλύτερη ανάλυση βλέπουμε ρήξη από μηχανικό στρες όπου διακρίνονται ίνες κολλαγόνου (1).

### Φλεγμονώδης απόκριση στον μηχανικό αερισμό

Η πνευμονική βλάβη και φλεγμονή είναι μία πολύπλοκη διεργασία όπου οι κυτταροκίνες διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο. Οι κυτταροκίνες είναι διαλυτές πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους οι οποίες μεταφέρουν σήματα μεταξύ κυττάρων που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη απόκριση (17). Παράγονται από τα βρογχικά, βρογχιολικά και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα (18) αλλά επίσης από κυψελιδικά μακροφάγα και ουδετερόφιλα (19).

Η ισορροπία ανάμεσα στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες: tumor necrosis factor – α (TNF-α), interleukin - 1 (IL-1), IL-6 και IL-8 και στις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-10 είναι πολύ σημαντική για τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης (20). Μερικές από τις κυτταροκίνες έχουν φυσικούς ανταγωνιστές όπως για παράδειγμα ο IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την εκτίμηση της επενέργειας τους (21, 22).



**Εικόνα 2** Παθοφυσιολογική εικόνα παρουσία πολύ σοβαρής πνευμονικής βλάβης

Ο TNF-α και η IL-1 επάγουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ, ένα κρίσιμο βήμα για την ενεργοποίηση των γονιδίων απαραίτητων για τη διαιώνιση της απόκρισης της φυσικής ανοσίας η οποία τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση και εξαγγείωση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (PMNs) και άλλων ανοσολογικά ενεργών κυττάρων, μία διεργασία η οποία ξεκινάει μέσα σε λεπτά μετά την έναρξη του μηχανικού αερισμού (23). Τα λευκοκύτταρα ενεργοποιούνται και επιστρατεύονται στον πνεύμονα από τις χημειοκίνες CXC και την IL-8 (24). Ωστόσο, η κυψελιδική στρατολόγηση των PMNs με ενστάλαξη μίας χημειοτακτικής ουσίας (LTB<sub>4</sub>) δεν οδηγεί σε πνευμονική βλάβη (25), γεγονός που μας υποδεικνύει ότι άλλοι παράγοντες, πιθανόν κυτταροκίνες, είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση των PMNs. Η ενεργοποίηση και η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του βιοτραύματος. Πειραματικές μελέτες που χρησιμοποιούσαν ζώα που τους είχαν αφαιρεθεί τα PMNs έδειξαν πολύ μικρότερο βαθμό της VILI στα ζώα αυτά (26).

Επίσης παρατηρείται καθυστερημένη απόπτωση λευκοκυττάρων σε ασθενείς με οξεία βλάβη πνεύμονα (ALI) ενηλίκων και χρόνια νεογνική ασθένεια του πνεύμονα (CLD) (27, 28), σε αντίθεση με τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα (29, 30) και άλλα περιφερειακά όργανα που παρουσιάζουν αυξημένη απόπτωση (31). Επώαση φυσιολογικών PMNs με βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ARDS οδηγεί σε καθυστερημένη απόπτωση σε αντίθεση με τα PMNs που επωάζονται με φυσιολογικό βρογχοκυψελιδικό υγρό (32). Η αναστολή της απόπτωσης των ουδετερόφιλων φαίνεται ότι διαμεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες όπως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, πιθανόν από τις IL-8 και IL-2 (33), τον G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) και GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), όπως επίσης φαίνεται ότι και τα επίπεδα του διαλυτού FAS-ligand είναι μεγαλύτερα σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα προερχόμενο από ασθενείς με ARDS που δεν επιβίωσαν σε σύγκριση με αυτό των ασθενών που επιβίωσαν (32). Επιπρόσθετα, χορήγηση διαλυτού ανασυνδυασμένου ανθρώπινου Fas-ligand οδήγησε σε αυξημένη κυψελιδική απόπτωση και βλάβη (34).

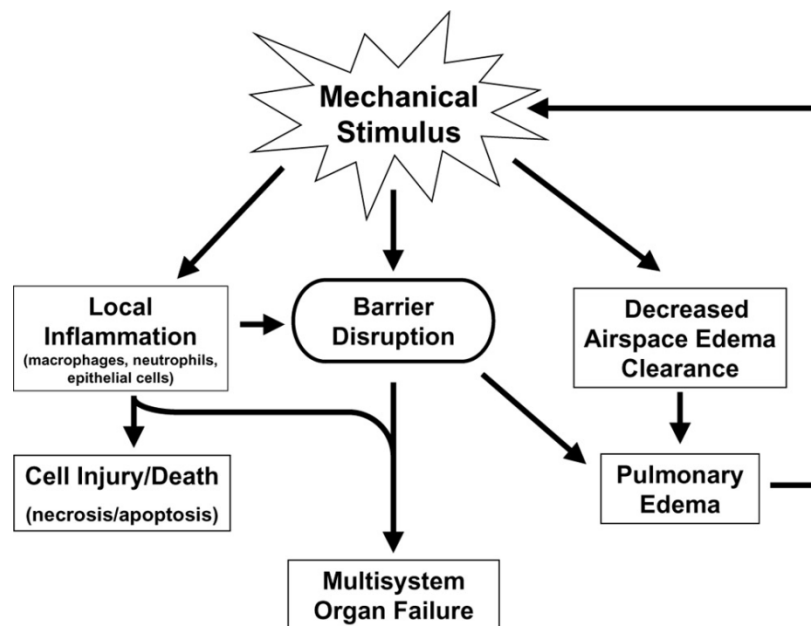
## Επιφανειοδραστικός παράγοντας και VILI

Η ανακάλυψη του επιφανειοδραστικού παράγοντα ακολούθησε την παρατήρηση ότι η παρατηρούμενη επιφανειακή τάση των πνευμόνων ήταν κατά πολύ μικρότερη από την υπολογιζόμενη με το νόμο του Laplace. Διαπιστώθηκε ότι αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μιας λιπιδικής μονοστοιβάδας που επικαλύπτει τις κυψελίδες και μειώνει την επιφανειακή τους τάση. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας αποτελείται κατά 85% από φωσφολιπίδια και κατά 10% από πρωτεΐνες. Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων έχει μια ειδική στερεοδομή που του επιτρέπει να ελαττώνει την επιφανειακή τάση στις κυψελίδες αποτρέποντας την σύγκλιση τους. Ο μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα περιλαμβάνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών, το σχηματισμό του συμπλόκου με τα φωσφολιπίδια στα lamellar bodies, την εξωκυττάρωση, και στη συνέχεια την απομάκρυνση και ενδοκυττάρια ανακύκλωση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι 4, οι υδρόφιλες A, και D, και οι υδρόφοβες B και C. Οι πρωτεΐνες B και C είναι πολύ βασικές στη σύνθεση και στη διατήρηση της μονοστοιβάδας του επιφανειοδραστικού παράγοντα (35).

Είναι γνωστό ότι η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα οδηγεί σε σύνδρομο οξείας βλάβης πνεύμονα (36). Έχει βρεθεί επίσης σε ασθενείς με οξεία βλάβη πνεύμονα μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα καθώς και μείωση της λειτουργικότητας του επιφανειοδραστικού παράγοντα (37, 38). Φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως ο TNF- $\alpha$  που εκκρίνονται στη VILI και παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξεία βλάβη πνεύμονα έχει βρεθεί ότι καταστέλλουν την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (39). Ειδικά έχει βρεθεί ότι ο TNF- $\alpha$  μπορεί να καταστείλει τη σύνθεση τόσο της φωσφατυδυλοχολίνης, βασικού συστατικού των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (40) όσο και πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα, στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (39). Τέλος οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται στη VILI μπορούν να προκαλέσουν και έμμεση μείωση της λειτουργικότητας του επιφανειοδραστικού παράγοντα με το να επάγουν τη διαρροή πρωτεϊνών από τις κυψελίδες οι οποίες τον αναστέλλουν (41).

### Μηχανισμοί επαγωγής της VILI

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί (Εικόνα 3) μέσω των οποίων γίνεται οι απελευθέρωση των μεσολαβητών κατά τον μηχανικό αερισμό: αλλαγές στη δομή του κυτταροσκελετού χωρίς να προκαλείται βλάβη πέραν της δομής – mechanotrasduction (σημ. σε ελεύθερη μετάφραση μηχανομετατροπή), ρήξη του κυψελιδικού φραγμού επαγόμενη από μηχανικό στρες – decompartmentalisation (αποδιαμερισματοποίηση), ρήξη της μεμβράνης επαγόμενη από μηχανικό στρες (νέκρωση) και επιδράσεις στην αγγείωση ανεξάρτητα από υπερδιάταση ή ρήξη.



Critical Care

**Εικόνα 3** Πιθανοί μηχανισμοί ανάπτυξης βλάβης επαγόμενης από μηχανικό αερισμό. Ο μηχανικός αερισμός επάγει μηχανικό στρες στον πνεύμονα. Αυτές οι δυνάμεις οδηγούν σε αυξημένη διαπερατότητα και διάρρηξη του αιμο-κυψελιδικού φραγμού. Οι μηχανικές δυνάμεις αυξάνουν επίσης την συγκέντρωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως IL-1β, tumor necrosis factor α, IL-8 and IL-6) στα απομακρυσμένους κυψελιδικούς αεροχώρους του πνεύμονα. Η απώλεια της διαμερισματοποίησης στον πνεύμονα οδηγεί σε απελευθέρωση αυτών των μεσολαβητών στη συστηματική κυκλοφορία όπου διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην δυσλειτουργία των περιφερειακών οργάνων. Το στρες από το μηχανικό αερισμό ελαττώνει επίσης την απομάκρυνση του οιδήματος από τους αεροχώρους που εξαρτάται από την ενεργή μεταφορά νατρίου. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε περαιτέρω σχηματισμό οιδήματος, απώλεια όγκου πνεύμονα και περισσότερη VILI (3).



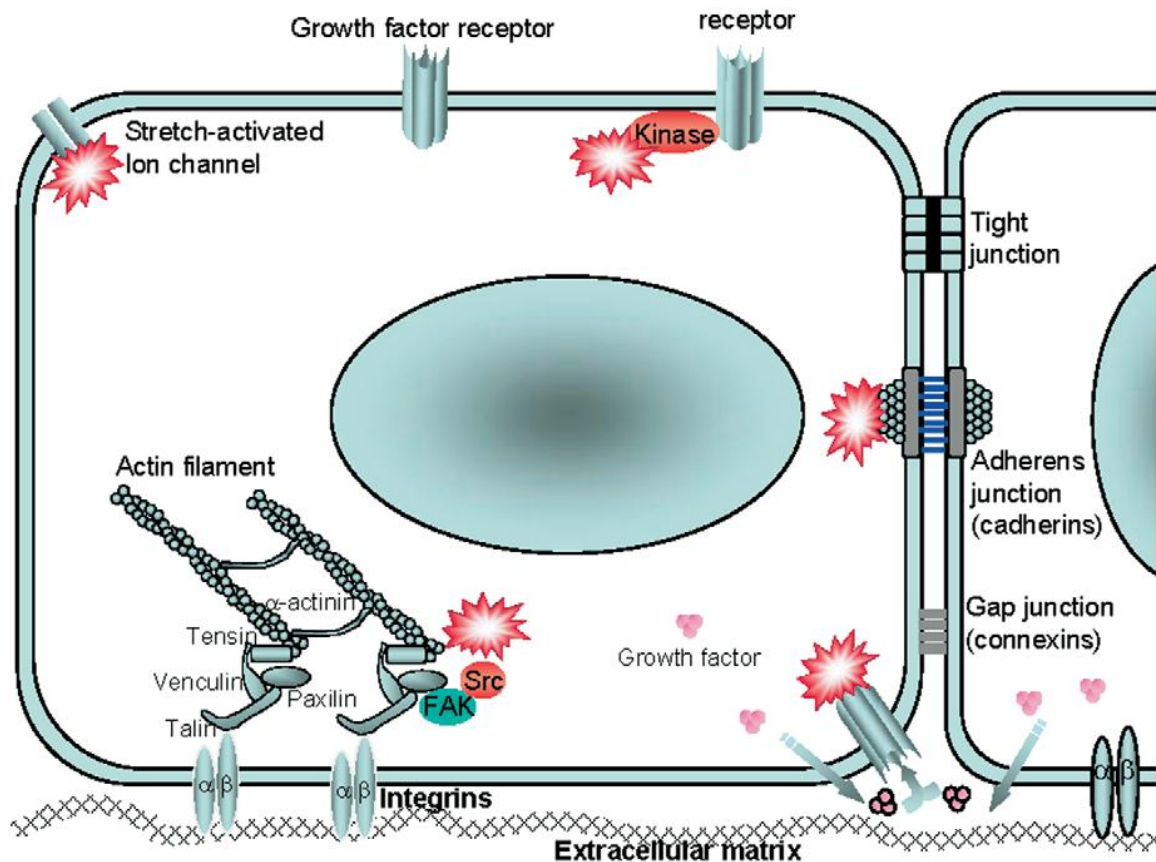
### ***Mechanotransduction***

Ένας από τους πιο ενδιαφέροντες μηχανισμούς της απελευθέρωσης κυτταροκινών είναι το mechanotransduction. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς όπως οι ιντεγκρίνες, τα κανάλια ιόντων που ενεργοποιούνται από υπερδιάταση και ο ίδιος ο κυτταροσκελετός αναγνωρίζονται ως οι κύριες δομές που εμπλέκονται στην αίσθηση των μηχανικών σημάτων που οδηγούν σε αρκετές ενδοκυττάρια διεργασίες (Εικόνα 4) (42, 43). Το mechanotransduction είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων (και όχι μόνο) ως αποτέλεσμα της αίσθησης των μηχανικών σημάτων, και πιθανά σηματοδοτείται από τη mitogen-activated protein kinase (MAPK) (44, 45). Τα περισσότερα κυψελιδικά κύτταρα είναι ικανά να παράγουν προ- και αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 και IL-10 (18, 19, 44, 46-49), όταν διατείνονται *in vitro* (19, 34, 48, 50) ή όταν τα ζώα υποβάλλονται σε μηχανικό αερισμό με υψηλό όγκο αερισμού σε *ex vivo* και *in vivo* πειράματα. Σε πρόωρα νεογνά, η παραγωγή κυτταροκινών φαίνεται να σχετίζεται με το χρόνο κυοφορίας, με μία καθυστερημένη ωρίμανση της αντιφλεγμονώδους απόκρισης (51). Μηχανικός αερισμός που προκαλεί βλάβη επάγει την υπερέκφραση γονιδίων που ενεργοποιούν το c-fos, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή κυτταροκινών (50), κυκλο-οξυγονάσης και intracellular adhesion molecule (ICAM) – 1 (50).

Ο NF- $\kappa$ B, ένας μεταγραφικός παράγοντας, παίζει κεντρικό ρόλο ως κοινός αγγελιοφόρος στην ρύθμιση των κυτταροκινών και της φλεγμονής. Σε πειραματικά μοντέλα, το μπλοκάρισμα του NF- $\kappa$ B μειώνει την VILI (19, 52-54). Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος του mechanotransduction δεν έχει κατανοηθεί πλήρως.

### ***Ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και αποδιαμερισματοποίηση***

Εκτός από το mechanotransduction, η ρήξη της μεμβράνης των κυψελιδικών κυττάρων και η απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση των ενδοκυττάρων κυτταροκινών στο διάμεσο χώρο και αποδιαμερισματοποίηση (decompartmentalization) τόσο στον κυψελιδικό χώρο όσο και στη συστηματική κυκλοφορία (55). Για παράδειγμα έχει δειχθεί ότι μηχανικός αερισμός (χωρίς PEEP) και ταυτόχρονη έγχυση LPS για να επάγει την τοπική παραγωγή TNF- $\alpha$  οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις TNF- $\alpha$  στον ορό και αντίθετα ενδοπεριτοναϊκή ένεση LPS οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα TNF- $\alpha$  στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (56).



**Εικόνα 4** Οι μηχανικοί αισθητήρες στην κύτταροπλασματική μεμβράνη. Ενεργοποιούμενα από υπερδιάταση κανάλια ιόντων, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και άλλων προσδετών, σύμπλοκα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας – ιντεγκρινών – κυτταροσκελετού είναι κοινά αποδεκτοί αισθητήρες της κύτταροπλασματικής μεμβράνης. Στην σηματοδότηση του μηχανικού στρες εμπλέκονται και ενδοκυττάρια μόρια των διακυτταρικών ενώσεων όπως και οι χασματοσυνδέσεις (2).

### *Επιδράσεις στην αγγείωση*

Πειραματικά και κλινικά δεδομένα επιβεβαιώνουν την δυνατότητα του μικροαγγειακού στρες να επηρεάσει τη σοβαρότητα και την εμφάνιση της πνευμονικής βλάβης που σχετίζεται με το μηχανικό αερισμό. Έντονες πιέσεις στο αγγειακό σύστημα του πνεύμονα όχι μόνο επηρεάζουν το οίδημα αλλά προδιαθέτουν την δομική

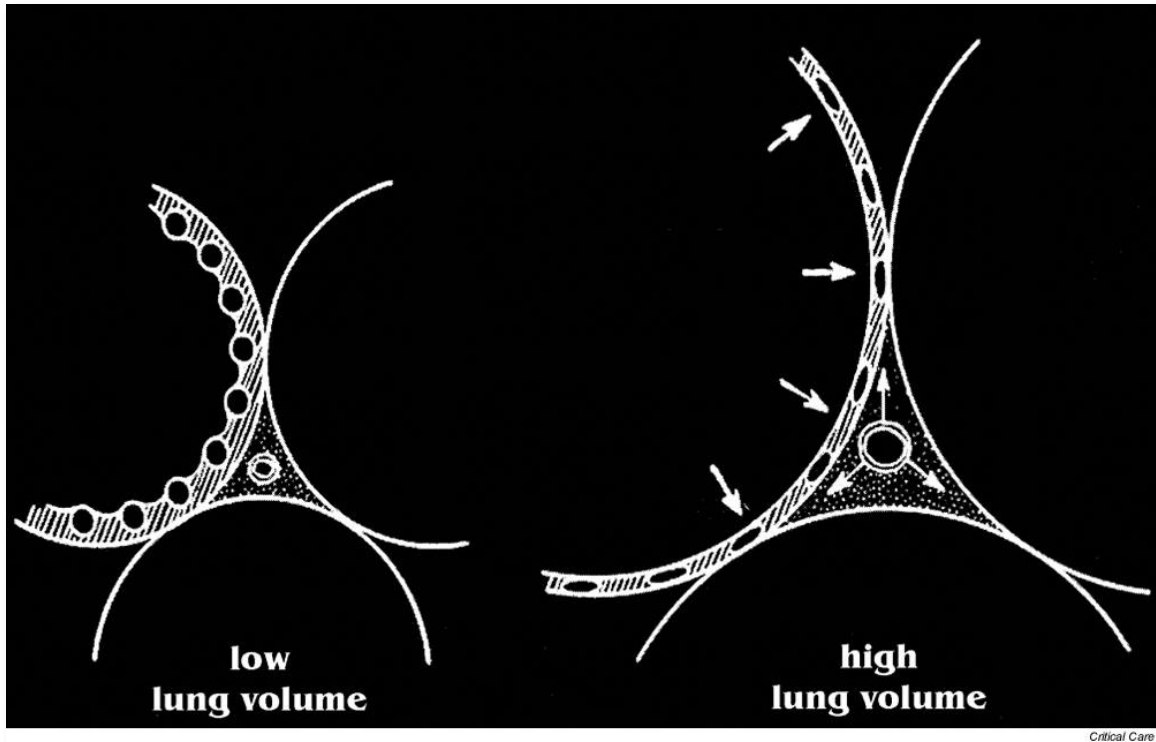
αποσταθεροποίηση του αιμο-κυψελιδικού φραγμού, πιθανόν με δυσμενείς επιπτώσεις για τον πνεύμονα και τα περιφερειακά όργανα

Επειδή οι εύθραυστες κυψελίδες αποτελούν την διεπιφάνεια μεταξύ του αέρα και του αίματος και επειδή οι πιέσεις που εφαρμόζονται στο επιθήλιο των αεραγωγών επηρεάζουν επίσης το αγγειακό ενδοθήλιο, οι πιέσεις και οι ροές εντός των αγγείων είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ανάπτυξη ή/και την εξέλιξη της VILI.

Η συμπεριφορά των κυψελιδικών και εξωκυψελιδικών αγγείων κατά την διαστολή του πνεύμονα είναι θεμελιωδώς διαφορετική. Οι μηχανικές δυνάμεις της αλληλοεξάρτησης προκαλούν μία πτώση στην πίεση του διάμεσου χώρου ακόμα και σε αερισμό θετικής πίεσης (57). Αυτή η μείωση στην πίεση του διάμεσου χώρου τείνει να αυξήσει την διατοιχωματική πίεση των αγγείων και έτσι τα διαστέλλει αυτό το γεγονός αυξάνει την ένταση κυρίως στα αγγεία που βρίσκονται ανοδικά από τις κυψελίδες. Ωστόσο κάτι αρκετά διαφορετικό συμβαίνει στα κυψελιδικά αγγεία. Κατά τη διαστολή του πνεύμονα σε έναν πλήρως «ανοιχτό» πνεύμονα, η πλειοψηφία των τριχοειδών που είναι ενσωματωμένα μέσα στα κυψελιδικά τοιχώματα συμπιέζονται από την διαστολή των κυψελίδων ενώ τα εξωκυψελιδικά αγγεία διαστέλλονται (Εικόνα 5).

Σε όλους τους πνευμονικούς όγκους άνω της υπολειμματικής λειτουργικής χωρητικότητας, οι επιδράσεις της επιμήκυνσης των αγγείων και η συμπίεση των κυψελιδικών αγγείων υπερκερνούν την τάση των εξωκυψελιδικών αγγείων να διασταλούν, έτσι η ολική αγγειακή αντίσταση των πνευμόνων αυξάνει σε συνάρτηση με τον όγκο του πνεύμονα. Τα αποκαλούμενα «γωνιακά» αγγεία, τα οποία βρίσκονται στις ενώσεις 3 ή περισσότερων κυψελιδικών διαφραγμάτων, επηρεάζονται ταυτόχρονα από τις πιέσεις που αναπτύσσονται στα κυψελιδικά τοιχώματα και στον διάμεσο χώρο και δεν συμπεριφέρονται όπως τα κυψελιδικά αγγεία. Λειτουργικά συμπεριφέρονται όπως τα εξωκυψελιδικά αγγεία (Εικόνα 5). Πράγματι μπορούν να εκτελέσουν χρέη αγωγού για κάποια ποσότητα αίματος να περάσει μέσα από το διάμεσο χώρο ακόμα και όταν η κυψελιδική πίεση ξεπερνάει την αρτηριακή (58).





**Εικόνα 5** Επίδραση της διαστολής του πνεύμονα στα κυψελιδικά και εξωκυψελιδικά τριχοειδή. Η διαστολή συμπιέζει τα ενσωματωμένα κυψελιδικά τριχοειδή αλλά διαστέλλει τα εξωκυψελιδικά τριχοειδή (1).

Επομένως είναι εμφανές ότι η πίεση των αεροχώρων είναι άμεσα σχετιζόμενη με την πίεση των αγγείων και ότι διατάραξη αυτής της ισορροπίας, μπορεί να προκαλέσει ρήξη του αιμο-κυψελιδικού φραγμού (από την πλευρά των μικροαγγείων) και αύξηση του οιδήματος που αυξάνει τη συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο κυψελιδικό υγρό. Σε αυτή τη διεργασία ανάπτυξης της VILI πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα εξωκυψελιδικά αγγεία (1).

### **Αναζητώντας τη χρυσή τομή των συνθηκών μηχανικού αερισμού για ελαχιστοποίηση της VILI**

Μηχανικός αερισμός με υψηλό όγκο αερισμού έχει συσχετιστεί με τοπική και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (14, 31, 59-63), ακόμα και σε περιπτώσεις απουσίας υποκείμενης πνευμονικής βλάβης (18, 64). Ο συσχετισμός του  $V_T$  με τη VILI

αποδείχθηκε ακόμα πιο σπουδαίος με μία μεγάλη πολυκεντρική μελέτη σε ανθρώπους (ARDSnet study) η οποία έδειξε μία σημαντική βελτίωση στην πρόοδο των ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS = acute respiratory distress syndrome) που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό μικρού  $V_T$  (65, 66). Η μελέτη του ARDSnet χρησιμοποίησε ένα πρωτόκολλο μηχανικού αερισμού, συχνά χρησιμοποιούμενο, το οποίο προτείνει τη χρήση χαμηλού  $V_T$  (6mL/ kg) και χαμηλής υψηλότερης τιμής πίεσης αεραγωγών (<30cmH<sub>2</sub>O). Το πρωτόκολλο επιτρέπει τη χρήση αναπνευστικής συχνότητας έως και 35 αναπνοές/λεπτό (η οποία είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη της φυσιολογικής) με στόχο την διατήρηση του pH πάνω από το 7.30. Όμως η ασφάλεια της χρήσης τόσο υψηλών συχνοτήτων μηχανικού αερισμού δεν έχει υποστηριχθεί από πειραματικά δεδομένα.

Αντιθέτως, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη συχνότητα διαστολής αυξάνει την ευπάθεια των κυττάρων σε πνευμονική βλάβη και μπορεί να προκαλέσει νέκρωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων (30, 67, 68). Επιπλέον, μελέτες σε ζωικά μοντέλα της VILI υποδεικνύουν ότι η χαμηλή αναπνευστική συχνότητα μπορεί να ελαττώσει την πνευμονική βλάβη που προκαλείται από τον υψηλό  $V_T$  (69-71). Παρόλα αυτά, η ερμηνεία αυτών των μελετών είναι καταδικασμένη είτε από τη χρήση υψηλού  $V_T$  ή από τις μεγάλες διαφορές στην PaCO<sub>2</sub> οι οποίες ακολουθούν αναπόφευκτα την διακύμανση της αναπνευστικής συχνότητας. Πράγματι και ο  $V_T$  και η PaCO<sub>2</sub> μπορούν να παρέμβουν σημαντικά στην ανάπτυξη του VILI (14, 72).

Αρκετοί μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν την ελάττωση του πνευμονικού οιδήματος και της περιαγγειακής αιμορραγίας, που παρατηρούνται κατά την ελάττωση της αναπνευστικής συχνότητας σε μελέτες απομονωμένου πνεύμονα (73). Μεγαλύτερη αναπνευστική συχνότητα μπορεί να μειώσει πιο αποτελεσματικά την πληρότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα και έτσι να αυξήσει την τάση που εφαρμόζεται στην επιφάνεια των κυψελίδων, μειώνοντας την τελοεκπνευστική εξωαγγειακή πίεση και επάγοντας την πλήρωση με υγρό των κυψελίδων. Πιο ανοδικά, το αυξημένο διααγγειακό κλεινές πίεσης κατά μήκος των εξωκυψελιδικών αγγείων θα μπορούσε

επίσης να ευνοήσει την διαρροή υγρών στις κυψελίδες, την ρήξη του αγγείου και την εμφάνιση αιμορραγίας. Είναι λογικό ότι ο αυξημένος αριθμός κύκλων στρες που εφαρμόζονται στις ομάδες με υψηλότερη αναπνευστική συχνότητα θα μπορούσε να προκαλεί να εξηγηθεί ως ένα αθροιστικό φαινόμενο που παρατηρείται σε μία μεγάλη γκάμα βιοϋλικών που υπόκεινται σε επαναλαμβανόμενο ζημιογόνο στρες (74).

Τέλος θα ήταν ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι η μικρότερη αναπνευστική συχνότητα μπορεί να δίνει αρκετό χρόνο ανάμεσα σε διαδοχικούς κύκλους στρες σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς για να δράσουν. Είναι εκπληκτικό ότι πραγματικά χρειάζεται πολύ λίγος χρόνος για να επανασφραγιστεί ένα μικρό ρήγμα στα φράγματα των ιστών (75, 76).

### **Στόχος της παρούσας εργασίας**

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση κλινικά εφαρμόσιμων διακυμάνσεων στην αναπνευστική συχνότητα σε συνδυασμό με συμβατικό  $V_T$  και σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα  $P_aCO_2$  στην επαγωγή της VILI.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Ζώα

Μελετήθηκαν 65 αρσενικά C57BL/6 ποντίκια ηλικίας 8-12 εβδομάδων (βάρους 24-30g, εκτός 2 ποντικίων που ζύγιζαν 22g). Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Εργαστηριακής Φροντίδας Ζώων του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Κτηνιατρικού Τμήματος της Νομαρχίας Ηρακλείου

### Σχεδιασμός πειράματος

Τα ζώα τυχαιοποιήθηκαν σε πειραματικές ομάδες χρησιμοποιώντας σφραγισμένους φακέλους με τυχαίους αριθμούς. Μετά την τυχαιοποίηση, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση ketamine (120 mg/kg) και xylazine (8 mg/kg) και μετά τραχειοτομήθηκαν και εισαγάγαμε ενδοτραχειακό σωλήνα (18G, 1.30mm OD). Τα ζώα υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό χρησιμοποιώντας έναν εμπορικά διαθέσιμο αναπνευστήρα ποντικών (SAR-830/P, OPTION 041 special smaller internal components, IITC Inc. CA, USA) ικανό να παρέχει ελάχιστη εισπνευστική ροή 10 mL/min. Η πίεση των αεραγωγών ( $P_{aw}$ ) μετρήθηκε από μία πλαϊνή θύρα του κυκλώματος χρησιμοποιώντας έναν μετατροπέα πίεσης ( $P_{aw}$ ; Micro-Switch 140PC, Honeywell, Ontario, Canada). Η δειγματοληψία του σήματος  $P_{aw}$  έγινε με συχνότητα 150Hz (Windaq Instruments Inc, OH, USA) και αποθηκεύτηκε σε υπολογιστή για περαιτέρω ανάλυση. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η θερμοκρασία του ορθού ελεγχόταν και διατηρούταν σε φυσιολογικά επίπεδα με τη χρήση θερμοστάτη θέρμανσης συνδεδεμένο με λάμπα. Κατά την έναρξη του πειράματος χορηγούταν bolus των 10mL/g Ringer's lactate μέσω της κοιλιακής ουραίας φλέβας. Η αναισθησία διατηρούταν με μία δόση bolus ενδοπεριτοναϊκής ένεσης ketamine (30mg/kg) και xylazine (2mg/kg) χορηγούμενη μετά από 45-90 λεπτά και η συνολική δόση δεν ήταν διαφορετική ανάμεσα στις ομάδες.

Όλα τα ζώα ( $n=13$  ανά ομάδα) υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό για 2 ώρες με μοντέλο ελεγχόμενου όγκου (VC), με σταθερή εισπνευστική ροή και διαφορετική συχνότητα αερισμού (RR) και όγκου αερισμού ( $V_T$ ). Οι τέσσερις ομάδες αντιστοιχούν σε

μία από τις τέσσερις συνθήκες αερισμού i) Ομάδα  $RR_{80}VT_{12}$  χαμηλό RR: 80 breaths/min ( $V_T$ : 12 mL/kg) ii) Ομάδα  $RR_{120}VT_{10}$  δηλαδή φυσιολογικό RR: 120 breaths/min ( $V_T$ : 10 mL/kg) iii) Ομάδα  $RR_{160}VT_8$  υψηλό RR: 160 breaths/min ( $V_T$ : 8 mL/kg) iv) Μια τέταρτη ομάδα  $RR_{160}VT_{10}$  υποβλήθηκε σε μηχανικό αερισμό με υψηλό RR: 160 breaths/min και  $V_T$ : 10 mL/kg με κατάλληλη προσαρμογή του νεκρού χώρου ώστε να διατηρηθεί η  $PaCO_2$  σε ίδια επίπεδα με τις άλλες ομάδες. Η διαφοροποίηση στον  $V_T$  και στον νεκρό χώρο βασίστηκε σε προκαταρκτικά πειράματα.

Επειδή ο αναπνευστήρας που χρησιμοποιήσαμε δεν μπορεί να χορηγήσει μίγμα αερίων και η χρησιμοποίηση ατμοσφαιρικού αέρα ( $FiO_2=0.21$ ) μπορεί να οδηγήσει σε υποξαιμία, όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό με πεπιεσμένο οξυγόνο  $FiO_2=1$ . Η θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP) διατηρήθηκε στο 1.5 cmH<sub>2</sub>O καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο εισπνευστικός χρόνος ρυθμίστηκε για να επιτευχθεί ελάχιστη διαφοροποίηση της εισπνευστικής ροής και της ενδογενής PEEP (Πίνακας 1). Συχνότητα αερισμού των 120 αναπνοών/λεπτό επιλέχθηκε ως το φυσιολογικό κατά την διάρκεια προκαταρκτικών πειραμάτων και προηγούμενων μελετών (77, 78). Μια διατηρούμενη τελοεισπνευστική εμφύσηση έγινε στην αρχή του πειράματος ώστε να αποφευχθούν τυχόν ατελεκτασίες. Από τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό τα δείγματα πάρθηκαν αμέσως χωρίς τη διαμεσολάβηση χειρισμών μηχανικού αερισμού καθώς τα ζώα τα οποία ναρκώνονται και υποβάλλονται σε τραχειοστομία οδηγούνται σε υπερκαπνία και δε θα ήταν κατάλληλα για συγκρίσεις.

Για τα δεδομένα που αφορούν τα αρτηριακά αέρια αίματος (ABGs = arterial blood gases), τον ορρό και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL = broncho-alveolar lavage) για κυτταροκίνες χρησιμοποιήθηκαν 8 ζώα από κάθε ομάδα. Για να σχεδιαστεί η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα και για την ιστολογική εξέταση που διενεργήθηκε χρησιμοποιήθηκαν τα εναπομείναντα 5 ζώα από κάθε ομάδα.

## Μηχανική του αναπνευστικού συστήματος

Η εκτίμηση των μηχανικών ιδιοτήτων του πνεύμονα περιλαμβάνει τη μέτρηση της ενδογενούς θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης και τη στατική καμπύλη πίεσης/όγκου. Η εκτίμηση της ενδογενούς θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (PEEPi) γίνεται στην αρχή και στο τέλος του πειράματος πριν θανατωθεί το ζώο, ενώ η στατική καμπύλη πίεσης/όγκου στο τέλος του πειράματος μετά το θάνατο του ζώου με χορήγηση μεγάλης δόσης αναισθητικού.

Επειδή η υψηλή αναπνευστική συχνότητα μπορεί να σχετίζεται με δυναμική υπερδιάταση, η δυναμική ενδογενής PEEP (PEEPi) εκτιμήθηκε στην αρχή και στο τέλος κάθε πειράματος στα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Καθώς δεν μπορούμε να κάνουμε τελοεκπνευστικό αποκλεισμό στον συγκεκριμένο αναπνευστήρα που χρησιμοποιήσαμε, η PEEPi εκτιμήθηκε με σύγκριση της διαφοράς της κορυφής της πίεσης αεραγωγών πριν και μετά από παρατεταμένη εκπνοή ( $\Delta P_{aw_{peak}}$ ), υποθέτοντας ότι αν υπήρχε ενδογενής PEEP, αυτή θα χανόταν κατά τη διάρκεια μιας εκπνοής η οποία θα διαρκούσε περισσότερο από 5 πλήρεις κύκλους αναπνοής. Γίνεται επίσης η παραδοχή ότι η αντίσταση των αεραγωγών και η ενδοτικότητα του πνεύμονα παραμένουν σταθερές στη διάρκεια αυτού του χειρισμού

Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα σχεδιάστηκε στο τέλος του πειράματος με κλιμακωτή χειροκίνητη εμφύσηση και αναρρόφηση των πνευμόνων χρησιμοποιώντας προσθήκη ή αφαίρεση 100 mL όγκου ατμοσφαιρικού αέρα μέχρι η πίεση να φτάσει τα 30 cmH<sub>2</sub>O στο τέλος της εμφύσησης [το οποίο αντιστοιχεί στη συνολική χωρητικότητα πνεύμονα (TLC = total lung capacity)] και τα 0 cmH<sub>2</sub>O στο τέλος της αναρρόφησης, όπως έχει περιγραφεί και αλλού(79). Αυτή η μεθοδολογία εφαρμόστηκε δύο φορές σε κάθε ζώο. Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου αναλύθηκε με τη σιγμοειδή καμπύλη που προτάθηκε από τους Venegas et al.(80).

## Μέτρηση των αρτηριακών αερίων αίματος (ABGs)

Στο τέλος του πειράματος αρτηριακό αίμα ελήφθη από την αριστερή κοιλία και διεξήχθη ανάλυση αερίων αίματος. Ένα επιπλέον δείγμα αίματος (150μL) φυγοκεντρήθηκε στα 10,000g για 10 λεπτά και ο ορρός συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

## Καθορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

Μετά το θάνατο του ζώου με μεγάλη δόση αναισθητικού, πραγματοποιήθηκε με χρήση σύριγγας ισοουλίνης ενδοτραχειακή έγχυση 600 μL φυσιολογικού ορού (normal saline) ο οποίος συλλέχτηκε και επανεγχύθηκε δύο φορές στους πνεύμονες. Τα υγρά που αναρροφάται (400-450 μL) φυγοκεντρήθηκε στα 10,000g για 10 λεπτά, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας ένα protein assay kit της Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) με bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) για την κατασκευή της καμπύλης συγκέντρωσης.

### Υλικά και Συσκευές

- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma USA)
- Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 : Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies)
- Πλάκες 96 οπών, τύπου ELISA, επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)
- Φωτόμετρο πλακών ELISA (Biorad)

### Μέθοδος

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων (αργινίνη, αρωματικά αμινοξέα και ιστιδίνη) των πρωτεϊνών. Η ελεύθερη μορφή της χρωστικής έχει κόκκινο χρώμα (465nm) ενώ με τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη, μετατρέπεται σε μπλε (595nm). Η ένταση του χρώματος μετριέται φωτομετρικά με την απορρόφηση στα 595nm. Το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη έχει υψηλό συντελεστή

απορροφήσεως, παρέχοντας κατά αυτόν τον τρόπο μεγάλη ευαισθησία στη μέθοδο. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη γίνεται γρήγορα (2 λεπτά) και μπορεί να μετρηθεί σε χρονικό διάστημα 1 ώρας. Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA. Με την χρήση του νόμου των Beer-Lambert μπορούμε να προσδιορίσουμε την πρωτεϊνική συγκέντρωση σε ένα δεδομένο διάλυμα. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των διαλυμάτων BSA είναι το ίδιο με το διάλυμα, στο οποίο βρίσκονται διαλυμένα τα υπό εξέταση δείγματα. Σε πλάκα 96 οπών τύπου ELISA φέρονται 160μl ανά οπή από κάθε γνωστό και άγνωστο δείγμα εις τριπλούν και προστίθενται 40μl του διαλύματος χρωστικής. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) σε μήκος κύματος 595nm σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων υπολογίζεται βάσει της πρότυπης καμπύλης και εκφράζονται σε μονάδες μg/ml.

### **Καθορισμός της συγκέντρωσης της IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα**

Ο προσδιορισμός της κυτταροκίνης IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα γίνεται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα πακέτα αντιδραστηρίων και μικροπλάκες για ELISA ειδικά για τις συγκεκριμένες κυτταροκίνες ποντικού (Quantikine, R&D Systems, UK) και ακολουθήθηκε η μέθοδος που συνιστά ο κατασκευαστής.

Συνοπτικά, χρησιμοποιούνται μικροπλάκες ELISA επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του IL-6. Η προσθήκη στις κυψελίδες δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων καθώς και των άγνωστων δειγμάτων επιτρέπει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ της υπό μελέτη ουσίας και ακινητοποιημένου αντισώματος. Μετά την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου κλάσματος προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τις μετρούμενες ουσίες το οποίο είναι σημασμένο με φυτική (horseradish) υπεροξειδάση και συνδέεται με το



ακίνητοποιημένο αντιγόνο σχηματίζοντας σύμπλοκο μορφής «σάντουιτς». Η προσθήκη χρωμογόνου διαλύματος (τετραμεθυλβενζιδίνη) οδηγεί στην ανάπτυξη χρώματος το οποίο είναι ανάλογο της δεσμευμένης ουσίας. Η αντίδραση διακόπτεται και η ένταση του χρώματος μετρείται σε φωτόμετρο ELISA.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ιντερλευκινών. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα όπου χρειάζεται ώστε οι τιμές μέτρησής τους να βρίσκονται μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης. Η ευαισθησία της μεθόδου για την IL-6 είναι 1.6 pg/ml.

### Ανάλυση στυπώματος κατά Western

Η ανάλυση στυπώματος κατά Western πραγματοποιήθηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (81). Συνοπτικά η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες αποδιάταξης με χρήση SDS, μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, υβριδοποίησή της με το αντίστοιχα κάθε φορά αντίσωμα και ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης με σύστημα χημειοφωταύγειας ECL.

#### Υλικά και Συσκευές

- Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου: SDS (Serva, Γερμανία), (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)
- EDTA (Sigma, ΗΠΑ)
- μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete, Boehringer, Germany)
- Tris (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)
- NaCl, HCl, Bacitracin, Leupeptin (Sigma, ΗΠΑ)
- Αζίδιο του νατρίου: Sodium Azide (Merck, Γερμανία)
- Γλυκερόλη (Sigma, ΗΠΑ), (Merk, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Tris/HCl (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)
- Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) (Merk, Germany)
- Γλυκίνη (GIBCO, ΗΠΑ)

- Υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS):  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Sigma, ΗΠΑ)
- Ακρυλαμίδιο (Serva, Γερμανία)
- Διο-ακρυλαμίδιο: N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (Promega, ΗΠΑ)
- Tween-20 (Merk Germany)
- TEMED (N,N,N,N τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη) (Serva, Γερμανία)
- Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Biorad, ΗΠΑ)
- Τροφοδοτικό (Hoefler, ΗΠΑ)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Amersham)
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Σουηδία)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell)
- Χαρτί Wattman 3MM (Amersham ΗΠΑ)
- Μεθανόλη, (Merk, Γερμανία)
- Ξηρό γάλα (Regilait) χωρίς λιπαρά
- Πρώτο αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που θα μελετηθεί κάθε φορά
- Δεύτερο αντίσωμα κατά του πειραματοζώου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα
- Σύστημα χημειοφωταύγιας ECL (Amersham USA)
- Φίλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (Kodak)

### Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Κατά το τέλος του πειράματος οι πνεύμονες αφαιρέθηκαν από τη θωρακική κοιλότητα.

Ένα τμήμα του ιστού όγκου 100  $\mu\text{L}$  διαλύθηκε σε 500 $\mu\text{L}$  διαλύματος λύσης (lysis buffer):

- 50 mM Tris pH 6.8 (ρυθμιστικό διάλυμα)
- 2% SDS (αποδιατακτικός ανιοντικός παράγοντας)
- 5 mM EDTA (Sigma, ΗΠΑ) (χηλικός παράγοντας δισθενών ιόντων)
- μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete, Boehringer, Germany).

Το μίγμα ομογενοποιήθηκε, υποβλήθηκε σε sonication (2'' σε πάγο), φυγοκεντρήθηκε (12000 rpm για 15') και το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες αποθηκεύτηκε στους  $-80^\circ\text{C}$ .

Εν συντομία κάθε προς μελέτη δείγμα αποψύχεται, προστίθεται δείγμα φόρτωσης (loading buffer), βράζει για 5 λεπτά, τοποθετείται στον πάγο για 3 λεπτά και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό. Με την διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στα αμινοξέα προσδένεται SDS το οποίο προσδίδει στο σύμπλοκο

αρνητικό φορτίο ανάλογο με το μοριακό βάρος της κάθε πρωτεΐνης, η ψύξη προκαλεί το κλείσιμο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων με επακόλουθη σταθεροποιημένη δέσμευση του SDS και της χρωστικής.

loading buffer 10X που χρησιμοποιήθηκε (φυλάσσεται στους -20°C):

- 0.3% bromophenol blue (χρωστική για να βλέπουμε το δείγμα μας) (Sigma, ΗΠΑ)
- 50% glycerol (αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος για να τοποθετείται σωστά το δείγμα στα πηγάδια) (Sigma, ΗΠΑ)
- 0.3% mercaptoethanol (αναγωγικός παράγων, διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς) (Sigma, ΗΠΑ)
- lysis buffer 50% v/v.

### **Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης**

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης που περιείχε SDS. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροφόρησης (Amersham) και τροφοδοτικό (Hoefler, ΗΠΑ). Για την εύρεση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (BioRad, ΗΠΑ). Επίσης παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% - μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης δημιουργείται ένας μοριακός ηθμός που με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου διαχωρίζει τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS ανάλογα με το μοριακό τους βάρος

- Ακρυλαμίδη 29.2% (w/v) (Serva, Γερμανία)
- Bis-ακρυλαμίδη 0.8% (w/v) (Το μόριο αυτό ρυθμίζει το βαθμό διακλάδωσης της πολυακρυλαμίδης) (Promega, ΗΠΑ)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (1λίτρο)

- Tris/HCl 30.3g
- Γλυκίνη 144.2g
- SDS 10g, pH 8.3

Διάλυμα διαχωρισμού (running buffer)

- Tris.HCl pH 8.8 1.5M
- SDS 0.4 (w/v)

#### Διάλυμα επιστοίβαξης (stacking buffer)

- Tris.HCl pH 6.8 0.5M
- SDS 0.4% (w/v)

#### Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (30ml)

- Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 12 ml
- Διάλυμα διαχωρισμού 7.5 ml
- Απεσταγμένο νερό 9.9 ml
- APS 10% 300μl (απελευθερώνει ελεύθερες ρίζες που καταλύουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες)
- TEMED 12μl (το TEMED επιταχύνει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης καταλύοντας την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών από το APS)
- SDS 10% 300μl

#### Πήκτωμα επιστοίβαξης (10ml)

- Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.7ml
- Διάλυμα επιστοίβαξης 1.25 ml
- Απιονισμένο νερό 6.8ml
- APS 10% 100μl
- TEMED 10μl
- SDS 10% 100μl

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται στην συνέχεια το πήκτωμα επιστοίβαξης και τοποθετείται το κατάλληλο 'χτένι' με τον αντίστοιχο αριθμό εσοχών όπου φορτώνονται τα δείγματα των πρωτεϊνών καθώς και ένας δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker), όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει μεγαλύτερους πόρους από το πήκτωμα διαχωρισμού. Οι πρωτεΐνες περνούν πρώτα από το πήκτωμα επιστοίβαξης όπου δε συναντούν δυσκολία και το διανύουν με ταχύτητα ανεξάρτητη του μοριακού βάρους, έτσι τα δείγματα φτάνουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Τα δείγματα κινούνται στο πήκτωμα διαχωρισμού με βάση το μοριακό τους βάρος σε ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται αρχικά 150V και μετά την διέλευση τους από το διάλυμα επιστοίβαξης στα 280V. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης διότι το

φορτίο/μονάδα μάζας είναι σταθερό. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων διαρκεί 1-2 ώρες.

### **Μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη**

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.

#### Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών:

- 500ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x
- 1 λίτρο μεθανόλης
- ο όγκος ρυθμίζεται στα 5 λίτρα με χρήση απιονισμένου νερού

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφορητική διαδικασία η πηκτή πολυακρυλαμίδης απομακρύνεται από την συσκευή. Διαχωρίζεται η πηκτή επιστοιβαξης και λαμβάνεται μόνο η πηκτή διαχωρισμού που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες. Τοποθετείται στο διχτυωτό πλέγμα της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών σε μορφή 'σάντουιτς' που αποτελείται από τα εξής : χαρτί wattman, πηκτή πολυακρυλαμίδης, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ξανά χαρτί wattman. Το πλέγμα τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 0.8mA για 1.5 ώρα. Οι πρωτεΐνες στην πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως αναφέρθηκε είναι αρνητικά φορτισμένες. Προς τον θετικό πόλο τοποθετείται η νιτροκυτταρίνη. Οι πρωτεΐνες λόγω του αρνητικού τους φορτίου μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμίδης στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Όταν τελειώσει η διαδικασία της μεταφοράς η μεμβράνη επώάζεται με το κατάλληλο αντίσωμα για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης

### **Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη**

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

#### Διάλυμα TBS-T (10x)

- Tris/HCl 20mM, pH 7.6
- NaCl 137mM
- Tween-20 0.1%

#### Διάλυμα αφαίρεσης πρωτεϊνών (Stripping buffer)

- Tris/HCl 62.5mM, pH 6.7

- β-μερκαπτοαιθανόλη
- 100mM SDS 2%

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με ξηρό γάλα 5% σε TBS-T για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T. Η μεμβράνη επωάζεται στη συνέχεια με αντίσωμα ειδικό για κάθε πρωτεΐνη συνήθως μέχρι την επόμενη ημέρα στους 4°C υπό ανάδευση (οι συνθήκες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιείται). Τα αντισώματα Phospho- και total AKT, και phospho- και total ERK1/2 που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρία Cell Signaling (MA, USA). Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα goat anti-rabbit antiserum το οποίο είχε προσδεμένη horseradish peroxidase (Amersham, UK) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκπλένεται με TBS-T και επωάζεται τέλος με το σύστημα χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence – ECL) το οποίο αποτέλεσε το χρωμογόνο υπόστρωμα για την horseradish peroxidase του δεύτερου αντισώματος για 1 λεπτό. Ακολουθεί έκθεση στο φιλμ και εμφάνιση σε εμφανιστικό μηχάνημα. Η ένταση της κάθε ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και μετράται με την χρήση του λογισμικού Image Quant.

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίο να γίνει ανίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών στην ίδια νιτροκυτταρίνη. Αυτό γίνεται με επώαση της μεμβράνης για 30 λεπτά στους 56°C με το διάλυμα αφαίρεσης των συνδεδεμένων πρωτεϊνών (stripping). Ακολουθεί έκπλυση με TBS-T και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας.

### **Ιστοπαθολογική ανάλυση**

Για την ιστοπαθολογική εξέταση, ένα τμήμα πνευμονικού ιστού τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμαλίνης και εμπεδώθηκε σε παραφίνη. Πρέπει να τονιστεί ότι οι πνεύμονες δε μονιμοποιήθηκαν σε σταθερή πίεση αλλά αφαιρέθηκαν όλοι με την ίδια διαδικασία από τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν στη διαδικασία λήψης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Ένας παθολογοανατόμος ο οποίος δεν ήξερε σε τι

ομάδα άνηκαν τα δείγματα του πνευμονικού ιστού χρησιμοποίησε ένα απλό σύστημα βαθμολόγησης(78) για να αξιολογήσει καλύτερα τις μη αιμορραγικές κακώσεις της VILI.

Εν συντομία κάθε δείγμα πήρε μία βαθμολογία από το 0 μέχρι το 4:

- 0 -> φυσιολογικός πνεύμονας
- 1 -> ήπιες βλάβες με προσβολή <25% του πνεύμονα
- 2 -> μέτριες βλάβες με προσβολή 25-50% του πνεύμονα
- 3 -> σοβαρές βλάβες με προσβολή 50-75% του πνεύμονα
- 4 -> πολύ σοβαρές βλάβες με >75% του πνεύμονα προσβεβλημένου

Αυτές οι βαθμολογίες δόθηκαν για τις εξής κατηγορίες ιστικής βλάβης: κυψελιδική συμφόρηση, αιμορραγία, λευκοκυτταρική διήθηση και πάχος του κυψελιδικού τοιχώματος. Η άθροιση των επιμέρους βαθμολογιών οδηγεί σε μία συνολική ιστολογική βαθμολογία βλάβης (HIS: histological injury score), όπου το 0 αντιστοιχεί σε μία φυσιολογική ιστολογική εικόνα και το 16 σε πολύ σοβαρή πνευμονική βλάβη. Τρεις τομές από κάθε πνεύμονα και πέντε πνεύμονες από κάθε ομάδα μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα εκφραστήκαν ως μέσος όρος  $\pm$  SD (σταθερή απόκλιση).

### Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσοι όροι  $\pm$  SD. Οι διαφορές ανάμεσα στις μετρήσεις των ομάδων όσον αφορά τα αρτηριακά αέρια αίματος, την ιστολογική βαθμολογία βλάβης, την πρωτεϊνική συγκέντρωση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης IL-6 συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας μη-παραμετρικά τεστ λόγω του μικρού μέγεθος δείγματος, πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα τεστ Kruskal Wallis και Mann-Whitney (τα οποία διορθώθηκαν κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ορίζονται αυτά τα οποία έχουν τιμή  $p$  μικρότερη από 0.05 (χρησιμοποιήθηκε προσέγγιση Monte Carlo για τα δεδομένα από ELISA assays). Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου αναλύθηκε με τη σιγμοειδή εξίσωση που προτάθηκε από τους Venegas et al.(80) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλα τα ποντίκια ήταν ζωντανά στο τέλος του πειράματος.

Η μέγιστη πίεση των αεραγωγών ήταν στο εύρος 10-11 cmH<sub>2</sub>O και η  $\Delta P_{aw_{peak}}$  ήταν μικρότερη από 1 cmH<sub>2</sub>O σε όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό.

Στο τέλος του πειράματος αρτηριακό αίμα ελήφθη από την αριστερή κοιλία και διεξήχθη ανάλυση αερίων αίματος. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα αέρια αρτηριακού αίματος ανάμεσα στις ομάδες των ζώων που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό (Πίνακας 1).

Όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό παρουσίασαν σε κάποιο βαθμό μεταβολική οξέωση, αλλά δεν υπήρχαν διαφορές στο pH του αρτηριακού αίματος ανάμεσα στις ομάδες.



**Εικόνα 6 Πειραματική Διάταξη** Τα ζώα υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό χρησιμοποιώντας έναν εμπορικά διαθέσιμο αναπνευστήρα ποντικών (Πίσω) ικανό να παρέχει ελάχιστη εισπνευστική ροή 10 mL/min. Η πίεση των αεραγωγών ( $P_{aw}$ ) μετρήθηκε από μία πλαϊνή θύρα του κυκλώματος χρησιμοποιώντας έναν μετατροπέα πίεσης. Η δειγματοληψία του σήματος  $P_{aw}$  έγινε με συχνότητα 150Hz και αποθηκεύτηκε σε υπολογιστή για περαιτέρω ανάλυση. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η θερμοκρασία του ορθού ελεγχόταν και διατηρούταν σε φυσιολογικά επίπεδα με τη χρήση θερμοστάτη θέρμανσης συνδεδεμένο με λάμπα (δε φαίνεται στην εικόνα).



**Πίνακας 1** Ρυθμίσεις αερισμού διαφορετικών ομάδων και αέρια αρτηριακού αίματος 2 ώρες μετά από μηχανικό αερισμό. Τα αρτηριακά αέρια αίματος (μετρήθηκαν σε αναλυτή αερίων) ήταν παρόμοια σε όλες τις ομάδες και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $\text{PaO}_2$   $p=0.86$ ,  $\text{PaCO}_2$   $p=0.57$ ,  $\text{pH}$   $p=0.88$ ). Οι τιμές είναι μέσος όρος  $\pm$  σταθερή απόκλιση,  $n=13$  ζώα για κάθε ομάδα, τα αέρια αρτηριακού αίματος μετρήθηκαν στο τέλος του πειράματος σε 8 ζώα ανά ομάδα.. Συντομογραφίες: RR = αναπνευστική συχνότητα,  $V_T$  = όγκος αερισμού,  $T_i$  = εισπνευστικός χρόνος,  $\text{Flow}_{\text{mean}}$  = μέση εισπνευστική ροή,  $\text{Paw peak}$  = δυναμική κορυφή πίεσης αεραγωγών,  $\Delta\text{Paw}$  = διαφορά στη δυναμική κορυφή πίεση αεραγωγών πριν και μετά από παύση 5 δευτερολέπτων που αντιπροσωπεύει την δυναμική ενδογενή τελοεκπνευστική πίεση, PEEP = θετική τελοεκπνευστική πίεση και  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  = μερική πίεση αρτηριακού μοριακού αντίστοιχα οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

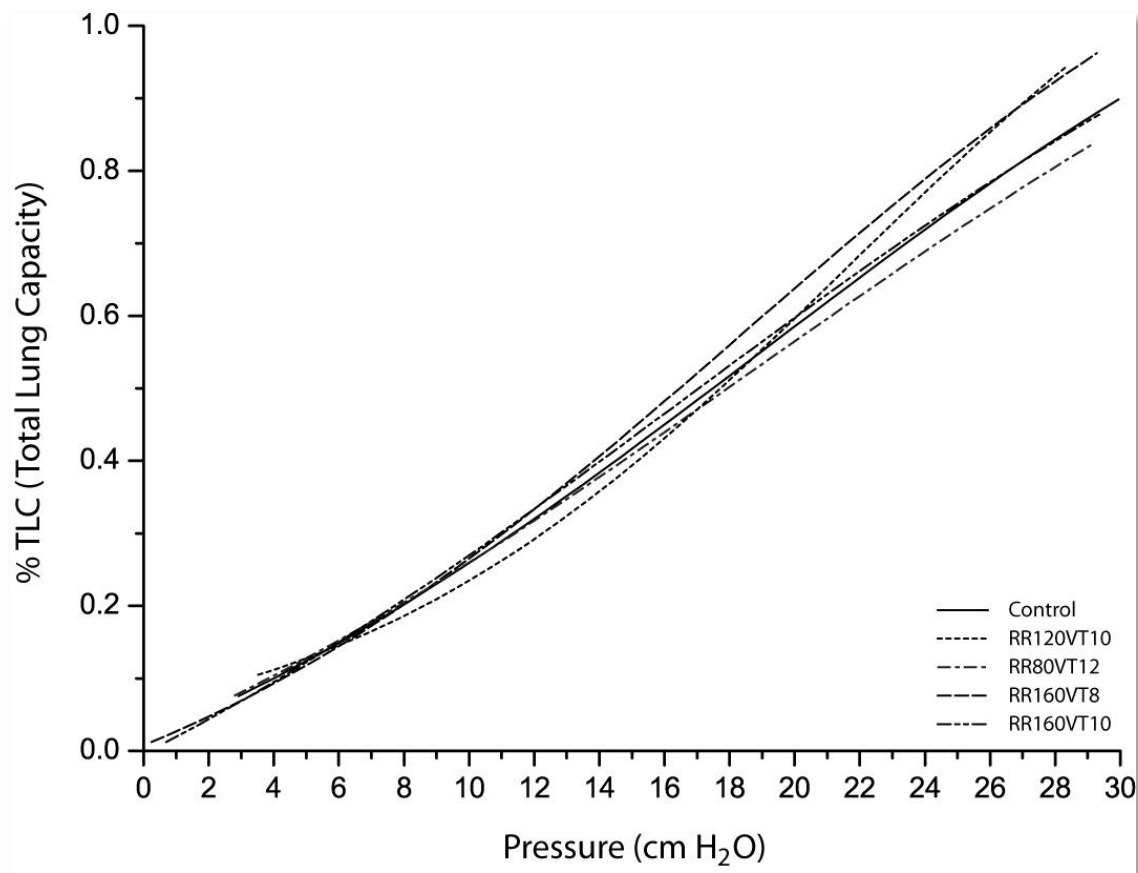
	RR <sub>120</sub> VT <sub>10</sub>	RR <sub>80</sub> VT <sub>12</sub>	RR <sub>160</sub> VT <sub>8</sub>	RR <sub>160</sub> VT <sub>10</sub>
RR (breaths/min)	120	80	160	10
$V_T$ (mL/kg)	10	12	8	10
$T_i$ (sec)	0.18	0.24	0.16	0.15
$T_i/T_{\text{total}}$	1/1.8	1/2	1/1.7	1/1.7
$\text{Flow}_{\text{mean}}$ (ml/min)	96 $\pm$ 5.8	87 $\pm$ 4.9	86 $\pm$ 6.8	92 $\pm$ 4.6
$\text{Paw peak}$ (cm H <sub>2</sub> O)	11.7 $\pm$ 0.7	9.9 $\pm$ 0.5	10.9 $\pm$ 0.4	8.9 $\pm$ 0.8
$\Delta\text{Paw}$ (cm H <sub>2</sub> O)	0.65 $\pm$ 0.1	0.75 $\pm$ 0.1	0.22 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
PEEP (cm H <sub>2</sub> O)	1.5	1.5	1.5	1.5
$\text{FiO}_2$ (%)	100	100	100	100
$\text{PaO}_2$ (mm Hg)	369 $\pm$ 57	352 $\pm$ 47	354 $\pm$ 47	340 $\pm$ 37
$\text{PaCO}_2$ (mm Hg)	31 $\pm$ 8	36 $\pm$ 11	39 $\pm$ 14	39 $\pm$ 17
pH	7.25 $\pm$ 0.07	7.27 $\pm$ 0.06	7.24 $\pm$ 0.12	7.26 $\pm$ 0.02

**Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην μηχανική των πνευμόνων ανάμεσα στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό και ούτε στα ζώα που υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες μηχανικού αερισμού.**

Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα σχεδιάστηκε στο τέλος του πειράματος (μετά τη θανάτωση του ζώου με χορήγηση μεγάλης δόσης αναισθητικού) με κλιμακωτή (βήμα = 100μL) χειροκίνητη εμφύσηση και αναρρόφηση των πνευμόνων μέχρι η πίεση να φτάσει τα 30 cmH<sub>2</sub>O στο τέλος της εμφύσησης [το οποίο αντιστοιχεί στη συνολική χωρητικότητα πνεύμονα (TLC = total lung capacity)] και τα 0 cmH<sub>2</sub>O στο τέλος της αναρρόφησης, όπως έχει περιγραφεί και αλλού (79).

Αυτή η μεθοδολογία εφαρμόστηκε δύο φορές σε κάθε ζώο. Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου αναλύθηκε με τη σιγμοειδή καμπύλη που προτάθηκε από τους Venegas et al. (80).

Οι καμπύλες της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα τόσο για την εμφύσηση όσο και για τη αναρρόφηση δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες (Εικόνα 7), πράγμα που σημαίνει ότι η ενδοτικότητα του αναπνευστικού συστήματος δεν επηρεάστηκε ούτε από το μηχανικό αερισμό ούτε από τις διαφορετικές συνθήκες μηχανικού αερισμού.



**Εικόνα 7** Οι καμπύλες της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα δεν διέφεραν ανάμεσα στις ομάδες ζώων που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό (no-MV) και σε ζώα τα οποία υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες μηχανικού αερισμού. Η καμπύλη της στατικής αναλογίας πίεσης/όγκου για το αναπνευστικό σύστημα σχεδιάστηκε στο τέλος του πειράματος, μετά τη θανάτωση του ζώου με χορήγηση μεγάλης δόσης αναισθητικού, με κλιμακωτή χειροκίνητη εμφύσηση (βήμα = 100μL) και αναρρόφηση των πνευμόνων μέχρι η πίεση να φτάσει τα 30 cmH<sub>2</sub>O στο τέλος της εμφύσησης, το οποίο αντιστοιχεί στη συνολική χωρητικότητα πνεύμονα για διάστημα 2 ωρών. Κάθε καμπύλη έχει σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας τη σιγμοειδή καμπύλη που περιγράφηκε από τους Venegas et al. η οποία προσαρμόζεται στα δεδομένα και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο από όλα τα ζώα μίας ομάδας (n=5 ζώα για κάθε ομάδα). Για λόγους ευκρίνειας, η καμπύλη από την αναρρόφηση δε φαίνεται στο σχήμα.

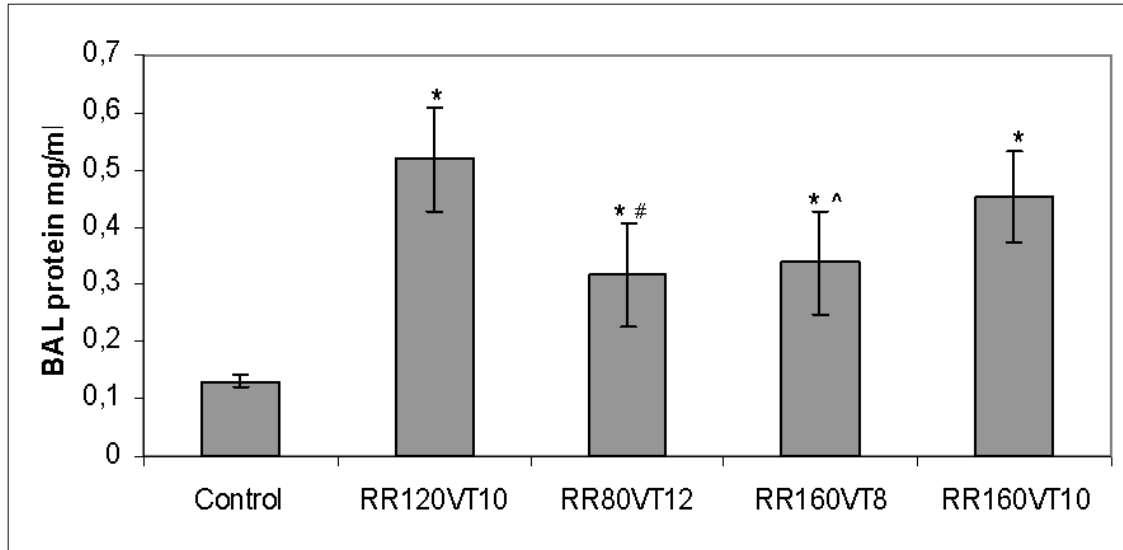
**Τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό παρουσίασαν αύξηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Η αύξηση ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>.**

Μετά το θάνατο του ζώου με μεγάλη δόση αναισθητικού, πραγματοποιήθηκε με σύριγγα ινσουλίνης ενδοτραχειακή έγχυση φυσιολογικού ορού (normal saline) ο οποίος συλλέχτηκε και επανεγχύθηκε δύο φορές στους πνεύμονες. Σε αυτό το υγρό (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) που πήραμε υπολογίσαμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών, αφού πρώτα απομονώσαμε μετά από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που περιείχε τις πρωτεΐνες.

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας ένα protein assay kit της Bio-Rad με bovine serum albumin για την κατασκευή της καμπύλης συγκέντρωσης.

Ο μηχανικός αερισμός ανεξάρτητα από το ποιες συνθήκες αερισμού χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη οδήγησε σε μία στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ) αύξηση στην ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε σύγκριση πάντα με τα ζώα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό.

Η αύξηση αυτή ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>. Πιο συγκεκριμένα στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub>, η ολική συγκέντρωση ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ( $p < 0.05$ ) από τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. Στην ομάδα RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>, η ολική συγκέντρωση ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ( $p < 0.05$ ) από την ομάδα RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8** Δύο ώρες μηχανικού αερισμού είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Μετά το θάνατο του ζώου με μεγάλη δόση αναισθητικού, πραγματοποιήθηκε με σύριγγα ισοουλίνης ενδοτραχειακή έγχυση φυσιολογικού ορού (normal saline) ο οποίος συλλέχτηκε και επανεγχύθηκε δύο φορές στους πνεύμονες. Σε αυτό το υγρό (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) που πήραμε υπολογίσαμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών, αφού πρώτα απομονώσαμε μετά από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που περιείχε τις πρωτεΐνες. Η αύξηση στην ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών ήταν σημαντικά μικρότερη στα ποντίκια τα οποία άνηκαν στην ομάδα μηχανικού αερισμού RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> και στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στο ιστόγραμμα απεικονίζονται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε n=8 ζώα ανά ομάδα. \*p<0.05 σε σύγκριση με τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. #p<0.05 σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. ^ p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub>.

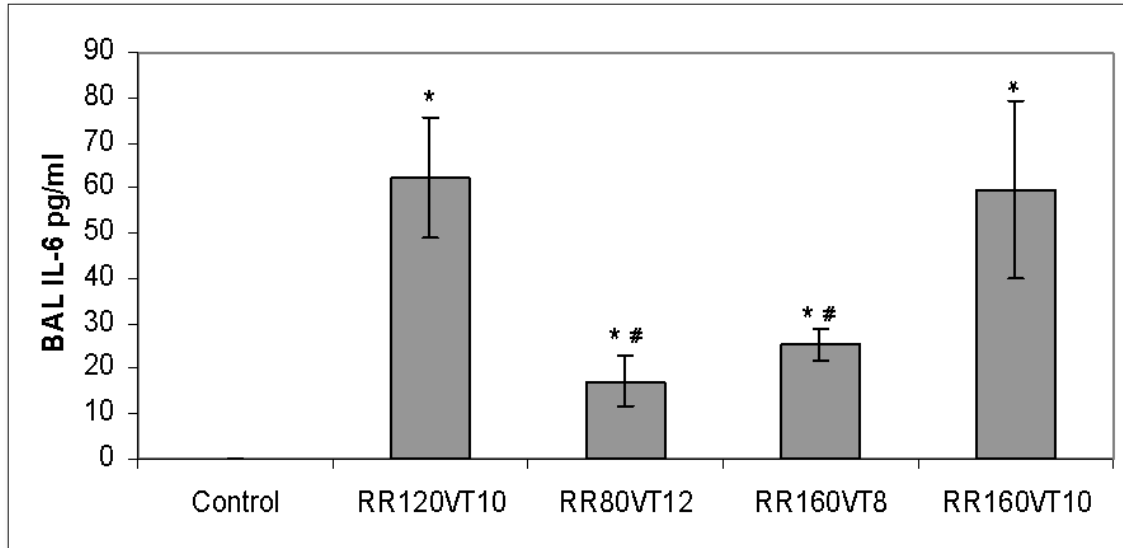
Η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>, σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. Στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό η IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό υγρό δεν ήταν ανιχνεύσιμη.

Μετά το θάνατο του ζώου με μεγάλη δόση αναισθητικού, πραγματοποιήθηκε με χρήση σύριγγας ισοουλίνης ενδοτραχειακή έγχυση φυσιολογικού ορού (normal saline) ο οποίος συλλέχτηκε και επανεγχύθηκε δύο φορές στους πνεύμονες. Σε αυτό το υγρό (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) που πήραμε υπολογίσαμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών, αφού πρώτα απομονώσαμε μετά από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που περιείχε τις πρωτεΐνες.

Ο προσδιορισμός της κυτοκίνης IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα γίνεται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ιντερλευκινών. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα όπου χρειάζεται ώστε οι τιμές μέτρησής τους να βρίσκονται μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης. Η ευαισθησία της μεθόδου για την IL-6 είναι 1.6 pg/ml.

Τα επίπεδα της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν σημαντικά μικρότερο στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. Στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό, η IL-6 ήταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Οι διαφορές αυτές παρέμειναν όταν η συγκέντρωση του IL-6 διορθώθηκε με βάση την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και το βάρος των ζώων.



**Εικόνα 9** Δύο ώρες μηχανικού αερισμού οδήγησαν σε αύξηση της ιντερλευκίνης 6 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Μετά το θάνατο του ζώου με μεγάλη δόση αναισθητικού, πραγματοποιήθηκε με σύριγγα ινσουλίνης ενδοτραχειακή έγχυση φυσιολογικού ορού (normal saline) ο οποίος συλλέχτηκε και επανεγχύθηκε δύο φορές στους πνεύμονες. Σε αυτό το υγρό (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) που πήραμε υπολογίσαμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών, αφού πρώτα απομονώσαμε μετά από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που περιείχε τις πρωτεΐνες. Η αύξηση στην ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών ήταν σημαντικά μικρότερη στα ποντίκια τα οποία άνηκαν στην ομάδα μηχανικού αερισμού RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>. Η IL-6 ήταν μη ανιχνεύσιμη στα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στο ιστόγραμμα απεικονίζονται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε n=8 ζώα ανά ομάδα. \*p<0.05 σε σύγκριση με τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. #p<0.05 σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>. ευαισθησία της μεθόδου είναι 1.6 pg/ml.

**Η ιστοπαθολογική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι ο μηχανικός αερισμός στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> σχετίζεται με προστατευτική δράση ενάντια στην ανάπτυξη της VILI.**

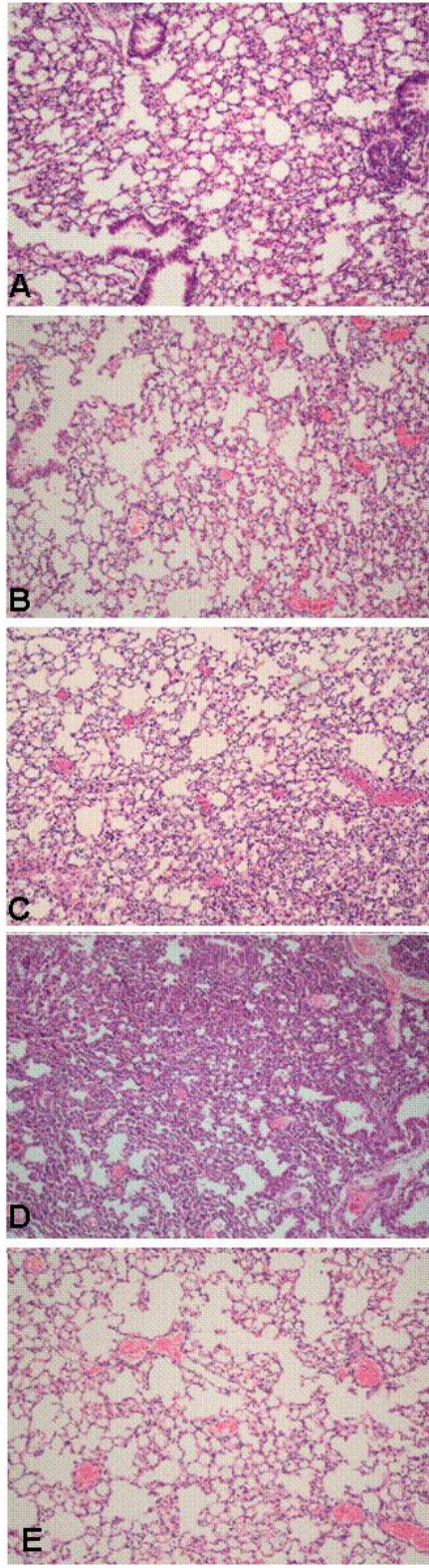
Για την ιστοπαθολογική εξέταση, ένα τμήμα πνευμονικού ιστού - μετά το θάνατο του ζώου με υπερβολική δόση ενδοπεριτοναϊκής ένεσης αναισθητικού - τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμαλίνης και εμπεδώθηκε σε παραφίνη.

Πρέπει να τονιστεί ότι οι πνεύμονες δε μονιμοποιήθηκαν σε σταθερή πίεση αλλά αφαιρέθηκαν όλοι με την ίδια διαδικασία από τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν στη διαδικασία λήψης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.

Η ιστοπαθολογική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι ο μηχανικός αερισμός στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> σχετίζεται με προστατευτική δράση ενάντια στην ανάπτυξη της VILI (Εικόνα 10).

Η αρχιτεκτονική των κυψελίδων διατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα και δεν παρατηρήθηκαν υαλοειδείς μεμβράνες. Στις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub> παρατηρήθηκε πιο έντονη εστιακή διήθηση λευκοκυττάρων, πάχυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων, κυψελιδική συμφόρηση από ότι στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> (Εικόνα 10). Στην ομάδα RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> υπήρχαν περιοχές όπου εντοπίστηκε ήπια μορφή αιμορραγίας, ενώ στην ομάδα RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub> παρατηρήθηκαν περισσότερες αιμορραγικές περιοχές. Στις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> παρατηρήθηκε ήπιας μορφής κυψελιδική συμφόρηση και πάχυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων.





**Εικόνα 10** Αντιπροσωπευτικές εικόνες τομής πνεύμονα με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (μεγέθυνση X100) ποντικών που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό για 2 ώρες με διαφορετικές συνθήκες αερισμού. Για την ιστοπαθολογική εξέταση, ένα τμήμα πνευμονικού ιστού τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμαλίνης και εμπεδώθηκε σε παραφίνη. **A)** RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> **B)** RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> **C)** RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> **D)** RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub> **E)** ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό, από n=5 ζώα ανά ομάδα. Στις ομάδες και ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> (B) και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> (C) παρατηρήθηκε ήπιας μορφής κυψελιδική συμφόρηση και πάχυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων. Στις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> (A) και RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> (D) παρατηρήθηκε πιο έντονη εστιακή λευκοκυτταρική διήθηση, πάχυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων όπως επίσης και αιμορραγικές περιοχές. Τέλος, στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> (D) παρατηρήθηκαν περισσότερες αιμορραγικές περιοχές

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από την ιστολογική εξέταση (Εικόνα 11) χρησιμοποιήσαμε μία συνολική ιστολογική βαθμολογία βλάβης (HIS = histological injury score), όπου το 0 αντιστοιχεί σε μία φυσιολογική ιστολογική εικόνα και το 16 σε πολύ σοβαρή πνευμονική βλάβη.

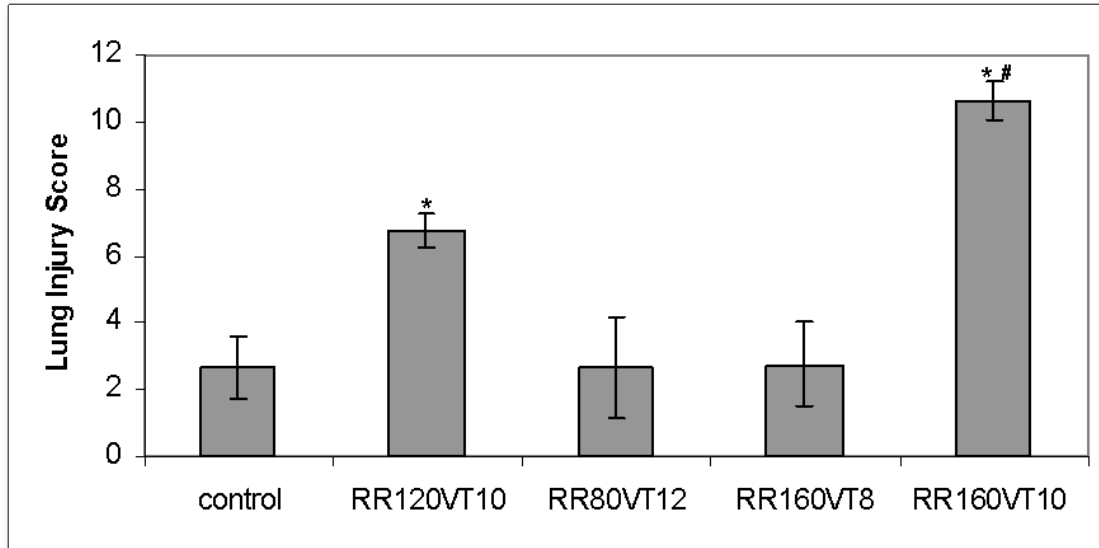
Για την εξαγωγή αυτής της συνολικής βαθμολογίας χρησιμοποιήθηκε ένα απλό σύστημα βαθμολόγησης (78) για να αξιολογήσει καλύτερα τις μη αιμορραγικές κακώσεις της VILI όπου λάβαμε υπόψη μας τους εξής παράγοντες που προαναφέρθηκαν: κυψελιδική συμφόρηση, αιμορραγία, λευκοκυτταρική διήθηση και πάχος του κυψελιδικού τοιχώματος (βλ. Υλικά και Μέθοδοι)..

Εν συντομία κάθε δείγμα πήρε μία βαθμολογία από το 0 μέχρι το 4 στον κάθε επιμέρους τομέα:

- 0 -> φυσιολογικός πνεύμονας
- 1 -> ήπιες βλάβες με προσβολή <25% του πνεύμονα
- 2 -> μέτριες βλάβες με προσβολή 25-50% του πνεύμονα
- 3 -> σοβαρές βλάβες με προσβολή 50-75% του πνεύμονα
- 4 -> πολύ σοβαρές βλάβες με >75% του πνεύμονα προσβεβλημένου

Η άθροιση των επιμέρους βαθμολογιών οδηγεί σε μία συνολική ιστολογική βαθμολογία βλάβης, όπου το 0 αντιστοιχεί σε μία φυσιολογική ιστολογική εικόνα και το 16 σε πολύ σοβαρή πνευμονική βλάβη.

Τρεις τομές από κάθε πνεύμονα και πέντε πνεύμονες από κάθε ομάδα μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα εκφραστήκαν ως μέσος όρος  $\pm$  SD (σταθερή απόκλιση).



**Εικόνα 11** Συνολική ιστολογική βαθμολογία βλάβης (HIS = **histological injury score**) όλων των ομάδων της μελέτης μας. Για να αξιολογήσουμε καλύτερα τις μη αιμορραγικές κακώσεις της VILI όπου λάβαμε υπόψη μας στη βαθμονόμηση της συνολικής ιστολογικής βαθμολογία βλάβης τους εξής επιμέρους παράγοντες που προαναφέρθηκαν: κυψελιδική συμφόρηση, αιμορραγία, λευκοκυτταρική διήθηση και πάχος του κυψελιδικού τοιχώματος (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Το 0 αντιστοιχεί σε μία φυσιολογική ιστολογική εικόνα και το 16 σε πολύ σοβαρή πνευμονική βλάβη. Οι ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub> και RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> συγκέντρωσαν πολύ υψηλή βαθμολογία σε αντίθεση με τις ομάδες RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>. Στο ιστόγραμμα αναπαρίστανται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση. \*p<0.05 σε σύγκριση με τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό, RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub>. #p<0.05 σε σύγκριση με τις ομάδες RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub>.

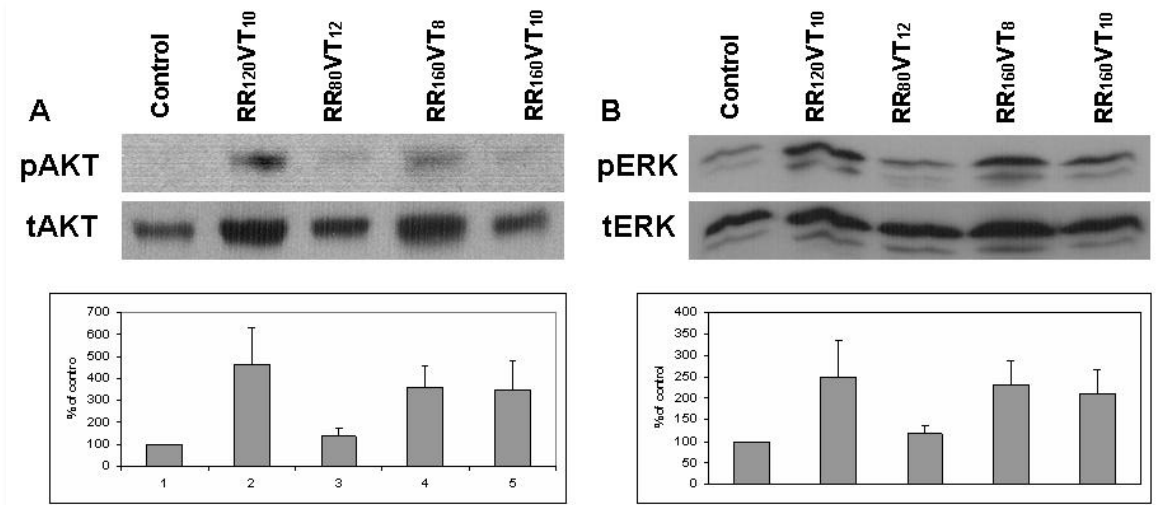
Η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 αυξήθηκε σε όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό.

Για την ανάλυση στυπώματος κατά Western, ένα τμήμα πνευμονικού ιστού μετά το θάνατο του ζώου με υπερβολική δόση ενδοπεριτοναϊκής ένεσης αναισθητικού λήφθηκε και αξιοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των επιμέρους πρωτεϊνών.

Τα τμήματα πνευμονικού ιστού λήφθηκαν από ζώα που δεν υποβλήθηκαν στη διαδικασία λήψης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.

Η ανάλυση στυπώματος κατά Western πραγματοποιήθηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (81). Συνοπτικά η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες αποδιάταξης με χρήση SDS, μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, υβριδοποίησή της με το αντίστοιχα κάθε φορά αντίσωμα και ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης με σύστημα χημειοφωταύγειας ECL.

Είναι γνωστό ότι τα AKT και ERK1/2 ενεργοποιούνται κατά την υπερδιάταση. Η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 στην μελέτη μας ήταν αυξημένη σε όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub>, η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12** Στύπωμα κατά WESTERN το οποίο μετράει τη φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2. Λήφθηκαν τμήματα πνευμονικού ιστού μετά το τέλος του πειράματος από ζώα όλων των ομάδων, τα οποία δεν είχαν υποβληθεί σε διαδικασία λήψης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 ήταν αυξημένη σε όλες τις ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό για 2 ώρες με διαφορετικές συνθήκες αερισμού σε σύγκριση με τα ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στην ομάδα RR<sub>80</sub>VT<sub>12</sub> η φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκρισή με όλες τις άλλες ομάδες που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό. Στην εικόνα φαίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από στυπώματα κατά WESTERN των φωσφορυλιωμένων και ολικών AKT (A) και ERK1/2 (B) από δείγματα πνεύμονα που λήφθηκαν στο τέλος κάθε πειράματος και από κάτω ιστογράμματα μετά από στατιστική ανάλυση (n=4) των αποτελεσμάτων. Το ισοφόρτωμα ελέγχεται με τις ολικές (φωσφορυλιωμένες και μη) AKT και ERK1/2, και όλες οι ομάδες εκφράζονται ως επί τοις εκατό της ομάδας ελέγχου (ζώα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό). \*p<0.05 σε σύγκριση με τις ομάδες μηχανικού αερισμού RR<sub>120</sub>VT<sub>10</sub>, RR<sub>160</sub>VT<sub>8</sub> και RR<sub>160</sub>VT<sub>10</sub>.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση διαφορετικών αναπνευστικών συχνοτήτων στην ανάπτυξη πνευμονικής βλάβης από μηχανικό αερισμό σε ένα μοντέλο ποντικού σε φυσιολογικούς πνεύμονες. Χρησιμοποιήσαμε συμβατικό όγκο αερισμού στοχεύοντας σε φυσιολογικό PaCO<sub>2</sub>, συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Τα κύρια ευρήματα της έρευνάς μας μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

1. Ο μηχανικός αερισμός ανεξαρτήτως από τα μοντέλα μηχανικού αερισμού που επιλέγονται σχετίζεται με αυξημένη απελευθέρωση κυτοκινών στον πνεύμονα και στην συστηματική κυκλοφορία χωρίς αλλαγές στη μηχανική του αναπνευστικού συστήματος.
2. Η αυξημένη όμως αναπνευστική συχνότητα οδηγεί σε βλάβη του πνεύμονα η οποία μπορεί να αποτραπεί με την ταυτόχρονη μείωση του όγκου αερισμού
3. Η μείωση της αναπνευστικής συχνότητας ακόμα και σε συνδυασμό με ελαφρά αυξημένο όγκο αερισμού σχετίζεται με μείωση της φλεγμονής στον πνεύμονα και σε μειωμένη φωσφορυλίωση των κινασών που ενεργοποιούνται με την υπερδιάταση, των AKT και ERK1/2

Προηγούμενες μελέτες οι οποίες εκτίμησαν την επίδραση της συχνότητας αερισμού σε *ex vivo* και *in vivo* μοντέλα έδειξαν μία προστατευτική λειτουργία της χαμηλής συχνότητας αερισμού σε βλάβη του πνεύμονα η οποία προκαλείται από τον υψηλό όγκο αερισμού (20-40 mL/kg) και από μηχανικό αερισμό με υψηλή πίεση αεραγωγών (70, 71, 73). Στην μελέτη των Rich et al. (71) η ελάττωση της αναπνευστικής συχνότητας μείωσε τη VILI μόνο όταν χρησιμοποιούταν υψηλός όγκος αερισμού. Ένα μειονέκτημα αυτής της μελέτης ήταν ότι δεν ελεγχόταν η εισπνευστική ροή και η PaCO<sub>2</sub>. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η εισπνευστική ροή όσο και η PaCO<sub>2</sub> μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη της VILI (69, 72). Στην μελέτη μας οι δύο αυτές μεταβλητές είχαν ελάχιστες διαφορές και αυτό ήταν αποτέλεσμα των ρυθμίσεων του μηχανικού αερισμού και παρατηρήσαμε ότι η αναπνευστική συχνότητα μπορεί να επηρεάσει την



ανάπτυξη της VILI ακόμα και όταν ο όγκος αερισμού ήταν στην περιοχή των 10 mL/kg. Παρατηρήσαμε επίσης ότι ελάττωση του όγκου αερισμού σε υψηλές συχνότητες αερισμού απέτρεψε την ανάπτυξη της VILI. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα των Bshouty and Younes (82) που έδειξαν, σε ένα *ex vivo* μοντέλο, ότι το πνευμονικό οίδημα ελαττώθηκε σε υψηλή συχνότητα με μείωση του όγκου αερισμού.

Η ανάπτυξη της VILI σε μοντέλα φυσιολογικού πνεύμονα δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Ενώ μερικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα (61, 83) έχουν δείξει ότι ο μηχανικός αερισμός με ελαττωμένο όγκο αερισμού (6-7 mL/kg) δεν είναι βλαπτικός, άλλες μελέτες (78, 84-87) έχουν δείξει μέτρια αύξηση της εμφάνισης VILI με συμβατικό όγκο αερισμού και πίεση αεραγωγών. Αυτές οι ανακολουθίες μπορούν πιθανώς να αποδοθούν στην προστατευτική επίδραση του μικρού όγκου αερισμού όπως και στις μικρές διαφορές στη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και στις ρυθμίσεις αερισμού (για παράδειγμα επίπεδα PEEP). Στην μελέτη μας βρήκαμε ότι ο μηχανικός αερισμός με συμβατικό όγκο αερισμού αλλάζει διάφορους βιολογικούς δείκτες της VILI σε φυσιολογικούς πνεύμονες, δεδομένα τα οποία είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.

Σε μελέτες με ζωικά μοντέλα της VILI πρέπει να συμπεριλάβουμε στις εκτιμήσεις μας τις διαφορές ανάμεσα στα είδη. Η δύναμη που επιφέρει διάταση (strain) είναι το μέγεθος της κυψελιδικής παραμόρφωσης για δεδομένη εφαρμοζόμενη ισχύ, και διαφέρει από είδος σε είδος (35, 88). Πράγματι έχει δειχθεί ότι η ελάττωση του όγκου αερισμού από τα 10 στα 8 mL/kg στα ποντίκια οδηγεί σε παρόμοια μείωση της δύναμης που επιφέρει διάταση όταν η ελάττωση του όγκου αερισμού είναι από τα 12 στα 6 mL/kg στους ανθρώπους (88). Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι μία ελάττωση του όγκου αερισμού από τα 10 στα 8 mL/kg βελτίωσε τα επίπεδα της πνευμονικής βλάβης τα οποία επάγονται από την υψηλή συχνότητα αερισμού. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από την ελάττωση της δύναμης που επιφέρει κυψελιδική διάταση κατά αναλογία με την προστατευτική δράση που παρατηρήθηκε στην μελέτη του ARDSnet (65). Επιπροσθέτως είναι πολύ πιθανό η παρατηρούμενη προστατευτική



δράση της χαμηλής συχνότητας αερισμού να έχει υποτιμηθεί καθώς στην ομάδα χαμηλής αναπνευστικής συχνότητας χρησιμοποιήσαμε υψηλότερο όγκο αερισμού (12 mL/kg) για να διατηρήσουμε νορμοκαπνία.

Μια σημαντική κλινική παρατήρηση της μελέτης μας ήταν ότι η μηχανική του αναπνευστικού συστήματος δεν επηρεάστηκε από το μηχανικό αερισμό. Αυτό μας υποδεικνύει ότι η μηχανική των πνευμόνων δεν είναι ένα ευαίσθητος δείκτης για τα πρώτα στάδια σχηματισμού της VILI.

Στην παρούσα μελέτη είχαμε σχετικά μικρές διαφορές στις παραμέτρους του μηχανικού αερισμού έτσι ώστε να είναι κλινικά αξιοποιήσιμες. Συνεπώς αφού είχαμε μικρές διαφορές στις παραμέτρους ήταν σημαντικό να μειώσουμε στο ελάχιστο τις τυχαίες πηγές διακύμανσης στο πειραματικό μας μοντέλο. Για να αποφύγουμε την υπέρμετρη εισπνευστική ροή, η οποία μπορεί επίσης να επάγει τη VILI (69), ο λόγος χρόνου εισπνοής προς εκπνοή αυξήθηκε στις ομάδες υψηλής συχνότητας. Εξετάσαμε την παρουσία ενδογενούς PEEP και παρατηρήσαμε ότι δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες, πράγμα που μας υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα μας δεν επηρεάστηκαν από την συνολική PEEP. Να σημειωθεί ότι παρόλο που ο αυξημένος εισπνευστικός χρόνος έχει συσχετιστεί με τη VILI (89, 90), στην μελέτη μας, οι διαφορές ήταν πολύ μικρότερες από τις προηγούμενες αναφορές.

Στην ομάδα χαμηλής συχνότητας αερισμού, ο χρόνος εισπνοής ήταν μεγαλύτερος από αυτόν της φυσιολογικής ομάδας, εν τούτοις η πιθανότητα να ελαττώθηκε η προστατευτική δράση της χαμηλής συχνότητας αερισμού λόγω της αύξησης του χρόνου εισπνοής κατά 40% στην ομάδα  $RR_{80}VT_{12}$  δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Αναφορικά με τα επίπεδα  $PaCO_2$  επιδιώξαμε στο τέλος του πειράματος να είναι σχεδόν φυσιολογικά και πράγματι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Παρόλο που υπήρχε μία μικρή διακύμανση στην  $PaCO_2$  δεν υπήρχε κάποια συσχέτιση μεταξύ  $PaCO_2$ , επιπέδων πρωτεΐνης ή και IL-6 στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι σε τέτοιους τύπους πειραμάτων διακυμάνσεις στην  $PaCO_2$  παρατηρούνται συχνά. Πράγματι, σε αυτό το

ζωικό μοντέλο, σε μελέτες με παραπλήσιες συνθήκες αερισμού παρατηρήθηκαν διαφορετικές  $\text{PaCO}_2$ , πιθανόν λόγω μικρών διαφορών στις πειραματικές συνθήκες (για παράδειγμα μέγεθος σωλήνα) (83, 91).

Παρόλο που δε παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μηχανική του αναπνευστικού συστήματος, ο μηχανικός αερισμός με μικρή αναπνευστική συχνότητα συσχετίστηκε με σημαντική βελτίωση στην εικόνα του πνεύμονα σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες και στις συνθήκες με υψηλή αναπνευστική συχνότητα. Η ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση στο βρογχοκυψελιδικό υγρό που χαρακτηρίζει την παρουσία πνευμονικού οιδήματος υψηλής διαπερατότητας, και οι ενδείξεις πνευμονικής βλάβης στην ιστολογική εικόνα, ήταν μειωμένες στα ζώα τα οποία υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό χαμηλής αναπνευστικής συχνότητας σε σύγκριση με τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό φυσιολογικής ή υψηλής αναπνευστικής συχνότητας.

Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι ο μηχανικός αερισμός με υψηλή συχνότητα μηχανικού αερισμού δεν ήταν βλαπτικός όταν χρησιμοποιήθηκε χαμηλός όγκος αερισμού, υπογραμμίζοντας για μία ακόμα φορά την σημασία του όγκου αερισμού στην ανάπτυξη της πνευμονικής βλάβης επαγόμενης από μηχανικό αερισμό. Έτσι αν προσπαθήσουμε να παραλληλίσουμε τη VILI με την επαγωγή επαναλαμβανόμενου στρες σε κάποιο βιοϋλικό (74) βλέπουμε ότι είτε μειώνοντας την συχνότητα εφαρμογής του στρες (αναπνευστική συχνότητα) είτε την ένταση του στρες (όγκος αερισμού) μπορούμε να ελαττώσουμε αποτελεσματικά το μέγεθος της VILI. Οι διαφοροποιήσεις στην συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών που παρατηρήθηκαν δεν μπορούν να εξηγηθούν από αλλαγές στην διαπερατότητα του επιθηλίου επαγόμενη από την PEEP, καθώς η PEEP ήταν ελάχιστη και δεν διαφοροποιήθηκε ανάμεσα στις ομάδες (92).

Διαφορετικές αναπνευστικές συχνότητες σχετίζονται με αλλαγές στο περιβάλλον της φλεγμονής. Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), μία σημαντική προφλεγμονώδης κυτοκίνη αυξήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό και στον ορό των ζώων τα οποία υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό φυσιολογικής αναπνευστικής συχνότητας. Υπάρχουν λόγοι που

κάνουν ελκυστική την προτίμηση της IL-6 για μέτρηση από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Σύμφωνα με μία μετα-ανάλυση (93), η IL-6 βρέθηκε αυξημένη στις περισσότερες πειραματικές μελέτες VILI, επίσης στη μεγάλη κλινική μελέτη του ARDSnet (65) τα επίπεδα της IL-6 ήταν μειωμένα στην ομάδα που λάμβανε μικρότερο όγκο αερισμού και παρουσίαζε μικρότερη VILI και καλύτερα ποσοστά θνητότητας.

Ο μηχανικός αερισμός με χαμηλή συχνότητα αερισμού ήταν προστατευτικός για την ανάπτυξη αυτής της φλεγμονώδους αντίδρασης. Μηχανικός αερισμός με υψηλή αναπνευστική συχνότητα σχετίστηκε με αυξημένη φλεγμονή και ελαττώθηκε με τη μείωση του όγκου αερισμού, παρόλο που μία προηγούμενη μελέτη (83) με τη χρήση παρόμοιων συνθηκών μηχανικού αερισμού δε βρήκε αυξημένη ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό υγρό και IL-6, αν και διαφορές στη μεθοδολογία ιδιαίτερα στην τεχνική εξαγωγής του βρογχοκυψελιδικού υγρού θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή τη διαφορά.

Για να συλλέξουμε περισσότερα στοιχεία για την επίδραση διαφορετικών αναπνευστικών συχνοτήτων μελετήσαμε την ενεργοποίηση των AKT και ERK1/2. Έχει δειχθεί ότι τα AKT και ERK1/2 ενεργοποιούνται ως αντίδραση στην υπερέκταση των κυψελιδικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (94-96). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση των AKT και ERK1/2 οδηγεί σε μετατροπή της επαγόμενης από υπερδιάταση φλεγμονή και απόπτωση (19, 97). Επιπρόσθετα, σε μία πρόσφατη μελέτη (98) έγινε γνωστό ότι η υπερδιάταση του πνεύμονα ενεργοποιεί πολλαπλά μονοπάτια τα οποία επάγονται από την PI3K τα οποία αντιτίθενται το ένα στο άλλο και η ισορροπία που θα επέλθει, καθορίζει την αγγειακή διαπερατότητα. Ενεργοποίηση του PI3K/Src μονοπατιού αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα του πνεύμονα και οδηγεί στο σχηματισμό οιδήματος ενώ η ενεργοποίηση του PI3K/Akt/GSK3β μονοπατιού αντιτίθεται στην αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας σε μοντέλο απομονωμένου πνεύμονα (98). Παρατηρήσαμε αυξημένη φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 σε όλες τις ομάδες ζώων οι οποίες υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό, αν και τα επίπεδα της ενεργοποίησης του AKT και ERK1/2 ήταν μειωμένα σε μηχανισμό αερισμό με χαμηλή

αναπνευστική συχνότητα σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει ότι αλλαγές στην αναπνευστική συχνότητα οδηγούν σε αλλαγές στα μονοπάτια μεταφοράς των μηχανικών σημάτων. Η ακριβής σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης των AKT και ERK1/2 στην ανάπτυξη της VILI *in vivo* παραμένει άγνωστη.

Δυστυχώς, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί στην μελέτη μας. Πρώτον είναι μια μελέτη σε μοντέλο φυσιολογικού πνεύμονα, συνεπώς είναι άγνωστο αν αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να μεταφερθούν σε πνεύμονα που έχει ήδη υποστεί βλάβες. Δεύτερον οι αιμοδυναμικοί παράγοντες δεν μελετήθηκαν διεξοδικά, αν και η μεταβολική οξέωση δε διέφερε ανάμεσα στις ομάδες. Επιπροσθέτως για σύγκριση απευθυνθήκαμε σε μελέτες σε ζώα που δεν είχαν υποστεί τραχειοστομία και επομένως η επίδραση της τραχειοστομίας ως μεθόδου δεν αξιολογήθηκε. Τέλος, η κλινική σημασία μικρών αυξήσεων των δεικτών της πνευμονικής βλάβης δεν έχει ακόμα αποδειχτεί και αυτή η μελέτη μπορεί μόνο να προτείνει ότι η αναπνευστική συχνότητα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω ως παράγων ανάπτυξης της VILI.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο μηχανικός αερισμός με συμβατικό όγκο αερισμού και αναπνευστική συχνότητα επάγει την δημιουργία βλάβης στον πνεύμονα ακόμα και χωρίς αλλαγή στη μηχανική του πνεύμονα. Ελάττωση της αναπνευστικής συχνότητας δρα προστατευτικά ενάντια στην ανάπτυξη της VILI. Επιπρόσθετα η βλαπτική επίδραση της υψηλής αναπνευστικής συχνότητας μπορεί να περιοριστεί από την ταυτόχρονη μείωση του όγκου αερισμού. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η χαμηλή αναπνευστική συχνότητα μπορεί να αποβεί αποτελεσματική ως στρατηγική για την αποφυγή της VILI.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Marini JJ, Hotchkiss JR, Broccard AF. Bench-to-bedside review: microvascular and airspace linkage in ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 2003;7(6):435-444.
2. Han B, Lodyga M, Liu M. Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(3):181-187.
3. Frank JA, Matthay MA. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 2003;7(3):233-241.
4. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):818-824.
5. Sloane PJ, Gee MH, Gottlieb JE, et al. A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. Physiology and outcome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(2):419-426.
6. Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, et al. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(6 Pt 1):1818-1824.
7. Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 1):1159-1164.
8. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342(18):1334-1349.
9. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, et al. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2(7511):319-323.
10. Petty TL, Ashbaugh DG. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest* 1971;60(3):233-239.
11. 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 Respir Dis* 1974;110(5):556-565.
12. Dreyfuss D, Saumon G. Role of tidal volume, FRC, and end-inspiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1993;148(5):1194-1203.
13. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 1970;28(5):596-608.
14. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(5):1159-1164.
15. Colmenero-Ruiz M, Fernandez-Mondejar E, Fernandez-Sacristan MA, et al. PEEP and low tidal volume ventilation reduce lung water in porcine pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):964-970.
16. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, et al. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(3):485-489.
17. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002;109(6):699-705.
18. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, et al. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99(5):944-952.
19. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, et al. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):L1040-1050.

20. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(10 Pt 1):1896-1903.
21. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(3 Pt 1):602-611.
22. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(6):523-535.
23. Lim LH, Wagner EM. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(9):1068-1074.
24. Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(1):L3-15.
25. Martin TR, Pistoresse BP, Chi EY, et al. Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J Clin Invest* 1989;84(5):1609-1619.
26. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 1987;62(1):27-33.
27. Kotecha S, Mildner RJ, Prince LR, et al. The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants. *Thorax* 2003;58(11):961-967.
28. Oei J, Lui K, Wang H, et al. Decreased neutrophil apoptosis in tracheal fluids of preterm infants at risk of chronic lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88(3):F245-249.
29. Lukkarinen HP, Laine J, Kaapa PO. Lung epithelial cells undergo apoptosis in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 2003;53(2):254-259.
30. Hammerschmidt S, Kuhn H, Grasenack T, et al. Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(3):396-402.
31. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *Jama* 2003;289(16):2104-2112.
32. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, 2nd, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(6):1969-1977.
33. Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit Care* 2003;7(5):355-358.
34. Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(2):L328-335.
35. Mercer RR, Russell ML, Crapo JD. Alveolar septal structure in different species. *J Appl Physiol* 1994;77(3):1060-1066.
36. Seeger W, Pison U, Buchhorn R, et al. Surfactant abnormalities and adult respiratory failure. *Lung* 1990;168 Suppl:891-902.
37. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(6):1843-1850.
38. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88(6):1976-1981.
39. Bachurski CJ, Pryhuber GS, Glasser SW, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits surfactant protein C gene transcription. *J Biol Chem* 1995;270(33):19402-19407.
40. Salome RG, McCoy DM, Ryan AJ, et al. Effects of intratracheal instillation of TNF-alpha on surfactant metabolism. *J Appl Physiol* 2000;88(1):10-16.

41. Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, et al. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 1991;29(4 Pt 1):353-356.
42. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Response of alveolar cells to mechanical stress. *Curr Opin Crit Care* 2003;9(1):2-8.
43. Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S200-206.
44. Oldenhof AD, Shynlova OP, Liu M, et al. Mitogen-activated protein kinases mediate stretch-induced c-fos mRNA expression in myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(5):C1530-1539.
45. Peverali FA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. *Mol Med* 2001;7(1):68-78.
46. Dunn I, Pugin J. Mechanical ventilation of various human lung cells in vitro: identification of the macrophage as the main producer of inflammatory mediators. *Chest* 1999;116(1 Suppl):95S-97S.
47. Mourgéon E, Isowa N, Keshavjee S, et al. Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(4):L699-706.
48. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, et al. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):L167-173.
49. von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, et al. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):263-272.
50. Grembowicz KP, Sprague D, McNeil PL. Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress. *Mol Biol Cell* 1999;10(4):1247-1257.
51. Blahnik MJ, Ramanathan R, Riley CR, et al. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates. *Pediatr Res* 2001;50(6):726-731.
52. Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol* 2000;89(4):1645-1655.
53. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* 1998;24(11):1131-1138.
54. Held HD, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(3 Pt 1):711-716.
55. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):294-323.
56. Haitzma JJ, Uhlig S, Goggel R, et al. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med* 2000;26(10):1515-1522.
57. Lai-Fook SJ. Perivascular interstitial fluid pressure measured by micropipettes in isolated dog lung. *J Appl Physiol* 1982;52(1):9-15.
58. Lamm WJ, Kirk KR, Hanson WL, et al. Flow through zone 1 lungs utilizes alveolar corner vessels. *J Appl Physiol* 1991;70(4):1518-1523.
59. Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, et al. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg* 2001;92(2):428-436.



60. 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(1):109-116.
61. Gurkan OU, O'Donnell C, Brower R, et al. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(3):L710-718.
62. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama* 1999;282(1):54-61.
63. Stuber F, Wrigge H, Schroeder S, et al. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med* 2002;28(7):834-841.
64. Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, et al. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* 2003;95(4):1385-1393.
65. 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(18):1301-1308.
66. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2004;351(4):327-336.
67. Vlahakis NE, Schroeder MA, Pagano RE, et al. Role of deformation-induced lipid trafficking in the prevention of plasma membrane stress failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(9):1282-1289.
68. Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies AS. Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Pt 1):357-362.
69. Rich PB, Reickert CA, Sawada S, et al. Effect of rate and inspiratory flow on ventilator-induced lung injury. *J Trauma* 2000;49(5):903-911.
70. Conrad SA, Zhang S, Arnold TC, et al. Protective effects of low respiratory frequency in experimental ventilator-associated lung injury. *Crit Care Med* 2005;33(4):835-840.
71. Rich PB, Douillet CD, Hurd H, et al. Effect of ventilatory rate on airway cytokine levels and lung injury. *J Surg Res* 2003;113(1):139-145.
72. Sinclair SE, Kregenow DA, Lamm WJ, et al. Hypercapnic acidosis is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(3):403-408.
73. Hotchkiss JR, Jr., Blanch L, Murias G, et al. Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 1):463-468.
74. Hashin Z, Rotem A. A cumulative damage theory of fatigue failure. *Mater Sci Eng* 1978;34(2):147-160.
75. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Spontaneous resolution of pulmonary edema caused by short periods of cyclic overinflation. *J Appl Physiol* 1992;72(6):2081-2089.
76. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Invited review: plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* 2000;89(6):2490-2496;discussion 2497.
77. Li LF, Liao SK, Lee CH, et al. Ventilation-induced neutrophil infiltration and apoptosis depend on apoptosis signal-regulated kinase 1 pathway. *Crit Care Med* 2005;33(9):1913-1921.
78. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 2002;110(11):1703-1716.

79. Tankersley CG, Rabold R, Mitzner W. Differential lung mechanics are genetically determined in inbred murine strains. *J Appl Physiol* 1999;86(6):1764-1769.
80. Venegas JG, Harris RS, Simon BA. A comprehensive equation for the pulmonary pressure-volume curve. *J Appl Physiol* 1998;84(1):389-395.
81. Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, et al. Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF-alpha release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2. *J Cell Physiol* 2007;210(3):774-783.
82. Bshouty Z, Younes M. Effect of breathing pattern and level of ventilation on pulmonary fluid filtration in dog lung. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(2 Pt 1):372-376.
83. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, et al. Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(4):L710-717.
84. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(3):L533-542.
85. Moriondo A, Pelosi P, Passi A, et al. Proteoglycan fragmentation and respiratory mechanics in mechanically ventilated healthy rats. *J Appl Physiol* 2007;103(3):747-756.
86. O'Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, et al. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care* 2006;10(5):R136.
87. Takenaka K, Nishimura Y, Nishiuma T, et al. Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(6):L1078-1086.
88. Gattinoni L, Carlesso E, Cadringer P, et al. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. *Eur Respir J Suppl* 2003;47:15s-25s.
89. Casetti AV, Bartlett RH, Hirschl RB. Increasing inspiratory time exacerbates ventilator-induced lung injury during high-pressure/high-volume mechanical ventilation. *Crit Care Med* 2002;30(10):2295-2299.
90. Ozcan PE, Cakar N, Tugrul S, et al. The effects of airway pressure and inspiratory time on bacterial translocation. *Anesth Analg* 2007;104(2):391-396.
91. Li LF, Yu L, Quinn DA. Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(4):518-524.
92. Cooper JA, van der Zee H, Line BR, et al. Relationship of end-expiratory pressure, lung volume, and 99mTc-DTPA clearance. *J Appl Physiol* 1987;63(4):1586-1590.
93. Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, et al. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med* 2005;63(10):382-392.
94. Uhlig U, Fehrenbach H, Lachmann RA, et al. Phosphoinositide 3-OH kinase inhibition prevents ventilation-induced lung cell activation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(2):201-208.
95. Li LF, Ouyang B, Choukroun G, et al. Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappaB-inducing kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(2):L464-475.
96. Lionetti V, Lisi A, Patrucco E, et al. Lack of phosphoinositide 3-kinase-gamma attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2006;34(1):134-141.
97. Flaherty DM, Hinde SL, Monick MM, et al. Adenovirus vectors activate survival pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(2):L393-401.

98. Miyahara T, Hamanaka K, Weber DS, et al. Phosphoinositide 3-kinase, Src, and Akt modulate acute ventilation-induced vascular permeability increases in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(1):L11-21.