

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ Μ. ΣΙΑΦΑΚΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS ΣΤΟ
ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ ΣΕ ΔΙΑΧΥΤΕΣ ΔΙΑΜΕΣΕΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΣ**

**ΚΩΣΤΑΣ Ε. ΨΑΘΑΚΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS	
1.1 Αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και αερόβιος μεταβολισμός	2
1.2 Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες;	3
1.3 Το οξυγόνο ως οξειδωτικό μόριο – φυσικοχημικές ιδιότητες	3
1.4 Οξυγόνο και αερόβιος μεταβολισμός	6
1.5 Προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου	7
1.6 Πηγές ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου in vivo	9
1.7 Ο ρόλος των μεταβατικών μετάλλων στην παραγωγή ελευθέρων ριζών	11
1.8 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας	13
1.9 Η κυτταρική βλάβη που προκαλούν οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου	18
1.10 Η έννοια του οξειδωτικού stress	21
1.11 Οξειδωτικό stress και πνεύμονας	23
1.12 Ο ρόλος του οξειδωτικού stress σε παθήσεις των αεραγωγών	26
2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS ΚΑΙ ΔΙΑΧΥΤΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΙΚΕΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΕΣ	
2.1 Γενικά	29
2.2 Σαρκοείδωση	30
2.3 Το οξειδωτικό stress στη σαρκοείδωση	35
2.4 Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση	36
2.5 Το οξειδωτικό stress στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση	41
3. ΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ	
3.1 Γενικά	45
3.2 Τι είναι το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα;	45
3.3 Τεχνικές συλλογής	46
3.4 Τι μετράται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα;	47
3.4.1 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	47

3.4.2	8-ισοπροστάνιο (8-isoprostane)	50
3.4.3	pH	51
3.4.4	Προϊόντα μεταβολισμού του μονοξειδίου του αζώτου (NO)	52
3.4.5	Άλλα μόρια	54
3.5	Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τις μετρήσεις στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα	55
3.6	Η θέση του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα σε ερευνητικό και κλινικό επίπεδο σήμερα	61

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	65
1.1	Αρχική υπόθεση	65
1.2	Σκοπός της μελέτης	65
2.	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	67
2.1	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	67
2.1.1	Ομάδα ασθενών και ομάδα ελέγχου	67
2.1.2	Αξιολόγηση της δραστηριότητας της νόσου	67
2.1.3	Συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα	69
2.1.4	Ανάλυση των δειγμάτων	71
2.1.5	Στατιστική ανάλυση	72
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3.	ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (IPF)	76
3.1	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	76
3.1.1	Ομάδα ασθενών και ομάδα ελέγχου	76
3.1.2	Αξιολόγηση της νόσου	76
3.1.3	Συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα	77
3.1.4	Ανάλυση των δειγμάτων	77
3.1.5	Στατιστική ανάλυση	77
3.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80

5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
6.	ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	90
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	91
	SUMMARY	93
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	112
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΠΙΝΑΚΕΣ	112
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΙΚΟΝΕΣ	119
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	137

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

1.1 Αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και αερόβιος μεταβολισμός

Οξειδωση σημαίνει αποβολή ηλεκτρονίων από ένα άτομο ή μόριο.

Αναγωγή σημαίνει πρόσληψη ηλεκτρονίων από ένα άτομο ή μόριο.

Όταν μια ουσία A προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από κάποια άλλη ουσία B, τότε η A ανάγεται προκαλώντας οξειδωση στη B. Η A που είναι ο αποδέκτης των ηλεκτρονίων δρα ως **οξειδωτική ουσία** για την B. Αντίστοιχα η B που προσφέρει ηλεκτρόνια στην A δρα ως **αναγωγική ουσία** για την A.¹ Το οξυγόνο έχει την τάση να προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από άλλες ουσίες προκαλώντας οξειδωση σ' αυτές. Η λέξη «οξειδωση» προέρχεται ακριβώς από το «οξυγόνο» επειδή το τελευταίο παίζει πολύ καλά αυτό το ρόλο στον αερόβιο μεταβολισμό.²

Για να διατηρηθεί η κυτταρική οργάνωση και τάξη απαιτείται άντληση ενέργειας από το περιβάλλον. Στη φύση υπάρχουν δυο μορφές ζωής: α) οι φωτότροφοι οργανισμοί (τα φυτά), που με τη φωτοσύνθεση δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια και την χρησιμοποιούν μέσω ενδεργονικών αντιδράσεων (συσσώρευση ενέργειας) στη σύνθεση οργανικών ενώσεων και β) οι χημειότροφοι οργανισμοί όπως ο άνθρωπος, που τρώνε τις οργανικές αυτές ενώσεις και τις χρησιμοποιούν σε εξεργονικές αντιδράσεις (απόδοση ενέργειας), τις «καύσεις». Οι αντιδράσεις αυτές, που έχουν ως τελικό προϊόν CO₂ και H₂O, επιτρέπουν στα ηλεκτρόνια (ή άτομα υδρογόνου) να επιστρέψουν στο μόριο που τα «θέλει» περισσότερο (μοριακό οξυγόνο), απελευθερώνοντας μεγάλη ποσότητα ενέργειας. Οι αντιδράσεις αυτές, όπου μεταφέρονται ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου από τη μια ουσία στην άλλη, είναι **αντιδράσεις οξειδοαναγωγής** και βρίσκονται ακριβώς στον πυρήνα του αερόβιου (ανθρώπινου) μεταβολισμού. Οι χημειότροφοι οργανισμοί εγκλωβίζουν τελικά την παραγόμενη από τις καύσεις ενέργεια, σε ενώσεις «υψηλής ενέργειας», όπως το ATP (ADP + P + ενέργεια → ATP). Το τελευταίο παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου: δρα ως φορέας ελεύθερης ενέργειας που τροφοδοτεί ενεργειακά και με ελεγχόμενο τρόπο τις ενδεργονικές λειτουργίες του κυττάρου (ATP → ADP + P + ενέργεια).^{2,3}

1.2 Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες;

Στα μόρια, όπως και στα άτομα, τα ηλεκτρόνια καταλαμβάνουν περιοχές που ονομάζονται τροχιακά. Σύμφωνα με τη θεωρία των μοριακών τροχιακών, σε κάθε τροχιακό ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να έχει δυο μόνο πιθανές κατευθύνσεις spin (κίνηση περιστροφής) και κάθε τροχιακό μπορεί να φιλοξενήσει δυο μόνο ηλεκτρόνια, αντίθετου spin (απαγορευτική αρχή του Pauli).¹ **Ελεύθερη ρίζα** ονομάζουμε κάθε ένωση που μπορεί να υπάρχει ως ανεξάρτητη ουσία (ελεύθερη) και περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.⁴ Ασύζευκτο είναι ένα ηλεκτρόνιο που βρίσκεται μόνο του σε ένα τροχιακό. Τα περισσότερα μόρια δεν είναι ρίζες και περιέχουν ζεύγη ηλεκτρονίων, με αντίθετα spin σε κάθε τροχιακό (συζευγμένα), που μπορεί να μετέχουν ή όχι στο σχηματισμό δεσμών. Όταν τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συζευγμένα σε ένα τροχιακό είναι περισσότερο σταθερά. Αντίθετα όταν είναι μονήρη, όπως στις ελεύθερες ρίζες, είναι πιο «δραστικά» και έχουν την τάση να αντιδρούν με παρακείμενα μόρια προκειμένου να μεταπέσουν σε σταθερότερη (και χαμηλότερη ενεργειακά) κατάσταση. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με άλλες ουσίες με διάφορους τρόπους. Όταν συναντώνται δυο ρίζες, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους μπορεί να συνδυαστούν, με αντίθετο spin, σε ένα κοινό τροχιακό, σχηματίζοντας έτσι ένα ομοιοπολικό δεσμό, πχ: $H\bullet + H\bullet \rightarrow H_2$ (H - H). Το «•» συμβολίζει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και το «-» τη σύζευξη δυο τέτοιων ηλεκτρονίων σε ένα κοινό τροχιακό, δηλ. ένα ομοιοπολικό δεσμό (••). Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί επίσης να αντιδρούν με μη ρίζες:

- i) να προσφέρουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους (αναγωγική ρίζα)
- ii) να προσλάβουν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο προκειμένου το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους να σχηματίσει ζεύγος (οξειδωτική ρίζα)
- iii) να προσκολληθούν σε άλλο μόριο.

Σε κάθε περίπτωση το μόριο με το οποίο αντιδρά μια ρίζα μετατρέπεται σε ρίζα. Ένα χαρακτηριστικό των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών είναι ότι έχουν την τάση να εξελίσσονται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπου μια ρίζα δημιουργεί μια επόμενη κοκ.⁴

1.3 Το οξυγόνο ως οξειδωτικό μόριο – φυσικοχημικές ιδιότητες

Το μόριο του οξυγόνου διαθέτει δύο ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε δυο διαφορετικά τροχιακά το καθένα ($\bullet\text{O}-\text{O}\bullet$). Έχει επομένως τα χαρακτηριστικά μιας ρίζας με δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια (diradical).² Θερμοδυναμικά, το οξυγόνο έχει την τάση να δέχεται ηλεκτρόνια (δύο ανά άτομο ή τέσσερα ανά μόριο) για να σχηματίσει μόρια νερού, που έχουν πολύ χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη ($\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$).⁵

Παρά την ισχυρή αυτή ιδιότητα του οξυγόνου, ως οξειδωτικό μόριο, υπάρχει ένα «κινητικός φραγμός» που δεν επιτρέπει την άμεση εκδήλωσή της. Ο κινητικός αυτός φραγμός οφείλεται στον τρόπο κατανομής των δυο ασύζευκτων ηλεκτρονίων στα τροχιακά τους, γι αυτό και συχνά το φαινόμενο αυτό περιγράφεται και ως «spin restriction».⁶ Μια λεπτομερής ανάλυση των φυσικοχημικών αυτών ιδιοτήτων του οξυγόνου θα απαιτούσε εξειδικευμένες γνώσεις φυσικοχημείας και θα ξέφευγε ενδεχομένως από το σκοπό της παρούσας μελέτης. Λόγω όμως της σημασίας των φαινομένων αυτών για τα βιολογικά συστήματα, παρατίθεται στη συνέχεια μια συνοπτική και απλουστευμένη περιγραφή:

Τα δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια του μορίου του οξυγόνου κατανέμονται σε δυο διαφορετικά τροχιακά, αλλά με το ίδιο spin (παράλληλα). Αυτό, σύμφωνα με τη θεωρία των μοριακών τροχιακών, προσδίδει στο μόριο τη μεγαλύτερη σταθερότητα (μικρότερη ενεργειακή στάθμη – μορφή «triplet» O_2).¹ Η κατανομή αυτή όμως, προσδίδει στο μόριο του οξυγόνου και παραμαγνητικές ιδιότητες, που οφείλονται στο μαγνητικό πεδίο που δημιουργούν τα ηλεκτρόνια εξαιτίας του spin. Σε ενώσεις όπου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται όλα συζευγμένα στα τροχιακά τους, τα μαγνητικά πεδία από τα αντίθετα (αντιπαράλληλα) spin σε κάθε τροχιακό αλληλοαναιρούνται με αποτέλεσμα το μόριο συνολικά να μην παρουσιάζει μαγνητικό πεδίο (διαμαγνητικό μόριο). Στο μόριο του οξυγόνου όπου τα δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια έχουν παράλληλο spin το μαγνητικό πεδίο διατηρείται (παραμαγνητικό μόριο). Φαίνεται ότι το γεγονός αυτό καθιστά το μόριο του οξυγόνου ενεργειακά «δυσπρόσιτο», κάνοντας αδύνατη την πρόσληψη ηλεκτρονίων. Απαιτείται αναστροφή του spin ενός από τα ασύζευκτα ηλεκτρονία του, με πρόσληψη ενέργειας από το μόριο του οξυγόνου, ώστε να επιτραπεί η σύζευξη με άλλο ηλεκτρόνιο (ενεργοποιημένη κατάσταση – μορφή «singlet» O_2). Στη συμβατική συχνότητα

πρόσκρουσης των μορίων, η περίοδος επαφής είναι πολύ βραχείας διάρκειας για να γίνει αναστροφή του spin. Έτσι υπό φυσιολογικές συνθήκες, τέτοιες αντιδράσεις οξειδωσης συνήθως αποτρέπονται.²

Παρακάτω φαίνονται παραστατικά οι δυο μορφές του μοριακού οξυγόνου (triplet και singlet O₂) και οι αντίστοιχες θέσεις των ασύζευκτων ηλεκτρονίων στα δύο τροχιακά τους. Τα βέλη δείχνουν τη φορά του spin των ηλεκτρονίων:

Ενεργειακή κατάσταση O ₂	Δέσμευση «εξωτερικών» τροχιακών		Ενέργεια πάνω από το βασικό ενεργειακό επίπεδο
Δεύτερο επίπεδο ενεργοποίησης (singlet O ₂)	↑	↓	37 kcal/mol
Πρώτο επίπεδο ενεργοποίησης (singlet O ₂)	↑↓	κενό	22 kcal/mol
Βασικό ενεργειακό επίπεδο (triplet O ₂)	↑	↑	

Όπως φαίνεται παραπάνω, η ενεργοποιημένη μορφή οξυγόνου (singlet O₂) αντιστοιχεί σε δυο πιθανές καταστάσεις με διαφορετικό ενεργειακό επίπεδο η κάθε μια. Στο πρώτο επίπεδο ενεργοποίησης το οξυγόνο μπορεί να δεχθεί ζεύγος ηλεκτρονίων, ενώ στο δεύτερο επίπεδο ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά. Και στις δυο αυτές καταστάσεις ενεργοποίησης αίρεται ο περιορισμός του spin, αφού τα ηλεκτρόνια περιστρέφονται αντιπαράλληλα, και η οξειδωτική ικανότητα του οξυγόνου αυξάνεται εξαιρετικά.^{6,7,8} Έτσι το singlet-O₂ (σε αντίθεση με το triplet-O₂) γίνεται ιδιαίτερα τοξικό στα διάφορα βιολογικά συστήματα, λόγω της ισχυρής οξειδωτικής του δράσης σε ζωτικής σημασίας μόρια, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια.⁹

Το χαρακτηριστικό αυτό του μοριακού οξυγόνου (spin restriction) δημιουργεί ένα ενεργειακό εμπόδιο για τις περισσότερες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, αφού απαιτείται ενέργεια ενεργοποίησης για την πραγματοποίησή τους. Μέσα στη γήινη ατμόσφαιρα, όπου η υψηλή πυκνότητα οξυγόνου δημιουργεί ένα

θερμοδυναμικά υψηλό οξειδωτικό δυναμικό, το ενεργειακό αυτό εμπόδιο αποδεικνύεται εξαιρετικά σημαντικό για τη διατήρηση της ζωής, αφού μας προφυλάσσει από την καταστροφική δράση του οξυγόνου.

Από την άλλη μεριά, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια, το ίδιο αυτό ενεργειακό εμπόδιο καθιστά το οξυγόνο ιδεώδη τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων για τα βιολογικά συστήματα. Υπάρχουν ένζυμα με περιοχές σύνδεσης, που μπορούν να κρατήσουν σε επαφή το οξυγόνο με ένα προς οξείδωση μόριο, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από εκείνο μιας απλής μοριακής πρόσκρουσης, παρακάμπτοντας το ενεργειακό εμπόδιο και επιτρέποντας να γίνει η αντίδραση, με ελεγχόμενο πλέον τρόπο. Ταυτόχρονα τα ένζυμα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα δέσμευσης της εκλυόμενης από την οξείδωση ενέργειας σε υψηλής ενέργειας ενώσεις, όπως το ATP.²

1.4 Οξυγόνο και αερόβιος μεταβολισμός

Στον άνθρωπο ο αερόβιος μεταβολισμός και κατ' επέκταση όλος ο μηχανισμός παραγωγής ενέργειας βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στο οξυγόνο που λειτουργεί ως τελικός αποδέκτης. Σε ένα εχθρικό - οξειδωτικό περιβάλλον, όπως αυτό της γήινης ατμόσφαιρας, ο άνθρωπος, αλλά και όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί, έχουν προσαρμοστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να χρησιμοποιούν το O₂ στην καύση των οργανικών ενώσεων της τροφής τους, εγκλωβίζοντας, κατά τρόπο ελεγχόμενο, την εκλυόμενη ζωτική ενέργεια σε ATP (οξειδωτική φωσφορυλίωση - Εικόνα 1).

Ελάχιστα είναι τα ένζυμα στο οργανισμό που διαχειρίζονται ακριβώς το μόριο του οξυγόνου. Το 98% περίπου του οξυγόνου που καταναλώνουμε το διαχειρίζεται ένα μόνο ένζυμο: η οξειδάση του κυτοχρώματος. Βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και μεταφέρει, με μια μόνο αντίδραση, τέσσερα ηλεκτρόνια στο μόριο του οξυγόνου δίνοντας ως προϊόν δυο μόρια ύδατος ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$). Η δομή του ενζύμου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Διαθέτει τέσσερις θέσεις αναγωγής (οι δύο περιέχουν από ένα μόριο αίμης και οι άλλες δυο από ένα ιόν χαλκού). Όταν όλες οι θέσεις αναχθούν (δεχθούν από ένα ηλεκτρόνιο), ακολουθεί η ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων σε ένα μόριο οξυγόνου χωρίς ενδιάμεσες αντιδράσεις. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν ενδιάμεσα στάδια αναγωγής του μοριακού

οξυγόνου φαίνεται ότι είναι ένα φαινόμενο επιλογής των ειδών με αερόβιο μεταβολισμό, καθώς αυτό τους έχει εξασφαλίσει την επιβίωση: αναγωγή του οξυγόνου με τρόπο ασφαλή και ελεγχόμενο. Όπως θα περιγραφεί παρακάτω, οποιοσδήποτε άλλος τρόπος αναγωγής του οξυγόνου κατά στάδια εκτός από την πλήρη αναγωγή του με τέσσερα ηλεκτρόνια, θα οδηγούσε στο σχηματισμό «ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου». Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν τοξικές ιδιότητες για τα οργανικά μόρια και η ανεξέλεγκτη παραγωγή τους θα είχε καταστροφικές συνέπειες σε έναν αερόβιο οργανισμό. Φαίνεται επομένως ότι η μεταβολική οδός μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο (ως αποτέλεσμα προσαρμογής των ειδών σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο) ώστε τα ηλεκτρόνια να καθοδηγούνται προς την κατάλληλη κατεύθυνση, χωρίς απώλειες, όπως ακριβώς λειτουργεί η μόνωση σε ένα ηλεκτρικό κύκλωμα.^{2,3}

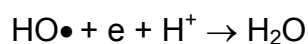
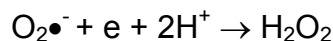
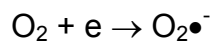
1.5 Προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου

Η πλήρης αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια από την οξειδάση του κυτοχρώματος, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (θέση «κυτόχρωμα α₃» στη Εικόνα 1), δίνει ως τελικό προϊόν ύδωρ. Μερικές φορές όμως, το οξυγόνο κατορθώνει να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα μόρια με μη ενζυμικό τρόπο (αυτο-οξειδωση). Αλλά επειδή δεν μπορεί να δεχθεί ένα ζεύγος ηλεκτρονίων, δέχεται ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών: Η αναγωγή του O₂ με ένα ηλεκτρόνιο δίνει ως προϊόν την ρίζα του υπεροξειδίου (O₂•⁻). Με τη προσθήκη και δεύτερου ηλεκτρονίου σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ δεν είναι ρίζα. Επειδή όμως έχει την τάση να προσλαμβάνει άλλα δυο ηλεκτρόνια προς σχηματισμό δυο μορίων ύδατος, συμπεριφέρεται (όπως και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) ως κυτταροτοξική οξειδωτική ουσία. Μια από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητές του είναι ότι, σε αντίθεση με το O₂•⁻, έχει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να παρουσιάζει την οξειδωτική του δράση σε σχετικά απομακρυσμένα από τον τόπο παραγωγής του σημεία, όπως παρακείμενα κυτταρικά διαμερίσματα ή γειτονικά κύτταρα.

Όταν ένα τρίτο ηλεκτρόνιο προστεθεί στον δεσμό O-O του H₂O₂, ο δεσμός αυτός διασπάται σχηματίζοντας μια ρίζα υδροξυλίου (HO•). Η τελευταία

αποτελεί μια από τις πιο ισχυρές οξειδωτικές ουσίες, αφού πρακτικά μπορεί να οξειδώσει οποιαδήποτε οργανική ένωση (υπεροξείδωση λιπών, διάσπαση αλύσου DNA κλπ). Ας σημειώσουμε εδώ ότι η δραστηριότητα των $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 συχνά εκδηλώνεται έμμεσα. Είναι γνωστό για παράδειγμα ότι αυξημένα επίπεδα $O_2^{\bullet-}$ ή H_2O_2 έχουν βλαπτική επίδραση στο DNA ή στις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά κανένας από τους μεταβολίτες αυτούς δεν αντιδρά άμεσα με τα δομικά αυτά στοιχεία του κυττάρου. Η βλαπτική δράση τους εκδηλώνεται μέσω της παραγωγής δραστικότερων προϊόντων όπως το $HO\bullet$. Έτσι το $HO\bullet$ θεωρείται ως ο πιθανότερος τελικός μεσολαβητής μέσω του οποίου οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες ασκούν την τοξική δράση τους στους ιστούς. Όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια, ο κυριότερος μηχανισμός παραγωγής του $HO\bullet$ είναι η αναγωγή των $O_2^{\bullet-}$ ή H_2O_2 παρουσία ιόντων σιδήρου ή χαλκού. Δευτερεύοντες μηχανισμοί μπορεί να είναι η διάσπαση του υπεροξυ-νιτρώδους ανιόντος (βλ. παράγραφο 1.6), ή η διάσπαση μορίων ύδατος μετά από επίδραση υψηλής ενέργειας ακτινοβολίας (π.χ. γ-ακτινοβολία) σε υδατικά διαλύματα: $H-O-H \rightarrow HO\bullet + H\bullet$

Συνοπτικά, η αναγωγή του οξυγόνου κατά στάδια περιγράφεται με τις αντιδράσεις:



Η ομάδα λοιπόν των προϊόντων-μεταβολιτών που προέρχονται από την ατελή αναγωγή του οξυγόνου περιλαμβάνει το $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 και το $HO\bullet$. Με εξαίρεση το H_2O_2 που παρουσιάζει σταθερότητα *in vitro*, οι υπόλοιποι μεταβολίτες έχουν πολύ μικρή ημιπερίοδο ζωής (της τάξεως του msec ή λιγότερο), γεγονός που δείχνει και τη μεγάλη δραστηριότητά τους.

Όλες οι παραπάνω ουσίες, που περιγράφονται και ως «προ-οξειδωτικές», έχουν ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες και επιβλαβή επίδραση στα κύτταρα. Η ομάδα αυτή περιγράφεται με διάφορους όρους στη βιβλιογραφία, όπως «ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από το μεταβολισμό του οξυγόνου», «ενεργό μεταβολίτες οξυγόνου» (Reactive Oxygen Metabolites – ROM), «ενεργά είδη οξυγόνου» (Reactive Oxygen Species – ROS) κλπ. Επειδή το H_2O_2 δεν είναι

ρίζα, ο όρος «ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου» θεωρείται πιο δόκιμος. Στη ίδια αυτή ομάδα συμπεριλαμβάνονται πολλές φορές και άλλες ουσίες με ανάλογες οξειδωτικές ιδιότητες. Τέτοιες είναι το «ενεργό» οξυγόνο (singlet-O₂), το υποχλωριώδες οξύ (παράγωγο του ενζύμου των ουδετεροφίλων μυελοϋπεροξειδάση), το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν, το οξειδίο του αζώτου καθώς και οργανικές (R•), αλκόξυ- (RO•) και υπερόξυ(λο)- (ROO•) ρίζες.
2,4,10,11,12,13

1.6 Πηγές ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου in vivo

Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει μια σταθερή παραγωγή ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου. Ο σχηματισμός τους οφείλεται σε ενδογενείς μηχανισμούς αλλά και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Εικόνα 2). Το κάπνισμα, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, η ακτινοβολία, δηλητήρια, φάρμακα κλπ (xenobiotics), είναι συνήθεις «εξωγενείς» παράγοντες που ευνοούν άμεσα ή έμμεσα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών στον οργανισμό.^{11,12} Από τους ενδογενείς μηχανισμούς δύο είναι οι κυριότεροι:

α) Ο αερόβιος μεταβολισμός.

ι) Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.4, ο ανθρώπινος μεταβολισμός έχει προσαρμοστεί με τέτοιο τρόπο στο αερόβιο περιβάλλον, ώστε χρησιμοποιεί το οξυγόνο έχοντας την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση ενέργειας και τη μικρότερη παραγωγή τοξικών υποπροϊόντων. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως, με την πλήρη αναγωγή του οξυγόνου στο επίπεδο του μιτοχονδρίου, από την οξειδάση του κυτοχρώματος, αποφεύγοντας έτσι την παραγωγή ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου.

Ωστόσο, παρά την προσαρμογή μας αυτή στο οξειδωτικό περιβάλλον, ο μεταβολισμός μας δεν φαίνεται τελικά να είναι τέλειος. Τουλάχιστον δυο σημεία στην αναπνευστική αλυσίδα έχουν βρεθεί, όπου ηλεκτρόνια μπορούν να «ξεφύγουν» και να ανάγουν παρακείμενα μόρια οξυγόνου σχηματίζοντας H₂O₂. Τα σημεία αυτά έχουν εντοπιστεί στη θέση του Complex I και της ubiquinone (κόκκινο βέλος - Εικόνα 1), και αποτελούν την κύρια πηγή ενδοκυττάρου H₂O₂. Υπολογίζεται ότι αυτή η «διαρροή» ηλεκτρονίων αποτελεί το 1-2% των ηλεκτρονίων που «ρέουν» στην αναπνευστική αλυσίδα. Έτσι τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή «τυχαίας» παραγωγής ενεργών

μεταβολιτών οξυγόνου.¹⁴ Η κλινική σημασία αυτού του φαινομένου φαίνεται στη περίπτωση της τοξικότητας του οξυγόνου στους πνεύμονες. Σε καταστάσεις υπεροξυγόνωσης, ο ρυθμός διαρροής ηλεκτρονίων από τα μιτοχόνδρια των πνευμονοκυττάρων αυξάνεται ανάλογα με την μερική πίεση του οξυγόνου. Έτσι υγιή ποντίκια, θα πεθάνουν μέσα σε 72 ώρες όταν παραμένουν σε περιβάλλον με 100% οξυγόνο.¹⁵

ii) Το οξυγόνο δεν χρησιμοποιείται μόνο στα μιτοχόνδρια. Μικρές ποσότητες χρησιμοποιούνται και σε άλλα ενζυμικά συστήματα με πιο αντιπροσωπευτικό το κυτόχρωμα P450. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 8 διαφορετικά είδη κυτοχρωμάτων P450 που βρίσκονται στα μικροσωμάτια του ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατοκυττάρων (αλλά και άλλων κυττάρων). Αυτά καταλύουν αντιδράσεις μεταβολισμού και/ ή αδρανοποίησης πολλών ενδογενών αλλά και εξωγενών ουσιών, όπως φάρμακα, τοξικές ουσίες, ορμόνες κλπ. Οι αντιδράσεις αυτές μπορεί να αποτελέσουν πηγή παραγωγής ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου, λόγω «διαρροής», όπως συμβαίνει και στην αναπνευστική άλυσσο.^{3,5}

iii) Κάποιες ουσίες, όπως οι κατεχολαμίνες ή το ασκορβικό οξύ, μπορούν να «αυτό-οξειδωθούν», παρουσία ιόντων μετάλλων, αντιδρώντας απευθείας με το οξυγόνο και σχηματίζοντας $O_2\bullet^-$.¹⁶

iv) Έχει βρεθεί ότι το $O_2\bullet^-$ παράγεται (εκτός από τα φαγοκύτταρα που θα περιγραφούν στη συνέχεια) από λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες και το ενδοθήλιο των αγγείων. Η σημασία της παραγωγής αυτής δεν έχει επακριβώς διευκρινιστεί, φαίνεται όμως ότι το $O_2\bullet^-$, σε ελεγχόμενες ποσότητες, μπορεί να συμμετέχει σε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες έχοντας το ρόλο του «μεταφορέα» μηνυμάτων. Το ενδοθήλιο των αγγείων π.χ., παράγει $O_2\bullet^-$, που με τη σειρά του ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο μειώνοντας τα επίπεδα του NO: $NO\bullet + O_2\bullet^- \rightarrow ONOO^-$. Το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν ($O=NOO^-$, peroxyntirite), αποτελεί και αυτό με τη σειρά του ενεργό μεταβολίτη οξυγόνου, που είτε προκαλεί οξειδωση σε -SH ομάδες πρωτεϊνικών μορίων ή αποδομείται σχηματίζοντας $HO\bullet$ ως υποπροϊόν.^{5,13,16,17}

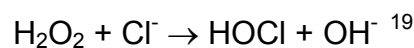
v) Η οξειδάση της ξανθίνης σχηματίζεται σε παθολογικές καταστάσεις από μετατροπή της δεϋδρογενάσης της ξανθίνης (όπως στο σύνδρομο

ισχαιμίας – επαναιμάτωσης), και καταλύει την μετατροπή της ξανθίνης και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ σχηματίζοντας $O_2\bullet^-$ ως υποπροϊόν.⁵

β) Τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα.

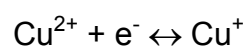
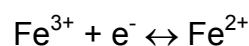
Είναι και το μεγαλύτερο ποσοστό των παραγόμενων ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου *in vivo* («λειτουργική» παραγωγή). Η παραγωγή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί επιτρέπει στα φαγοκύτταρα να σκοτώνουν τα βακτηρίδια που φαγοκυτταρώνουν.⁴ Τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα) παράγουν $O_2\bullet^-$ και H_2O_2 . Το $O_2\bullet^-$ σχηματίζεται με τη δράση του ενζύμου NADPH οξειδάση. Σε ασθενείς με χρόνια κοκκιωματώδη νόσο, το ένζυμο αυτό δεν λειτουργεί με αποτέλεσμα σοβαρές και επανειλημμένες λοιμώξεις λόγω ακριβώς της αδυναμίας των φαγοκυττάρων να ασκήσουν βακτηριοκτόνο δράση.¹⁸

Στα ουδετερόφιλα το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση χρησιμοποιεί το H_2O_2 για να σχηματίσει HOCl (υποχλωριώδες οξύ) που είναι επίσης ένα ισχυρό βακτηριοκτόνο:



1.7 Ο ρόλος των μεταβατικών μετάλλων στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

Τα μέταλλα σίδηρος και χαλκός ανήκουν στα μεταβατικά στοιχεία ή στοιχεία μεταπτώσεως του περιοδικού πίνακα.¹ Ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι ο μεταβαλλόμενος αριθμός οξειδώσεώς τους:

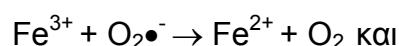


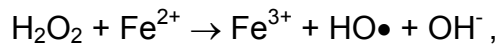
Με την ιδιότητά τους αυτή, είναι ιδανικά στην επαγωγή σχηματισμού ελευθέρων ριζών και στην επιτάχυνση των αλυσιδωτών αντιδράσεών τους.⁴

Μια σημαντική αντίδραση που υπό φυσιολογικές συνθήκες αναστέλλεται στον οργανισμό είναι η *αντίδραση Fenton*, που σχηματίζει HO• με τη βοήθεια ιόντων σιδήρου ή χαλκού:

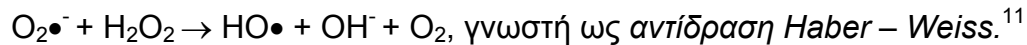


Η αντίδραση Fenton μπορεί να αποτελεί τμηματική αντίδραση της αλληλουχίας:





το «καθαρό» αποτέλεσμα της οποίας είναι:



Το HO• είναι το πλέον δραστικό από τα προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου. Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν ένα μεταβατικό μέταλλο είναι συνδεδεμένο με κάποιο βιολογικό μόριο (λιπίδιο κυτταρικής μεμβράνης, DNA), τότε το HO• που θα σχηματιστεί από μια πιθανή αντίδραση Fenton θα αντιδράσει αμέσως με αυτό το μόριο «στόχο», ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι οποιασδήποτε αντιοξειδωτικής ουσίας. Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας αντίδρασης μπορεί να είναι η βλάβη της κυτταρική μεμβράνης ή η διάσπαση του DNA αντίστοιχα.¹⁶ Είναι επομένως κριτικής σημασίας η ασφαλής αποθήκευση των μετάλλων αυτών στον οργανισμό, προκειμένου να αποφευχθεί η έκθεσή τους σε οξειδωτικές ουσίες και κατ' επέκταση η συμμετοχή τους σε αντιδράσεις Fenton.

i) *Σίδηρος*. Η ποσότητα σιδήρου σε ένα ενήλικα οργανισμό υπολογίζεται σε 4 gr περίπου. Από αυτά τα 2/3 βρίσκονται στην αιμοσφαιρίνη, ένα 10% στη μυοσφαιρίνη και ένα μικρό ποσοστό σε ένζυμα και στην τρανσφερρίνη (πρωτεΐνη μεταφοράς για τον σίδηρο). Ο υπόλοιπος σίδηρος βρίσκεται δεσμευμένος σε ενδοκυττάρια «αποθηκευτικές» πρωτεΐνες, όπως η φερριτίνη και η αιμοσιδηρίνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μόνο το 30% της τρανσφερρίνης στο πλάσμα είναι δεσμευμένη με σίδηρο, ενώ η ελεύθερη συγκέντρωση σιδήρου στο πλάσμα είναι σχεδόν μηδενική. Τα κύτταρα παραλαμβάνουν τον απαιτούμενο για τη λειτουργία τους σίδηρο, πιθανότατα μέσω πινοκυττάρωσης του συμπλέγματος τρανσφερρίνη-σίδηρος. Στα κύτταρα ο σίδηρος αποθηκεύεται άμεσα στην φερριτίνη. Η τελευταία έχει τεράστια σιδηροδεσμευτική ικανότητα: 4500 mol σιδήρου για κάθε mol φερριτίνης. Η δέσμευση αυτή του σιδήρου στον οργανισμό και η πρακτικά μηδενική παρουσία του ως ελεύθερο ιόν, αποτρέπει την συμμετοχή του σε αντιδράσεις Fenton. Διάφορα άλλα μόρια στο πλάσμα συμμετέχουν επίσης στην προστασία του οργανισμού από τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του σιδήρου: *Το ουρικό οξύ* δεσμεύει το σίδηρο και αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες, *η σερουλοπλασμίνη* καταλύει την μετατροπή του σιδήρου από Fe²⁺ σε Fe³⁺ αποτρέποντας έτσι την αντίδραση Fenton, *η απποσφαιρίνη* δεσμεύει την

ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, αποτρέποντας την απελευθέρωση σιδήρου από την αίμη.⁵

ii) Χαλκός. Όπως και ο σίδηρος, μπορεί επίσης να συμμετέχει σε ανάλογες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις προς σχηματισμό HO• από H₂O₂. Σε φυσιολογικές συνθήκες τέτοιες αντιδράσεις όμως αποφεύγονται λόγω της δέσμευσης του χαλκού σε πρωτεΐνες. Στο πλάσμα ο χαλκός συνδέεται με την σερουλοπλασμίνη και την αλβουμίνη. Η αλβουμίνη που είναι συνδεδεμένη με το χαλκό έχει την ιδιότητα να αντιδρά άμεσα με τα σχηματιζόμενα HO• και να τα αδρανοποιεί. Κατά μίαν έννοια, η αλβουμίνη δρα εδώ ως ένα «θυσιαζόμενο» αντιοξειδωτικό μόριο.^{5,20}

iii) Απελευθέρωση σιδήρου ή χαλκού από τις αποθηκευτικές πρωτεΐνες τους με τη μορφή ιόντων δεν συμβαίνει κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Έχει βρεθεί όμως ότι ο σίδηρος απελευθερώνεται από την φερριτίνη σε όξινο pH, ιδιαίτερα παρουσία ATP, ADP ή κιτρικού. Τέτοιες συνθήκες συναντάμε σε περιοχές ενεργού φλεγμονής ή στην ιστική βλάβη από το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Είναι επομένως πιθανό, στις καταστάσεις αυτές να σχηματίζονται HO• που συμμετέχουν επίσης στην ιστική βλάβη. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, μέσω των H₂O₂ και O₂•⁻ που εκλύουν, βρέθηκε επίσης ότι μπορούν να αποδεσμεύσουν το σίδηρο από τη φερριτίνη και από άλλες αποθηκευτικές πρωτεΐνες. Έτσι γίνεται σαφές ότι η προστασία που προσφέρει στον οργανισμό αυτή η «απομόνωση» των ιόντων σιδήρου (ή χαλκού), καταλύεται σε νοσηρές καταστάσεις, όπως η φλεγμονή.^{11,12}

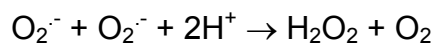
1.8 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Ο οργανισμός διαθέτει διάφορους μηχανισμούς άμυνας έναντι των οξειδωτικών ουσιών που τελικά θα παραχθούν είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Οι μηχανισμοί αυτοί συνοψίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τις αντιοξειδωτικές ουσίες και τις πρωτεΐνες ασφαλούς αποθήκευσης του σιδήρου και του χαλκού. Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς, τα κύτταρα επιπλέον διαθέτουν συστήματα επιδιόρθωσης ή μεταβολισμού-καταστροφής των δομικών εκείνων συστατικών τους (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια μεμβρανών) που έχουν αλλοιωθεί από την επίδραση των ελευθέρων ριζών.^{4,10}

α) Αντιοξειδωτικά ένζυμα

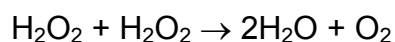
i) Η υπεροξειδική δυσμουτάση (superoxide dismutase – SOD).

Υπάρχουν τρεις μορφές του ενζύμου με μεγάλες διαφορές μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων τους και τις θέσεις εντόπισής τους τόσο μέσα στο κυττάρου αλλά και στους διάφορους ιστούς. Η Cu,Zn-SOD μορφή εμπεριέχει στις ενεργές περιοχές του από ένα άτομο χαλκού και ψευδαργύρου και εντοπίζεται στο κυτταροδιάλυμα. Η Mn-SOD μορφή εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και εμπεριέχει ένα άτομο μαγγανίου στις θέσεις κατάλυσης. Τέλος η EC-SOD μορφή εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο και περιέχει επίσης χαλκό και ψευδάργυρο στις θέσεις κατάλυσης, είναι όμως διαφορετική από την Cu,Zn-SOD. Όλες οι μορφές αυτές καταλύουν την αντίδραση:



Το παραγόμενο H_2O_2 θα αποδομηθεί στη συνέχεια από την καταλάση ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης όπως περιγράφεται παρακάτω.

ii) Η καταλάση εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και μετασχηματίζει το H_2O_2 σε ύδωρ και οξυγόνο:



Σε αντίθεση με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η καταλάση δεν μπορεί να μεταβολίσει μόρια μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων), και η δραστηριότητά της αφορά κυρίως το H_2O_2 .

iii) Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης καταλύει την οξειδωση της γλουταθειόνης (GSH) αποδομώντας παράλληλα ένα μόριο υδροϋπεροξειδίου:



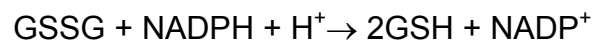
Το «R» μπορεί να αντιστοιχεί σε $\text{H}\cdot$ (οπότε η αντίδραση γράφεται: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$) ή σε κάποια άλλη ρίζα (π.χ. υδροϋπεροξειδίο ενός λιπιδίου).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ελαττώνει επομένως το H_2O_2 όπως και τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων. Έτσι δρα προστατευτικά έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης και αποτελεί σημαντικό ένζυμο για την διατήρηση της δομής και λειτουργίας των κυτταρικών μεμβρανών. Το ένζυμο χρησιμοποιεί σελήνιο στην θέση κατάλυσης και βρίσκεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς τόσο στον ενδοκυττάριο όσο και στον εξωκυττάριο χώρο. Μέσα στα κύτταρα το

συναντάμε στα μιτοχόνδρια και στο κυτταροδιάλυμα και αποτελεί τον κυριότερο ενδοκυττάριο «εκκαθαριστή» του H_2O_2 .

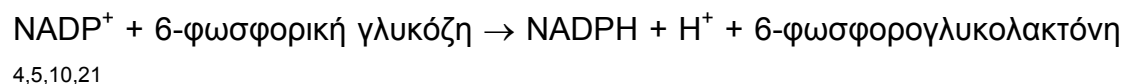
Τα δυο επόμενα ένζυμα αναφέρονται συχνά ως αντιοξειδωτικά υπό την έννοια ότι η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται από αυτά.

iv) Η αναγωγή της γλουταθειόνης χρησιμοποιεί NADPH ώστε να διατηρεί το λόγο GSH/GSSG υψηλό:



Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται από τα διαθέσιμα επίπεδα της GSH.

v) Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) διατηρεί με τη σειρά της επαρκή τα αποθέματα NADPH για την «τροφοδοσία» της αναγωγής της γλουταθειόνης:

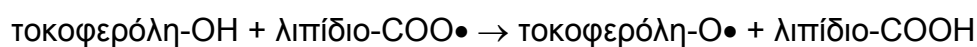


β) Αντιοξειδωτικές ουσίες

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες είναι μόρια που αντιδρούν με τους ενεργούς μεταβολίτες οξυγόνου και τους αδρανοποιούν πριν εκείνοι επιδράσουν σε ζωτικά συστατικά του κυττάρου (κυτταρική μεμβράνη, DNA). Υπάρχουν εκατοντάδες τέτοιες ουσίες σε όλους τους οργανισμούς, ιδιαίτερα στα φυτά. Επειδή, όπως είπαμε σε προηγούμενη παράγραφο, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών εξελίσσονται αλυσιδωτά, οι αντιοξειδωτικές ουσίες αναφέρονται και ως «chain-breaking antioxidants» επειδή ακριβώς διακόπτουν την αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων και περιορίζουν το βλαπτικό τους αποτέλεσμα. Διακρίνονται σε «λιπόφιλες» (lipid phase) και «υδρόφιλες» (aqueous phase).¹¹ Στην πρώτη ομάδα ανήκουν λιποδιαλυτά μόρια που εντοπίζονται και ενεργούν στις κυτταρικές μεμβράνες και στα σωματίδια των λιποπρωτεϊνών. Είναι κριτικής σημασίας για την προστασία από την λιπιδική υπεροξειδωση. Εδώ ανήκουν η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), τα καροτενοειδή, φλαβονοειδή κ.ά. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν υδατοδιαλυτά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη (η συνδεδεμένη στην αλβουμίνη), οι θειόλες κ.ά. Παρακάτω περιγράφονται εν συντομία μερικά από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά.

i) α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E). Η βιταμίνη E είναι ένα μίγμα λιποδιαλυτών ουσιών: α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλη. Από αυτές η α-τοκοφερόλη έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, γι' αυτό και όταν αναφερόμαστε στην βιταμίνη E ως αντιοξειδωτικό, συχνά χρησιμοποιούμε ως συνώνυμό της την α-τοκοφερόλη.

Η α-τοκοφερόλη βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και δρα προστατευτικά έναντι της υπεροξειδωσης των λιπών. Περιέχει την ομάδα -OH στο μόριό της που αντιδρά εύκολα (και κατά προτίμηση) με τις ρίζες που σχηματίζονται κατά τις διαδοχικές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης:



Η ρίζα τοκοφερόλη-O• είναι ελάχιστα ενεργός και δεν μπορεί να επηρεάσει τις γειτονικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων των λιπιδίων. Έτσι πρακτικά τερματίζεται στο μόριο αυτό η αλυσίδα αντιδράσεων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (chain-breaking antioxidant). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι σχηματιζόμενες ρίζες τοκοφερόλη-O• μπορούν να επανέλθουν στην αρχική μορφή της τοκοφερόλης (τοκοφερόλη-OH) με τη βοήθεια του ασκορβικού οξέως ή της γλουταθειόνης στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης.^{4,5}

Στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος η τοκοφερόλη δρα επίσης ως προστατευτικό μόριο και δυνατόν να επηρεάζει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, μιας νόσου όπου η υπεροξειδωση των λιπιδίων έχει ενοχοποιητικό ρόλο. Χαμηλά επίπεδα τοκοφερόλης στο πλάσμα έχουν συσχετιστεί με αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών επεισοδίων.²²

ii) ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Είναι μια υδρόφιλη βιταμίνη με πολύ γνωστές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Όπως και η α-τοκοφερόλη έτσι και η βιταμίνη C δρα ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Η σχηματιζόμενη ρίζα (βιταμίνη C•) είναι σχετικά αδρανής, τερματίζοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις η βιταμίνη C μπορεί να δρα και ως προ-οξειδωτική ουσία. Παρουσία ιόντων σιδήρου πχ, η αναγωγή του σιδήρου από τη βιταμίνη C ευνοεί την αντίδραση Fenton: $\text{Fe}^{3+} + \text{vit C} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{vit C}\bullet + 2\text{H}^+$ Ανάλογες ιδιότητες μπορεί, υπό προϋποθέσεις, να αποκτήσουν και άλλα αντιοξειδωτικά μόρια.⁵

iii) θειόλες. Περιέχουν στο μόριό τους την ομάδα $-SH$ και αποτελούν ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Δρουν ως δότες ηλεκτρονίων αδρανοποιώντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες. Αντιπροσωπευτικό μόριο της ομάδας αυτής είναι ένα τριπεπτίδιο (γ -Glu – Cys – Gly): η γλουταθειόνη (GSH). Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πολλά ενζυμικά συστήματα που ασκούν προστατευτικό ρόλο έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τρανσφεράση της γλουταθειόνης κλπ. Το υπόστρωμα των αντιδράσεων που καταλύουν τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνει το H_2O_2 , υδροϋπεροξειδία λιπιδίων (L) και φωσφολιπιδίων (PL) ($L-OOH$, $PL-OOH$): $R-OOH + 2GSH \rightarrow R-OH + H_2O + GSSG$ (βλ. παράγραφο 1.8.α)^{4,5,10} Εκτός από τη συμμετοχή της σε ενζυμικές αντιδράσεις η γλουταθειόνη μπορεί να δρα και ως ανεξάρτητο αντιοξειδωτικό.¹⁶ Η GSH αποτελεί «πηγή» $-SH$ ομάδων για τον ενδοκυττάριο κυρίως χώρο.

Στο πλάσμα, το ρόλο του δότη $-SH$ ομάδων έχει κυρίως η αλβουμίνη. Η αλβουμίνη παρουσιάζει επιπρόσθετες αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας της ικανότητας της να δεσμεύει τα ιόντα χαλκού αποτρέποντας το σχηματισμό $HO\bullet$ (βλ. αντίδραση Fenton). Εξάλλου αποτελεί το κύριο μέσο αδρανοποίησης του $HOCl$ που παράγουν τα φαγοκύτταρα. Παρόλο που η αλβουμίνη ασκεί την αντιοξειδωτική δράση της ως ένα «θυσιαζόμενο» κάθε φορά μόριο, τα υψηλά επίπεδά της στο πλάσμα εξασφαλίζουν τον οργανισμό ώστε τέτοιου είδους αντιδράσεις (που καταστρέφουν δηλ. την αλβουμίνη) να μην αποκτούν τελικά κλινική σημασία.¹¹

γ) Πρωτεΐνες ασφαλούς αποθήκευσης των μετάλλων (Fe^{+2} , Cu^+)

Όπως τονίστηκε στην παράγραφο 1.7, ο οργανισμός προσπαθεί να διατηρεί τα αποθέματα Fe^{+2} και Cu^+ συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες μεταφοράς ή αποθήκευσης, αποφεύγοντας, κατά το δυνατόν, την κυκλοφορία των μετάλλων αυτών υπό μορφή ιόντων. Ο μηχανισμός αυτός αποκτά ιδιαίτερη σημασία στο εξωκυττάριο υγρό όπου τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι χαμηλά.^{16,23}

Στο πλάσμα πχ, που η δεσμευτική ικανότητα της τρανσφερρίνης είναι τριπλάσια από την απαιτούμενη για τη μεταφορά του υπάρχοντος σιδήρου, δεν ανευρίσκεται πρακτικά σίδηρος υπό μορφή ιόντων. Ο συνδεδεμένος στην

τρανσφερρίνη σίδηρος δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων ή να επάγει τον σχηματισμό ριζών HO• (αντίδραση Fenton).

Το ίδιο συμβαίνει και με τον χαλκό που στο πλάσμα βρίσκεται συνδεδεμένος στην σερουλοπλασμίνη ή στην αλβουμίνη.^{4,16}

Η σημασία αυτού του μηχανισμού αντιοξειδωτικής άμυνας είναι έκδηλη σε καταστάσεις υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο, που εκδηλώνονται με πολυοργανική ανεπάρκεια, όπως στην αιμοχρωμάτωση.²⁴

1.9 Η κυτταρική βλάβη που προκαλούν οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου

Από μελέτες πάνω στην παθογένεια της φλεγμονής, έχει γίνει σαφές ότι οξειδωτικές ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα της φλεγμονής έχουν βλαπτική επίδραση στα κύτταρα και τους ιστούς του ίδιου του οργανισμού. Κατά την τελευταία δεκαετία, πειράματα *in vitro* μας αποκαλύπτουν τον τρόπο με τον οποίο επιδρούν οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου πάνω στους ιστούς:

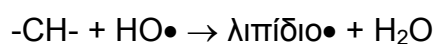
α) Το HOCl, σε μικρές συγκεντρώσεις προκαλεί οξείδωση των -SH ομάδων διαφόρων πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης αναστέλλοντας την λειτουργία τους (μεταφορείς γλυκόζης ή αμινοξέων, αντλία K⁺ - Na⁺). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλείται καταστροφή της μεμβράνης και λύση του κυττάρου.²⁵

β) *Επίδραση στο ενεργειακό σύστημα του κυττάρου.* Έχει αποδειχθεί ότι οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου (H₂O₂, O₂•⁻, HOCl) ελαττώνουν την σύνθεση του ATP, επιδρώντας στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Ειδικότερα το H₂O₂ αναστέλλει την γλυκόλυση επιδρώντας σε ένα από τα ένζυμα της γλυκολυτικής οδού (δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης). Ανάλογη δράση του H₂O₂ έχει βρεθεί και στην φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.²⁶

γ) *Οξειδωτική βλάβη στο DNA.* Το H₂O₂ θεωρείται ως ο πιθανότερος ενεργός μεταβολίτης οξυγόνου που μπορεί να διεισδύσει στο κύτταρο και να επιδράσει σε οποιοδήποτε δομικό του συστατικό, επομένως και στο DNA. Το H₂O₂ επιδρά έμμεσα στο DNA μέσω παραγωγής ελεύθερων ριζών HO•. Οι προκαλούμενες βλάβες αφορούν είτε στην διάσπαση της αλύσου του DNA, είτε στην μεταβολή της αλληλουχίας των βάσεων του. Ανάλογες βλάβες

μπορεί επίσης να προκληθούν, εκτός από το H_2O_2 , και από προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Οι βλάβες αυτές μπορεί να οδηγήσουν είτε στο θάνατο του κυττάρου ή στην κακοήθη εξαλλαγή του, όπως αυτό επιβεβαιώνεται σε πειραματικά μοντέλα από κυτταροκαλλιέργειες.^{26,27} Η μεταλλαξιογένεση /σχάση κλώνων του DNA, η ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ή η απενεργοποίηση /απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων φαίνεται να είναι οι βασικοί μηχανισμοί για μια τέτοια εξαλλαγή.¹²

δ) Η λιπιδική υπεροξειδωση αναφέρεται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών που αφορούν τις πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων των λιπιδίων. Τα μόρια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το αραχιδονικό οξύ, είναι τα πλέον ευπαθή. Από τους ενεργούς μεταβολίτες οξυγόνου το $HO\bullet$ φαίνεται ότι διαδραματίζει και τον καταλυτικότερο ρόλο στην πυροδότηση αυτών των αντιδράσεων:



(το «-CH-» αντιστοιχεί σε άτομο C της πλευρικής αλυσίδας λιπαρού οξέως ενός λιπιδίου και «λιπίδιο \bullet » στη ρίζα (R)-C \bullet -(R) που απομένει μετά την αφαίρεση ενός H \bullet από το λιπίδιο).

Η ρίζα «λιπίδιο \bullet » μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικό δεσμό με άλλη γειτονική (C=C) συνδέοντας έτσι μεταξύ τους γειτονικές πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων και τροποποιώντας τη δομή της μεμβράνης. Επιπλέον μπορεί να αντιδράσει με πρωτεΐνες της μεμβράνης (ένζυμα, υποδοχείς κλπ) μεταβάλλοντας τη λειτουργία τους. Συνηθέστερα όμως σχηματίζει διαδοχικά άλλες ρίζες «λιπιδίων \bullet » και υδροϋπεροξειδία αντιδρώντας με διπλανά μόρια:



Έτσι ο σχηματισμός ριζών $-C\bullet-$ συνεχίζεται. Μια ρίζα $OH\bullet$ μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό εκατοντάδων $-COOH$ στις πλευρικές αλυσίδες των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, που με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργία και καταστροφή της μεμβράνης. Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων μπορεί επίσης να υποστούν διάσπαση δεσμών σχηματίζοντας ελεύθερες οργανικές ρίζες με το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του άνθρακα ή να αποδομηθούν παρουσία κυρίως ιόντων μετάλλου παράγοντας ως τελικά προϊόντα αέριους υδρογονάνθρακες (αιθάνιο, πεντάνιο) ή αλδεϋδικές ενώσεις όπως εξανάλη, 4-υδρόξυ-εννεανάλη

και μηλονική διαλδεϋδη (OCH-CH₂-CHO, MDA, malondialdehyde), οι περισσότερες από τις οποίες είναι τοξικές και μεταλλαξιογόνες.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων έχει άμεσες συνέπειες στη λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών και κατ' επέκταση στη λειτουργία ολόκληρου του κυττάρου: μεταβολή της διαπερατότητας των μεμβρανών, διαταραχή της αντλίας ιόντων, δυσλειτουργία των ενζύμων και των υποδοχέων που βρίσκονται πάνω στις μεμβράνες κοκ. Έμμεσες συνέπειες είναι η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, που μπορεί να επιφέρει ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών ενζύμων (πρωτεάσες, νουκλεάσες) και στη συνέχεια διάσπαση του κυτταροσκελετού ή του DNA (Εικόνα 3).^{4,12,13,27}

ε) *Τα ισοπροστανία.* Ένα προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης που θα μας απασχολήσει παρακάτω είναι το 8-ισοπροστανίο, που ανήκει στην γενικότερη ομάδα των ισοπροστανίων. Τα ισοπροστανία είναι ενώσεις παρόμοιες με τις προσταγλανδίνες, που παράγονται in vivo από την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος. Πρόκειται για μια αλληλουχία αντιδράσεων που οφείλεται στη δράση ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου πάνω στο αραχιδονικό οξύ, το οποίο συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό σε κάποιο φωσφολιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι αντιδράσεις οξειδωσης του αραχιδονικού συμβαίνουν in situ πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Τα ισοπροστανία, τα τελικά προϊόντα αυτών των αντιδράσεων, απελευθερώνονται από τη μεμβράνη με τις φωσφολιπάσες, που διασπούν τον εστερικό δεσμό φωσφολιπιδίου – ισοπροστανίου. Στο μηχανισμό αυτό παραγωγής των ισοπροστανίων δεν συμμετέχει η κυκλοοξυγενάση, η οποία δρα σε ελεύθερα μόρια αραχιδονικού οξέος για το σχηματισμό των γνωστών προσταγλανδινών (PGs). Μια άλλη σημαντική διαφορά των ισοπροστανίων από τις προσταγλανδίνες (τις προερχόμενες από την κυκλοοξυγενάση), που αφορά στην κατασκευή τους, είναι ότι τα ισοπροστανία περιέχουν πλευρικές αλυσούς με cis προσανατολισμό ως προς τον δακτύλιο του προστανίου (κυκλοπεντάνιο), ενώ στις προσταγλανδίνες έχουμε trans προσανατολισμό.

Ανάλογα με το ποιο άτομο άνθρακα στο μόριο του αραχιδονικού οξέος θα υποστεί υπεροξειδωση έχουμε τέσσερις ομάδες – σειρές ισομερών ισοπροστανίων, τις 5-, 12-, 8-, 15- (όπου οι αριθμοί αντιστοιχούν στη θέση του άνθρακα στο μόριο του αραχιδονικού που υφίσταται την υπεροξειδωση).

Τα ισοπροστάνια που περιέχουν τον τύπο F του προστανικού δακτυλίου είναι ισομερή με την προσταγλανδίνη $PGF_{2\alpha}$ και γι' αυτό το λόγο ονομάζονται F_2 -ισοπροστάνια (υπάρχουν και άλλοι τύποι δακτυλίου, όπως A, D, J, που δε θα μας απασχολήσουν). Το 8-ισοπροστάνιο είναι η απλούστερη ονομασία του 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$, που σημαίνει ότι πρόκειται για το τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής του αραχιδονικού οξέος στη θέση 8 και φέρει προστανικό δακτύλιο τύπου F (ισομερές της $PGF_{2\alpha}$). Το 8-ισοπροστάνιο είναι η πιο γνωστή ένωση της κατηγορίας των F_2 -ισοπροστανίων και λόγω της σταθερότητας του μορίου του, της ειδικότητάς του στη λιπιδική υπεροξειδωση, της παραγωγής του in vivo και της σχετικής αφθονίας του στα βιολογικά υγρά, θεωρείται άριστος δείκτης οξειδωτικού stress.^{28,29,30}

Συνοψίζοντας, οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου επιδρούν βλαπτικά στα δομικά συστατικά των κυττάρων (λιπίδια κυτταρικών μεμβρανών, πρωτεΐνες, DNA) και προκαλούν δυσλειτουργία, κυτταρικό θάνατο ή κακοήθη εξαλλαγή (Εικόνες 2, 3).

1.10 Η έννοια του οξειδωτικού stress

Όπως έχει ήδη αναλυθεί, η παρουσία των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου είναι εγγενής της φυσιολογικής αερόβιας ζωής. Φλεγμονώδεις καταστάσεις αλλά και εξωγενείς παράγοντες (κάπνισμα, περιβαλλοντικοί ρύποι, ακτινοβολία) αυξάνουν τα επίπεδα των ενεργών αυτών προϊόντων στον οργανισμό. Η συνεχής παραγωγή των μεταβολιτών αυτών εξισορροπείται από έναν ανάλογο ρυθμό εξουδετέρωσής τους από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, ενζυμικούς ή μη. Το οξειδωτικό stress εμφανίζεται όταν η ισορροπία αυτή διαταραχθεί προς όφελος των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου. Μη αντιρροπούμενη αύξηση των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου ή μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. μείωση των επιπέδων της GSH), επιφέρει μια «καθαρή» αύξηση του οξειδωτικού φορτίου. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται «οξειδωτικό stress». Πολλαπλά βιολογικά φαινόμενα όπως η φλεγμονή, το γήρας, η καρκινογένεση, η δράση και τοξικότητα φαρμάκων, η άμυνα έναντι μικροοργανισμών, έχουν συσχετιστεί με την ύπαρξη του οξειδωτικού stress.^{10,12,21}

Είναι προφανές, ότι η ιστική βλάβη και καταστροφή αυτή καθαυτή είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αυξημένο οξειδωτικό φορτίο. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σχεδόν οποιαδήποτε νόσος μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση του οξειδωτικού stress. Παραμένει επομένως υπό διερεύνηση το αν η αύξηση του οξειδωτικού stress που ενδεχομένως παρατηρείται σε μια πάθηση, συνδέεται με την παθογένεια της ή είναι απλώς ένα επιφαινόμενο που απλώς συνοδεύει ή επιτείνει την υποκείμενη ιστική βλάβη. Ειδικότερα για την λιπιδική υπεροξειδωση έχει διατυπωθεί η άποψη ότι είναι ένα όψιμο γεγονός που συνοδεύει την κυτταρική λύση και σπάνια αποτελεί πρώιμο αίτιο κυτταρικής βλάβης. Παρ' όλα αυτά σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις έχει αποδειχθεί ο παθογενετικός ρόλος του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, όπως στην αθηρωμάτωση, στην τραυματική ή ισχαιμική βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στη ΧΑΠ κ.α.^{4,13,21}

Ο «ορισμός» του οξειδωτικού stress που δόθηκε προηγουμένως έχει περισσότερο ποιοτικό χαρακτήρα: δεν έχουν καθοριστεί τα όρια κάποιας μετρήσιμης παραμέτρου, πέρα από τα οποία να ισχύει η κατάσταση που ο όρος αυτός περιγράφει. Οι μελέτες που ασχολούνται με το οξειδωτικό stress συγκρίνουν συνήθως δείγματα ασθενών με αντίστοιχα υγιών μαρτύρων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδηλώνουν «αυξημένο» οξειδωτικό stress σε σχέση με το φυσιολογικό κ.ο.κ. Ένας «ποσοτικός» ορισμός θα είχε πολλές δυσκολίες αν λάβει κανείς υπόψη του τον αριθμό των παραμέτρων – δεικτών που μπορούν να προσδιοριστούν στα διάφορα βιολογικά δείγματα, την ποικιλία των δειγμάτων αυτών (αίμα, ούρα, πτύελα, BAL, συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα κλπ) ή τις διαφορές που υπάρχουν σε κάθε νόσημα ως προς την έκφραση του οξειδωτικού stress (εφόσον υπάρχει). Σε αυτή τη λογική λοιπόν, όταν θέλουμε να «μετρήσουμε» το οξειδωτικό stress σε κάποιο νόσημα, καθορίζουμε σε ποιο βιολογικό δείγμα θα γίνουν οι μετρήσεις και ποια ουσία – δείκτης θα προσδιοριστεί σ' αυτό. Ως «δείκτες» οξειδωτικού stress χρησιμοποιούνται ουσίες αντιπροσωπευτικές του οξειδωτικού φορτίου, που παρουσιάζουν σχετική σταθερότητα (ως χημικές ενώσεις) και μπορούν να προσδιοριστούν στα βιολογικά υγρά. Τέτοιοι δείκτες είναι το H₂O₂ και ουσίες που προκύπτουν από την επίδραση των οξειδωτικών μορίων σε δομικά συστατικά του κυττάρου. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης όπως το 8-ισοπροστανίνο, η μηλονική-διαλδεύδη,

αέριοι υδρογονάνθρακες, κ.ά. Άλλοι δείκτες που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress είναι τα παράγωγα του αζώτου (ONOO⁻, NO₂/NO₃ κ.ά.) και το pH.^{30,31,32} Όπως αναπτύχθηκε προηγουμένως το οξειδωτικό stress αφορά ουσιαστικά όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Στη συνέχεια θα αναπτυχθεί συνοπτικά η σχέση που φαίνεται να έχει το οξειδωτικό stress με κάποιες παθολογικές καταστάσεις του πνεύμονα. Στα πλαίσια αυτά θα γίνει μια σύντομη ανασκόπηση στα νοσήματα των αεραγωγών ενώ στο δεύτερο κεφάλαιο θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στα διάμεσα νοσήματα με τα οποία ασχολείται η παρούσα μελέτη.

1.11 Οξειδωτικό stress και πνεύμονας

α) Ο πνεύμονας και το επικαλυπτήριο υγρό του επιθηλίου (epithelial lining fluid – ELF).

Ο πνεύμονας λόγω της θέσης, της ανατομίας και της λειτουργίας του, είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένος στις επιδράσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος. Τα επιθήλιο του κατώτερου αναπνευστικού καλείται να καλύψει την επιφάνεια 300 εκατομμυρίων περίπου κυψελίδων και >2²² γενεές βρόγχων από την τραχεία μέχρι τις κυψελίδες, μια επιφάνεια περίπου 140 m², όσο ένα γήπεδο του τένις.³³ Το επιθήλιο αυτό δεν είναι ομοιόμορφο σε όλη του την έκταση. Έτσι στους μεγάλους αεραγωγούς βρίσκουμε πολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο με βλεννογόνους αδένες, ενώ στους μικρότερους αεραγωγούς το επιθήλιο γίνεται λεπτότερο, αποτελούμενο από κροσσωτά κύτταρα (που αποπλατύνονται προοδευτικά σε κυβοειδή), βλεννώδη/ ορώδη κύτταρα και κύτταρα Clara. Στις κυψελίδες το επιθήλιο αποτελείται από πνευμονοκύτταρα τύπου I και II που σχηματίζουν μια μονήρη στιβάδα πάνω στη βασική μεμβράνη. Σε όλη του την έκταση το επιθήλιο αυτό καλύπτεται από μια λεπτή στιβάδα υγρού (epithelial lining fluid – ELF). Η στιβάδα αυτή προσφέρει ύγρανση του εισπνεόμενου αέρα αλλά κυρίως συμμετέχει στο μηχανισμό άμυνας του κατώτερου αναπνευστικού, τόσο με μηχανικό τρόπο (βλεννοκροσσωτή κάθαρση) όσο και με τη δράση των κυττάρων και μεσολαβητικών ουσιών της φλεγμονής που εμπεριέχει. Στο επίπεδο των κυψελίδων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μηχανική της αναπνοής (επιφανειοδραστική ουσία – surfactant).^{34,35,36}

Η σύσταση του ELF είναι ανομοιογενής και εξαρτάται από την κυτταρική σύνθεση του υποκείμενου επιθηλίου. Γενικά αποτελείται από δυο φάσεις: την στερεά (gel) που βρίσκεται επιφανειακά και την υδαρή (sol), με σημαντική όμως αλληλοεπικάλυψη ανάμεσά τους. Κατά το μεγαλύτερο μέρος της περιέχει ύδωρ (έως και 95%) μέσα στο οποίο βρίσκονται νησίδες βλέννης, έκκριμα από τα αδενικά κύτταρα, πρωτεΐνες και διαλυμένες μικρομοριακές ενώσεις, που παράγονται τοπικά ή διαχέονται από το πλάσμα (ένζυμα, ανοσοσφαιρίνες, αντιοξειδωτικά μόρια κλπ).

Σε όλη την έκταση του ELF ανευρίσκονται φλεγμονώδη κύτταρα που υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν αμυντικό ρόλο. Ο φυσιολογικός κυτταρικός πληθυσμός στο ELF αποτελείται κυρίως από μακροφάγα και σε μικρότερο ποσοστό T-λεμφοκύτταρα. Το ποσοστό των πολυμορφοπυρήνων ανέρχεται μόλις στο 1-2% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων.³⁷

Το ELF επομένως διαγράφει για το κατώτερο αναπνευστικό τα φυσικά σύνορα περιβάλλοντος και ανθρώπινου οργανισμού. Εκεί συμβαίνουν οι αλληλεπιδράσεις με εξωγενείς λοιμογόνους ή άλλους τοξικούς-βλαπτικούς παράγοντες, αλλεργιογόνα, οξειδωτικά μόρια κλπ. Αντίστροφα, νοσήματα του υποκείμενου παρεγχύματος φαίνεται ότι αντικατοπτρίζονται στο ELF με αντίστοιχες μεταβολές της σύστασής του (κυτταρικής και μη). Οι λόγοι λοιπόν που εδώ γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στο επιθήλιο και στο ELF είναι οι ακόλουθοι:

i) Η οξειδωτική βλάβη του επιθηλίου αποτελεί για πολλές αναπνευστικές παθήσεις ένα σημαντικό παθογενετικό μηχανισμό.

ii) Η οξειδοαναγωγική διαταραχή, όπως αυτή μπορεί να καταγραφεί στο ELF, προσφέρει ένα μοντέλο μελέτης του οξειδωτικού stress στον ανθρώπινο οργανισμό γενικά και ειδικότερα για τις παθήσεις του πνεύμονα που μας ενδιαφέρουν. Η λήψη μη βιοπτικών δειγμάτων από το κατώτερο αναπνευστικό είτε με επεμβατικό τρόπο (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα – BAL) ή με μη επεμβατικές τεχνικές (προκλητά πτύελα, μετρήσεις στον εκπνεόμενο αέρα ή στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα) αφορά ουσιαστικά στην προσπάθεια λήψης δείγματος από το ELF. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μελέτη της υγρής αυτής στιβάδας μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικές για μια πλειάδα διαταραχών του πνεύμονα, δεδομένου ότι το ELF επικαλύπτει ακριβώς το πάσχον όργανο (βρόγχους και κυψελίδες).³⁸

β) Η προέλευση του οξειδωτικού stress στο ELF.

Το οξειδωτικό φορτίο του ELF δυνατόν να προέρχεται είτε από ενδογενή παραγωγή είτε από οξειδωτικές ουσίες που εμπεριέχονται στον εισπνεόμενο αέρα. Υπολογίζεται για παράδειγμα ότι στη διάρκεια της ζωής ενός ενήλικα εισπνέονται περίπου 300×10^6 λίτρα αέρα, εκθέτοντας τον πνεύμονα σε μια πληθώρα οξειδωτικών ουσιών, όπως το όζον, το διοξείδιο του αζώτου, καυσαέρια, καπνός τσιγάρου κλπ.³⁹ Ειδικά ο καπνός του τσιγάρου εμπεριέχει περισσότερες από 10^{14} ελεύθερες ρίζες ανά εισπνοή.^{38,40}

Ενδιαφέρουν παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μελετών σε πειραματόζωα όπου βρέθηκε ότι τα πνευμονοκύτταρα τύπου II παράγουν H_2O_2 πιθανότατα μέσω της αναπνευστικής αλυσού ή την ενζυμική δράση της NADPH οξειδάσης και SOD.⁴¹

Η κυριότερη βέβαια πηγή οξειδωτικού φορτίου παραμένουν τα κύτταρα της φλεγμονής. Τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα φαγοκυττάρων μικροοργανισμούς και ξένα σωματίδια στα πλαίσια του αμυντικού ρόλου που επιτελούν. Μέσα στα δημιουργούμενα από τη φαγοκυττάρωση φαγο-λυσωσώματα απελευθερώνονται οξειδωτικά μόρια ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} , $HClO$) εκθέτοντας έτσι τους εγκλωβισμένους μικροοργανισμούς σε υψηλές συγκεντρώσεις οξειδωτικών μορίων, με απώτερο στόχο την καταστροφή τους. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, υπάρχει μια άλλοτε άλλου βαθμού διαρροή οξειδωτικών μορίων στο εγγύς (εξωκυττάριο) περιβάλλον του κυττάρου, που δυνατόν να ευθύνεται για οξειδωτικές βλάβες σε κυτταρικές δομές του ίδιου του ξενιστή. Σε νοσηρές καταστάσεις (βλ. παρακάτω), όπου η δραστηριότητα των φλεγμονωδών κυττάρων είναι σαφώς εντονότερη, οι «διαρροές» αυτές μπορεί να αποτελούν σημαντικό αίτιο αύξησης του οξειδωτικού stress.

Τα επιθηλιακά κύτταρα προστατεύονται από το οξειδωτικό φορτίο, όπως συμβαίνει και στον υπόλοιπο οργανισμό, με τη βοήθεια ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στο ELF συναντάμε την πλειοψηφία των μηχανισμών, ενζυμικών και μη, που περιγράφονται στην παράγραφο 1.8. Παρόλα αυτά δεν είναι απολύτως γνωστή η ακριβής προέλευση των αντιοξειδωτικών ουσιών στο ELF. Η GSH π.χ. αποτελεί την κυριότερη μικρομοριακή αντιοξειδωτική ουσία

στο ELF και βρίσκεται σε επίπεδα 100πλάσια από εκείνα του πλάσματος, υποδηλώνοντας είτε σύνθεσή της τοπικά είτε ενεργητική μεταφορά της.^{42,43} Τα επίπεδα της βιταμίνης C είναι παρόμοια με εκείνα του πλάσματος, υποδηλώνοντας ελεύθερη μετακίνηση αυτού του μορίου από την κυκλοφορία στους αεραγωγούς, ενώ τα επίπεδα του ουρικού είναι υποδιπλάσια από εκείνα του πλάσματος. Υπάρχουν επομένως διαφορετικοί για κάθε μόριο παράγοντες που καθορίζουν την παρουσία του στο ELF.⁴³

1.12 Ο ρόλος του οξειδωτικού stress σε παθήσεις των αεραγωγών.

α) Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

Την τελευταία δεκαετία υπάρχει αρκετό ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο που έχουν οι οξειδωτικοί και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στην ΧΑΠ. Μια πληθώρα παραγόντων, που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress, φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένειά της, ιδιαίτερα σε καπνιστές:

- i) Ο καπνός του τσιγάρου, που θεωρείται ως το κύριο αίτιο της νόσου, περιέχει ένα τεράστιο αριθμό ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών μορίων.⁴⁰
- ii) Στην πνευμονική μικροκυκλοφορία προσελκύονται ουδετερόφιλα που με τη σειρά τους παράγουν και εκλύουν $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $HO\bullet$ και $HClO$.⁴⁴
- iii) Τα ουδετερόφιλα εκλύουν επίσης πρωτεολυτικά ένζυμα όπως ελαστάση και κολλαγενάση. Η πρωτεολυτική δράση των ενζύμων αυτών φαίνεται να ευθύνεται για το εμφύσημα, δεδομένου ότι η φυσιολογική δράση των αντιπρωτεασών αναστέλλεται από τα οξειδωτικά μόρια. Έχει βρεθεί ότι οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου αναστέλλουν την δράση της $\alpha 1$ -αντιθρυψίνης προκαλώντας οξείδωση στη μεθειονίνη που βρίσκεται στη θέση 358 του ενζύμου.^{21,45}
- iv) Στη ΧΑΠ αυξάνεται το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, που επίσης σχηματίζει $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 , ενώ παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του $NO\bullet$ και διαταραχή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.⁴⁴
- v) Σε καπνιστές και σε ασθενείς με ΧΑΠ οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου ενεργοποιούν τους NF-kB (nuclear factor-kB) και AP-1 (activator protein-1) και προάγουν την σύνδεσή τους με τον πυρήνα του κυττάρου. Οι παράγοντες

αυτοί ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που ενέχονται τόσο στην φλεγμονή της ΧΑΠ (παραγωγή IL-8, TNF-α) όσο και σε μηχανισμούς προστασίας από τις οξειδωτικές βλάβες (παραγωγή GSH).^{46,47}

vi) Ο μεταβολισμός του σιδήρου φαίνεται επίσης να ενέχεται στην παθοφυσιολογία της νόσου. Έχει βρεθεί ότι τα οξειδωτικά μόρια προάγουν την απελευθέρωση σιδήρου από την τρανσφερρίνη δίνοντας την δυνατότητα στον σίδηρο να συμμετάσχει σε αντιδράσεις Fenton. Έχουν επίσης βρεθεί αυξημένα επίπεδα σιδήρου στα κυψελιδικά μακροφάγα και στο ELF καπνιστών σε σχέση με μη καπνιστές.^{12,44}

vii) Οι λοιμώξεις σχετίζονται με την παραγωγή οξειδωτικών ουσιών μέσω της συγκέντρωσης και της ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων. Αυξημένη απελευθέρωση O_2^- από ουδετερόφιλα παρατηρήθηκε σε φάση παρόξυνσης ΧΑΠ λόγω λοίμωξης.^{48,49,50}

Επομένως υπάρχουν σαφείς ενδείξεις σχετικά με τη συμμετοχή του οξειδωτικού stress στην παθογένεια της νόσου. Δείκτες οξειδωτικού stress σε ασθενείς με ΧΑΠ έχουν προσδιοριστεί στο αίμα, στο BAL, στον εκπνεόμενο αέρα και στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.⁴⁴

β) Βρογχικό άσθμα

Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό stress με το βρογχικό άσθμα, χωρίς όμως να έχει επακριβώς καθοριστεί ο ρόλος του:

Έχει βρεθεί ότι κύτταρα, που λαμβάνονται από το BAL ασθματικών ασθενών, παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ συγκρινόμενα με αυτά φυσιολογικών ατόμων.⁵¹ Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε και μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο.⁵² Αυξημένη απελευθέρωση $O_2^{\bullet-}$ παρατηρήθηκε επίσης σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα του αίματος σε ασθενείς με άσθμα.⁵³

Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι ηωσινόφιλα κύτταρα, μετά από ενεργοποίηση, παράγουν αυξημένες ποσότητες οξειδωτικών μορίων, που αυξάνονται ακόμη περισσότερο μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο.^{54,55}

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες σε ασθματικούς ασθενείς που αφορούν στην αξιολόγηση διαφόρων δεικτών οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Έτσι βρέθηκε ότι τα επίπεδα του H_2O_2 αυξάνουν σε ασθματικούς ασθενείς (ενήλικες και παιδιά) με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στην διάρκεια των παροξύνσεων.^{56,57,58} Δείκτες της

λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως τα παράγωγα της αντίδρασης με TBA και τα επίπεδα του πεντανίου και αιθανίου, βρέθηκαν επίσης αυξημένα σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα.^{59,60,61} Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα των ισοπροστανίων, με επιπλέον στοιχείο την συσχέτιση των επιπέδων τους με την βαρύτητα της νόσου.⁶²

Σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα έχουν βρεθεί επίσης μεταβολές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί η σημασία τους.^{63,64,65}

γ) Βρογχεκτασίες –Κυστική ίνωση.

Λίγες σχετικά μελέτες έχουν ασχοληθεί με το οξειδωτικό stress σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Οι περισσότερες αφορούν μελέτη παραμέτρων που εκφράζουν το οξειδωτικό stress στον εκπνεόμενο αέρα. Έτσι έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στους ασθενείς αυτούς.^{66,67}

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress στην ινοκυστική νόσο έχει μελετηθεί περισσότερο. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι υπάρχει αύξηση του οξειδωτικού stress στην κυστική ίνωση, με παράλληλη μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.^{68,69,70,71} Υπάρχουν ενδείξεις ότι θεραπευτικές παρεμβάσεις με φάρμακα είναι δυνατόν να βελτιώσουν το αντιοξειδωτικούς αυτούς μηχανισμούς στο ELF.^{72,73}

2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS ΚΑΙ ΔΙΑΧΥΤΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΙΚΕΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

2.1 Γενικά

Οι διάχυτες παρεγχυματικές πνευμονοπάθειες (ΔΠΠ) (ή αλλιώς διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες - ΔΔΠ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μη λοιμωδών, μη νεοπλασματικών νοσημάτων του πνευμονικού παρεγχύματος, που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή, ίνωση και καταστροφή του διαμέσου πνευμονικού ιστού.^{74,75} Αν και ετερογενής ομάδα, τα διάμεσα νοσήματα έχουν κάποια κοινά κλινικά, ακτινολογικά, λειτουργικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά.⁷⁶ Συνήθως εκδηλώνονται με προοδευτική δύσπνοια στην κόπωση και μη παραγωγικό βήχα. Τα ευρήματα από την κλινική εξέταση κατά κανόνα δεν είναι τυπικά, ενώ τα ακτινομορφολογικά ευρήματα από την ακτινογραφία και την αξονική τομογραφία θώρακα είναι χαρακτηριστικά και σε μερικές περιπτώσεις διαγνωστικά της υποκείμενης νόσου. Η τυπική λειτουργική διαταραχή είναι το περιοριστικό σύνδρομο, με μείωση της διαχυτικής ικανότητας και αύξηση της κυψελιδο-αρτηριακής διαφοράς οξυγόνου, ιδιαίτερα στην άσκηση. Τα σημαντικότερα ιστολογικά πρότυπα είναι η κοκκιωματώδης φλεγμονή (π.χ. σαρκοειδωση) και η φλεγμονή/ ίνωση (π.χ. ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση). Από τα γενικά αυτά χαρακτηριστικά υπάρχουν βέβαια αρκετές εξαιρέσεις, για τις οποίες μπορεί κανείς να ανατρέξει στην περιγραφή των επί μέρους νοσημάτων.⁷⁷

Ο «διάμεσος» χώρος, στον οποίο αναφέρεται ο όρος «διάμεσες πνευμονοπάθειες», περιλαμβάνει το χώρο μεταξύ των βασικών μεμβρανών του κυψελιδικού επιθηλίου και του ενδοθηλίου των τριχοειδών. Ο χώρος αυτός επεκτείνεται στα μεσολοβίδια διαφραγμάτια καθώς και κεντρικότερα στον συνδετικό ιστό των βρογχαγγειακών δεματίων.

Όπως κάθε ιστός, ο διάμεσος χώρος αποτελείται από κύτταρα και εξωκυττάρια ουσία. Τα κύτταρα είναι: (i) δομικά – αυτόχθονα (υπεύθυνα για τη δημιουργία και τις ιδιότητες του ιστού): ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα και (ii) μεταναστευτικά – φλεγμονώδη: μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα.

Η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται από τη θεμέλιο ουσία (γλυκοζαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες, μη ινιδικές δομικές πρωτεΐνες), κολλαγόνο, ελαστικές ίνες και ινονεκτίνη.⁷⁸

Αν και ο διάμεσος χώρος θεωρείται η περιοχή όπου συμβαίνει η παθολογική διεργασία των διαμέσων νοσημάτων, στις παθήσεις αυτές πολύ συχνά η βλάβη επεκτείνεται στις κυψελίδες, στους περιφερικούς αεραγωγούς και στα αγγεία με συμμετοχή των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων αντίστοιχα.⁷⁶

Οι ΔΠΠ ταξινομούνται όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.

Από τις συχνότερες και πλέον αντιπροσωπευτικές μορφές διαμέσων νοσημάτων είναι η σαρκοείδωση και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.

2.2 Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι η συχνότερη ιδιοπαθής (αγνώστου αιτιολογίας) διάμεση πνευμονοπάθεια.⁷⁹ Είναι πολυοργανική νόσος, αλλά οι πνεύμονες προσβάλλονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (> 90%). Συνήθως εμφανίζεται σε ηλικίες κάτω των 40 ετών, ενώ παρατηρείται και μια δεύτερη αύξηση της συχνότητάς της στις ηλικίες άνω των 50.

Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν διαφορές στις εκδηλώσεις της νόσου ανάλογα με τη φυλή ή το φύλο, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια γονίδια ή λοιμώδεις παράγοντες πιθανόν να προδιαθέτουν στην εμφάνισή της.⁸⁰

Ανοσοπαθολογία

Η χαρακτηριστική παθολογοανατομική βλάβη στη σαρκοείδωση είναι το μη νεκρωτικό επιθηλιοειδές κοκκίωμα.

Χαρακτηριστικά στη σαρκοείδωση, στις θέσεις της ιστολογικής βλάβης, συμβαίνει άθροιση μακροφάγων και CD4 λεμφοκυττάρων τύπου Th1. Θεωρείται ότι για τη δημιουργία των κοκκιωμάτων προηγείται έκθεση σε κάποιο άγνωστο αντιγόνο. Ενεργοποιημένα μακροφάγα εκφράζουν έντονα το MHC-class II (μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας – τάξη II) που σχετίζεται με την «παρουσίαση» εξωγενών αντιγόνων στα CD4 λεμφοκύτταρα. Τα μακροφάγα εκλύουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2) που ενεργοποιεί τα CD4 λεμφοκύτταρα προς μια αντίδραση τύπου Th1 (έκλυση IL-2, IL-6, IL-12, ιντερφερόνης -γ (IFN-γ) και TNF-α). Το προφίλ αυτό αντίδρασης ευθύνεται για την περαιτέρω άθροιση μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων στις θέσεις

φλεγμονής και την διαφοροποίηση των μακροφάγων σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα και επιθηλιοειδή κύτταρα που είναι χαρακτηριστικά στα σαρκοειδικού τύπου κοκκιώματα.^{80,81}

Κλινικές εκδηλώσεις

Ως πολυσυστηματική νόσος, παρουσιάζει μια ποικιλία εκδηλώσεων από διάφορα όργανα ανάλογα με την εντόπισή της. Η πιο συχνή εντόπιση της νόσου είναι οι λεμφαδένες του μεσοθωρακίου (95-98%) και ακολουθούν οι πνεύμονες (> 90%), το ήπαρ (50-80%), ο σπλήνας (40-80%), οι οφθαλμοί (20-50%), περιφερικοί λεμφαδένες (30%), το δέρμα (25%), το νευρικό σύστημα (10%) και η καρδιά (5%).⁸¹

Σε ένα μεγάλο ποσοστό (έως 50%) η νόσος δεν παρουσιάζει συμπτώματα και συχνά διαγιγνώσκεται έπειτα από ένα τυχαίο ακτινολογικό έλεγχο με ακτινογραφία θώρακα. Στο 1/3 περίπου των περιπτώσεων υπάρχουν συστηματικά συμπτώματα όπως πυρετός, απώλεια βάρους, αδυναμία, καταβολή ή νυκτερινοί ιδρώτες.

Διακρίνουμε δυο μορφές σαρκοειδωσης ως προς τον τρόπο εμφάνισής της:

(i) Την οξεία σαρκοειδωση (Lofgren's syndrome), που χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη με πυρετό, απώλεια βάρους, κακουχία, αδυναμία, αρθρίτιδα, οζώδες ερύθημα και αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια. Η μορφή αυτή έχει καλή πρόγνωση και συνήθως αποδράμει μέσα στα πρώτα δυο χρόνια.

(ii) Την χρόνια μορφή, που χαρακτηρίζεται από αμβλυχρή συμπτωματολογία (βήχας, δύσπνοια), συχνές υποτροπές, παρατεταμένη πορεία και λιγότερες πιθανότητες ύφεσης σε σχέση με την προηγούμενη.

Λειτουργικές διαταραχές από το αναπνευστικό σύστημα

Οι λειτουργικές δοκιμασίες του αναπνευστικού μπορεί να είναι φυσιολογικές στα αρχικά στάδια της νόσου. Όσο πιο εκτεταμένες όμως βλάβες εμφανίζει ο πνεύμονας τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες λειτουργικών διαταραχών. Το συνηθισμένο πρότυπο λειτουργικής διαταραχής είναι το περιοριστικό σύνδρομο με μείωση της ολικής χωρητικότητας του πνεύμονα καθώς και της διαχυτικής ικανότητας. Η ανταλλαγή των αερίων διαταράσσεται συνήθως σε προχωρημένη νόσο. Στο 1/3 των ασθενών μπορεί να συνυπάρχει και αποφρακτικό λειτουργικό σύνδρομο από προσβολή των αεραγωγών.

Έχει βρεθεί ότι η βαρύτητα της λειτουργικής διαταραχής δεν σχετίζεται με το είδος της ιστολογικής βλάβης στη σαρκοείδωση (κυψελιδίτιδα, κοκκίωμα, ίνωση) ούτε και με την έκταση ή την μορφολογία των βλαβών στην αξονική τομογραφία θώρακα. Η αξία των λειτουργικών δοκιμασιών έγκειται περισσότερο στην παρακολούθηση της νόσου.⁸²

Ακτινολογικά ευρήματα

Ανάλογα με τα ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακα η νόσος σταδιοποιείται ως ακολούθως:

Στάδιο 0: Φυσιολογική ακτινογραφία (συχνότητα 5-10%)

Στάδιο I: Αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια (50%)

Στάδιο II: Αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια + πνευμονικές διηθήσεις (25%)

Στάδιο III: Πνευμονικές διηθήσεις χωρίς πυλαία λεμφαδενοπάθεια (15%)

Στάδιο IV: Ίνωση του πνευμονικού παρεγχύματος (5-10%)

Στην αξονική τομογραφία θώρακα και ειδικότερα στην υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία, καταδεικνύονται διάσπαρτα οζίδια, με προτίμηση τα ανώτερα πνευμονικά πεδία, που συχνά συρρέουν ακολουθώντας την πορεία των βρογχαγγειακών δεματίων. Μπορεί να συνυπάρχουν πάχυνση των μεσολοβιδίων διαφραγματίων, εικόνα θολής υάλου, κυψελιδικά διηθήματα ή εικόνα μελισσοκηρύθρας σε προχωρημένα στάδια ίνωσης (Εικόνα 5).

Διάγνωση

Η διάγνωση θα βασιστεί στα συμβατά κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα, στην ιστολογική εικόνα του μη νεκρωτικού κοκκιώματος και στον αποκλεισμό άλλης νόσου με παρόμοια κλινική ή ιστολογική εικόνα. Η εξέταση εκλογής για τη διάγνωση είναι η βρογχοσκόπηση και η διαβρογχική βιοψία (ευαισθησία 90%).⁸²

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, που συνήθως γίνεται μαζί με την βιοψία στη διάρκεια της βρογχοσκόπησης, δείχνει χαρακτηριστικά την εικόνα λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδας από CD4 T-λεμφοκύτταρα, που εκφράζεται από ένα υψηλό λόγο CD4/CD8 στο δείγμα. Έχει βρεθεί ότι λόγος CD4/CD8 > 3.5 ή 4 έχει ειδικότητα 94-96% στη σαρκοείδωση. Έτσι σε ασθενείς με τυπικά κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα και CD4/CD8 > 3.5 μπορεί κανείς να παραλείψει την ιστολογική επιβεβαίωση και να θέσει με αρκετή ασφάλεια τη διάγνωση της σαρκοείδωσης.⁸¹

Πρόγνωση και θεραπεία

Η σαρκοείδωση είναι μια νόσος με γενικά «καλοήθη» πορεία. Σε έναν αριθμό ασθενών η νόσος παραμένει υποκλινική και πιθανόν δεν διαγιγνώσκεται. Στις περιπτώσεις που έχουμε τελικά διάγνωση, τα 2/3 περίπου των ασθενών θα παρουσιάσουν αυτόματη ύφεση. Η νόσος θα μεταπέσει σε χρόνια ή θα παρουσιάσει προοδευτική επιδείνωση στο 10-30% των περιπτώσεων. Περίπου το 1/3-1/2 των ασθενών θα λάβουν θεραπεία με κορτικοειδή και η νόσος τους θα παρουσιάσει ύφεση ή σταθεροποίηση. Όμως ένα υψηλό ποσοστό από αυτούς θα υποτροπιάσει με τη μείωση της δόσης ή μετά τη διακοπή της θεραπείας (16-74%). Η θνητότητα υπολογίζεται στο 1-5% και αποδίδεται σε προοδευτική αναπνευστική ανεπάρκεια, προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος ή του μυοκαρδίου.⁸³

Συστηματική θεραπεία με κορτικοειδή θα λάβουν συνήθως οι ασθενείς που παρουσιάζουν συμπτώματα και προοδευτική επιδείνωση της νόσου. Ασυμπτωματικοί άρρωστοι με προοδευτική επιδείνωση των λειτουργικών δοκιμασιών είναι επίσης υποψήφιοι για θεραπεία.⁸³ Τα κορτικοειδή είναι μεν αποτελεσματικά στον έλεγχο της νόσου αλλά σε μακροχρόνια χορήγηση παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες (οστεοπόρωση, καταρράκτη κλπ) και δεν έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αλλάξουν την τελική έκβαση. Εναλλακτικές λύσεις προσφέρουν άλλα φάρμακα που επίσης δεν στερούνται ανεπιθύμητων δράσεων και που χορηγούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με κορτικοειδή (ανθελνοσοιακά, αζαθειοπρίμη, μεθοτρεξάτη, κά).^{80,83}

Η δραστηριότητα (ενεργότητα - activity) της νόσου στη σαρκοείδωση

Η έννοια της ενεργότητας στη σαρκοείδωση καθορίστηκε στο 3^ο Διεθνές Συνέδριο της WASOG (Los Angeles, 1993):⁸⁴

Η λέξη «ενεργότητα» υποδηλώνει ότι «κάτι εξακολουθεί να συμβαίνει και δεν έχει έρθει ακόμα σε ηρεμία». Στη σαρκοείδωση η «ενεργότητα» σημαίνει ότι η νόσος υφίσταται κλινικές, ακτινολογικές ή λειτουργικές αλλαγές ως αποτέλεσμα της συνεχιζόμενης δράσης του (άγνωστου) παράγοντα που ευθύνεται για την εκδήλωσή της.

Επειδή στη σαρκοείδωση (i) η ιστολογική βλάβη είναι δυνατόν να αλλάζει μορφή καθώς η νόσος εξελίσσεται (κυψελιδίτιδα με συμμετοχή T-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων → σχηματισμός κοκκιωμάτων → εξέλιξη σε

ίνωση) και (ii) είναι δυνατόν να προσβάλλονται πολλαπλά όργανα εκτός των πνευμόνων, έχει προταθεί κατά καιρούς μια πλειάδα «δεικτών» που αντικατοπτρίζουν την δραστηριότητα της νόσου τόσο στα διάφορα προσβεβλημένα όργανα όσο και στις διαφορετικές «φάσεις» της ιστολογικής βλάβης (βλ. παρακάτω). Είναι φανερό ότι καθένας από τους δείκτες αυτούς δείχνει την δραστηριότητα της νόσου από μια συγκεκριμένη οπτική γωνία, μπορεί να αφορά κάποιο συγκεκριμένο μόνο όργανο και δεν σχετίζεται κατ' ανάγκη με άλλους δείκτες.

Δείκτες δραστηριότητας στη σαρκοείδωση^{84,85}

α) *Κλινικοί δείκτες.* Συμπτώματα και σημεία όπως ο πυρετός, οι αρθραλγίες, ο βήχας, η προοδευτική δύσπνοια, το οζώδες ερύθημα, η σπληνομεγαλία κλπ, είναι σαφείς ενδείξεις ενεργού νόσου (όταν φυσικά δεν αποδίδονται σε άλλο συνυπάρχον αίτιο).

β) *Ακτινολογικοί δείκτες.* Η προοδευτική επιδείνωση των ακτινολογικών βλαβών σε διαδοχικούς ελέγχους, στην ακτινογραφία ή/ και στην αξονική τομογραφία θώρακα, είναι δείκτης δραστηριότητας της νόσου.

γ) *Λειτουργικοί δείκτες.* Η προοδευτική επιδείνωση των λειτουργικών δοκιμασιών του αναπνευστικού (π.χ. μείωση της ζωτικής χωρητικότητας), σε διαδοχικούς ελέγχους, δείχνει επίσης ενεργό νόσο.

δ) *Σπινθηρογραφικοί δείκτες.* Το σπινθηρογράφημα με Γάλλιο-67 βασίζεται στην πρόσληψη του ραδιοφαρμάκου από τα σαρκοειδικά κοκκιώματα και τα μακροφάγα. Ένα θετικό σπινθηρογράφημα με Γάλλιο-67 στη σαρκοείδωση δείχνει επομένως ενεργό κοκκιωματώδη φλεγμονή. Το σπινθηρογράφημα με ^{99m}Tc-DTPA χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της διαπερατότητας του αναπνευστικού επιθηλίου σε διαλυτές ουσίες. Η κάθαρση του DTPA αυξάνει σε φλεγμονές του πνευμονικού παρεγχύματος, όπως και στην ενεργό σαρκοείδωση.

ε) *Ορολογικοί δείκτες.* Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης που προσδιορίζεται στον ορό (sACE) είναι ο πλέον διαδεδομένος ορολογικός δείκτης στη σαρκοείδωση. Παράγεται από τα επιθηλιοειδή κύτταρα των κοκκιωμάτων και τα μακροφάγα και τα επίπεδά του αντικατοπτρίζουν το σύνολο των κοκκιωμάτων του οργανισμού και όχι μόνο του πνεύμονα. Ανάλογη σημασία έχουν το ασβέστιο ορού και ούρων 24ώρου που αυξάνονται, λιγότερο όμως συχνά, στην ενεργό νόσο. Άλλοι δείκτες που κατά

καιρούς έχουν προταθεί είναι η λυσοζύμη, η νεοπτερίνη, ο διαλυτός υποδοχέας της IL-2, η IFN- γ κ.ά.

στ) *Δείκτες στο BALF*. Οι κυριότεροι δείκτες εδώ είναι τα επίπεδα των CD4 λεμφοκυττάρων (CD4 λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα), όπως αυτά εκφράζονται από το ποσοστό των λεμφοκυττάρων στο BALF και το λόγο CD4/CD8. Έχουν και εδώ προταθεί και άλλες ουσίες ως πιθανοί δείκτες δραστηριότητας, όπως η κολλαγενάση, η ινονεκτίνη, το πεπτιδίιο του προκολλαγόνου III κ.ά.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η δραστηριότητα της νόσου δεν σχετίζεται με την έκταση της νόσου, ούτε έχει σχέση με την πρόγνωση. Επίσης δεν έχει αξία ως προς τη λήψη αποφάσεων για τη χορήγηση ή όχι θεραπείας. Επομένως η κλινική της χρησιμότητα είναι μάλλον περιορισμένη. Στην πράξη, το sACE και ίσως ο διαλυτός υποδοχέας της IL-2 μπορούν να χρησιμεύσουν στην παρακολούθηση της νόσου ή στην εκτίμηση της ανταπόκρισής της στη θεραπεία.

Η τρέχουσα πρακτική, σχετικά με την αξιολόγηση της δραστηριότητας της νόσου στη σαρκοείδωση, είναι η εκτίμηση της «κλινικής δραστηριότητας» όπως αυτή εκτιμάται από την συμπτωματολογία και την φυσική εξέταση του ασθενούς, καθώς και από τις μεταβολές των λειτουργικών παραμέτρων του αναπνευστικού ή των ευρημάτων στην ακτινογραφία θώρακα. Από κλινικής απόψεως, η έκταση και η βαρύτητα της νόσου έχει περισσότερη σημασία για έναν ασθενή από ό,τι η δραστηριότητα της νόσου.^{86,87}

2.3 Το οξειδωτικό stress στη σαρκοείδωση

Λίγες σχετικά μελέτες έχουν ασχοληθεί με το θέμα αυτό. Φαίνεται ότι υπάρχει αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού stress στη σαρκοείδωση, δεν έχει όμως καθοριστεί η σημασία του φαινομένου αυτού στην παθοφυσιολογία της νόσου.

Έτσι έχει βρεθεί ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα που απομονώνονται από το BALF ασθενών με σαρκοείδωση εκλύουν μεγαλύτερες ποσότητες H₂O₂ από ό,τι τα κυψελιδικά μακροφάγα φυσιολογικών ατόμων.^{88,89}

Στο BALF σαρκοειδικών ασθενών έχουν επίσης βρεθεί αυξημένα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού stress, όπως είναι οι οξειδωμένες πρωτεΐνες⁹⁰ και το 8-ισοπροστανόιο.⁹¹

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο του οξειδωτικού stress, η G6PD διατηρεί επαρκή τα αποθέματα του NADPH για την «τροφοδοσία» της αναγωγάσης της GSH, που με τη σειρά της διατηρεί επαρκή τα επίπεδα της GSH, του κυριότερου αντιοξειδωτικού στο ELF. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι σε κάποιες μελέτες έχουν βρεθεί αυξημένα ποσοστά έλλειψης ή λειτουργικής ανεπάρκειας G6PD σε σαρκοειδικούς ασθενείς, υποδηλώνοντας μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα στους ασθενείς αυτούς. Η σημασία της παρατήρησης αυτής δεν έχει διευκρινιστεί.⁹²

2.4 Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση

Η Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (IPF – Idiopathic Pulmonary Fibrosis) είναι η συχνότερη από τις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες (Εικόνα 3). Είναι μια χρόνια νόσος αγνώστου αιτιολογίας, που περιορίζεται στους πνεύμονες και εξελίσσεται προοδευτικά σε ίνωση του πνευμονικού παρεγχύματος και αναπνευστική ανεπάρκεια. Η ιστολογική βλάβη που χαρακτηρίζει την IPF περιγράφεται από τον παθολογοανατομικό όρο «συνήθης διάμεση πνευμονία» (UIP - usual interstitial pneumonia).

Η νόσος φαίνεται να είναι μάλλον συχνότερη στους άνδρες και εμφανίζεται στα 2/3 των περιπτώσεων μετά την ηλικία των 60 ετών.⁹³

Ιστολογική εικόνα (UIP)

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της UIP είναι η ετερογένεια των βλαβών και οι «ινοβλαστικές εστίες» (fibroblastic foci). Οι τελευταίες αποτελούν αθροίσεις ινοβλαστών και κυρίως μυοϊνοβλαστών που αναπαριστούν ενεργές εστίες σχηματισμού ινώδους ιστού.

Στο ιστολογικό παρασκεύασμα έχουμε εναλλαγή της εικόνας από φυσιολογικό πνεύμονα σε περιοχές φλεγμονής του διαμέσου χώρου (δίηθηση από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα και υπερπλασία των πνευμονοκυττάρων τύπου II), περιοχές ίνωσης (με εναπόθεση κολλαγόνου και διάσπαρτες εστίες ανάπτυξης ινοβλαστών - ινοβλαστικές εστίες) και περιοχές καταστροφής της αρχιτεκτονικής (σχηματισμός κυστικών αεροχώρων δίκην μελησσοκηρύθρας).^{76,93}

Παθογένεια

Μέχρι προ ετών υπήρχε η θεωρία ότι η πνευμονική ίνωση ήταν το αποτέλεσμα μιας χρόνιας εμμένουσας φλεγμονής που κατέληγε σε ίνωση –

ουλοποίηση του παρεγχύματος. Σήμερα υπάρχει μια πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζει τη θεωρία ότι η IPF είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών. Επανειλημμένες μικροσκοπικές βλάβες του κυψελιδικού επιθηλίου από τον (άγνωστο) παράγοντα που ευθύνεται για τη νόσο, ακολουθούνται από μη φυσιολογική επούλωση των βλαβών και τη δημιουργία ίνωσης. Στη διαδικασία αυτή η φλεγμονή πιθανόν να είναι ένα επιφαινόμενο και όχι το γενεσιουργό αίτιο της ίνωσης.

Η θεωρία αυτή συνοψίζεται στην Εικόνα 6 ως ακολούθως:

α) Επανειλημμένες βλάβες του κυψελιδικού επιθηλίου οδηγούν σε ενεργοποίησή του και έκλυση ιστικού παράγοντα και των PAI-1 και PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitors-1, 2). Το γεγονός αυτό προδιαθέτει στο σχηματισμό θρόμβου μέσα στις κυψελίδες, που αποτελεί το προστάδιο σχηματισμού στρώματος.

β) Το κυψελιδικό επιθήλιο εκλύει μια πλειάδα μεσολαβητών όπως transforming growth factor - β (TGF β), tumor necrosis factor - α (TNF α), platelet derived growth factor (PDGF), με αποτέλεσμα την προσέλκυση, πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση των ινοβλαστών και την διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες. Παράλληλα παρατηρείται μείωση της PGE₂ τοπικά, που έχει ανασταλτική δράση στους ινοβλάστες.

γ) Οι μυοϊνοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα εκλύουν τα ένζυμα Gelatinases A, B (ή αλλιώς μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases - MMP) 2 και 9 αντίστοιχα) που διασπούν την βασική μεμβράνη (κολλαγόνο τύπου IV) και προάγουν τη μετανάστευση των μυοϊνοβλαστών στον κυψελιδικό χώρο.

δ) Έκλυση αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, FGF-2: Fibroblast Growth Factor-2) έχει ως επακόλουθο τη νέο-αγγείωση στα πρώιμα στάδια. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να υποστρέφει στα όψιμα στάδια της ίνωσης.

ε) Οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν πρωτεΐνες θεμέλιας ουσίας και κολλαγόνο. Παρατηρείται διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των κολλαγενασών/ μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs: Tissue Inhibitor Metalloproteinases), με τελικό αποτέλεσμα την προοδευτική εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

στ) Παρατηρείται απουσία ή καθυστέρηση της φυσιολογικής απόπτωσης των μυοϊνοβλαστών, γεγονός που παρατείνει το σχηματισμό ινώδους ιστού, καθώς και αύξηση της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων που εμποδίζει την φυσιολογική επιθηλιοποίηση των βεβλαμμένων κυψελίδων.

ζ) Ουδετερόφιλα εκλύουν τοπικά μεσολαβητές της φλεγμονής, ενεργούς μεταβολίτες οξυγόνου και MMPs που φαίνεται ότι έχουν ρυθμιστική δράση, ενώ λεμφοκύτταρα εκλύουν Th2 τύπου κυτταροκίνες (IL4, IL13) που ευνοούν την ενεργοποίηση και μετανάστευση των ινοβλαστών.

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η καταστροφή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής της κυψελιδο-τριχοειδικής μονάδας. Στην διαδικασία που περιγράφηκε πιθανόν να παρεμβαίνουν ρυθμιστικά γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες.^{94,95}

Διάγνωση

Η διάγνωση της IPF τίθεται εφόσον πληρούνται τα παρακάτω κριτήρια:⁹³

α) Ιστολογική εικόνα UIP σε βιοψία πνεύμονα που λαμβάνεται χειρουργικά (πολλαπλά δείγματα και από διαφορετικές περιοχές του πνεύμονα)

β) Αποκλεισμός άλλων αιτίων που προκαλούν παρόμοια κλινική και /ή ιστολογική εικόνα (φάρμακα, νοσήματα του κολλαγόνου, περιβαλλοντική έκθεση)

γ) Συμβατά ευρήματα με IPF από τον λειτουργικό έλεγχο του αναπνευστικού και τον ακτινολογικό έλεγχο του θώρακα με ακτινογραφία ή HRCT.

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει ιστολογική διάγνωση, είτε επειδή ο ασθενής θεωρείται υψηλού κινδύνου για χειρουργική βιοψία πνεύμονα (μεγάλη ηλικία, συνυπάρχοντα νοσήματα από το καρδιαγγειακό, αναπνευστική ανεπάρκεια κλπ) είτε επειδή ο ίδιος αρνείται να υποβληθεί σε χειρουργείο. Τότε η διάγνωση της IPF μπορεί να τεθεί με αρκετή βεβαιότητα εφόσον πληρούνται τα παρακάτω μείζονα και ελάσσονα κριτήρια (όλα τα μείζονα και τουλάχιστον τρία από τα ελάσσονα):

Μείζονα κριτήρια

α) Αποκλεισμός άλλων γνωστών αιτίων που προκαλούν ΔΔΠ (φάρμακα, νοσήματα του κολλαγόνου, περιβαλλοντική έκθεση)

β) Συμβατά ευρήματα με IPF από τον λειτουργικό έλεγχο (περιοριστικό σύνδρομο με διαταραχή της ανταλλαγής των αερίων)

γ) Διαμέσου τύπου σκιάσεις στις βάσεις άμφω, με περιορισμένης έκτασης περιοχές ground glass στην HRCT θώρακα.

δ) Ευρήματα από τη διαβρογχική βιοψία πνεύμονα ή το BAL που δεν είναι συμβατά με κάποια άλλη διάγνωση, διαφορετική από IPF.

Ελάχιστο κριτήρια

α) Ηλικία > 50 έτη

β) Ανεξήγητη από άλλο νόσημα προϊούσα δύσπνοια στην κόπωση

γ) Διάρκεια νόσου τουλάχιστον 3 μήνες

δ) Χαρακτηριστικοί ρόγχοι (Velcro-like) από την ακρόαση του θώρακα

Κλινική εικόνα

Εκδηλώνεται συνήθως με προοδευτικά επιδεινούμενη δύσπνοια στην κόπωση και ξηρό βήχα. Από την κλινική εξέταση βρίσκουμε πληκτροδακτυλία σε υψηλό ποσοστό (25-50%), ενώ στην ακρόαση του θώρακα ακούμε τους χαρακτηριστικούς λεπτούς τελο-εισπνευστικούς ρόγχους (Velcro-like) της πνευμονικής ίνωσης, αρχικά στις βάσεις και αργότερα σε όλη την έκταση των πνευμόνων.^{93,95}

Λειτουργικές διαταραχές από το αναπνευστικό

Η βασική λειτουργική διαταραχή στην IPF είναι το περιοριστικό σύνδρομο (μείωση της ολικής πνευμονικής χωρητικότητας και των επιμέρους λειτουργικών όγκων), με μείωση της διαχυτικής ικανότητας του πνεύμονα για το CO. Προοδευτικά εγκαθίσταται υποξυγοναιμία με αύξηση της κυψελιδοτριχοειδικής διαφοράς, αρχικά στην άσκηση και αργότερα στην ηρεμία.⁹³

Ακτινολογικά ευρήματα

Στην IPF παρατηρείται μείωση του όγκου του πνεύμονα στην ακτινογραφία θώρακα και διάμεσου τύπου δικτυοοζώδεις σκιάσεις αμφοτερόπλευρα με προτίμηση τις βάσεις και την περιφέρεια των πνευμόνων. Σε προχωρημένα στάδια παρατηρείται εικόνα μελισσοκηρύθρας.

Η υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία θώρακα (HRCT) επιτρέπει την πρώιμη και πιο έγκυρη διάγνωση της IPF εκεί όπου η ακτινογραφία θώρακα είναι φυσιολογική ή μη τυπική. Έχει αναφερθεί ότι η διάγνωση της IPF μπορεί να τεθεί με αξιοπιστία μέχρι και 90% μόνο από την HRCT. Τα τυπικά ευρήματα εδώ είναι οι δικτυωτού τύπου σκιάσεις, κατά τόπους, με προτίμηση

τις περιφερικές υποϋπεζωκοτικές περιοχές και τις βάσεις των πνευμόνων αμφοτερόπλευρα. Μπορεί να συνυπάρχουν περιορισμένης έκτασης περιοχές «θολής υάλου» (ground glass), βρογχεκτασίες και βρογχιολεκτασίες εξ έλξεως, καθώς και υποϋπεζωκοτικές περιοχές μελισσοκηρύθρας (Εικόνα 7).^{93,96}

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) στην IPF.

Ενώ το BAL έχει αποδειχθεί ένα εξαιρετικό ερευνητικό εργαλείο στην μελέτη της παθοφυσιολογίας της IPF, δεν φαίνεται να έχει ανάλογη αξία στην διάγνωση της νόσου. Τα χαρακτηριστικά ευρήματα από το BAL στην IPF είναι η αύξηση των πολυμορφοπυρήνων (>5%) και λιγότερο συχνά των ηωσινοφίλων (>5%) ή των λεμφοκυττάρων (>10%). Αύξηση μόνο των τελευταίων υποδηλώνει ότι η υποκείμενη νόσος πιθανότατα δεν είναι η IPF. Ο τύπος αυτός του BAL παρατηρείται γενικά σε κάθε τύπο πνευμονικής ίνωσης και δεν είναι χαρακτηριστικός της IPF μόνο. Η αξία επομένως της βρογχοσκόπησης και του BAL στην αρχική τουλάχιστον διερεύνηση ενός ασθενούς με πιθανή IPF έγκειται κυρίως στο να αποκλείσει εναλλακτικές διαγνώσεις (όπως λοιμώξεις, κακοήθεια, ηωσινοφιλική πνευμονία, ιστοκυττάρωση Χ κλπ) ή να περιορίσει το εύρος των πιθανών διαγνώσεων.⁹³

Πρόγνωση και Θεραπεία

Η IPF είναι μια θανατηφόρος ασθένεια με μέση επιβίωση τα 3 έτη περίπου. Έχει υπολογιστεί ότι το 50% περίπου των ασθενών θα καταλήξει μέσα στα 5 πρώτα έτη από την διάγνωση, αλλά πιθανόν οι υπολογισμοί αυτοί να αποτελούν υπερεκτίμηση της πραγματικότητας, δεδομένου ότι σε αρκετές από τις μελέτες αυτές έχουν συμπεριληφθεί ασθενείς με νόσο του κολλαγόνου ή NSIP που έχουν καλύτερη πρόγνωση από την IPF.⁹⁶

Δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ότι τα διαθέσιμα φάρμακα αλλάζουν την πορεία της νόσου ή βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών αυτών. Λόγω της κακής όμως προγνώσεως, οι περισσότεροι ασθενείς, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, τίθενται σε θεραπεία με την ελπίδα της προσωρινής έστω σταθεροποίησης της νόσου. Τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα σήμερα είναι τα κορτικοειδή σε συνδυασμό με αζαθειοπρίμη ή μεθοτρεξάτη.⁹³ Εναλλακτικά έχουν χρησιμοποιηθεί η κολχικίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, η ιντερφερόνη γ και τελευταία η Ν-ακετυλοκυστεΐνη ως αντιοξειδωτικό.^{97,98}

2.5 Το οξειδωτικό stress στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το οξειδωτικό stress διατηρεί την διεργασία της ίνωσης στους ιστούς επιδρώντας στην απόπτωση τόσο δομικών όσο και φλεγμονωδών κυττάρων, μεταβάλλοντας παράλληλα την τοπική «ισορροπία» κυτταροκινών.⁹⁹ Το οξειδωτικό stress φαίνεται να επηρεάζει και να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της IPF σε πολλαπλά επίπεδα:

α) Αύξηση του οξειδωτικού φορτίου. Μια σειρά μελετών έχουν αποδείξει ότι το οξειδωτικό stress είναι αυξημένο στην IPF. Έτσι έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου από τα κυψελιδικά μακροφάγα και ουδετερόφιλα στο BALF ασθενών με IPF.¹⁰⁰

Η οξειδο-αναγωγική ισορροπία κλίνει ακόμα περισσότερο προς την πλευρά των οξειδωτικών ουσιών μετά από την παρατήρηση ότι στο ELF υπάρχει μείωση των επιπέδων της GSH (κύριο αντιοξειδωτικό στο ELF).¹⁰¹ Η μείωση αυτή μπορεί να προέρχεται εν μέρει από την «κατανάλωση» της GSH από τους ενεργούς μεταβολίτες οξυγόνου. Πιθανότατα όμως συμβάλει σ' αυτό και η αναστολή της σύνθεσής της στα επιθηλιακά κύτταρα που είναι οι τροφοδοτές του ELF σε GSH. Ο TGFβ φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή αυτή.¹⁰²

Εκτός από την GSH μια πλειάδα αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι επίσης μειωμένα στους πνεύμονες ασθενών με IPF, όπως η γ-γλουταμυλ-κυστεϊνική συνθετάση (γ-GCS), που ρυθμίζει την παραγωγή της GSH, η δισμουτάση το υπεροξειδίου (MnSOD), η οξυγενάση της αίμης (OH1) κλπ.¹⁰³

Στο BALF ασθενών με IPF βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού stress, όπως οι οξειδωμένες πρωτεΐνες⁹⁰ και το 8-ισοπροστανόιο.⁹¹

Στην IPF έχει επίσης βρεθεί ότι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα κύτταρα του κυψελιδικού επιθηλίου εκλύουν αυξημένες ποσότητες NO και ONOO⁻.¹⁰⁴

β) Απόπτωση του κυψελιδικού επιθηλίου. Η βλάβη του κυψελιδικού επιθηλίου αποτελεί σημαντικό γεγονός στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης. Κατά την διαδικασία της φυσιολογικής επούλωσης τα επιθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης, διαφοροποιούνται και υπερπλάσσονται με τελικό αποτέλεσμα την ανάκτηση της συνέχειας του καλυπτήριου επιθηλίου. Στην IPF η διαδικασία αυτή φαίνεται ανεπαρκής και εξηγείται, τουλάχιστον εν μέρει, από την αύξηση της απόπτωσης των

επιθηλιακών κυττάρων. Οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου αυξάνουν την απόπτωση, πιθανότατα μέσω της αγγιοτενσίνης II που παράγεται από τους μυοϊνοβλάστες και θεωρείται ως μεσολαβητής του οξειδωτικού stress. Στην αγγιοτενσίνη II αποδίδονται επιπλέον ιδιότητες, όπως η ενεργοποίηση των ινοβλαστών προς παραγωγή θεμέλιας ουσίας και η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, ενώ φαίνεται ότι σχετίζεται και με την διακυτταρική επικοινωνία, που στην IPF φαίνεται να διαταράσσεται με αποτέλεσμα την ανεξάρτητη και ανεξέλεγκτη υπερπλασία των ινοβλαστών.^{94,99}

γ) Ενεργοποίηση πυρηνικών μεσολαβητών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα της φλεγμονής ο λόγος GSH/GSSG είναι αυξημένος (> 90%). Σε καταστάσεις οξειδωτικού stress και φλεγμονής επέρχεται μείωση του λόγου αυτού. Επιπλέον στην IPF υπάρχει μειωμένη παραγωγή GSH. Η ενδοκυττάρια αυτή αλλαγή προκαλεί ενεργοποίηση (άρση της αναστολής) των πυρηνικών μεσολαβητών NF-kB και AP-1. Ο NF-kB προάγει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην φλεγμονή και την ίνωση (IL-1, IL-6, TNF-α, IL-8, VCAM-1, ICAM-1, GM-CSF), ενώ ο AP-1 ενεργοποιεί το γονίδιο του TGF-β. Παράλληλα ενεργοποιούνται και γονίδια αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι η γ-GCS, που ρυθμίζει την παραγωγή της GSH, η MnSOD και η OH1. Η επικρατούσα κάθε φορά γονιδιακή έκφραση θα καθορίσει και την έκβαση (επίταση βλάβης/ νόσος vs επούλωση/ ίαση).^{99,105}

δ) Αλληλεπίδραση οξειδωτικού stress και συστήματος πρωτεασών/ αντιπρωτεασών. Έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση των MMP2, 7 και 9 σε ασθενείς με IPF. Οι MMPs βρίσκονται σε ανενεργή μορφή και ενεργοποιούνται με τη διάσπαση ενός δεσμού κυστείνης-Zn που εμπεριέχουν (cysteine switch). Οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου (H₂O₂, HClO κλπ) και αζώτου (ONOO, NO κλπ) προκαλούν οξειδωση και διάσπαση του δεσμού αυτού και ενεργοποίηση των MMPs. Αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η SOD και η υπεροξειδάση της GSH, καθώς και η χορήγηση N-ακετυλο-κυστείνης (NAC) που αυξάνει τα επίπεδα της GSH στο ELF, αναστέλλουν την ενεργοποίηση των MMPs. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι η εξωκυττάρια SOD είναι ευαίσθητη στην πρωτεολυτική δράση των πρωτεασών, που μπορούν να ενισχύσουν έτσι το οξειδωτικό stress.

Η δράση των MMPs εκτός από την ενεργοποίησή τους εξαρτάται και από την ρυθμιστική επίδραση των αναστολέων τους (TIMPs, α₂-μακροσφαιρίνη). Έχει βρεθεί ότι οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου αναστέλλουν τη δράση του TIMP1 και της α₂-μακροσφαιρίνης, ενισχύοντας περαιτέρω τη δράση των MMPs.

Ο ρόλος του συστήματος MMPs/ TIMPs στην παθοφυσιολογία της IPF φαίνεται να είναι περισσότερο περίπλοκος και η αλληλεπίδραση του οξειδωτικού stress με το σύστημα πρωτεασών/ αντιπρωτεασών δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρη. Έτσι σε ιστολογικά παρασκευάσματα πνεύμονα ασθενών με IPF βρέθηκε αυξημένη έκφραση της MMP2 και ιδίως της MMP9, που αφορούσε τα μακροφάγα, τα επιθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Τα ουδετερόφιλα έδειξαν αυξημένη έκφραση της MMP9 ενώ όλα τα κύτταρα πλην των ουδετεροφίλων παρουσίασαν αυξημένη έκφραση του TIMP2. Οι MMP2 και 9 έχουν συσχετιστεί με την διάσπαση της βασικής μεμβράνης όπως έχει ήδη περιγραφεί, ενώ η TIMP2 φαίνεται να σχετίζεται με την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας και την καταστροφή – αναδιαμόρφωση (remodeling) της κυψελιδοτριχοειδικής μονάδας.^{94,103,106,107}

ε) Οξειδωτικό stress και TGF-β. Ο TGF-β είναι ένας κριτικής σημασίας μεσολαβητής της ιστικής ίνωσης, που προκαλεί μετανάστευση, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών και προάγει την εναπόθεση κολλαγόνου. Πρακτικά όλα τα κύτταρα μπορούν να παράγουν TGF-β και έχουν υποδοχείς γι' αυτόν.^{103,108}

Υπάρχει μια θετική αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικού stress και TGF-β. Οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου αυξάνουν την απελευθέρωσή του από τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα και ενεργοποιούν απευθείας τα ανενεργά εξωκυττάρια αποθέματα του TGF-β.^{103,108}

Ο TGF-β ενεργοποιεί με τη σειρά του την NADPH οξειδάση των ινοβλαστών αυξάνοντας την παραγωγή ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο TGFβ μειώνει τα επίπεδα της γ-GCS των επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνθεση GSH.^{103,105} Εκτός από τον TGFβ και ο PDGF, ένας άλλος «ινοποιός» μεσολαβητής, επάγεται υπό την επίδραση των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου.⁹⁹

στ) Οξειδωτικό stress και ανοσολογική απάντηση. Έχει βρεθεί ότι το H₂O₂ προάγει την έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD40, CD80 και CD86.

Το CD40 στα μονοκύτταρα σχετίζεται με μείωση της απόπτωσης και παράταση της δράσης των κυττάρων αυτών στις θέσεις φλεγμονής. Η έκφραση των παραπάνω αντιγόνων στα μονοκύτταρα είναι κριτικής σημασίας για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Διάφορα δεδομένα υποστηρίζουν ότι στις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους τα μονοκύτταρα/μακροφάγα βρίσκονται σε συνεχή ανοσοδιέγερση. Η επαγωγή επομένως των παραπάνω μορίων από το οξειδωτικό stress, μπορεί να προκαλεί εξεσημασμένη και παρατεταμένη αντιγονική παρουσίαση που οδηγεί τελικά σε χρονιότητα και ιστική βλάβη. Η σημασία των παρατηρήσεων αυτών στην IPF δεν γνωστή. Τέλος, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό stress δρα ρυθμιστικά στη αντίδραση των λεμφοκυττάρων ευνοώντας το φαινότυπο μιας Th2 αντίδρασης.⁹⁹

3. ΤΟ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.1 Γενικά

Στα νοσήματα του κατώτερου αναπνευστικού, η διάγνωση μιας νόσου και στη συνέχεια η αξιολόγηση της πορείας της, του επιπέδου και του είδους της υποκείμενης φλεγμονής, της ενεργότητας της νόσου κλπ, είναι πληροφορίες που συχνά απαιτούν τη λήψη αντιπροσωπευτικών βιολογικών δειγμάτων από το κατώτερο αναπνευστικό. Αυτό γινόταν μέχρι πρόσφατα σχεδόν αποκλειστικά με επεμβατικές τεχνικές, όπως το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), την ενδοβρογχική και τη διαβρογχική βιοψία, που απαιτούν βρογχοσκόπηση. Ωστόσο τέτοιες τεχνικές ενέχουν τον κίνδυνο των επιπλοκών και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαδοχικές μετρήσεις στον ίδιο ασθενή. Κατά τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί σε λιγότερο επεμβατικές μεθόδους δειγματοληψίας από το κατώτερο αναπνευστικό, όπως είναι η προκλητή απόχρεμψη, η μέτρηση δεικτών στον εκπνεόμενο αέρα (κυριότερος δείκτης το μονοξείδιο του αζώτου - NO) και το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.^{31,109,110}

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (exhaled ή expired breath condensate) άρχισε να γίνεται γνωστό από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, μετά από μια μελέτη που έγινε σε διασωληνωμένους ασθενείς σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.¹¹¹ Από τότε, ιδιαίτερα μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1990, αυξάνεται διαρκώς το ενδιαφέρον για τη νέα αυτή μη επεμβατική τεχνική και τις πιθανές προοπτικές αξιοποίησής της στη μελέτη των νοσημάτων του αναπνευστικού.

3.2 Τι είναι το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα;

Ο εκπνεόμενος αέρας αποτελείται από μια αέρια φάση, που εμπεριέχει πτητικά μόρια, όπως NO, CO κ.ά. και μια υγρή φάση που περιέχει υδρατμούς πτητικές και μη πτητικές ουσίες.¹¹² Οι υδρατμοί αποτελούν και το μεγαλύτερο μέρος της υγρής αυτής φάσης (> 99%) και αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό, αν λάβει κανείς υπόψη του ότι ο αέρας στους βρόγχους και τις κυψελίδες είναι κορεσμένος με υδρατμούς κατά 100%. Δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο μη πτητικές ουσίες βρίσκονται στον εκπνεόμενο αέρα. Έχει υποτεθεί ότι κατά τη διάρκεια στροβιλώδους ροής του αέρα που διέρχεται από

τους αεραγωγούς προς τα έξω, δημιουργείται αερόλυμα (aerosol) από το υγρό που επικαλύπτει την επιφάνεια των αεραγωγών (ELF). Έτσι με την εκπνοή συμπαρασύρονται προς τα έξω και μη πτητικές ουσίες, που βρίσκονται διαλυμένες μέσα στο υγρό των δημιουργούμενων μικροσταγονιδίων.¹¹³

Η ψύξη του εκπνεόμενου αέρα θα επιφέρει υγραποίηση των υδρατμών. Οι υγρατοποιημένοι πλέον υδρατμοί συμπαρασύρουν μαζί τους τόσο τις διαλυμένες σ' αυτούς πτητικές ουσίες όσο και τα μη πτητικά μόρια των μικροσταγονιδίων. Η υγρή λοιπόν αυτή φάση του εκπνεόμενου αέρα, η οποία συμπυκνώνεται και συλλέγεται ως υγρό μετά από ψύξη του, αποτελεί το *συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα* (Εικόνα 8).^{32,113,114}

Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα στοχεύει:

(i) στη μελέτη των διαλυμένων σε αυτό μορίων, από τα οποία είναι δυνατό να αντληθούν πληροφορίες για θέσεις του αναπνευστικού που είναι προσπελάσιμες μόνο επεμβατικά

(ii) στην καλύτερη κατανόηση των νοσημάτων του αναπνευστικού μελετώντας τα επίπεδα και /ή τις μεταβολές των διαφόρων μεσολαβητικών ουσιών από το κατώτερο αναπνευστικό

(iii) στη χρήση αυτών των μεσολαβητικών ουσιών ως δείκτες της πορείας νόσου.^{32,114}

3.3 Τεχνικές συλλογής

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα συλλέγεται με διάφορες τεχνικές, ανάλογα με το ερευνητικό κέντρο. Πρόκειται για παραλλαγές που αφορούν κατά βάση τον τρόπο ψύξης του εκπνεόμενου αέρα, ενώ η υπόλοιπη διαδικασία παραμένει γενικά η ίδια.

Η μέθοδος συλλογής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο «Υλικό και Μέθοδος» του Ειδικού Μέρους. Βασίζεται στην ψύξη ενός γυάλινου σωλήνα διπλού αυλού μήκους 30 cm περίπου, που λειτουργεί ως συμπυκνωτής (σωλήνας συλλογής). Η ψύξη επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ψυχρού αέρα σταθερής θερμοκρασίας και ροής, που παράγεται από τη συσκευή πρόκλησης με ψυχρό αέρα (αυτή που χρησιμοποιείται στη διάγνωση του βρογχικού άσθματος). Ο εξεταζόμενος αναπνέει ήρεμα και σταθερά (tidal breathing) για 10-15 λεπτά, μέσα από ένα

επιστόμιο συνδεδεμένο στο ένα άκρο του σωλήνα. Μεταξύ του επιστομίου και του σωλήνα συλλογής παρεμβάλλεται μια βαλβίδα διπλής κατεύθυνσης (τύπου Hans-Rudolph), που διαχωρίζει της εισπνοής από την εκπνοή. Το δείγμα συλλέγεται στο άλλο άκρο του σωλήνα συλλογής. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το εργαστήριό μας και είναι πλέον διεθνώς αποδεκτή.^{114,115,116,117,118,119}

Υπάρχουν διάφορες άλλες συσκευές για τη συλλογή του συμπυκνώματος που χρησιμοποιούν σωλήνες διαφορετικών υλικών (Teflon, μέταλλα κλπ), διαφορετικού μήκους ή διαμέτρου και σύστημα ψύξης από υγρό ή ξηρό πάγο. Τελευταία κυκλοφορούν στο εμπόριο και έτοιμες κατασκευές οι οποίες ψύχονται στο ψυγείο στους -20°C και αμέσως μετά χρησιμοποιούνται στον ασθενή. Σε όλες όμως τις μεθόδους η αρχή ψύξης και συμπύκνωσης του εκπνεόμενου αέρα παραμένει η ίδια.¹¹⁴

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- (i) αποφεύγεται εντελώς η ανάμειξη με σιέλο, καθώς η συλλογή γίνεται στο περιφερικό άκρο του σωλήνα που βρίσκεται 30 cm μακριά από το στόμα του ασθενούς. Επιπλέον η βαλβίδα Hans-Rudolph ενεργεί και ως παγίδα σιέλου.
- (ii) η θερμοκρασία ψύξεως του δείγματος μέσω του μηχανήματος του ψυχρού αέρα είναι σταθερή, κάτι που δεν είναι απολύτως εφικτό με τις άλλες μεθόδους (στην περίπτωση του υγρού πάγου π.χ. αυτός τήκεται κατά τη διάρκεια της συλλογής, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της θερμοκρασίας ψύξεως).

3.4 Τι μετράται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα;

Μέχρι σήμερα στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχει μετρηθεί μια πληθώρα χημικών ουσιών. Οι περισσότερες μελέτες ασχολούνται με τον προσδιορισμό ουσιών που εκφράζουν την υποκείμενη φλεγμονή και το οξειδωτικό stress σε διάφορα νοσήματα του αναπνευστικού. Παρακάτω αναφέρονται οι περισσότεροι μελετημένες από τις ουσίες αυτές.

3.4.1 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

a) Προέλευση:

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το H_2O_2 είναι ένας ενεργός μεταβολίτης οξυγόνου που σχηματίζεται από το $\text{O}_2^{\bullet-}$ με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Στο αναπνευστικό σύστημα σχηματίζεται από διάφορα φλεγμονώδη και μη κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Είναι ένα πτητικό μόριο και η παρουσία του στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχει αποδειχθεί από πολλαπλές μελέτες.

β) Καταστάσεις που επηρεάζουν τα επίπεδα του H_2O_2 :

Σε υγιή άτομα βρέθηκε ένας κερκάρδιος ρυθμός στα επίπεδα του εκπνεόμενου H_2O_2 , με υψηλότερα επίπεδα την 12:00 και 24:00 ώρα.¹²⁰

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα, όπου τα επίπεδα του εκπνεόμενου H_2O_2 σε ασθενείς με ασταθή νόσο ή παρόξυνση βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με εκείνους που ήταν σε σταθερή κατάσταση. Οι ασθενείς με σταθερό άσθμα, υπό αγωγή με εισπνεόμενα στεροειδή, είχαν παρόμοια επίπεδα H_2O_2 με τους υγιείς. Τα επίπεδα του H_2O_2 βρέθηκαν να σχετίζονται με την υποκείμενη φλεγμονή, όπως αυτή εκφράζεται από την βρογχική υπεραντιδραστικότητα, τα επίπεδα των ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα και την ECP του ορού.^{56,121} Η χορήγηση κορτικοειδών φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα του εκπνεόμενου H_2O_2 , ενώ οι ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων δεν φαίνεται να έχουν καμία επίδραση.^{122,123}

Σε ασθενείς με ΧΑΠ τα επίπεδα του εκπνεόμενου H_2O_2 βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ οι ασθενείς που ήταν σε παρόξυνση παρουσίαζαν ακόμη υψηλότερες τιμές H_2O_2 .¹²⁴ Το εκπνεόμενο H_2O_2 στη ΧΑΠ βρέθηκε να σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου και το ποσοστό των ουδετεροφίλων στα προκλητά πτύελα.¹¹⁷

Τα επίπεδα του H_2O_2 στον εκπνεόμενο αέρα έχουν επίσης βρεθεί αυξημένα σε ασυμπτωματικούς καπνιστές,^{120,125} στις βρογχεκτασίες,^{66,67} στις λοιμώδεις παροξύνσεις της κυστικής ίνωσης,¹²⁶ στο ARDS,¹²⁷ στην αλλεργική ρινίτιδα,¹²⁸ μετά από λοβεκτομή ή πνευμονεκτομή,¹²⁹ και στο σκληρόδερμα.¹³⁰

γ) Προσδιορισμός των επιπέδων του H_2O_2 :

Οι μέθοδοι μέτρησης του H_2O_2 βασίζονται στην ικανότητά του να αντιδρά με κατάλληλα υποστρώματα, αποδίδοντας χρώμα, φως ή φθορισμό (χρωματομετρικές, φασματο-φωτομετρικές μέθοδοι).

Στη μέθοδο των Gallati και Pracht,¹³¹ το προς μέτρηση δείγμα αναμιγνύεται με διάλυμα 3,3',5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνης και διάλυμα υπεροξειδάσης horseradish. Το μίγμα επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν οξινίζεται σε pH= 1 με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος. Το

προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση του H_2O_2 στο αρχικό δείγμα. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι περίπου 0,1 μM . Μια παραλλαγή αυτής της μεθόδου είναι εκείνη που περιγράφηκε από τους Ruch και συν,¹³² στην οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά ένα προϊόν της οξειδωσης του ομοβανιλλικού οξέος (homovanillic acid-HVA) που σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του H_2O_2 στο δείγμα. Οι Hyslop και Sklar¹³³ χρησιμοποιούν το p-υδροξυφαινολοξικό οξύ ως υπόστρωμα οξειδωσης, από το προϊόν της αντίδρασης του H_2O_2 και της υπεροξειδάσης horseradish και το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται φωτομετρικά. Τέλος, οι Russell και συν¹³⁴ έχουν εφαρμόσει μια τεχνική χημειοφωταύγειας με τη χρήση luminol που επιτρέπει την ανίχνευση H_2O_2 σε συγκεντρώσεις μέχρι 2,5 nM. Στις κλινικές μελέτες, οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο είναι οι δυο πρώτες.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα παρουσιάζει ωστόσο κάποια προβλήματα:

Το H_2O_2 είναι ένα ασταθές μόριο, το οποίο αποδομείται στη θερμοκρασία δωματίου ή όταν έρχεται σε επαφή με μέταλλο. Τα δείγματα θα πρέπει να καταψύχονται ταχύτατα και να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία $-70^\circ C$.¹³⁵ Τα δεδομένα, σχετικά με τη σταθερότητα του H_2O_2 σε καταψυγμένα δείγματα, δίδονται στις διάφορες μελέτες.¹¹⁴ Στη μελέτη των Jobsis et al , όπου εξετάστηκε ένας σχετικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων, τα επίπεδα του H_2O_2 παρέμειναν σταθερά, για τουλάχιστον ένα μήνα στους $-20^\circ C$.¹³⁶

Ένα άλλο σημείο που χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή είναι η αποφυγή πρόσμιξης σιέλου στο δείγμα, δεδομένου ότι ο σίελος περιέχει 10 – 100 φορές περισσότερο H_2O_2 από το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.¹¹⁴

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των επιπέδων του H_2O_2 που συνήθως χρησιμοποιούμε σήμερα, έχουν ένα όριο ανίχνευσης (0.1 μM) που είναι κοντά στα επίπεδα H_2O_2 που ανιχνεύονται σε φυσιολογικά άτομα αλλά και σε ασθενείς με παθήσεις του αναπνευστικού. Έτσι το ποσό H_2O_2 που αποβάλλεται από πολλούς φυσιολογικούς ανθρώπους είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο. Επιπλέον παρατηρούνται διαφορές σχετικά με την επαναληψιμότητα των μετρήσεων του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του

εκπνεόμενου αέρα, στις υπάρχουσες δημοσιεύσεις. Πιθανότατα η εφαρμογή μεθόδων προσδιορισμού του H₂O₂ με μεγαλύτερη ευαισθησία μετρήσεων, θα επιλύσει τα προβλήματα αυτά.^{32,114}

3.4.2 8-ισοπροστανίο (8-isoprostane)

α) Προέλευση:

Το 8-ισοπροστανίο είναι μια σταθερή ένωση, ανάλογη των προσταγλανδινών, που προέρχεται από την μη ενζυμική επίδραση των ενεργών μεταβολιτών O₂ στο αραχιδονικό οξύ της κυτταρικής μεμβράνης (βλ. παράγραφο 1.9.ε). Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια ομάδα ισομερών ενώσεων που σχηματίζονται μ' αυτόν τον τρόπο (ισοπροστανία), αλλά το 8-ισοπροστανίο έχει μελετηθεί περισσότερο και θεωρείται ένας πολύ αξιόπιστος δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσής και κατ' επέκταση του οξειδωτικού stress.¹³⁷ Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι σε μελέτες in vitro βρέθηκε ότι το 8-ισοπροστανίο προκαλεί βρογχόσπασμο, σύσπασση των αγγείων στα νεφρά και στους πνεύμονες, συμμετέχει στη διαδικασία συγκέντρωσης και προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και προκαλεί εξίδρωση πλάσματος στο βρογχικό βλεννογόνο. Αν και η κλινική σημασία των παρατηρήσεων αυτών δεν έχει καθοριστεί επακριβώς, υπονοείται σαφώς μια βιολογική δραστηριότητα του 8-ισοπροστανίου, ως μεσολαβητή του οξειδωτικού stress.^{138,139}

β) Καταστάσεις που επηρεάζουν τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου:

Το 8-ισοπροστανίο έχει βρεθεί αυξημένο στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα και τα επίπεδά του φαίνεται να σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου.⁶² Στη ΧΑΠ τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου επίσης αυξάνονται.^{117,140} Οι ασθενείς με ΧΑΠ σε παρόξυνση παρουσιάζουν αύξηση του εκπνεόμενου 8-ισοπροστανίου συγκριτικά με αυτούς που είναι σε ηρεμία, ενώ τα επίπεδα αυτά μειώνονται μετά την θεραπεία της παρόξυνσης.¹⁴¹ Αύξηση του εκπνεόμενου 8-ισοπροστανίου έχει βρεθεί επίσης σε ασθενείς με ARDS,¹⁴² κυστική ίνωση,¹⁴³ στο σύνδρομο αποφρακτικών απνοιών κατά τον ύπνο,¹⁴⁴ καθώς και σε ασυμπτωματικούς καπνιστές.¹⁴⁰

γ) Προσδιορισμός των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου:

Ως μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό του 8-ισοπροστανίου σε βιολογικά υγρά θεωρείται η αέριος χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

(gas chromatography-mass spectrometry ή GC-MS), λόγω της μεγάλης της ειδικότητας και ευαισθησίας.¹³⁷ Ωστόσο η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και εφαρμόσιμη, λόγω οργάνων, σε λίγα μόνο κέντρα. Έτσι, στις περισσότερες κλινικές μελέτες σήμερα το 8-ισοπροστάδιο προσδιορίζεται με τη βοήθεια ανοσολογικών (radioimmunoassay - RIA) ή ανοσοενζυμικών (enzyme immunoassay - EIA) μεθόδων. Ειδικά πακέτα αντιδραστηρίων (kits) που βασίζονται στις μεθόδους αυτές διατίθενται πλέον στο εμπόριο, δίνοντας τη δυνατότητα προσδιορισμού του 8-ισοπροσταδίου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων και σε λιγότερο χρόνο.^{145,146,147,148}

Η EIA μέθοδος (περιγράφεται εκτενέστερα στο ειδικό μέρος) χρησιμοποιεί ειδικό αντιγόνο που παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα (100%) για το 8-ισοπροστάδιο και έχει δείξει πολύ καλή συσχέτιση με την GC-MS. Σε πολύ μικρό ποσοστό συν-προσδιορίζονται μαζί με το 8-ισοπροστάδιο ενώσεις παρόμοιας χημικής δομής (PGF_{2α}, PGF_{3α}, PGE₁ και PGE₂ σε ποσοστό 0.2% η κάθε μια και 6-keto-PGF_{1α} σε ποσοστό 0.1%). Αυτό συμβαίνει και στις άλλες μεθόδους (GC-MS και RIA), όπου οι συν-προσδιοριζόμενες ενώσεις είναι διαφορετικές διότι εξαρτώνται από την εκάστοτε τεχνική.

Η EIA έχει όριο ανίχνευσης στα 4 pg/ml. Σε φυσιολογικά άτομα, οι τιμές του 8-ισοπροσταδίου κυμαίνονται στις διάφορες μελέτες από 0 έως 40 pg/ml.³² Όπως και στην περίπτωση του H₂O₂, υπάρχουν αναφορές που αμφισβητούν την επαναληψιμότητα της μεθόδου σε αντίθεση με άλλες που την επιβεβαιώνουν.¹¹⁴

3.4.3 pH

α) Καταστάσεις που επηρεάζουν το pH στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα:

Προσδιορίστηκε το pH των αεραγωγών σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθματικούς ασθενείς στην παρόξυνση και στην αποδρομή αυτής, με βάση την υπόθεση ότι η ενδογενής όξυνση των αεραγωγών μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος. Οι τιμές του pH στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα των ασθματικών σε παρόξυνση ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών, ενώ επανέρχονταν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από την κατάλληλη θεραπεία και αποδρομή της παρόξυνσης.¹⁴⁹ Το pH έχει βρεθεί επίσης σημαντικά ελαττωμένο στην κυστική ίνωση, τις βρογχεκτασίες, τη ΧΑΠ και το ARDS, ενώ φαίνεται να σχετίζεται με

τα επίπεδα της πολυμορφοπυρηνικής φλεγμονής στη ΧΑΠ και στις βρογχεκτασίες και με τα επίπεδα της ηωσινοφιλικής φλεγμονής στο άσθμα.^{116,150,151}

β) Προσδιορισμός του pH:

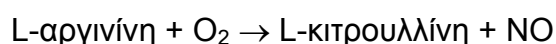
Το pH στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μπορεί να μετρηθεί εύκολα με τη βοήθεια ηλεκτροδίων ή ειδικών stick. Επειδή στις μετρήσεις αυτές παρατηρείται αστάθεια, εφαρμόζεται αποαέρωση του δείγματος πριν από τη μέτρηση με τη βοήθεια αερίου που δεν περιέχει CO₂ (πχ αργό). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το pH σταδιακά αυξάνει και σταθεροποιείται τελικά όταν έχει αφαιρεθεί όλο το CO₂ από το δείγμα. Σε φυσιολογικά άτομα έπειτα από την διαδικασία αποαέρωσης τα επίπεδα του pH προσδιορίζονται περίπου στο 8.^{114,152}

3.4.4 Προϊόντα μεταβολισμού του μονοξειδίου του αζώτου (NO) [νιτρώδη (NO₂⁻), νιτρικά (NO₃⁻), νιτροτυροσίνη, νιτροζοθειόλες].

α) Προέλευση:

Παρακάτω παρατίθενται κάποια στοιχεία μεταβολισμού του NO και των προϊόντων του, σχετικά με τον τρόπο σχηματισμού τους και την βιολογική σημασία τους.

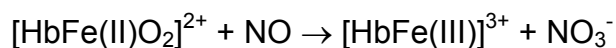
Το NO (παλαιότερα γνωστό ως EDRF: endothelial derived relaxing factor) είναι ο καλύτερα μελετημένος δείκτης φλεγμονής στον εκπνεόμενο αέρα. Σχηματίζεται από την NO-συνθετάση (NOS):



Η NOS μαζί με τα νιτρώδη και τις νιτροζοθειόλες (βλ. παρακάτω) θεωρούνται οι κύριες πηγές NO στους αεραγωγούς.^{31,153}

Το NO είναι βιολογικά δραστικό και η πιο χαρακτηριστική του αντίδραση είναι με τον σίδηρο σε πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη, όπως η γουανυλική κυκλάση και η αιμοσφαιρίνη. Μετά την προσκόλληση του NO στο ένζυμο, η γουανυλική κυκλάση ενεργοποιείται και παράγει cGMP που με τη σειρά του μειώνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο προκαλώντας χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Η αντίδραση αυτή θεωρείται ως η πλέον αντιπροσωπευτική της βιολογικής δράσης του NO.¹⁵³

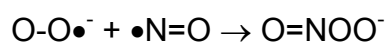
Το NO αντιδρά επίσης με την οξυαιμοσφαιρίνη του αίματος παράγοντας μεθαιμοσφαιρίνη και **νιτρικά**:



Το NO είναι μια ασταθής ρίζα που γρήγορα αντιδρά με το οξυγόνο σχηματίζοντας **νιτρώδη**: $4 \text{NO} + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{NO}_2^- + 4 \text{H}^+$

Σε χαμηλό pH (π.χ. παρόξυνση άσθματος) η παραπάνω αντίδραση κινείται προς τα αριστερά (σχηματισμός HNO₂) με αύξηση του NO.¹⁴⁹

Με το υπεροξειδίο το NO σχηματίζει το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν:



Το τελευταίο δρα ως οξειδωτικό σε ποικίλους βιολογικούς στόχους (DNA, πρωτεΐνες, κυτταρικές μεμβράνες). Έτσι συναντάμε στη βιβλιογραφία, σε αντιστοιχία με τον όρο «oxidative stress» (οξειδωτικό stress), και τον όρο «nitrosative stress».^{35,154}

Το O=NOO⁻ μπορεί να αποδομηθεί σε **νιτρώδη** και **νιτρικά** ($4 \text{O=NOO}^- \rightarrow 2 \text{ONO}_2^- + 2 \text{ONO}^- + \text{O}_2$)¹⁵³ ή να αντιδράσει με κατάλοιπα τυροσίνης από πρωτεϊνικά μόρια δημιουργώντας το σταθερό προϊόν **νιτροτυροσίνη**. Τα επίπεδα νιτροτυροσίνης στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχουν προταθεί ως έμμεσος δείκτης φλεγμονής των αεραγωγών.¹⁵⁵

Το NO αντιδρά με μόρια που περιέχουν θειολικές ομάδες (-SH) σχηματίζοντας τις **νιτροζοθειόλες**, ο χημικός τύπος των οποίων είναι: R-S-N=O. Το R-S- μπορεί να αντιστοιχεί σε γλουταθειόνη, κυστεΐνη, αλβουμίνη κλπ. Οι νιτροζοθειόλες θεωρούνται ως η κυριότερη «δεξαμενή» NO-βιολογικής δραστηριότητας στον οργανισμό.¹⁵⁴

Επειδή τα προϊόντα μεταβολισμού του NO είναι περισσότερο σταθερά σε σχέση με το NO, αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την αξιολόγηση των ουσιών αυτών στη έκφραση της φλεγμονής των αεραγωγών:

β) Καταστάσεις που επηρεάζουν τα επίπεδα των προϊόντων μεταβολισμού του NO:

Τα νιτρώδη και τα συνολικά νιτρικά/ νιτρώδη έχουν βρεθεί αυξημένα στο βρογχικό άσθμα, ενώ η χρήση εισπνεόμενων κορτικοειδών φάνηκε να μειώνει τα επίπεδά τους.^{115,156,157} Τα νιτρώδη έχουν επίσης βρεθεί αυξημένα στη ΧΑΠ και στην κυστική ίνωση.^{154,158} Τα νιτρικά βρέθηκαν αυξημένα στους καπνιστές και σε ασθενείς με άσθμα και πνευμονία, ενώ ήταν φυσιολογικά σε ασθενείς με ΧΑΠ.¹⁵⁹ Στην πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών τα επίπεδα νιτρωδών

και συνολικών νιτρικών/ νιτρωδών έχουν βρεθεί φυσιολογικά, σε αντίθεση με τα επίπεδα του NO που είναι χαρακτηριστικά μειωμένα στην πάθηση αυτή.¹⁶⁰

Αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσίνης έχουν βρεθεί σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα,¹⁵⁵ ενώ οι νιτροζοθειόλες έχουν βρεθεί αυξημένες στους καπνιστές, στο σοβαρό άσθμα, στην κυστική ίνωση και στην ΧΑΠ.¹⁵⁴

γ) Προσδιορισμός των επιπέδων των προϊόντων μεταβολισμού του NO:

(i) Ο προσδιορισμός των νιτρωδών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα βασίζεται στην αντίδραση του Griess,¹⁵³ που είναι η πιο δημοφιλής και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Για τον προσδιορισμό του συνόλου των νιτρικών/ νιτρωδών (άθροισμα των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO), τα νιτρικά μετατρέπονται ενζυμικά σε νιτρώδη με την επίδραση της αναγωγάσης των νιτρικών και στη συνέχεια προσδιορίζονται τα ολικά νιτρώδη (αναχθέντα νιτρικά + νιτρώδη) με την αντίδραση Griess.¹¹⁵ Τα νιτρικά μπορούν να μετρηθούν με άμεσο τρόπο, χρωματογραφικά.¹⁵⁹

(ii) Η νιτροτυροσίνη έχει μετρηθεί στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα με ειδική ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA).¹⁵⁵

(iii) Οι νιτροζοθειόλες έχουν μετρηθεί με τη βοήθεια ενός kit που κυκλοφορεί στο εμπόριο και βασίζεται στη διάσπαση των νιτροζοθειολών και στην απελευθέρωση NO. Το NO στη συνέχεια οξειδώνεται σε NO₂⁻ και προσδιορίζεται με την αντίδραση Griess. Η μέθοδος έχει όριο ανίχνευσης τα 0.025 μM.¹⁵⁴

3.4.5 Άλλα μόρια

α) *Αδενοσίνη*. Προέρχεται από την αποδόμηση του ATP και παρουσιάζει πολλές δράσεις στα βιολογικά συστήματα μέσω των ειδικών υποδοχέων της.¹⁶¹ Έχει προσδιοριστεί στον εκπνεόμενο αέρα με τη βοήθεια HPLC (High Performance Liquid Chromatography) και έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με αλλεργική ρινίτιδα και βρογχικό άσθμα.^{162,163}

β) *Μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως*. Η προσταγλανδίνες E₂ (PGE₂) και D₂ (PGD₂) και η θρομβαξάνη B₂ (TXB₂) έχουν προσδιοριστεί στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα με ανοσοενζυμικές (EIA) και ανοσολογικές (RIA) τεχνικές. Βρέθηκε ότι δεν διαφέρουν μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με άσθμα, ενώ η PGE₂ βρέθηκε αυξημένη σε ασθενείς με ΧΑΠ καθώς και σε καπνιστές με άσθμα.^{114,164,165}

γ) *Λευκοτριένια*. Τα κυστεϊνυλικά λευκοτριένια (Cys-LTs: LTC₄, D₄, E₄, F₄) έχουν συσχετιστεί περισσότερο με την ασθματική αντίδραση ενώ το LTB₄ με την πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή.^{166,167} Προσδιορίζονται με ανοσοενζυμικές μεθόδους (EIA). Τα Cys-LTs και το LTB₄ έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα,¹⁶⁸ ενώ το LTB₄ βρέθηκε επίσης αυξημένο στη ΧΑΠ^{164,169} και την κυστική ίνωση σε παρόξυνση.¹⁷⁰

δ) *Κυτταροκίνες*. Προσδιορίζονται με τη βοήθεια EIA / ELISA kits. Στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχει επιβεβαιωθεί από διαφορετικούς ερευνητές η παρουσία της ιντερλευκίνης 6 και 8, ενώ υπάρχουν αναφορές για τις ιντερλευκίνες 1β, 4, 10 και την ιντερφερόνη γ.¹¹⁴

ε) Υπάρχουν αναφορές για προσδιορισμό αλδευδών και γλουταθειόνης ως δεικτών οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, καθώς και άλλων μορίων όπως NH₄, DNA κλπ.¹¹⁴ Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης μελέτες που συνδυάζουν την τεχνική PCR στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, για την γρήγορη διάγνωση λοιμώξεων όπως είναι η φυματίωση.¹⁷¹

Πολλά από τα παραπάνω ευρήματα πιθανόν να αποτελέσουν πεδίο μελλοντικής έρευνας. Σε κάθε περίπτωση, παραμένει ανοικτό το ερώτημα τι ακριβώς μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

3.5 Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τις μετρήσεις στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα

α) *Οι συσκευές συμπύκνωσης*. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές συσκευές συμπύκνωσης του εκπνεόμενου αέρα. Πολλές από αυτές πωλούνται έτοιμες στο εμπόριο ενώ άλλες αποτελούν κατασκευές των ίδιων των ερευνητικών κέντρων που έχουν ασχοληθεί με την τεχνική αυτή. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν συγκριτικές μελέτες για το αν κάποια συσκευή υπερτερεί έναντι των άλλων (όγκος συλλεγόμενου συμπυκνώματος, επίπεδα διαφόρων μεσολαβητών κλπ). Οι επίσημες οδηγίες σήμερα προτείνουν τη χρήση μιας συγκεκριμένης συσκευής για τη συλλογή όλων των δειγμάτων κάθε μελέτης, ώστε να υπάρχουν συγκρίσιμες μετρήσεις. Κάθε τέτοια συσκευή θα πρέπει να έχει επιφάνεια συμπυκνώσεως από ανενεργό υλικό ώστε να μην αντιδρούν με

αυτό τα συστατικά που πρόκειται να μετρηθούν στο συμπύκνωμα. Επιπλέον θα πρέπει να υπάρχει κάποιο σύστημα για την αποφυγή πρόσμιξης του συμπυκνώματος με σίελο και ο εκπνεόμενος αέρας να οδηγείται στη συσκευή συμπύκνωσης μέσα από βαλβίδα μιας κατεύθυνσης ώστε να μην επανεισπνέεται ο προς συμπύκνωση αέρας. Τέλος ο σχεδιασμός της συσκευής πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να αποφεύγεται η συμπύκνωση του περιβάλλοντος αέρα κατά τη διάρκεια της εξέτασης.¹¹⁴

β) *Ο όγκος δείγματος.* Γενικά 10 λεπτά ήρεμης αναπνοής αρκούν για τη συλλογή 1 – 2 ml συμπυκνώματος. Το μεγαλύτερο μέρος αυτού του δείγματος αντιπροσωπεύει συμπυκνωμένους υδρατμούς. Κανένας από τους υπάρχοντες συμπυκνωτές δεν μπορεί να συγκεντρώσει όλο το ύδωρ που βρίσκεται υπό μορφή υδρατμών στον εκπνεόμενο αέρα. Έχει υπολογιστεί ότι από τους υδρατμούς αυτούς το 40% περίπου συλλέγεται τελικά στο συμπύκνωμα.¹⁷² Ο συνολικός όγκος του δείγματος εξαρτάται από τον κατά λεπτό αερισμό, την επιφάνεια συμπύκνωσης¹⁷² τη θερμοκρασία (βλ. παρακάτω)¹⁷³ και φυσικά τη διάρκεια συμπύκνωσης. Καθώς δεν είναι γνωστό αν οι διάφορες ουσίες που προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα κατανέμονται ομοιόμορφα στον εκπνεόμενο αέρα, ο κατά λεπτό αναπνεόμενος όγκος θα μπορούσε να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις κάποιων μεσολαβητών στο συμπύκνωμα. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές έχει προταθεί τα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών να εκφράζονται ως προς ένα προκαθορισμένο όγκο αναπνεόμενου αέρα και όχι με βάση ένα προκαθορισμένο χρόνο συμπύκνωσης. Αν και σε μικρό αριθμό ασθενών βρέθηκε ότι τα επίπεδα του εκπνεόμενου H₂O₂ είναι ανεξάρτητα από τον κατά λεπτό αερισμό,¹⁷⁴ δεν υπάρχουν συγκριτικές μελέτες μεταξύ των δυο αυτών προσεγγίσεων.¹¹⁴

γ) *Η διάρκεια συμπύκνωσης.* Ο χρόνος συμπύκνωσης στις διάφορες μελέτες κυμαίνεται από 3 έως 60 λεπτά με τις περισσότερες να χρησιμοποιούν χρόνους από 10 έως 30 λεπτά. Τα 10 λεπτά είναι ο προτεινόμενος σήμερα χρόνος γιατί δεν κουράζει τον εξεταζόμενο ενώ αποδίδει ένα όγκο δείγματος αρκετό για τις μετρήσεις των διαφόρων μεσολαβητών.¹¹⁴ Μερικές φορές χρειάζεται περισσότερος χρόνος συμπύκνωσης είτε για συγκριτικές μελέτες είτε για συλλογή μεγαλύτερου όγκου δείγματος. Από τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν έχουν βρεθεί διαφορές στα επίπεδα διαφόρων ουσιών (pH, H₂O₂, 8-ισοπροσάνιο κ.ά.) στο

συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα που συλλέχθηκε σε διάφορους χρόνους συμπίκνωσης (πχ 3, 10, 15, 20 λεπτά),^{114,174,175} Σε κάθε περίπτωση, η διάρκεια συμπίκνωσης θα πρέπει πάντα να αναφέρεται γιατί η παράτασή της θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα κάποιων ασταθών μορίων στο δείγμα.

δ) *Η θερμοκρασία συμπίκνωσης.* Συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μπορεί να παραχθεί σε θερμοκρασίες γύρω στους 0°C. Η θερμοκρασία συμπίκνωσης επηρεάζει τον όγκο του συλλεγόμενου δείγματος (όγκο συμπυκνωμένων υδρατμών), που με τη σειρά του επηρεάζει τις συγκεντρώσεις κάποιων μεσολαβητών στο λαμβανόμενο δείγμα. Μεσολαβητές με διαφορετική πτητικότητα ή διαλυτότητα είναι δυνατόν να επηρεαστούν σε διαφορετικό βαθμό από τις μεταβολές της θερμοκρασίας.¹⁷³ Για τους λόγους αυτούς και μέχρι την οριστική τυποποίηση της μεθόδου, θα πρέπει σε όλες τις μελέτες να αναφέρεται η θερμοκρασία συμπίκνωσης. Σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη πάντως, το pH δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την παράμετρο αυτή.¹⁷⁵

ε) *Ο αέρας του περιβάλλοντος.* Ο αέρας του περιβάλλοντος μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών που μετρώνται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Επίσης, ασταθείς ενώσεις μπορεί να αποδομηθούν ευκολότερα σε δείγματα που αφήνονται για αρκετή ώρα εκτεθειμένα στον ατμοσφαιρικό αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συνιστάται επομένως η χρήση βαλβίδας μονής κατεύθυνσης για το διαχωρισμό του εισπνεόμενου από τον εκπνεόμενο αέρα, όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως, ώστε να μην έρχεται άμεσα σε επαφή ο αέρας του περιβάλλοντος με το συμπύκνωμα. Επιπλέον, τα δείγματα του συμπυκνώματος μετά τη συλλογή τους θα πρέπει να καταψύχονται τα συντομότερο.¹¹⁴

στ) *Ο τρόπος αναπνοής.* Έχει βρεθεί ότι η εκπνευστική ροή επηρεάζει τα επίπεδα του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, αλλά η επίδραση αυτή είναι ασήμαντη στα επίπεδα ροής που παρατηρούνται κατά την ήρεμη αναπνοή.¹⁷⁶ Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με την επίδραση του κατά λεπτό αερισμού ή του βήχα στα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών στο συμπύκνωμα. Επομένως η σύσταση που ακολουθείται σήμερα είναι η συλλογή των δειγμάτων να γίνεται σε ήρεμη αναπνοή (tidal breathing).¹¹⁴

ζ) *Ηλικία, φύλο και φυλή.* Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την επίδραση της ηλικίας, του φύλου ή της φυλής στα επίπεδα των διαφόρων ουσιών που μετρώνται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Τα επίπεδα του H_2O_2 βρέθηκαν να αυξάνονται με την ηλικία σε υγιείς μάρτυρες, κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε σε υγιείς καπνιστές ή στα παιδιά.^{120,130,136} Λίγες αναφορές υπάρχουν για το 8-ισοπροσάνιο και το pH, όπου δεν έχει βρεθεί συσχέτιση με την ηλικία.^{62,140,152,175} Τέλος, έχει βρεθεί ότι το φύλο δεν επηρεάζει το pH στο συμπύκνωμα.^{152,175}

η) *Τροφή, κάπνισμα, συστηματικά νοσήματα, φάρμακα.* Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με την επίδραση της τροφής (ή ποτών) στα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών που μετρώνται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα πολλών μεσολαβητών στο συμπύκνωμα (H_2O_2 , 8-ισοπροσάνιο, νιτρικά, νιτροζοθειόλες).^{120,125,140,154,159} Χρόνια νοσήματα ή φάρμακα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπ' όψιν ως πιθανοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα των μετρούμενων μεσολαβητών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

θ) *Κιρκάδιος ρυθμός.* Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μεταβάλλονται στη διάρκεια του 24ώρου.¹²⁰ Κάτι τέτοιο δε φαίνεται να συμβαίνει για το pH,¹⁷⁵ ενώ ανάλογα φαινόμενα δεν έχουν μελετηθεί για άλλες ουσίες. Συνιστάται πάντως η συλλογή των δειγμάτων να γίνεται μια συγκεκριμένη περίοδο της ημέρας (πχ πρωί).¹¹⁴

ι) *Πρόσμιξη σιέλου.* Επειδή στο σίελο περιέχονται ποσότητες οξειδωτικών ουσιών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα των μετρήσεων στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η πρόσμιξη σιέλου στο δείγμα. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές όπως η χρήση παγίδας σιέλου μεταξύ επιστομίου και συσκευής συμπύκνωσης, η τοποθέτηση της συσκευής συμπύκνωσης σε υψηλότερο επίπεδο από εκείνο του επιστομίου, η χρήση μεγάλου μήκους συνδετικών σωλήνων κ.ά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, προκειμένου να αποκλειστεί η πρόσμιξη σιέλου, γίνεται προσδιορισμός της αμυλάσης στο δείγμα. Παρ' όλα αυτά η απουσία αμυλάσης στο δείγμα δεν αποκλείει την απουσία προσμίξεων από τον

ανώτερους αεραγωγούς, ενώ αντίθετα η ανίχνευση αμυλάσης δεν σημαίνει οπωσδήποτε πρόσμιξη σιέλου, δεδομένου ότι ποσότητες αμυλάσης ανιχνεύονται και στους πνεύμονες. Έτσι δεν θεωρείται απολύτως απαραίτητος ο προσδιορισμός της αμυλάσης στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Για τον αποκλεισμό πρόσμιξης σιέλου, περισσότερη βαρύτητα θα πρέπει να δίνεται στην κατάλληλη διαμόρφωση της συσκευής συμπύκνωσης.¹¹⁴

κ) *Ο παράγοντας αραιώσης.* Το θέμα αυτό προέκυψε από την προσπάθεια προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των διαφόρων διαλελυμένων ουσιών στο ELF, με βάση τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Προς την κατεύθυνση αυτή έχει εργαστεί κυρίως η ομάδα των Effros et al, βασιζόμενοι στις παρακάτω παραδοχές:

(i) Το μεγαλύτερο μέρος του συμπυκνώματος αποτελείται από ύδωρ προερχόμενο από τους υδρατμούς του εκπνεόμενου αέρα.

(ii) Τα μη πτητικά μόρια που εμπεριέχονται στο ELF δεν μπορούν να μεταφερθούν με εξαέρωση (και στη συνέχεια ψύξη) από το ELF στο συμπύκνωμα, όπως γίνεται με το ύδωρ. Ο μόνος τρόπος που θα μπορούσαν τέτοιες ουσίες να μεταφερθούν στο συμπύκνωμα είναι με τη μορφή αερολύματος: μικροσταγονίδια ELF (και ό,τι αυτό εμπεριέχει) που παρασύρονται με τη ροή του εκπνεόμενου αέρα προς τα έξω. Τα μικροσταγονίδια αυτά συγχωνεύονται με τους συμπυκνωμένους υδρατμούς στη συσκευή συμπύκνωσης και το υγρό που προκύπτει (συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα) αποτελεί στην ουσία ένα αραιωμένο δείγμα ELF (Εικόνα 8).

(iii) Αν μια μη πτητική ουσία βρεθεί αυξημένη στο συμπύκνωμα τότε μπορεί να συμβαίνουν τα εξής: είτε η ουσία αυτή αυξήθηκε στο ELF, είτε αυξήθηκε ο αριθμός ή/ και το μέγεθος των μικροσταγονιδίων του αερολύματος, είτε ελαττώθηκε ο όγκος των συμπυκνωμένων υδρατμών (και το συμπύκνωμα προέκυψε πυκνότερο). Η δεύτερη πιθανότητα είναι κάτι που μπορεί να συμβαίνει σε παθολογικές καταστάσεις π.χ. όταν αυξάνεται η ποσότητα των βρογχικών εκκρίσεων σε νοσήματα των αεραγωγών (άσθμα, ΧΑΠ κλπ). Τα χαρακτηριστικά ακροαστικά ευρήματα στις παθήσεις αυτές (που υποδηλώνουν τη δίοδο αέρα μέσα από στενωμένους αεραγωγούς), μπορεί να αντιστοιχούν ακριβώς στην αυξημένη παραγωγή αερολύματος.

(iv) Αν διευρύνουμε περισσότερο την προηγούμενη υπόθεση, θα λέγαμε ότι πιθανόν ο τρόπος παραγωγής αερολύματος και κατ' επέκταση η σχετική αναλογία ύδατος (συμπυκνωμένοι υδρατμοί) – μικροσταγονιδίων ELF στο συμπύκνωμα, να διαφέρει τόσο μεταξύ υγιών και ασθενών, όσο και σε διαδοχικές μετρήσεις στο ίδιο άτομο ή μεταξύ διαφορετικών υγιών ατόμων. Επομένως είναι αδύνατο να βγουν οποιαδήποτε συμπεράσματα από τις μετρήσεις στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα αν προηγουμένως δεν αναχθούν αυτές οι μετρήσεις στο «αρχικό διάλυμα» που είναι το ELF.

Με βάση τις παραπάνω παραδοχές αν μια μη πτητική ουσία X έχει συγκέντρωση $[X]_{EBC}$ στο συμπύκνωμα τότε η συγκέντρωσή της στο ELF $[X]_{ELF}$ προσδιορίζεται από τον τύπο: $[X]_{ELF} = D \times [X]_{EBC}$, όπου D ο παράγοντας αραιώσης. Ο D υπολογίζεται από τον τύπο:

$$D = [S]_{ELF} : [S]_{EBC} \text{ ή } D = [S]_{ΠΛΑΣΜΑ} : [S]_{EBC}$$

όπου S είναι μια ουσία-δείκτης που θα πρέπει να είναι μη πτητική, να διαχέεται ομοιόμορφα στους ιστούς (επομένως να έχει ίδια συγκέντρωση στο πλάσμα και στο ELF) και να μην παράγεται ή να μεταβολίζεται τοπικά στους πνεύμονες. Ως τέτοιοι δείκτες έχουν μελετηθεί η ουρία, τα ολικά κατιόντα και η αγωγιμότητα πλάσματος και ELF.

Η παραπάνω προσέγγιση προσπαθεί να προσδιορίσει, τουλάχιστον εν μέρει, τη σύσταση του ELF, ενώ εξηγεί και τις διακυμάνσεις που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία στα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών που προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.^{177,178,179}

Παρά την ορθολογική βάση πάνω στην οποία στηρίζεται, η χρήση του παράγοντα αραιώσης δεν έχει υιοθετηθεί επίσημα¹¹⁴ και οι λόγοι είναι πολλοί:

(i) Υπολογίστηκε ότι το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μας δίνει πληροφορίες για τα μη πτητικά μόρια που εμπεριέχονται στο ELF με μια αραιώση της τάξης του 1:20000.¹⁷⁹ Δεν μπορούμε όμως να θεωρήσουμε το συμπύκνωμα ως ένα αραιωμένο δείγμα του ELF, δεδομένου ότι η ακριβής προέλευσή του είναι άγνωστη. Η αναγωγή επομένως των μετρήσεων του συμπυκνώματος στο «αρχικό διάλυμα» (ELF, πλάσμα) έχει μόνο θεωρητική βάση.

(ii) Ο παράγοντας αραιώσης αφορά μόνο μη πτητικές ουσίες ενώ προσεγγίζει το ELF ως ομοιογενές υδατικό διάλυμα μη λαμβάνοντας υπόψη

τη ετερογενή σύστασή του από τις κυψελίδες προς το ανώτερο αναπνευστικό.¹⁸⁰

(iii) Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο παράγοντας αραίωσης δεν μπορεί να εξηγήσει από μόνος του τις μεταβολές των επιπέδων των διαφόρων μεσολαβητών που παρατηρούνται σε παθήσεις του αναπνευστικού, τις συσχετίσεις τους με δείκτες βαρύτητας της νόσου (λειτουργικά τεστ, ορολογικούς δείκτες κλπ) ή τις μεταβολές των επιπέδων αυτών μετά από θεραπεία.¹⁸¹

(iv) Δεν έχει αποδειχθεί ότι η «διόρθωση» των μετρήσεων με ένα παράγοντα αραίωσης θα διαφοροποιούσε σημαντικά τις μετρήσεις στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, ενώ μεγαλύτερη σημασία φαίνεται να έχει η ευαισθησία των μεθόδων μέτρησης.¹⁸²

λ) *Η επαναληψιμότητα και η ευαισθησία των μετρήσεων.* Ένα πρόβλημα που έχει ανακύψει από τον προσδιορισμό διαφόρων μεσολαβητών στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα είναι η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, φαίνεται ότι μια σημαντική αιτία γι' αυτό είναι η ευαισθησία των μετρήσεων.^{183,184} Δεδομένου ότι πολλές από τις προς μέτρηση ουσίες βρίσκονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις στο συμπύκνωμα, σε πολλές περιπτώσεις τα επίπεδα των μετρούμενων αυτών ουσιών βρίσκονται κοντά στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέτρησης. Έτσι π.χ. συγκεντρώσεις μικρότερες του ορίου ανίχνευσης μπορεί να θεωρούνται ως μηδενικές χωρίς αυτό να συμβαίνει στην πραγματικότητα. Αναμένεται ότι μέθοδοι μετρήσεων μεγαλύτερης ευαισθησίας, αλλά και η περαιτέρω τυποποίηση της μεθόδου, θα βελτιώσουν σημαντικά την αξιοπιστία του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα, προκειμένου η τεχνική αυτή να μπορέσει να εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο.^{32,114}

3.6 Η θέση του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα σε ερευνητικό και κλινικό επίπεδο σήμερα

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έρχεται να καλύψει την ανάγκη συλλογής πληροφοριών, σχετικά με βιοχημικές ή /και φλεγμονώδεις διεργασίες που επιτελούνται στο κατώτερο αναπνευστικό, με μη επεμβατικό τρόπο. Η τεχνική αυτή είναι πολλά υποσχόμενη σε διάφορα επίπεδα

εφαρμογών. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κλινικά, στην παρακολούθηση ασθενών με αναπνευστικό νόσημα καθώς και ερευνητικά, στη διευκρίνιση κάποιων παθοφυσιολογικών μηχανισμών στα πλαίσια μιας νόσου του αναπνευστικού. Επιπλέον θα μπορούσε να έχει θέση και στην πρόληψη, με την διάγνωση πρώιμων μεταβολών στο κατώτερο αναπνευστικό, σε κλινικώς υγιή άτομα.

Η τεχνική του συμπυκνώματος είναι μια απόλυτα μη επεμβατική μέθοδος δειγματοληψίας από το αναπνευστικό σύστημα. Είναι πολύ καλά ανεκτή και μπορεί να επαναληφθεί όσο συχνά απαιτείται χωρίς επιπλοκές για τον ασθενή. Μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς προβλήματα και σε παιδιά, ενώ οι νέες φορητές συσκευές συμπύκνωσης ενδέχεται να επιτρέψουν στο μέλλον τη συλλογή δειγμάτων και πέρα από το χώρο του εργαστηρίου (ΜΕΘ, θάλαμοι ασθενών, κατ' οίκον κλπ).^{32,114,185}

Όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα της μεθόδου μπορούν ίσως να εξηγήσουν το ενδιαφέρον που έχει προκαλέσει η τεχνική αυτή στους πνευμονολόγους σε διεθνές επίπεδο. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι δημοσιεύσεις εργασιών πάνω στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχουν εντυπωσιακά αυξηθεί τα τελευταία χρόνια.¹⁷⁹ Το γιατί τελικά η μέθοδος αυτή δεν έχει βρει εφαρμογή σε κλινικό επίπεδο οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Μια σημαντική αιτία είναι ο αριθμός των ουσιών που μπορεί κανείς να μετρήσει στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Ο αριθμός αυτός σήμερα παραμένει απροσδιόριστος. Το αποτέλεσμα είναι ότι μεγάλο μέρος της έρευνας στον τομέα του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα αναλώνεται στη μέτρηση καινούργιων κάθε φορά μορίων τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και σε ασθενείς με διάφορα νοσήματα του αναπνευστικού. Έτσι το πρόβλημα της τυποποίησης της τεχνικής όχι μόνο παραμένει αλλά γίνεται και πιο περίπλοκο δεδομένου ότι μια τέτοια τυποποίηση θα πρέπει να αφορά κάθε μια τέτοια ουσία χωριστά. Κι αυτό γιατί οι μετρούμενοι μεσολαβητές στο συμπύκνωμα μπορεί να έχουν διαφορετική σε κάθε περίπτωση διαλυτότητα, πτητικότητα ή σταθερότητα στο δείγμα. Θα πρέπει να καθοριστεί για κάθε έναν από αυτούς οι συγκεντρώσεις του, σε μια πλειάδα παθήσεων του αναπνευστικού, η επαναληψιμότητα των μετρήσεων αυτών και η αξία τελικά των πληροφοριών που μας δίνουν για την αξιολόγηση της νόσου. Το θέμα της τυποποίησης της μεθόδου περιπλέκεται, όπως τονίστηκε σε προηγούμενη παράγραφο και από το γεγονός ότι πολλές

από τις διαθέσιμες μεθόδους μέτρησης των συγκεντρώσεων των διαφόρων μεσολαβητών δεν είναι αρκετά ευαίσθητες, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η επαναληψιμότητα και εν τέλει η αξιοπιστία των μετρήσεων. Επιπλέον, αρκετές από τις μεθόδους αυτές μέτρησης είναι περίπλοκες και χρονοβόρες. Το θέμα του παράγοντα διαλυτότητας παραμένει ακόμα ανοικτό, αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζει σοβαρά τις μετρήσεις. Τέλος, ένα ουσιαστικό ερώτημα, που παρά τις διάφορες υποθέσεις δεν έχει τελικά απαντηθεί, είναι η «ανατομική προέλευση» των διαφόρων μεσολαβητών που μετρώνται στο συμπύκνωμα.¹¹⁴

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα είναι μια πολύ ελκυστική τεχνική που υπόσχεται πολλά για το μέλλον. Σήμερα δεν έχει ακόμα βρει τη θέση της στην κλινική πράξη γιατί πολλά μένουν να γίνουν προς την κατεύθυνση τόσο της τυποποίησης της μεθόδου όσο και της ευαισθησίας των μεθόδων μέτρησης των διαφόρων μεσολαβητών.

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα αποτελεί σήμερα ένα εργαλείο έρευνας και οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από τις διάφορες μετρήσεις του έχουν ποιοτική περισσότερο αξία παρά ποσοτική και ως τέτοιες πρέπει να ερμηνεύονται. Η παρατήρηση αυτή δεν μειώνει την σημασία των μετρήσεων στο συμπύκνωμα, ιδιαίτερα μάλιστα όταν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών.³²

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1.1 Αρχική υπόθεση

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, η τεχνική του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα αποτελεί μια ελκυστική μέθοδο δειγματοληψίας από το κατώτερο αναπνευστικό. Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μη παρεμβατικός χαρακτήρας της και η ευκολία εφαρμογής της, ακόμα και σε παιδιά.

Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς με διάφορες παθήσεις του αναπνευστικού και κυρίως με παθήσεις των αεραγωγών (βρογχικό άσθμα, ΧΑΠ, βρογχεκτασίες, κυστική ίνωση), με κυριότερο στόχο την μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress, που βρέθηκε αυξημένο στις παθήσεις αυτές.

Πριν από την έναρξη της παρούσας εργασίας, το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα δεν είχε μελετηθεί σε ασθενείς με διάμεση παρεγχυματική πνευμονοπάθεια.

Στις διάμεσες παρεγχυματικές πνευμονοπάθειες το οξειδωτικό stress έχει μελετηθεί περισσότερο στην IPF και λιγότερο στην πνευμονική ίνωση επί σκληροδέρματος και στη σαρκοείδωση. Στις κλινικές μελέτες που προηγήθηκαν, οι πληροφορίες σχετικά με το οξειδωτικό/ αντιοξειδωτικό status στους πνεύμονες των ασθενών αυτών προερχόταν κυρίως από μετρήσεις σε δείγματα BAL. Δεν ήταν γνωστό αν ανάλογες πληροφορίες θα μπορούσαν να ληφθούν και από το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

Υποθέσαμε επομένως ότι η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε ασθενείς με διάμεση πνευμονοπάθεια και ότι θα μπορούσαμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με το οξειδωτικό stress στους ασθενείς αυτούς, από το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

1.2 Σκοπός της μελέτης

Ο κύριος στόχος της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα σε ασθενείς με διάμεσες πνευμονοπάθειες και η σύγκριση των επιπέδων αυτών με αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες.

Δευτερεύοντες στόχοι ήταν η συσχέτιση των επιπέδων του οξειδωτικού stress με κλινικούς δείκτες αξιολόγησης της βαρύτητας και έκτασης της κάθε νόσου.

Τα παραπάνω ερωτήματα κατ' αρχήν διερευνήθηκαν σε ασθενείς με σαρκοείδωση και στη συνέχεια σε ασθενείς με IPF. Από τα διάμεσα νοσήματα του πνεύμονα επιλέχθηκαν για μελέτη η σαρκοείδωση και η IPF ως οι συχνότερες και πιο αντιπροσωπευτικές από τις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες.

Ως δείκτες αξιολόγησης των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, επιλέχθηκαν το H_2O_2 και το 8-ισοπροστανίνο, όπως περιγράφονται στα προηγούμενα κεφάλαια.

2. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

2.1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

2.1.1 Ομάδα ασθενών και ομάδα ελέγχου

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και της ομάδας ελέγχου συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Μελετήθηκαν 30 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη σαρκοείδωση. Αποκλείστηκαν ασθενείς με σαρκοείδωση, στους οποίους αναγνωρίστηκαν συνοδοί παράγοντες, που θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα: κάπνισμα, συνοδό χρόνιο νόσημα, αλλεργία, πρόσφατη λοίμωξη του αναπνευστικού (διάστημα μικρότερο των 6 εβδομάδων), λήψη φαρμάκων. Επίσης αποκλείστηκαν όσοι αρνήθηκαν να υποβληθούν στον προτεινόμενο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο.

Στην ομάδα των ασθενών, οι 7 ήταν νέες περιπτώσεις και οι 23 ήταν γνωστοί ασθενείς με σαρκοείδωση, που ήρθαν ως εξωτερικοί ασθενείς στα πλαίσια τρίμηνου τακτικού επανελέγχου. Εννιά από τους ασθενείς αυτούς λάμβαναν χαμηλές δόσεις κορτικοειδών (έως 10 mg ημερησίως). Για τις παλαιές περιπτώσεις η μέση διάρκεια νόσου πριν την έναρξη της μελέτης ήταν 3 ± 2 έτη (mean \pm SD). Η ακτινολογική σταδιοποίηση όλων των ασθενών φαίνεται στον Πίνακα 2.

Ως ομάδα ελέγχου μελετήθηκαν 12 υγιείς μάρτυρες, οι οποίοι ήταν μη καπνιστές, δεν είχαν ιστορικό χρόνιας νόσου ή αλλεργίας, δεν λάμβαναν φάρμακα, δεν ανέφεραν πρόσφατη λοίμωξη αναπνευστικού και είχαν φυσιολογική σπιρομέτρηση.

2.1.2 Αξιολόγηση της δραστηριότητας της νόσου

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δυο ομάδες, με *ενεργό* και *μη ενεργό* νόσο αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε με βάση τους δείκτες δραστηριότητας οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για την εκτίμηση της νόσου σε σαρκοειδικούς ασθενείς (βλ. γενικό μέρος, &2.2, δραστηριότητα και δείκτες δραστηριότητας στη σαρκοείδωση).⁸³

Κλινικοί δείκτες: Σε όλους τους ασθενείς ελήφθη ιστορικό και έγινε κλινική εξέταση, δίνοντας έμφαση σε εμμένουσα ή προοδευτικά επιδεινούμενη

συμπτωματολογία από το αναπνευστικό ή σημειολογία ενδεικτική της υποκείμενης νόσου.

Βιοχημικοί δείκτες: Στον ορό των ασθενών προσδιορίστηκαν το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (sACE), το ασβέστιο και τα ηπατικά ένζυμα. Παθολογικές τιμές κάποιων από τις παραμέτρους αυτές, που δεν μπορούσε να αποδοθεί σε άλλο αίτιο, αποδόθηκε σε δραστηριότητα της υποκείμενης πάθησης.

Δείκτες βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL): Βρογχοσκόπηση και BAL έγινε μόνο στους ασθενείς που διαγνώστηκαν κατά την περίοδο της μελέτης και συμπεριελήφθησαν στην ομάδα των ασθενών ως «νέες περιπτώσεις». Η βρογχοσκόπηση στους ασθενείς αυτούς είχε και διαγνωστικό χαρακτήρα (διαβρογχική βιοψία πνεύμονα) και έγινε μετά τη συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα, προκειμένου να μην επηρεασθούν οι μετρήσεις σ' αυτό. Το BAL πραγματοποιήθηκε μετά από ενσφήνωση του βρογχοσκοπίου σε κάποιον υποτμηματικό βρόγχο του μέσου λοβού (δεξιά) ή της γλωσσίδας (αριστερά), διαδοχικές εγχύσεις και στη συνέχεια αναρροφήσεις (4 x60 ml) φυσιολογικού ορού. Τα δείγματα σε όλες τις περιπτώσεις εξετάστηκαν από τον ίδιο κυτταρολόγο. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν το ποσοστό των λεμφοκυττάρων και ο λόγος των CD4/CD8 λεμφοκυττάρων. Λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα (> 18% λεμφοκύτταρα στο BALF) και/ ή CD4/CD8 >3.5 θεωρήθηκαν δείκτες ενεργού σαρκοείδωσης.

Ακτινολογικοί δείκτες: Ακτινογραφία θώρακα και αξονική τομογραφία (CT) θώρακα με τομές υψηλής ευκρίνειας (HRCT) έγιναν σε όλους τους ασθενείς εκτός από έναν. Ο ασθενής αυτός αρνήθηκε να υποβληθεί σε οποιονδήποτε ακτινολογικό έλεγχο, αλλά δεν αποκλείστηκε από την μελέτη διότι κατηγοριοποιήθηκε στην ομάδα της ενεργού σαρκοείδωσης με βάση τους υπόλοιπους δείκτες δραστηριότητας. Οι ακτινογραφίες θώρακα και οι αξονικές τομογραφίες αξιολογήθηκαν από τον ίδιο έμπειρο ακτινολόγο. Στις «παλαιές περιπτώσεις» ασθενών έγινε σύγκριση με τον προηγούμενο ακτινολογικό έλεγχο προκειμένου να διαπιστωθεί κάποια μεταβολή της ακτινολογικής εικόνας. Προοδευτική επιδείνωση στην ακτινογραφία θώρακα σε διάστημα παρακολούθησης τριών μηνών θεωρήθηκε ως ένδειξη ενεργού νόσου. Εικόνα θολής υάλου στην HRCT θεωρήθηκε επίσης σημείο

ενεργότητας. Η παρακολούθηση με HRCT στις παλαιές περιπτώσεις έγινε σε ετήσια βάση. Έτσι η HRCT χρησιμοποιήθηκε κυρίως για να αποκλείσει παρά για να επιβεβαιώσει ενεργό νόσο. Κι αυτό γιατί οποιαδήποτε μεταβολή της μέσα στη διάρκεια μιας ετήσιας παρακολούθησης θα ήταν αβέβαιης σημασίας ως προς την δραστηριότητα της νόσου κατά την τελευταία αξιολόγηση, ειδικά όταν η δραστηριότητα αυτή δεν επιβεβαιωνόταν από άλλους δείκτες. Τέτοιες αμφιβόλου δραστηριότητας περιπτώσεις δεν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Λειτουργικοί δείκτες: Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε λειτουργικό έλεγχο του αναπνευστικού. Οι λειτουργικοί δείκτες που αξιολογήθηκαν ήταν ο δυναμικά εκπνεόμενος όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV_1) και η δυναμική ζωτική χωρητικότητα (FVC) με τη σπιρομέτρηση, η ολική χωρητικότητα του πνεύμονα (TLC) με πληθυσμογραφία, καθώς και η διαχυτική ικανότητα του πνεύμονα για το μονοξείδιο του άνθρακα ($TLCO$) με την τεχνική single-breath. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα SensorMedics Vmax22, Yorba Linda, CA. Στις παλαιές περιπτώσεις τα αποτελέσματα των λειτουργικών δοκιμασιών συγκρίθηκαν με εκείνα του προηγούμενου έλεγχου προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή επιδείνωση. Μείωση στις τιμές δυο διαδοχικών μετρήσεων ($\geq 10\%$ ή ≥ 200 ml για τους πνευμονικούς όγκους, $\geq 15\%$ ή ≥ 3 ml/min/mmHg για την $TLCO$), σε διάστημα τριών μηνών, θεωρήθηκε ως δείκτης ενεργότητας.

Οι ασθενείς που είχαν ένα τουλάχιστον δείκτη συμβατό με ενεργό νόσο ταξινομήθηκαν στην ομάδα της ενεργού σαρκοείδωσης. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς, με αρνητική κλινική εξέταση, φυσιολογικούς βιοχημικούς δείκτες, σταθερή ακτινογραφία θώρακα κατά τους τελευταίους τρεις μήνες, σταθερή HRCT κατά το τελευταίο έτος χωρίς περιοχές θολής υάλου και σταθερές τιμές λειτουργικών δοκιμασιών κατά το τελευταίο τρίμηνο, ταξινομήθηκαν στην ομάδα της μη ενεργού σαρκοείδωσης.

2.1.3 Συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα

Το σύστημα συλλογής που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Ως μέθοδος ψύξεως του σωλήνα συλλογής χρησιμοποιήθηκε η συσκευή πρόκλησης με ψυχρό αέρα (RHES, model 6V3, Jaeger, Wuerzburg, Germany). Είναι η συσκευή που χρησιμοποιείται στη διάγνωση του βρογχικής υπεραντιδραστικότητας, σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο η συσκευή λειτουργεί ως μέσο παραγωγής ψυχρού

αέρα (-13 έως -16°C) ο οποίος εξέρχεται από σωληνίσκο με ροή 80 λίτρα/λεπτό.

Ως σωλήνας συλλογής του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιείται ένας γυάλινος σωλήνας διπλού αυλού, μήκους περίπου 30 cm. Ο ένας αυλός (εσωτερικός) βρίσκεται μέσα στον άλλο (εξωτερικός), χωρίς επικοινωνία μεταξύ τους. Ο εξωτερικός αυλός (που λειτουργεί ως σωλήνας ψύξεως) συνδέεται στο ένα άκρο του με τον σωληνίσκο ροής ψυχρού αέρα, με σκοπό την ψύξη του τοιχώματος του εσωτερικού αυλού: καθώς ο ψυχρός αέρας διατρέχει τον εξωτερικό αυλό ψύχει το τοίχωμα του εσωτερικού αυλού με το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή.

Ο εσωτερικός αυλός (που είναι ουσιαστικά ο σωλήνας σχηματισμού και συλλογής του συμπυκνώματος) συνδέεται στο ένα άκρο του με μία βαλβίδα δυο κατευθύνσεων (τύπου Hans-Rudolph) που έχει σκοπό να διακρίνει την εισπνοή από την εκπνοή. Οι εξεταζόμενοι φορούν ρινικό κλιπ και αναπνέουν από ένα επιστόμιο μέσω της βαλβίδας αυτής. Ο εισπνεόμενος αέρας εισέρχεται στον εξεταζόμενο από την βαλβίδα εισπνοής (άνοιγμα της βαλβίδας εισπνοής - κλείσιμο της βαλβίδας εκπνοής), ενώ ο εκπνεόμενος αέρας βγαίνει από την βαλβίδα εκπνοής (κλείσιμο της βαλβίδας εισπνοής - άνοιγμα της βαλβίδας εκπνοής). Η βαλβίδα εκπνοής που είναι συνδεδεμένη με τον εσωτερικό αυλό του σωλήνα συλλογής, οδηγεί τον εκπνεόμενο αέρα στον αυλό αυτό προς τα έξω. Καθώς ο εκπνεόμενος αέρας έρχεται σε επαφή με το ψυχρό τοίχωμα του αυλού υφίσταται υγραποίηση λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας και σχηματίζει σταγονίδια που συγκεντρώνονται πάνω στο τοίχωμα του αυλού (συμπύκνωμα). Το συμπύκνωμα αυτό συλλέγεται τελικά στο άλλο άκρο του εσωτερικού αυλού.

Η διαδικασία συλλογής γινόταν πάντα πρωινές ώρες, αφού είχαν προηγηθεί στοματοφαρυγγικές πλύσεις με αποσταγμένο νερό. Οι εξεταζόμενοι ήταν σε καθιστική θέση και ανέπνεαν όπως περιγράφηκε παραπάνω, με σταθερή και ήρεμη αναπνοή (tidal breathing), για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Σε όλες τις περιπτώσεις συλλέχθηκε τουλάχιστο 1 ml συμπυκνώματος σε πλαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 2 ml, που στη συνέχεια διατηρήθηκε στους -70 °C για την μετέπειτα επεξεργασία. Οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων έγιναν σε διάστημα όχι μεγαλύτερο των τριών εβδομάδων από την ημέρα συλλογής.

2.1.4 Ανάλυση των δειγμάτων

α. Ανίχνευση αμυλάσης

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία σιέλου με την μέθοδο ανίχνευσης της αμυλάσης. Η ανίχνευση αμυλάσης έγινε με φασματοφωτομετρική μέθοδο (model 981362 KONE Instr. Espoo, Finland). Με αυτή τη μέθοδο, η αμυλάση του δείγματος και το ένζυμο α-γλυκοσιδάση υδρολύουν το υπόστρωμα p-νιτροφαινυλο-α-D-μαλτοεπταοσίδη σε γλυκόζη και p-νιτροφαινόλη. Ο σχηματισμός της p-νιτροφαινόλης παρακολουθείται στα 405 nm (37°C) για 2 λεπτά. Σε δύο δείγματα έγινε έγχυση σιέλου με σκοπό να ελεγχθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε δεν ανεβρέθηκε αμυλάση σε κανένα από τα δείγματα της μελέτης. Στα δείγματα που έγινε έγχυση σιέλου ανιχνεύθηκε αμυλάση >5000 IU/ml.

β. Μέτρηση H₂O₂

Για την μέτρηση του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική μέθοδος των Gallati και Pracht.¹³¹ Περιληπτικά 250 μl διαλύματος 420 μM 3',3,5,5' τετραμεθυλβενζιδίνης (διαλυμένης σε 0,42 M ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών, pH 3.8) και 10 μl διαλύματος 52,5 U/ml υπεροξειδάσης horseradish (HRP, Sigma Chemicals, St Louis, USA) αναμίχθηκαν με 250 μl δείγματος συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα και επωάσθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αυτό οξινίσθηκε σε pH 1 με 10 μl διαλύματος θειικού οξέος 18 N και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Uvicon 940, Kontron Instr.). Η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική συγκέντρωση του H₂O₂ στο συμπύκνωμα. Η μέθοδος έχει όριο ανίχνευσης τα 0.1 μmol/L.

γ. Μέτρηση 8-ισοπροστανίου

Η μέτρηση του 8-ισοπροστανίου έγινε με ανταγωνιστική ανοσοενζυμική μέθοδο (competitive enzyme immunoassay) με τη βοήθεια ενός ειδικού kit (EIA KIT Cayman Cat No: 516351, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA). Η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του 8-ισοπροστανίου του δείγματος και 8-ισοπροστανίου σημασμένου με ακετυλοχοληνεστεράση, για ορισμένο αριθμό θέσεων ειδικού αντιορού για 8-ισοπροστανίου από

κουνέλι. Τα συμπλέγματα αντιορού – 8-ισοπροστανίου (σημασμένου ή ελεύθερου) συνδέονται με μονοκλωνικό αντίσωμα που ευρίσκεται στη στερεά φάση. Η ποσότητα του σημασμένου συνδεδεμένου 8-ισοπροστανίου ποσοτικοποιείται χρωματομετρικά (405 nm) μετά από προσθήκη υποστρώματος για την ακετυλοχοληνεστεράση (Ellman's Reagent). Η απορρόφηση που εμφανίζουν τα δείγματα είναι ευθέως ανάλογη του σημασμένου 8-ισοπροστανίου και αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του 8-ισοπροστανίου του δείγματος (ελεύθερου). Οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται με τη χρήση προτύπου καμπύλης 8 σημείων και συγκεκριμένα συγκεντρώσεων 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 και 3.9 pg/ml. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι τα 4 pg/ml.

δ. Επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου ελέγχθηκε σε δείγματα 5 ασθενών και 5 φυσιολογικών που επιλέχθηκαν τυχαία. Τα δείγματα ελήφθησαν σε 2 διαδοχικές ημέρες και η επαναληψιμότητα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο των Bland & Altman, όπως περιγράφηκε προηγουμένα στην βιβλιογραφία.¹⁸⁶

ε. Σταθερότητα των δειγμάτων.

Για τον έλεγχο σταθερότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα (5 ασθενείς). Στα παραπάνω άτομα ελήφθησαν 4 ml δείγματος. Αυτή η ποσότητα χωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη και οι μετρήσεις του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου έγιναν σε χρονικό διάστημα 2 ημερών, 1 εβδομάδας, 2 εβδομάδων και 3 εβδομάδων, που αποτελεί και το μέγιστο χρόνο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα δείγματα. Η σταθερότητα των δειγμάτων εκτιμήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένα στην βιβλιογραφία.¹¹⁷

2.1.5 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές που αφορούσαν τα χαρακτηριστικά των ατόμων εκφράστηκαν ως μέση τιμή (\pm SD). Οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στις ομάδες ασθενών και φυσιολογικών εκφράστηκαν ως μέση τιμή με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals - CI). Όλες οι τιμές εξετάστηκαν για κανονική κατανομή με το Kolmogorov-Smirnov test. Για παραμέτρους με κανονική κατανομή (όπως ήταν τα επίπεδα H_2O_2 και 8-ισοπροστανίου στις ομάδες φυσιολογικών και ασθενών), χρησιμοποιήθηκε το unpaired t-test για στατιστική σύγκριση. Η

σύγκριση των υποομάδων (φυσιολογικοί, ανενεργός νόσος, ενεργός νόσος), καθώς και των διαφόρων ακτινολογικών σταδίων της νόσου, ως προς τους παραπάνω δείκτες οξειδωτικού stress, έγινε με one-way analysis of variance (ANOVA), με ανάλογο διορθωτικό post hoc test (Bonferroni) για τις πολλαπλές συγκρίσεις. Το Pearson's correlation coefficient χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της στατιστικής συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων με κανονική κατανομή, ενώ για παραμέτρους με μη κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Spearman's correlation coefficient. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλες οι νέες περιπτώσεις (7 ασθενείς) κατατάχθηκαν στην ομάδα της ενεργού σαρκοείδωσης. Η συμπτωματολογία και σημειολογία τους περιελάμβανε ξηρό βήχα, δύσπνοια στην κόπωση, αρθραλγίες, οζώδες ερύθημα, ενώ τρεις από αυτούς ήταν ασυμπτωματικοί. Τα επίπεδα του sACE ήταν αυξημένα σε όλους εκτός από έναν. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε ευρήματα εξωπνευμονικής νόσου εκτός από δυο περιπτώσεις που παρουσίαζαν αυξημένα ηπατικά ένζυμα. Όλοι παρουσίαζαν λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα στο BALF και ακτινολογικά ευρήματα (ακτινογραφία θώρακα/ HRCT) συμβατά με σαρκοείδωση.

Από τις παλαιές περιπτώσεις (23 ασθενείς), οι 5 παρουσίαζαν ξηρό βήχα και δύσπνοια στην κόπωση. Πέντε ασθενείς είχαν επιδείνωση στην ακτινογραφία θώρακα ή νέες περιοχές με εικόνα θολής υάλου στην HRCT. Ένας από αυτούς παρουσίασε επίσης επιδείνωση των λειτουργικών δοκιμασιών. Οι υπόλοιποι ασθενείς παρουσίαζαν λειτουργική και ακτινολογική σταθερότητα. Σε έναν ασθενή, που κατηγοριοποιήθηκε στην ενεργό νόσο, το μόνο εύρημα ενεργότητας ήταν η αύξηση του sACE, που σε προηγούμενη μέτρηση ήταν φυσιολογικό. Ένα μήνα μετά, ο ασθενής αυτός εισήχθη με πλήρη υποτροπή της νόσου.

Σε ένα φυσιολογικό και δύο ασθενείς από την ομάδα της ανενεργού νόσου, οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 στο συμπύκνωμα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και εκτιμήθηκαν ως μηδενικές.

Τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών με σαρκοείδωση σε σχέση με

τους φυσιολογικούς (0.26 μM , με 95%CI 0.21 – 0.31 vs. 0.17 μM , με 95%CI 0.12 – 0.21, $p= 0.03$, Εικόνα 10).

Από τη σύγκριση των υποομάδων βρέθηκε ότι τα επίπεδα του H_2O_2 ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ενεργό σαρκοείδωση (0.30 μM , με 95%CI 0.22 – 0.37, $p= 0.04$). Οι ασθενείς με ανενεργό σαρκοείδωση δεν διέφεραν σημαντικά από τους φυσιολογικούς, αν και είχαν υψηλότερα επίπεδα H_2O_2 (0.23 μM , με 95%CI 0.15 – 0.31, $p> 0.05$). Τα επίπεδα του H_2O_2 στην ανενεργό νόσο ήταν χαμηλότερα σε σχέση με την ενεργό, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p> 0.05$). Οι ασθενείς με ενεργό νόσο διέφεραν σημαντικά από τους φυσιολογικούς ($p< 0.05$, Εικόνα 11).

Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς (64.23 pg/ml , με 95%CI 37 – 91.46 vs. 20.75 pg/ml , με 95%CI 16.06 – 25.44, $p= 0.04$, Εικόνα 12).

Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στους ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση (111.4 pg/ml , με 95%CI 62.56 – 160.30) ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ανενεργό νόσο (22.94 pg/ml , με 95%CI 15.89 – 29.99) και τους φυσιολογικούς ($p= 0.001$). Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ανενεργό σαρκοείδωση και των φυσιολογικών ($p> 0.05$, Εικόνα 13).

Στους ασθενείς με σαρκοείδωση τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα έδειξαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του sACE ($p< 0.0001$, $r= 0.69$, Εικόνα 14, Πίνακας 3).

Καμία άλλη συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ του H_2O_2 ή του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα με τις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα, τα επίπεδα του sACE ή του ασβεστίου στον ορό (Πίνακας 3).

Τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου δεν διέφεραν μεταξύ των ασθενών διαφορετικού ακτινολογικού σταδίου ($p= 0.13$ και $p= 0.21$ αντίστοιχα).

Στους ασθενείς που πραγματοποιήθηκε βρογχοσκόπηση και BAL (7 νέες περιπτώσεις), τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου δεν συσχετίστηκαν με τον αριθμό των κυττάρων στο BALF ($p= 0.2 – 0.4$, $r= -0.56 – 0.57$ και $p= 0.4 – 0.9$, $r= -0.18 – 0.37$ αντίστοιχα).

Τέλος, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του H_2O_2 και των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου, στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στους ασθενείς με σαρκοείδωση ($p= 0.48$, $r= -0.13$).

Διαδοχικές μετρήσεις σε δυο συνεχόμενες ημέρες έδειξαν μέση διακύμανση $0.002 \mu M$ (SD, $0.05 \mu M$) για το H_2O_2 ($p= 1$) και 0.6 pg/ml (SD, 2.3 pg/ml) για το 8-ισοπροστανίο ($p= 0.85$).

3. ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (IPF)

3.1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1.1 Ομάδα ασθενών και ομάδα ελέγχου

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (control) συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Μελετήθηκαν 16 ασθενείς με IPF και 15 φυσιολογικά άτομα, που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου.

Όλοι οι ασθενείς ήταν νέες περιπτώσεις. Κανένας από αυτούς δεν είχε ιστορικό επαγγελματικής έκθεσης ή λήψης φαρμάκων με τοξική επίδραση στους πνεύμονες, δεν ελάμβαναν φάρμακα, δεν ήταν καπνιστές και δεν έπασχαν από κάποιο άλλο χρόνια νόσημα. Επίσης, κανένας δεν ανέφερε λοίμωξη αναπνευστικού κατά τις τελευταίες 6 εβδομάδες πριν τη μελέτη.

Έντεκα ασθενείς είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη νόσο. Οι υπόλοιποι 5 δεν υποβλήθηκαν σε βιοψία πνεύμονα είτε λόγω της προχωρημένης ηλικίας ή της κακής γενικής τους κατάστασης, ως συνέπεια της υποκείμενης νόσου.

Όλοι όμως πληρούσαν τα μείζονα και ελάσσονα διαγνωστικά κριτήρια για την IPF.⁹³ Αποκλείστηκαν ασθενείς με διαγνωσμένη νόσο που ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή για IPF, καθώς και όσοι είχαν ήδη αναπτύξει πνευμονική υπέρταση. Σε όλες τις περιπτώσεις αποκλείστηκαν νοσήματα του κολλαγόνου με κλινικά και ανοσολογικά κριτήρια.

Τα φυσιολογικά άτομα (control) δεν είχαν ιστορικό αλλεργίας ή άλλου χρόνιου νοσήματος, δεν ήταν καπνιστές, δεν ελάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή σε χρόνια βάση, δεν ανέφεραν λοίμωξη αναπνευστικού κατά τις τελευταίες 6 εβδομάδες πριν τη μελέτη και είχαν φυσιολογική σπιρομέτρηση.

3.1.2 Αξιολόγηση της νόσου

Η βαρύτητα και η έκταση της νόσου αξιολογήθηκε με τους συνήθεις κλινικοεργαστηριακούς δείκτες για την IPF:⁹³

Κλινική αξιολόγηση. Σε όλους τους ασθενείς ελήφθη ιστορικό και έγινε κλινική εξέταση, δίνοντας έμφαση σε συμπτώματα ή σημεία ενδεικτικά της υποκείμενης νόσου. Το επίπεδο δύσπνοιας αξιολογήθηκε με βάση την τροποποιημένη κλίμακα MRC (Medical Research Council, 0 έως 4).¹¹⁷

Λειτουργικός έλεγχος του αναπνευστικού. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε λειτουργικό έλεγχο του αναπνευστικού. Οι λειτουργικοί δείκτες που αξιολογήθηκαν ήταν ο δυναμικά εκπνεόμενος όγκος στο πρώτο

δευτερόλεπτο (FEV₁) και η δυναμική ζωτική χωρητικότητα (FVC) με τη σπυρομέτρηση, η ολική χωρητικότητα του πνεύμονα (TLC) με πληθυσμογραφία, καθώς και η διαχυτική ικανότητα του πνεύμονα για το μονοξείδιο του άνθρακα (TLco) με την τεχνική single-breath. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα SensorMedics Vmax22, Yorba Linda, CA.

Ακτινολογικός έλεγχος. Ακτινογραφία θώρακα και αξονική τομογραφία (CT) θώρακα με τομές υψηλής ευκρίνειας (HRCT) έγιναν σε όλους τους ασθενείς. Τα ακτινολογικά films αξιολογήθηκαν από τον ίδιο έμπειρο ακτινολόγο, ο οποίος αποφάνθηκε για την ύπαρξη ή όχι ακτινολογικών ευρημάτων συμβατών με IPF.

Βρογχοσκόπηση και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL). Βρογχοσκόπηση και BAL έγινε σε όλους τους ασθενείς, μετά τη συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα. Το BAL πραγματοποιήθηκε μετά από ενσφήνωση του βρογχοσκοπίου σε κάποιον υποτομηματικό βρόγχο του μέσου λοβού (δεξιά) ή της γλωσσίδας (αριστερά), διαδοχικές εγχύσεις και στη συνέχεια αναρροφήσεις (4 x60 ml) φυσιολογικού ορού. Τα δείγματα σε όλες τις περιπτώσεις εξετάστηκαν από τον ίδιο κυτταρολόγο. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν ο ολικός αριθμός και το ποσοστό των κυττάρων στο BALF.

3.1.3 Συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα

Η συλλογή του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα έγινε με τη μέθοδο που ήδη έχει περιγραφεί.

3.1.4 Ανάλυση των δειγμάτων

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία σιέλου με την μέθοδο ανίχνευσης της αμυλάσης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Δεν ανεβρέθηκε αμυλάση σε κανένα από τα δείγματα της μελέτης.

Για την μέτρηση του H₂O₂ χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική μέθοδος που ήδη έχει περιγραφεί.

Για την μέτρηση του 8-ισοπραστανίου χρησιμοποιήθηκε η ενζυμο-ανοσομετρική μέθοδος (EIA), που ήδη έχει περιγραφεί.

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων και η σταθερότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε όπως προηγουμένως (βλ. Σαρκοείδωση – Υλικό και Μέθοδος).

3.1.5 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές που αφορούσαν τα χαρακτηριστικά των ατόμων εκφράστηκαν ως μέση τιμή (\pm SD). Οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στις ομάδες ασθενών και φυσιολογικών εκφράστηκαν ως μέση τιμή με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals - CI). Όλες οι τιμές εξετάστηκαν για κανονική κατανομή με το Kolmogorov-Smirnov test. Για παραμέτρους με κανονική κατανομή (όπως ήταν τα επίπεδα H_2O_2 και 8-ισοπροστανίου στις ομάδες φυσιολογικών και ασθενών), χρησιμοποιήθηκε το unpaired t-test για στατιστική σύγκριση. Το Pearson's correlation coefficient χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της στατιστικής συσχέτισης μεταξύ των δεικτών οξειδωτικού stress (H_2O_2 , 8-ισοπροστανίου) και των λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα, του pO_2 στην ηρεμία, του ποσοστού των κυττάρων στο BALF, καθώς και της συσχέτισης μεταξύ των H_2O_2 και 8-ισοπροστανίου στους ασθενείς με IPF. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν ξηρό βήχα και δύσπνοια στην κόπωση 2/4-3/4 της κλίμακας MRC. Από τη φυσική εξέταση παρουσίαζαν τους χαρακτηριστικούς λεπτούς τελοεισπνευστικούς μη μουσικούς ρόγχους της πνευμονικής ίνωσης, με εντόπιση κυρίως στις βάσεις του πνεύμονα αμφοτερόπλευρα. Δέκα ασθενείς είχαν πληκτροδακτυλία.

Τα ευρήματα από την ακτινογραφία θώρακα και την HRCT ήταν συμβατά με IPF σε όλες τις περιπτώσεις.

Τα αποτελέσματα των λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα, του pO_2 και των κυττάρων στο BALF συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Σε τέσσερις φυσιολογικούς οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 στο συμπύκνωμα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και εκτιμήθηκαν ως μηδενικές.

Η μέση (95% CI) συγκέντρωση του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα της IPF σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0.36, 0.24 - 0.47 μ M vs. 0.16, 0.10 - 0.23 μ M, $p = 0.003$, Εικόνα 15).

Η μέση (95% CI) συγκέντρωση του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα της IPF σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (74, 38 - 110 pg/ml vs. 33, 28 - 39 pg/ml, $p = 0.02$, Εικόνα 16).

Η συσχέτιση των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα με τις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα και τους κυτταρικούς πληθυσμούς στο BALF, στους ασθενείς με IPF, συνοψίζονται στους Πίνακες 5 και 6.

Βρέθηκε αρνητική συσχέτιση, στατιστικά σημαντική, μεταξύ της συγκέντρωσης του H_2O_2 στο συμπύκνωμα και της TLco ($p= 0.03$, $r= -0.58$, Πίνακας 5, Εικόνα 17).

Δεν βρέθηκε καμία άλλη συσχέτιση μεταξύ δεικτών οξειδωτικού stress και λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα ή του pO_2 (Πίνακας 5).

Επίσης, τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου δεν βρέθηκε να σχετίζονται με τα επίπεδα των κυτταρικών πληθυσμών στο BALF (Πίνακας 6). Στους ασθενείς με IPF, τα επίπεδα του H_2O_2 δεν βρέθηκε να σχετίζονται με τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ($p= 0.24$, $r= -0.32$).

Διαδοχικές μετρήσεις σε δυο συνεχόμενες ημέρες έδειξαν μέση διακύμανση $0.02 \mu M$ (SD, $0.06 \mu M$) για το H_2O_2 ($p= 0.35$) και 2.8 pg/ml (SD, 6.8 pg/ml) για το 8-ισοπροστανίο ($p= 0.23$).

Τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν σημαντικά νεότερα από τους ασθενείς με IPF ($p= 0.001$). Παρόλα αυτά, τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα, στην ομάδα ελέγχου, δεν βρέθηκε να σχετίζονται με την ηλικία ($p= 0.45$, $r= 0.20$ και $p= 0.43$, $r= -0.21$, αντίστοιχα).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε διάμεσες πνευμονοπάθειες.

Επιλέχθηκαν τα πλέον αντιπροσωπευτικά ιδιοπαθή νοσήματα αυτής της κατηγορίας, που είναι η σαρκοείδωση και η IPF, και το πιο σημαντικό εύρημα ήταν ότι τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα βρέθηκαν αυξημένα και στις δυο αυτές παθήσεις.

Μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε βιολογικό δείγμα ασθενών με σαρκοείδωση τα επίπεδα του H_2O_2 και βρέθηκε ότι στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, οι ασθενείς είχαν σημαντικά αυξημένο H_2O_2 σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Όταν οι ασθενείς διαχωρίστηκαν στις ομάδες ενεργού και ανενεργού νόσου, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα H_2O_2 στο συμπύκνωμα σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Επίσης είχαν υψηλότερα επίπεδα H_2O_2 από τους ασθενείς με ανενεργό νόσο αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Μεταξύ φυσιολογικών και ασθενών με ανενεργό νόσο δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνες 10, 11). Τα σχετικά αυξημένα επίπεδα H_2O_2 που παρουσίαζαν κάποιοι ασθενείς με ανενεργό σαρκοείδωση, θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντιστοιχούν στη μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που έχει περιγραφεί σε ασθενείς με σαρκοείδωση, ανεξάρτητα από την δραστηριότητα της νόσου.⁹² Τα αυξημένα επίπεδα H_2O_2 θα μπορούσαν επίσης να ερμηνευθούν και ως πρόωμη ένδειξη υποτροπής, αλλά οπωσδήποτε μια τέτοια ερμηνεία είναι υποθετική και χρήζει περαιτέρω τεκμηρίωσης.

Το 8-ισοπροστανίο ήταν επίσης σημαντικά αυξημένο στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Προηγούμενες μελέτες στο BALF ασθενών με σαρκοείδωση, έδειξαν επίσης αύξηση του 8-ισοπροστανίου σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, υποδηλώνοντας κάποια συσχέτιση του οξειδωτικού stress με την παθοφυσιολογία της νόσου.⁹¹ Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου που παρατηρούνται στους ασθενείς με σαρκοείδωση οφειλόταν κυρίως στους ασθενείς με ενεργό νόσο. Όταν η ομάδα των ασθενών διαχωρίστηκε σε ενεργό και ανενεργό νόσο, οι ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση είχαν

σημαντικά υψηλότερα επίπεδα 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα σε σχέση με εκείνους που είχαν ανενεργό σαρκοείδωση και τους φυσιολογικούς. Οι ασθενείς που δεν παρουσίαζαν καμία ένδειξη δραστηριότητας (ανενεργός νόσος) δεν διέφεραν από τους φυσιολογικούς (Εικόνες 12, 13). Φαίνεται επομένως ότι σε αντίθεση με το H_2O_2 , το 8-ισοπροστανίο μπορούσε να διακρίνει την ενεργό από την ανενεργό σαρκοείδωση.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα ήταν ότι στους ασθενείς με σαρκοείδωση, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της νόσου, τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα έδειξαν στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του sACE (Εικόνα 14). Είναι γνωστό ότι το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) παράγεται από τα επιθηλιοειδή κύτταρα των κοκκιωμάτων και τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα επίπεδα του sACE αντικατοπτρίζουν το συνολικό «φορτίο» κοκκιωμάτων στον οργανισμό και αποτελούν έναν έμμεσο δείκτη της συνολικής (σε όλο το σώμα) έκτασης και δραστηριότητας της νόσου.¹⁸⁷ Το 8-ισοπροστανίο, όπως αυτό προσδιορίστηκε στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, αποτελεί δείκτη οξειδωτικού stress κυρίως για το αναπνευστικό σύστημα. Το σύνολο των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν πνευμονική σαρκοείδωση και επομένως ως η κυριότερη «πηγή» του ACE στους ασθενείς αυτούς μπορούν να θεωρηθούν οι πνεύμονες. Θα μπορούσε λοιπόν να υποθέσει κανείς ότι η κοινή προέλευση του ACE και του 8-ισοπροστανίου από τις περιοχές της κοκκιωματώδους φλεγμονής του πνεύμονα μπορεί να εξηγήσει και τη συσχέτιση που έδειξαν οι δύο αυτές ουσίες. Η συσχέτιση του 8-ισοπροστανίου με το sACE θα μπορούσε επίσης να υποδηλώνει μια πιθανή σχέση του 8-ισοπροστανίου με τη σαρκοείδωση σε γονιδιακό επίπεδο, δεδομένου ότι τα επίπεδα του sACE σχετίζονται με τον πολυμορφισμό των γονιδίων του ACE.^{188,189} Προφανώς όμως, μια τέτοια σχέση είναι υποθετική και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η συσχέτιση μεταξύ 8-ισοπροστανίου και sACE να είναι καθαρά «αριθμητική».

Το H_2O_2 και το 8-ισοπροστανίο στο συμπύκνωμα δεν έδειξαν να σχετίζονται με τις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται λογικό, δεδομένου ότι οι δείκτες του οξειδωτικού stress όπως αυτοί προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, αφορούν την παθολογική εξεργασία η οποία συμβαίνει κατά την περίοδο λήψης του

δείγματος, ενώ οι λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα αφορούν γεγονότα που ήδη έχουν συμβεί. Σε ανάλογα συμπεράσματα είχε καταλήξει και παλαιότερη μελέτη που αφορούσε το 8-ισοπροστανίνο στο BALF ασθενών με σαρκοείδωση.⁹¹ Πιθανόν για τον ίδιο λόγο, δεν βρέθηκε να σχετίζονται τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα με το ακτινολογικό στάδιο της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε βρογχοσκόπηση και BAL σε όλους τους ασθενείς παρά μόνο στις νέες περιπτώσεις, για διαγνωστικούς λόγους. Στους λίγους αυτούς ασθενείς (7), τα επίπεδα του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου δεν βρέθηκε να σχετίζονται με τα κύτταρα του BALF. Πιθανότατα, το οξειδωτικό φορτίο στη σαρκοείδωση, όπως αυτό προσδιορίζεται στο συμπύκνωμα, δεν επηρεάζεται μόνο από τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυττάρων του ELF, αλλά και άλλοι παράγοντες φαίνεται να συμμετέχουν (όπως π.χ. η ελλιπής αντιοξειδωτική άμυνα). Το θέμα αυτό σχολιάζεται εκτενέστερα παρακάτω για την IPF, αλλά προφανώς αφορά και τη σαρκοείδωση. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξε και παλαιότερη μελέτη που συνέκρινε τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου με τους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς στο BALF, σε 10 ασθενείς με σαρκοείδωση.⁹¹ Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι πιθανότατα το 8-ισοπροστανίνο να εκφράζει καλύτερα την υποκείμενη παθοφυσιολογική διεργασία και κατ' επέκταση τη δραστηριότητα της νόσου στην σαρκοείδωση, από ότι το H₂O₂. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το 8-ισοπροστανίνο μπορεί να διαχωρίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια, από ότι το H₂O₂, την ενεργό από την ανενεργό σαρκοείδωση και επιπλέον σχετίζεται με έναν τουλάχιστον, ήδη γνωστό, δείκτη δραστηριότητας, το sACE. Το ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα, υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι οι δύο αυτοί δείκτες εκφράζουν διαφορετικές μεταξύ τους όψεις του οξειδωτικού stress. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και στη σαρκοείδωση και στην IPF, αλλά και σε προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με ΧΑΠ.¹¹⁷ Πράγματι, το H₂O₂ είναι ένας ενεργός μεταβολίτης οξυγόνου ενώ το 8-ισοπροστανίνο είναι ένα τελικό προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Θα λέγαμε ότι τα επίπεδα του H₂O₂ εκφράζουν το «αρχικό ερέθισμα» ενώ τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου το «τελικό

αποτέλεσμα». Τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα φαίνεται να είναι το προϊόν της αλληλεπίδρασης πολλαπλών παραγόντων που επηρεάζουν την τοπική οξειδοαναγωγική ισορροπία: αυξημένη παραγωγή ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου και/ ή ελάττωση της τοπικής αντιοξειδωτικής άμυνας (π.χ. μείωση της G6PD στη σαρκοείδωση, μείωση της GSH στην IPF).^{92,102,105} Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι το αποτέλεσμα των αλυσιδωτών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που προκαλούνται στις κυτταρικές μεμβράνες από την επίδραση των ελευθέρων ριζών. Στην μάλλον πολύπλοκη αυτή μεταβολική οδό, το αρχικό οξειδωτικό φορτίο (ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου) δεν έχει σημαντική επίδραση στα επίπεδα των τελικών προϊόντων της όπως το 8-ισοπροστανίνο.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, φαίνεται ότι το 8-ισοπροστανίνο, ως τελικό σταθερό προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης, σχετίζεται καλύτερα με τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής στη σαρκοείδωση (χρόνια λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα και κοκκιωματώδης φλεγμονή) και τις ήπιες γενικά κλινικές εκδηλώσεις που προκαλεί. Το H_2O_2 φαίνεται να εκφράζει περισσότερο τις φλεγμονώδεις εκείνες καταστάσεις όπου η συμμετοχή των κοκκιοκυττάρων (αποκοκκίωση και έκλυση $O_2\bullet^-$ και H_2O_2) είναι περισσότερο χαρακτηριστική, όπως συμβαίνει στην πολυμορφοπυρηνική φλεγμονή της ΧΑΠ ή την ηωσινοφιλική φλεγμονή του άσθματος.^{117,121,190}

Το 8-ισοπροστανίνο στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πολύ καλό δείκτη δραστηριότητας στη σαρκοείδωση. Σε αντίθεση με άλλους δείκτες δραστηριότητας όπου απαιτείται η ανίχνευση κάποιας μεταβολής για να χαρακτηριστεί η νόσος ως ενεργός (π.χ. ακτινογραφία θώρακα, λειτουργικές δοκιμασίες πνεύμονα), ο προσδιορισμός του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα θα μπορούσε να ανιχνεύσει άμεσα τυχόν υποκείμενη δραστηριότητα. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ότι ο δείκτης αυτός αφορά το αναπνευστικό (σε αντίθεση με το sACE που είναι συστηματικός δείκτης). Στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς δεν επανεξετάστηκαν με τη λήψη συμπυκνώματος και επομένως δεν γνωρίζουμε την «συμπεριφορά» του δείκτη αυτού στην πορεία της νόσου. Περαιτέρω μελέτες θα διευκρινίσουν το ζήτημα αυτό.

Ένα άλλο θέμα που δεν έχει απαντηθεί είναι η επίδραση που πιθανόν να έχει η θεραπεία στα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Η πλειοψηφία των ασθενών που μελετήθηκαν δεν λάμβαναν θεραπεία. Εννέα ασθενείς λάμβαναν κορτικοειδή σε χαμηλές δόσεις συντήρησης και ίσως αυτός ήταν ο λόγος που τρεις από αυτούς έδειξαν σημεία ενεργότητας (Πίνακας 1). Τα επίπεδα οξειδωτικού stress στους ασθενείς αυτούς ήταν στα ίδια επίπεδα (ή και υψηλότερα) με τους υπόλοιπους ασθενείς με ενεργό νόσο. Ο αριθμός βέβαια των ασθενών αυτών ήταν πολύ μικρός για να γίνει ξεχωριστή ανάλυση και απαιτούνται άλλες μελέτες για να διευκρινιστεί το θέμα.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η έννοια της δραστηριότητας της νόσου στη σαρκοείδωση. Το σκεπτικό (που επιβεβαιώθηκε εν μέρει στη συνέχεια) ήταν ότι οι ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση πιθανότατα θα είχαν διαφορετικά επίπεδα οξειδωτικού stress από εκείνους που δεν είχαν καμία ένδειξη ενεργού νόσου. Η έννοια της δραστηριότητας, όπως αυτή αναπτύχθηκε στο Γενικό Μέρος, έχει περισσότερο περιγραφικό χαρακτήρα και είναι αρκετά ανακριβής ως προς την βεβαιότητα του χαρακτηρισμού κάποιου ασθενούς ως «ενεργός» ή «ανενεργός». Ένας λόγος γι' αυτήν την ασάφεια είναι η μακριά λίστα δεικτών που κατά καιρούς έχουν προταθεί, οι οποίοι συχνά δεν συμφωνούν μεταξύ τους, αναφέρονται σε διαφορετικό όργανο ή σε διαφορετική «φάση» της σαρκοειδικής φλεγμονής (κυψελιδίτιδα – κοκκίωμα – ίνωση). Ένας άλλος λόγος είναι ότι η δραστηριότητα της νόσου μπορεί να συγχέεται με έννοιες όπως η πρόγνωση, η ανταπόκριση στη θεραπεία ή η ένδειξη για θεραπεία, με τις οποίες δεν έχει καμία σχέση. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν στην ομάδα της ενεργού σαρκοείδωσης αν παρουσίαζαν οποιοδήποτε ένδειξη ενεργότητας και στην ομάδα της ανενεργού σαρκοείδωσης αν όλοι οι δείκτες ήταν αρνητικοί. Αυτή η κατηγοριοποίηση ήταν εμπειρική και οπωσδήποτε δεν αποτελεί «ορισμό» για την δραστηριότητα της νόσου. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνοι που χρησιμοποιούνται ως ρουτίνα στην κλινική μας για τη αξιολόγηση και το follow-up των ασθενών με σαρκοείδωση. Οι δείκτες αυτοί έχουν κλινικό «προσανατολισμό» και αποσκοπούν στην αξιολόγηση της επίδρασης της νόσου στην καθημερινή δραστηριότητα και ποιότητα ζωής του ασθενούς.^{81,191} Αυτή η προσέγγιση έχει κάποιους εγγενείς περιορισμούς. Όταν θέλουμε να

εκτιμήσουμε τη σχέση μεταξύ των δεικτών οξειδωτικού stress στον εκπνεόμενο αέρα και της δραστηριότητας της υποκείμενης φλεγμονώδους διεργασίας στη σαρκοείδωση, μια τέτοια προσέγγιση της ενεργότητας μπορεί να έχει ως επακόλουθο την υποεκτίμησή της. Π.χ. αφού δεν έγινε βρογχοσκόπηση και BAL σε ασθενείς που είχαν διαγνωστεί σε προγενέστερο χρόνο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποιας υποκλινικής λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδας που αν ήταν γνωστή, θα κατηγοριοποιούσε κάποιους ασθενείς της ανενεργούς σαρκοείδωσης στην ενεργό σαρκοείδωση. Στην κλινική πράξη φυσικά, σε έναν ασυμπτωματικό ασθενή, με αρνητικό κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο, δεν πραγματοποιείται βρογχοσκόπηση για να αποκλειστεί η παραπάνω πιθανότητα. Μια τέτοια πληροφορία δεν θα άλλαζε τους θεραπευτικούς χειρισμούς μας, αλλά ούτε και την πρόγνωση του ασθενούς. Έτσι σήμερα, ο καλύτερος τρόπος για την αξιολόγηση της δραστηριότητας στη σαρκοείδωση θεωρείται η «κλινική» δραστηριότητα και αυτή την προσέγγιση ακολουθήσαμε.⁸¹

Στην IPF ο ρόλος του οξειδωτικού stress στην παθοφυσιολογία της νόσου είναι περισσότερο εμφανής από τη σαρκοείδωση και έχει μελετηθεί περισσότερο.^{99,103} Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής ήταν ότι και δύο δείκτες που μελετήθηκαν (H_2O_2 , 8-ισοπροστανίνο) ήταν αυξημένοι στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα στους ασθενείς με IPF σε σχέση με τους φυσιολογικούς (Εικόνες 15, 16). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή χρησιμότητα της συλλογής του συμπυκνώματος στην αξιολόγηση και παρακολούθηση των ασθενών αυτών και ίσως αυτό να είναι και το σημαντικότερο μήνυμα, δεδομένης της ευκολίας της μεθόδου.

Για πρώτη φορά στην IPF, εξετάστηκε η πιθανή σχέση των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα με τους κυτταρικούς πληθυσμούς στο BALF (μια παραδοσιακή αλλά επεμβατική μέθοδο δειγματοληψίας και αξιολόγησης της φλεγμονής από το κατώτερο αναπνευστικό). Δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Παλαιότερη μελέτη είχε εξετάσει τη σχέση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στο BALF με τα κύτταρα στο BALF, σε 9 ασθενείς με IPF, και είχε καταλήξει σε παρόμοια αποτελέσματα.⁹¹ Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και στη σαρκοείδωση όπως έχει ήδη σχολιαστεί. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυττάρων στο ELF (όπως αυτά εκτιμώνται στο

BALF) και η απελευθέρωση από αυτά των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου, δεν δικαιολογούν από μόνα τους τα επίπεδα του οξειδωτικού stress, όπως αυτά προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα. Προφανώς συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες. Έτσι έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα του κυψελιδικού επιθηλίου επίσης απελευθερώνουν ενεργούς μεταβολίτες οξυγόνου.^{41,192} Η μείωση των επιπέδων της GSH στο ELF, όπως έχει παρατηρηθεί στην IPF, μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας της αύξησης του οξειδωτικού φορτίου. Η μείωση της GSH μπορεί να οφείλεται απλά στην «κατανάλωσή» της από τις ελεύθερες ρίζες, αλλά ένα επιπλέον αίτιο είναι και η αναστολή της σύνθεσής της από τα επιθηλιακά κύτταρα.^{102,105}

Στους ασθενείς με IPF, τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα δεν έδειξαν σημαντική συσχέτιση με τις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα. Σε ανάλογα αποτελέσματα είχε καταλήξει και παλαιότερη μελέτη στο BALF ασθενών με IPF.⁹¹ Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και στη σαρκοείδωση, όπως έχει ήδη σχολιαστεί. Αντίθετα, τα επίπεδα του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έδειξαν μια οριακή, αλλά μη στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την TLC και στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την T_{Lco} (Εικόνα 17). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την παραδοχή ότι οι δείκτες του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα εκφράζουν γεγονότα που «συμβαίνουν» κατά το χρόνο συλλογής του δείγματος, ενώ οι λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα εκφράζουν γεγονότα που ήδη έχουν συντελεστεί. Τουλάχιστον αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για το H₂O₂ στην IPF. Φυσικά ένα τέτοιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι τυχαίο, χωρίς κάποια κλινική σημασία. Σε πρόσφατη μελέτη όμως, τα επίπεδα των ολικών υδροϋπεροξειδίων του πλάσματος (δείκτης οξειδωτικού stress) έδειξαν στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την FVC και την T_{Lco} σε ασθενείς με IPF.¹⁹³ Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Φαίνεται ότι καθώς η νόσος εξελίσσεται και η πνευμονική λειτουργία επιδεινώνεται παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του εκπνεόμενου H₂O₂. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε περαιτέρω μείωση της GSH τοπικά (λόγω της ιστικής καταστροφής) ή/ και σε αύξηση της απελευθέρωσης του H₂O₂ (λόγω προσβολής νέων περιοχών του πνεύμονα). Οι Kietzmann et al διατύπωσαν την άποψη ότι οι διαταραχές αερισμού/ αιμάτωσης του πνευμονικού παρεγχύματος μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα του H₂O₂

στον εκπνεόμενο αέρα.¹²⁷ Μια τέτοια προσέγγιση αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον εδώ, δεδομένου ότι οι διαταραχές αερισμού/ αιμάτωσης είναι ένα από τα κύρια αίτια μείωσης της T_{Lco} στην IPF.⁹³ Προφανώς, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτες η αξία του εκπνεόμενου H_2O_2 ως δείκτη βαρύτητας στην IPF. Σε κάθε περίπτωση όμως, το H_2O_2 φαίνεται να εκφράζει καλύτερα την υποκείμενη παθοφυσιολογική διαταραχή στην IPF, σε σχέση με το 8-ισοπροστανίνο. Αυτό ίσως σχετίζεται και με το είδος της φλεγμονής που χαρακτηρίζει την νόσο (πολυμορφοπυρηνική κυψελιδίτιδα). Οι διαφορετική «συμπεριφορά» του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου έχει ήδη σχολιαστεί παραπάνω.

Στην παρούσα μελέτη και ειδικότερα στην περίπτωση της IPF που αρκετοί ασθενείς ήταν ηλικίας 60 – 80 ετών, η εξεύρεση αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών μαρτύρων ήταν προβληματική (χωρίς χρόνια νόσημα ή λήψη φαρμάκων κλπ). Αυτός ήταν ο κύριος λόγος που η ηλικία των ασθενών διάφερε από εκείνη των φυσιολογικών. Αυτό θα μπορούσε δυνητικά να επηρεάσει τα αποτελέσματα των μετρήσεων και στη συνέχεια την συγκριτική αξιολόγηση των δυο ομάδων. Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα των διαφόρων μεσολαβητών, που προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, είναι εν πολλοίς άγνωστη. Οι λίγες μελέτες που έχουν ασχοληθεί με το θέμα δίνουν μάλλον αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Nowak et al βρήκαν στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση μεταξύ H_2O_2 στο συμπύκνωμα και ηλικίας σε φυσιολογικούς μη καπνιστές, αλλά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε φυσιολογικούς καπνιστές.¹²⁰ Οι Jobsis et al βρήκαν ότι τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα ήταν ανεξάρτητα από την ηλικία σε φυσιολογικά παιδιά.¹³⁶ Η σχέση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα και της ηλικίας έχει εξεταστεί σε δύο τουλάχιστον μελέτες, αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση.^{62,140} Στην παρούσα μελέτη, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του H_2O_2 ή του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και της ηλικίας, στην ομάδα των φυσιολογικών. Επομένως είναι αμφίβολη η επίδραση της ηλικίας στα αποτελέσματα της μελέτης.

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα πλεονεκτεί ως μέθοδος έναντι πιο παραδοσιακών μεθόδων δειγματοληψίας του κατώτερου αναπνευστικού (όπως είναι το BAL), στο ότι είναι μια απλή τεχνική, μη επεμβατική, εύκολα

επαναλήψιμη και επιτρέπει τη συλλογή μη αραιωμένου δείγματος σε υγρή φάση, προερχόμενο από τους αεραγωγούς και το πνευμονικό παρέγχυμα.¹¹⁴ Εξ αιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, η τεχνική αυτή αποτελεί σήμερα ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Όπως όμως ήδη έχει αναλυθεί εκτενώς στο Γενικό Μέρος, η μέθοδος δεν έχει εφαρμοστεί στην κλινική πράξη κυρίως επειδή δεν έχει ακόμα τυποποιηθεί και επειδή οι μέθοδοι προσδιορισμού των διαφόρων μεταβολιτών που μετρώνται στο συμπύκνωμα δεν είναι αρκετά ευαίσθητες σε σχέση με τις πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών.^{32,114} Έτσι η τεχνική αυτή παραμένει ακόμα σε πειραματικό επίπεδο, καθώς πολλά μένουν ακόμα να γίνουν για την κλινική της καθιέρωση. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες όταν οι συγκεντρώσεις των βιολογικών δεικτών που προσδιορίζονται σ' αυτό είναι σημαντικά διαφορετικές μεταξύ φυσιολογικών και ασθενών. Στις διάμεσες πνευμονοπάθειες που μελετήθηκαν, ο προσδιορισμός των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα θα μπορούσε να μας δώσει την δυνατότητα παρακολούθησης της νόσου και/ ή ανταπόκρισης στη θεραπεία, με τρόπο εύκολο και οικονομικό. Η υπόθεση αυτή αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπό το πρίσμα πρόσφατων μελετών που ασχολούνται με την εφαρμογή αντιοξειδωτικής θεραπείας στην IPF.^{98,194,195} Ο προσδιορισμός των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα στους ασθενείς αυτούς θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών φαρμάκων.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα είναι σημαντικά αυξημένα στη σαρκοείδωση σε σχέση με τους φυσιολογικούς.
2. Τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, αλλά δεν διαφέρουν μεταξύ των υπολοίπων ομάδων και επομένως δεν μπορούν να βοηθήσουν στη διάκριση μεταξύ ενεργού και ανενεργού σαρκοείδωσης.
3. Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση σε σύγκριση με την ανενεργό σαρκοείδωση και τους φυσιολογικούς. Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου δεν διαφέρουν μεταξύ ασθενών με ανενεργό σαρκοείδωση και φυσιολογικών.
4. Το 8-ισοπροστανίο στους ασθενείς με σαρκοείδωση έδειξε στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση με το sACE, που είναι γνωστός δείκτης δραστηριότητας στη σαρκοείδωση.
5. Τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με IPF σε σχέση με τους φυσιολογικούς.
6. Στους ασθενείς με IPF, τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έδειξαν στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την T_{LCO} , που σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου.
7. Τα επίπεδα του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα δεν έδειξαν καμία συσχέτιση μεταξύ τους, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι οι δύο αυτοί δείκτες εκφράζουν διαφορετικές μεταξύ τους όψεις του οξειδωτικού stress.
8. Τόσο στην σαρκοείδωση όσο και στην IPF, τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυττάρων στο ELF (όπως αυτά εκτιμώνται στο BALF) και η απελευθέρωση από αυτά των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου, δεν δικαιολογούν από μόνα τους τα επίπεδα του οξειδωτικού stress, όπως αυτά προσδιορίζονται στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

Προφανώς και άλλοι παράγοντες συμμετέχουν στην τελική έκφραση του οξειδωτικού stress.

6. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η μέτρηση των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, σε ασθενείς με διάμεσα νοσήματα του πνεύμονα, ενδεχομένως να χρησιμεύσει μελλοντικά στην αξιολόγηση και παρακολούθηση της νόσου, κατά τρόπο μη επεμβατικό και εύκολο.

Ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν προς αυτή την κατεύθυνση είναι η προγνωστική αξία των δεικτών του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα, καθώς και το πώς αυτοί μεταβάλλονται σε σχέση με την εξέλιξη της νόσου ή τους θεραπευτικούς χειρισμούς.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα, αποκτά ιδιαίτερη αξία μετά το πρόσφατο ενδιαφέρον για την εφαρμογή αντιοξειδωτικής θεραπείας σε ασθενείς με IPF.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη του επιπέδου του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα σε διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες.

Σκοπός της μελέτης: Ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου, ως δεικτών οξειδωτικού stress, στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα σε ασθενείς με σαρκοείδωση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF), καθώς και η συσχέτισή τους με κλινικούς δείκτες αξιολόγησης της βαρύτητας και εξέλιξης της κάθε νόσου.

Υλικό και Μέθοδος: Μελετήθηκαν τριάντα ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση και δεκαέξι ασθενείς με IPF και συγκρίθηκαν με αντίστοιχους φυσιολογικούς μάρτυρες. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα σε όλους τους συμμετέχοντες και στη συνέχεια συγκρίθηκαν μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών και φυσιολογικών. Στους ασθενείς με σαρκοείδωση τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα συσχετίστηκαν στη συνέχεια με δείκτες δραστηριότητας της νόσου, όπως οι λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα, το ασβέστιο ορού και το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης στον ορό (sACE). Στους ασθενείς με IPF τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα συσχετίστηκαν με συνήθεις δείκτες βαρύτητας και έκτασης της νόσου, όπως οι λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα, το pO₂ και τα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF).

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με σαρκοείδωση σε σχέση με τους φυσιολογικούς (0.26 μM, 95%CI 0.21-0.31, vs 0.17 μM, 95%CI 0.12-0.21, p= 0.03). Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα βρέθηκαν επίσης σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με σαρκοείδωση (64 pg/ml, 95%CI 37-91 vs 21 pg/ml, 95%CI 16 -25, p= 0.04). Το 8-ισοπροστανίο εξέφραζε καλύτερα την υποκείμενη φλεγμονή στη σαρκοείδωση δεδομένου ότι ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς με ενεργό νόσο, σε σχέση με εκείνους που είχαν ανενεργό νόσο (111 pg/ml, 95%CI 63-160 vs 23 pg/ml, 95%CI 16-30) και τους φυσιολογικούς (p< 0.001), ενώ δεν διέφερε μεταξύ ανενεργού σαρκοείδωσης και φυσιολογικών. Το H₂O₂ ήταν σημαντικά

αυξημένο στην ενεργό νόσο σε σχέση με τους φυσιολογικούς ($p= 0.04$), αλλά δεν μπορούσε να διαχωρίσει την ενεργό από την ανενεργό σαρκοείδωση ($0.30 \mu\text{M}$, 95%CI 0.22-0.37 vs $0.23 \mu\text{M}$, 95%CI 0.15-0.31, $p> 0.05$). Το 8-ισοπροστανίο έδειξε επιπλέον στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση με το sACE, που είναι γνωστός δείκτης δραστηριότητας στη σαρκοείδωση ($p< 0.0001$, $r= 0.69$). Δεν βρέθηκε άλλη σημαντική συσχέτιση των δεικτών οξειδωτικού stress με τους υπόλοιπους δείκτες δραστηριότητας.

Στους ασθενείς με IPF, τα επίπεδα του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ($0.36 \mu\text{M}$, 95%CI 0.24-0.47 vs $0.16 \mu\text{M}$, 95%CI 0.10-0.23, $p= 0.003$). Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου βρέθηκαν επίσης σημαντικά αυξημένα στην IPF (74 pg/ml , 95%CI 38-110 vs 33 pg/ml , 95%CI 28-39, $p= 0.02$). Επιπλέον, τα επίπεδα του H_2O_2 έδειξαν στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την διαχυτική ικανότητα του πνεύμονα για το μονοξείδιο του άνθρακα (T_{LCO}), που σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου στην IPF ($p= 0.03$, $r= -0.58$). Δεν βρέθηκε άλλη σημαντική συσχέτιση των δεικτών οξειδωτικού stress με τους υπόλοιπους δείκτες βαρύτητας στην IPF.

Συμπεράσματα: Τα επίπεδα του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, όπως αυτά εκφράζονται από τις συγκεντρώσεις του H_2O_2 και του 8-ισοπροστανίου, είναι σημαντικά αυξημένα στη σαρκοείδωση και στην IPF. Οι δείκτες αυτοί έδειξαν να συσχετίζονται με την υποκείμενη δραστηριότητα και βαρύτητα της νόσου. Η μέτρηση των επιπέδων του οξειδωτικού stress στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, ενδέχεται να χρησιμεύσει μελλοντικά στην αξιολόγηση και παρακολούθηση ασθενών με διάμεσα νοσήματα του πνεύμονα.

SUMMARY

Evaluation of the levels of oxidative stress in the expired breath condensate, in diffuse parenchymal lung diseases.

Kostas Psathakis, MD

Department of Pneumology, Army General Hospital of Athens

Objectives: The aim of this study was to evaluate the levels of H₂O₂ and 8-isoprostane, as indices of oxidative stress, in the expired breath condensate (EBC) of patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The relation of these biomarkers with known indices of disease severity was further explored.

Materials and Methods: We investigated 30 patients with sarcoidosis and 16 patients with IPF. The levels of H₂O₂ and 8-isoprostane in the EBC were determined in all subjects and were compared among the various groups of patients and the normal controls. In patients with sarcoidosis, the levels of oxidative stress in EBC were correlated with indices of disease activity, such as the pulmonary functions tests (PFTs), the serum Ca and the serum angiotensin converting enzyme (sACE).

In patients with IPF, the levels of oxidative stress in EBC were correlated with common indices of disease severity, such as the PFTs, the pO₂ and the cell count in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Results: The levels of H₂O₂ in EBC were significantly increased in patients with sarcoidosis compared to normal subjects (0.26 μM, 95%CI 0.21-0.31, vs 0.17 μM, 95%CI 0.12-0.21, p= 0.03). The levels of 8-isoprostane in EBC were also significantly increased in patients with sarcoidosis (64 pg/ml, 95%CI 37-91 vs 21 pg/ml, 95%CI 16 -25, p= 0.04). 8-isoprostane correlated better with the underlying inflammation in sarcoidosis, as it was significantly increased in the patients with active disease compared to the patients with inactive sarcoidosis and the normal subjects (111 pg/ml, 95%CI 63-160 vs 23 pg/ml, 95%CI 16-30, p< 0.001). Moreover it did not differ between inactive sarcoidosis and the normal subjects. H₂O₂ was significantly increased in active disease compared to the controls (p= 0.04), but could not discriminate

active from inactive disease (0.30 μM , 95%CI 0.22-0.37 vs 0.23 μM , 95%CI 0.15-0.31, $p > 0.05$). Furthermore, 8-isoprostane showed a significant positive correlation with sACE, a known marker of disease activity in sarcoidosis ($p < 0.0001$, $r = 0.69$). No other correlation was found between the levels of oxidative stress and the rest of the markers of disease activity.

In patients with IPF, the levels of H_2O_2 in EBC were significantly elevated compared to the normal subjects (0.36 μM , 95%CI 0.24-0.47 vs 0.16 μM , 95%CI 0.10-0.23, $p = 0.003$). The levels of 8-isoprostane were also significantly increased in IPF (74 pg/ml, 95%CI 38-110 vs 33 pg/ml, 95%CI 28-39, $p = 0.02$). Moreover, the levels of H_2O_2 showed a significant negative correlation with the diffusing capacity of the lung for CO (T_{LCO}), which is related to the disease severity in IPF ($p = 0.03$, $r = -0.58$). No other correlation was found between the levels of oxidative stress and the rest of the markers of disease severity in IPF.

Conclusions: The levels of oxidative stress in the EBC, as they are determined by the concentrations of H_2O_2 and 8-isoprostane, are significantly increased in patients with sarcoidosis and IPF. These markers were correlated with the severity and activity of the underlying disease. The measurement of the levels of oxidative stress in the EBC may be proved useful in the future for the evaluation and follow-up of patients with interstitial lung diseases.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μανουσάκης ΓΕ. Γενική χημεία βιολογικών επιστημών. Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1983.
2. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
3. Τρακατέλλης Α. Βιοχημεία (Τόμος Α'). Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1984.
4. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(suppl 3c): 14-22.
5. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Antioxidants and oxidants: State of the art. *Am J Med* 1991; 91(suppl 3c): 2-13.
6. Halliwell B, MC J. *Free Radical in Biology and Medicine*. Second Edition, Clarendon Press. Oxford 1982.
7. Foote CS, Clennan EL. Properties and reactions of singlet oxygen. In: Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF. *Active Oxygen in Chemistry*. Black Academic and Professional. London. 1995, pp. 105-141.
8. Ameta SC, Punjabi PB, Chobisa CS, et al. Singlet Molecular Oxygen. *Asian Journal of Chemistry Reviews* 1990; 1(2): 106-124.
9. Briviba K, Klotz LO, Sies H. Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* 1997; 378: 1259-1265.
10. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91(suppl 3c): 31-38.
11. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.
12. Βαλαβανίδης Α. Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί καρκινογένεσης. Εκδόσεις Βήτα Medical Arts, Αθήνα 2003.
13. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(suppl): 715-725.
14. McCord JM, Turrens JF. Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion. *Curr Topics Bioenerg* 1994; 17: 173-195.
15. Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974; 226: 1401-1407.

16. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl 10): 5-12.
17. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, et al. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993; 69: 261–274.
18. Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* 1987; 16: 229-245.
19. Weiss SS. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320: 365-376.
20. Halliwell B. Albumin – an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 569-571.
21. Del Donno M, Verduri A. Oxidants and antioxidants in pulmonary diseases. eRn supplemental issue prepared in occasion of “World Congress on Lung Health and 10th ERS Annual Congress”, Florence 2000, August 30 –September 3.
22. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart diseases and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 1368-1377.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 200: 1-8.
24. McLaren GD, Muir WA, Kellermeyer RW. Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1983; 19: 205-266.
25. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, et al. Mechanisms of hypochlorite (HOCl) injury of target cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 554-562.
26. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J med* 1991; 91(suppl 3c): 23-30.
27. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl 10): 17-24.
28. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ II. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10721-10725.
29. Morrow JD, Roberts LJ II. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharm* 1996; 51: 1–9.

30. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes. Their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: S25–S30.
31. Kharitonov SA, Barnes PJ. State of the Art: Exhaled markers of pulmonary diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693–1722.
32. Rahman I, Kelly F. Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res* 2003; 37: 1253-1266.
33. Crystal RG, West JB. *The lung. Scientific foundations*, New York, Raven Press, 1991.
34. Σιαφάκας Ν. Μηχανισμοί άμυνας και παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος (Τόμος εισηγήσεων συμποσίου). 20^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Ιατρική Εταιρεία Αθηνών, 1994.
35. van der Vliet A, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med* 2000; 109: 398-421.
36. Murray JF. *The normal lung*. 2nd Edition, W.B. Saunders co, Philadelphia, 1986.
37. Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, et al. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 650-658.
38. Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 91(suppl 3c): 39-44.
39. Murderly JL, Samet JM. General environment. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1990; 86: 962-971.
40. Church T, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 11-26.
41. Piotrowski WJ, Marczak J, Dinsdale D, et al. Release of hydrogen peroxide by rat type II pneumocytes in the prolonged culture. *Toxicol in Vitro* 2000; 14: 85-93.
42. Cantin A, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987; 63: 152-157.

43. Horvath I, MacNee W, Kelly FJ, et al. "Haemoxygenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases," summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999. *Eur Respir J* 2001; 18: 420-430.
44. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341–357.
45. Maier KL, Leuschel L, Constabel U. Increased oxidized methionine residues in BAL fluid proteins in acute or chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1992; 5: 651-658.
46. Adcock IM, Brown CR, Kwon OJ, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF- κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1518-1524.
47. MacNee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S58–S65.
48. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants and antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 669-681.
49. Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek A, et al. Association between non-specific bronchial hyperactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leucocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1998; 137: 57-61.
50. Dunn MM, Dunne M, Kamp DW. Polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* induced damage to a human pulmonary epithelial cell line. *J Infect Dis* 1990; 162: 172-177.
51. Jarjour NN, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 131-136.
52. Calhoun WJ, Bush RK. Enhanced reactive oxygen species metabolism of airspace cells and airway inflammation follow antigen challenge in human asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 306-313.
53. Vachier I, Chanez P, Le Doucen C, et al. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J* 1994; 7: 1585-1592.

54. Raible DG, Mohanty JG, Jaffe JS, et al. Hydrogen peroxide release from human eosinophils on fibronectin: scopoletin enhances eosinophil activation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1652-1660.
55. Evans DJ, Lindsay MA, O' Connor BJ, Barnes PJ. Priming of circulating human eosinophils following exposure to allergen challenge. *Eur Respir J* 1996; 9: 703-708.
56. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1998; 158: 1042-1046.
57. Jöbssis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J* 1997; 10: 519-521.
58. Dohlman AW, Black HR, Royal JA. Expired breath condensate is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 955-960.
59. Antzak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, et al. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997; 10: 1235-1241.
60. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1450-1454.
61. Olopade CO, Zakkar M, Swedler WI, Rubinstein I. Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest* 1997; 111: 862-865.
62. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 216-220.
63. Misso NL, Powers KA, Gillon RL, et al. Reduced platelet glutathione peroxidase and selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 838-847.
64. Smith LG, Houston M, Anderson J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1461-1464.
65. Bielory L, Gandhi L. Asthma and vitamin C. *Ann Allergy* 1994; 73: 89-96.

66. Loukides S., Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 991-994.
67. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P; Siafakas NM. Exhaled hydrogen peroxide in steady-state bronchiectasis. *Chest* 2002; 121: 81-87.
68. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2419-2424.
69. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 205-209.
70. Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, et al. Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1247-1251.
71. Lands LC, Grey VL, Grenier C. Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 81-87.
72. Gao L, Broughman JR, Iwamoto T, Tomich JM, Venglarik CJ, Forman HJ. Synthetic chloride channel restores glutathione secretion in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 24-30.
73. Range SP, Dunster C, Knox AJ, Kelly FJ. Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status. *Eur Respir J* 1999; 13: 560-564.
74. Μπούρος Δ, Κλιμαθιανάκη Μ. Εισαγωγή στις διάμεσες παρεγχυματικές πνευμονοπάθειες. Στο βιβλίο: Διάχυτες Διάμεσες Πνευμονοπάθειες – 11^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Αθήνα 2003, σελ. 23-30.
75. Cushley M, Davison A, du Bois RM, et al. (British Thoracic Society and Standards of Care Committee). The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. *Thorax* 1999; 54 (Suppl. 1): 1s-28s.
76. Travis WD, King TE Jr, Bateman ED, et al. American Thoracic Society/ European Respiratory Society international multidisciplinary consensus

- classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277–304.
77. Schwarz MI, King TE Jr. *Interstitial Lung Disease*. BC Decker Inc, 4th Edition, Hamilton – London, 2003.
78. Δαλαβάγκα Γ. Ο διάμεσος ιστός του πνεύμονα. Στο βιβλίο: Διάχυτες Διάμεσες Πνευμονοπάθειες – 11^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Αθήνα 2003, σελ. 47-63.
79. Judson MA, Baughman RP. Sarcoidosis. In: Baughman RP, du Bois RM. *Diffuse lung disease – A practical approach*. Arnold Edition, London, 2004, pp 109-129.
80. Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361: 1111-1118.
81. Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur Respir J* 2001 ; 18 (suppl 32) : 56s-68s.
82. Sharma OP. Sarcoidosis. *Clinics in Chest Medicine* 1997; 18: 755-785.
83. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, et al. American Thoracic Society – statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736–755.
84. Costabel U. Consensus conference: activity of sarcoidosis. *Eur Respir J* 1994; 7: 624-627.
85. Semenzato G. Assessment of disease activity in sarcoidosis: deeds and misdeeds. *Sarcoidosis* 1993; 10: 100-103.
86. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Eng J Med* 1997; 336: 1224–1234.
87. Costabel U, Guzman J, Drent M. Diagnostic approach to sarcoidosis. *Eur Respir Mon* 2005; 32: 259-264.
88. Fels AOS, Nathan CF, Cohn ZA. Hydrogen peroxide release by alveolar macrophages from sarcoid patients and by alveolar macrophages from normals after exposure to recombinant interferons α A, β , and γ and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Clin Invest* 1987; 80: 381–386.
89. Baughman RP, Lower EE, Pierson G, Strohofer S. Spontaneous hydrogen peroxide release from alveolar macrophages of patients with active sarcoidosis: comparison with cigarette smokers. *J Lab Clin Med* 1988; 111: 399–404.

90. Lenz A-G, Costabel U, Maier KL. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 1996; 9: 307–312.
91. Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, et al. 8-isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1524–1527.
92. Verleden GM, du Bois RM, Bouros D, et al. Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin. *Eur Respir J* 2001; 18 (suppl 32): 17s-29s.
93. King TE, Costabel U, Cordier JF, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-664.
94. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136-151.
95. White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/ idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2003; 201: 343-354.
96. du Bois RM, Wells AU. Cryptogenic fibrosing alveolitis/ idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2001 ; 18 (suppl 32): 43s-55s.
97. Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ* 2004; 171: 153-160.
98. Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2229-2242.
99. Mastruzzo C, Crimi N, Vancheri C. Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002; 57: 173-176.
100. Strausz J, Müller-Quernheim J, Stepling H, et al. Oxygen radical production by alveolar inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 124-128.
101. Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 370-372.

102. Rahman I, Skwarska E, Henry M, et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 60-68.
103. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis. A possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 417-422.
104. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1763-1769.
105. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16: 534-554.
106. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
107. Suga M, Lyonaga K, Okamoto T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1949-1956.
108. Lee YCG, Lane KB. The many faces of transforming growth factor- β in pleural diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 173-179.
109. O'Byrne PM, Hargreave FE. Non-invasive monitoring of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: S100-S102.
110. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J* 2002; 20 (Suppl. 37): 51s-55s.
111. Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, Simon RH, Ketai LH, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1: 11-14.
112. Horvath I. Exhaled breath condensate contains more than only volatiles. *Eur Respir J* 2003; 22: 187-188.
113. Scheideler L, Manke H-G, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 778-784.
114. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.

115. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/ nitrate in the expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med* 2001; 95: 649-654.
116. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1364-1370.
117. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest* 2003; 124: 1373-1380.
118. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, et al. 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004; 125: 1005-1011.
119. Kostikas K, Gaga M, Papatheodorou G, Karamanis T, Orphanidou D, Loukides S. Leukotriene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest* 2005; 127: 1553-1559.
120. Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Krol M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 178-186.
121. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 2001; 120: 1136-1139.
122. Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, Nowak D. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir Med* 2000; 94: 416-421.
123. Sandrini A, Ferreira IM, Gutierrez C, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. Effect of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma. *Chest* 2003; 124: 1334-1340.
124. Dekhuijzen PNR, Aben KKH, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813-816.
125. Nowak D, Antczak A, Krol M, et al. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996; 9: 652-657.

126. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur Respir J* 2000; 16: 95-100.
127. Kietzmann D, Kahl R, Muller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993; 19: 78-81.
128. Sandrini A, Ferreira IM, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. Effect of nasal triamcinolone on lower airway inflammatory markers in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 313-320.
129. Lases EC, Durkens VA, Gerritsen WB, Haas FJ. Oxidative stress after lung resection therapy: A pilot study. *Chest* 2000; 117: 999-1003.
130. Luczynska M, Szkudlarek U, Dziankowska-Bartkowiak B, et al. Elevated exhalation of hydrogen peroxide in patients with systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 274-279.
131. Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H₂O₂ and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 453-460.
132. Ruch W, Cooper PH, Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *J. Immunol Methods* 1983; 63: 347-357.
133. Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leucocytes: its use in simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 1984; 141: 280-286.
134. Russell REK, Culpitt SV, Wiggins J, Barnes PJ. A new method for the measurement of hydrogen peroxide in breath condensate. *Eur Respir J* 1998; 12 (Suppl 28): 1660.
135. Culpitt SV, Russell REK. The measurement of hydrogen peroxide in airways disease. *Eur Respir Rev* 1999; 9(Review 68): 246-248.
136. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Hop WCJ, Hermans PWM, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998; 12: 483-485.

137. Montuschi P. Isoprostanes and other exhaled markers in respiratory diseases. *Eur Respir Rev* 1999; 9(Review 68): 249-253.
138. Praticò D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 243-247.
139. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J* 2003; 21: 177-186.
140. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1175-1177.
141. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294-298.
142. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114: 1653-1659.
143. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 205-209.
144. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 2003; 124: 1386-1392.
145. Basu S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F_{2a}: an index for oxidative injury via free radical catalyzed lipid peroxidation. *Prostaglandin Leucot Essent Fatty Acids* 1998; 58: 319-325.
146. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S. Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E₂ measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003; 52: 502-507.
147. Devaraj S, Hirany SV, Burk RF, Jialal I. Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F₂-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clin Chem* 2001; 47 (No 11): 1974-1979.

148. Proudfoot J, Barden A, Mori TA, et al. Measurement of urinary F₂-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation - A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/ mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 272: 209-215.
149. Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 694-699.
150. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002; 57: 926-929.
151. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, et al. Exhaled breath acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003; 97: 1188-1194.
152. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, et al. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 2006; 129: 426-430.
153. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005; 39: 797-815.
154. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 854-858.
155. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1273-1276.
156. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346: 1235-1236.
157. Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, Collins JV, Barnes PJ. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 2002; 57: 889-896.
158. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53: 680-684.

159. Corradi M, Pesci A, Casana R, et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003; 8: 26-30.
160. Csoma Z, Bush A, Wilson NM, et al. Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest* 2003; 124: 633-638.
161. Fozard JR. The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 264-269.
162. Vass G, Huszar E, Barat E, et al. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 850-855.
163. Huszar E, Vass G, Vizi E, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* 2002; 20: 1393-1398.
164. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58: 585-588.
165. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Prostaglandin E₂ in the expired breath condensate of patients with asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 743-747.
166. Wardlaw A, Hay H, Cromwell O, Collins JV, Kay AB. Leukotrienes LTC₄ and LTB₄ in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 19-26.
167. Claesson HE, Odlander B, Jakobssen PJ. Leukotriene B₄ in the immune system. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14: 441-449.
168. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1345-1349.
169. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbation of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294-298.
170. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B₄ and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1109-1112.

171. Schreiber J, Meyer C, Rusch-Gerdes S, et al. Mycobacterium tuberculosis gene-amplification in breath condensate of patients with lung tuberculosis. *Eur J Med Res* 2002; 7: 290-291.
172. Gessner C, Kuhn H, Seyfarth H-J, et al. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 2001; 55: 414-419.
173. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005; 5: 10.
174. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989; 96: 606-612.
175. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway chemistry. *Eur Respir J* 2003; 22: 889-894.
176. Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jorres RA. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J* 2000; 16: 1115-1118.
177. Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 65: 663-669.
178. Effros RM, Biller J, Foss B, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1500-1505.
179. Effros RM, Dunning III MB, Biller J, Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L1073-L1080.
180. Dwyer TM. Sampling airway surface liquid: nonvolatiles in the expired breath condensate. *Lung* 2004; 182: 241-250.
181. Effros RM. Saving the breath condensate approach. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1129-1132.
182. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, et al. Repeatability of sodium and chloride in exhaled breath condensates. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37: 273-275.

183. Van Hoydonck PGA, Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Schouten EG, Dupont LJ, Temme EHM. Quantitative analysis of 8-isoprostane and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2004; 23: 189-192.
184. Rahman I. Reproducibility of oxidative stress biomarkers in breath condensate: are they reliable? *Eur Respir J* 2004; 23: 183-184.
185. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 731-737.
186. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310.
187. Sharma OP. Sarcoidosis. *Clinics in Chest Medicine* 1997; 18: 827-842.
188. Arbustini E, Grasso M, Leo G, et al. Polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 851-854.
189. Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, et al. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 255-259.
190. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P, Siafakas NM. The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation and asthma severity. *Chest* 2002; 121: 338-346.
191. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 1997; 336: 1224-1234.
192. Rochelle LG, Fischer BM, Adler KB. Concurrent production of reactive oxygen and nitrogen species by airway epithelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 863-864.
193. Daniil Z, Papageorgiou E, Koutsokera A, et al. Plasma level of total hydroperoxide (TH) as a marker of oxidative stress seems to be a useful index of disease severity in patients with IPF. P2196. European Respiratory Society Annual Congress, 17-21 September 2005, Copenhagen, Denmark.
194. Hunninghake GW. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2285-2287.

195. Tomioka H, Kuwata Y, Imanaka K, Hashimoto K, Ohnishi H, Tada K, et al. A pilot study of aerosolized N-acetylcysteine for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2005; 10: 449-455.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ (Α: ΠΙΝΑΚΕΣ, Β: ΕΙΚΟΝΕΣ, Γ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ)**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΠΙΝΑΚΕΣ**

Πίνακας 1**Χαρακτηριστικά των ασθενών με σαρκοείδωση και της ομάδας ελέγχου.**

	Ασθενείς (όλοι)	Ενεργός σαρκοείδωση	Μη ενεργός σαρκοείδωση	Ομάδα ελέγχου
Αριθμός ατόμων*	30 (9)	14 (3)	16 (6)	12
Φύλο (Άρρεν/Θήλυ)	10 / 20	6 / 8	4 / 12	5 / 7
Ηλικία (mean \pm SD)	48 \pm 14	43 \pm 15	53 \pm 11	39 \pm 9
<u>Δείκτες δραστηριότητας</u>				
FEV ₁ (% pred)	101 \pm 20	104 \pm 18	99 \pm 21	106 \pm 16
FVC (% pred)	103 \pm 18	105 \pm 16	102 \pm 19	103 \pm 4
TLC (% pred)	103 \pm 15	97 \pm 16	108 \pm 13	ΔΕ
TL _{CO} (% pred)	96 \pm 21	96 \pm 22	97 \pm 19	ΔΕ
sACE (IU/L)	40 \pm 34	64 \pm 38	19 \pm 6	ΔΕ
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	9.4 \pm 0.4	9.4 \pm 0.4	9.3 \pm 4	ΔΕ
<u>% κυττάρων στο BALF</u>				
Μακροφάγα	**	57 \pm 18	ΔΕ	ΔΕ
Λεμφοκύτταρα		43 \pm 18		
Ουδετερόφιλα		0.28 \pm 1		
CD4/CD8		4.9 \pm 4		

* Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αναφέρονται σε ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία με κορτικοειδή.

** Αφορά τους ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση (7) που βρογχοσκοπήθηκαν.

% pred: ποσοστό επί της προβλεπόμενης τιμής, ΔΕ: δεν έγινε.

Πίνακας 2**Ακτινολογικό στάδιο των ασθενών με σαρκοείδωση.**

Στάδιο	0	I	II	III	IV
Ασθενείς (όλοι)	4	6	11	8	1
Ενεργός νόσος	-	4	7	3	-
Ανενεργός νόσος	4	2	4	5	1

Πίνακας 3

Συσχέτιση των επιπέδων του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου με δείκτες δραστηριότητας της νόσου στους ασθενείς με σαρκοείδωση.

	H ₂ O ₂		8-isoprostane	
	p	r	p	r
FEV ₁ (% pred)	0.3	0.16	0.4	0.13
FVC (% pred)	0.4	0.15	0.4	0.13
TLC (% pred)	0.6	-0.08	0.5	-0.13
T _{Lco} (% pred)	0.7	-0.08	0.6	0.11
sACE (IU/L)	0.8	0.04	< 0.0001	0.69
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	0.2	0.23	0.7	-0.05

Με έντονη γραφή περιγράφεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

% pred: ποσοστό επί της προβλεπόμενης τιμής.

Πίνακας 4

Χαρακτηριστικά των ασθενών με IPF και της ομάδας ελέγχου.

	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου
Αριθμός ατόμων	16		15
Φύλο (Άρρεν/Θήλυ)	9 / 7		9 / 6
Ηλικία (mean \pm SD)	67 \pm 7		56 \pm 9
<u>Λειτουργικά tests και pO₂</u>			
	mean \pm SD	range	
FEV ₁ (% pred)	72 \pm 21	106 – 41	97 \pm 8
FVC (% pred)	67 \pm 20	98 – 38	100 \pm 7
TLC (% pred)	60 \pm 17	92 – 35	ΔΕ
T _{Lco} (% pred)	46 \pm 23	100 – 12	ΔΕ
pO ₂ (mm Hg)	75 \pm 12	97 - 53	ΔΕ
<u>Αριθμός (x 10⁶/μl) και % κυττάρων στο BALF</u>			
	mean \pm SD	% mean \pm SD	
Ολικός αριθμός	23.5 \pm 3		ΔΕ
Μακροφάγα	11.6 \pm 3	50 \pm 8	
Ουδετερόφιλα	6 \pm 1	26 \pm 6	
Λεμφοκύτταρα	1.7 \pm 1	7 \pm 5	
Ηωσινόφιλα	3.1 \pm 1	13 \pm 4	
Μαστοκύτταρα	0.9 \pm 0.5	4 \pm 2	

% pred: % του προβλεπόμενου, ΔΕ: δεν έγινε

Πίνακας 5

Συσχέτιση των επιπέδων του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου με τις τιμές των λειτουργικών δοκιμασιών του πνεύμονα και του pO₂ στους ασθενείς με IPF.

	H ₂ O ₂		8-isoprostane	
	p	r	p	r
FEV ₁ (% pred)	0.62	-0.14	0.71	-0.10
FVC (% pred)	0.35	-0.26	0.50	-0.18
TLC (% pred)	0.08	-0.49	0.89	-0.04
T _{Lco} (% pred)	0.03	-0.58	0.49	-0.20
pO ₂	0.88	-0.04	0.51	0.18

Η έντονη γραφή αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντική συσχέτιση

% pred: % του προβλεπόμενου

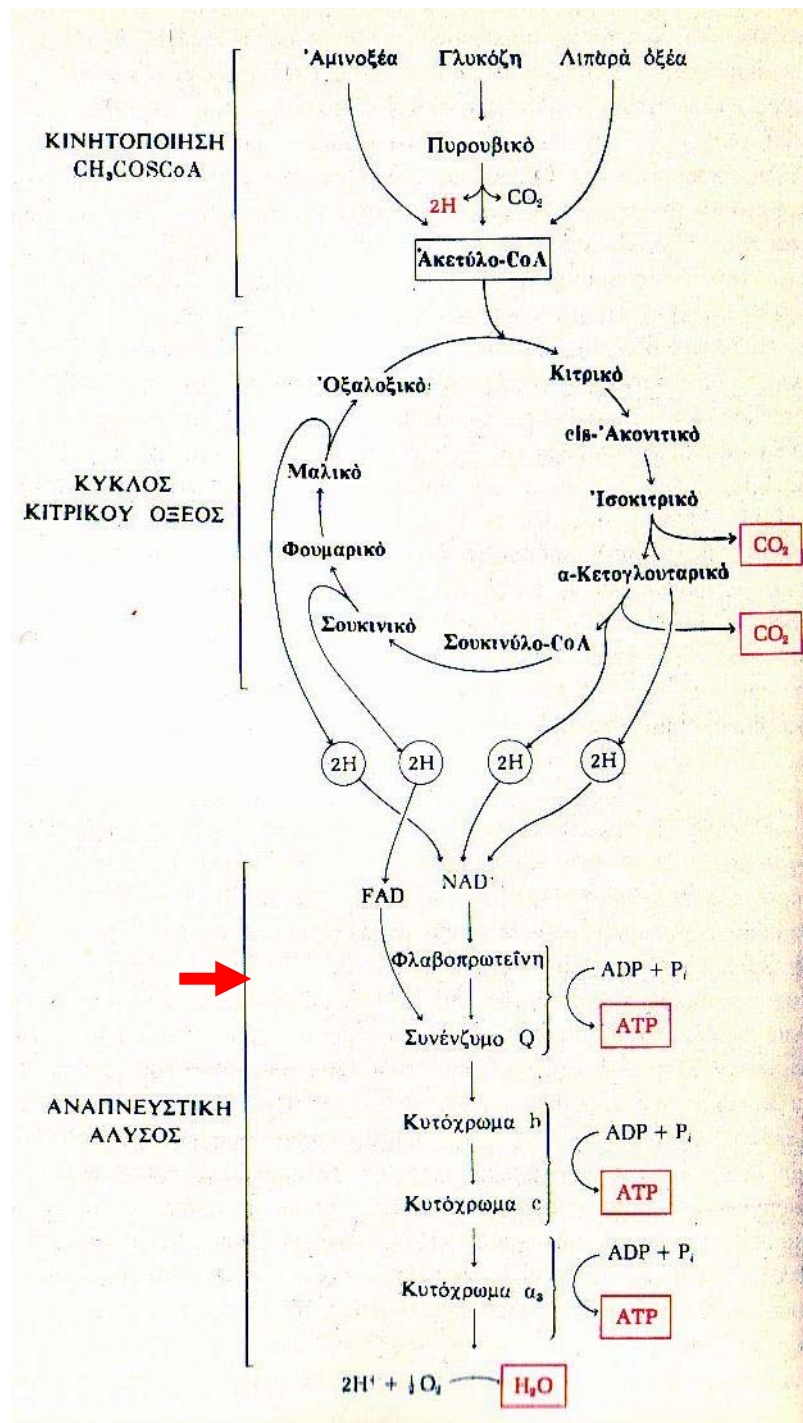
Πίνακας 6

Συσχέτιση των επιπέδων του H₂O₂ και του 8-ισοπροστανίου με τον αριθμό των κυττάρων στο BALF στους ασθενείς με IPF.

	H ₂ O ₂		8-isoprostane	
	ρ	r	ρ	r
Ολικός αριθμός κυττάρων	0.84	-0.06	0.29	-0.29
Μακροφάγα	0.78	-0.08	0.29	-0.29
Ουδετερόφιλα	0.58	0.16	0.75	-0.09
Λεμφοκύτταρα	0.07	-0.49	0.59	0.15
Ηωσινόφιλα	0.34	0.28	0.51	-0.18
Μαστοκύτταρα	0.29	0.30	0.63	-0.13

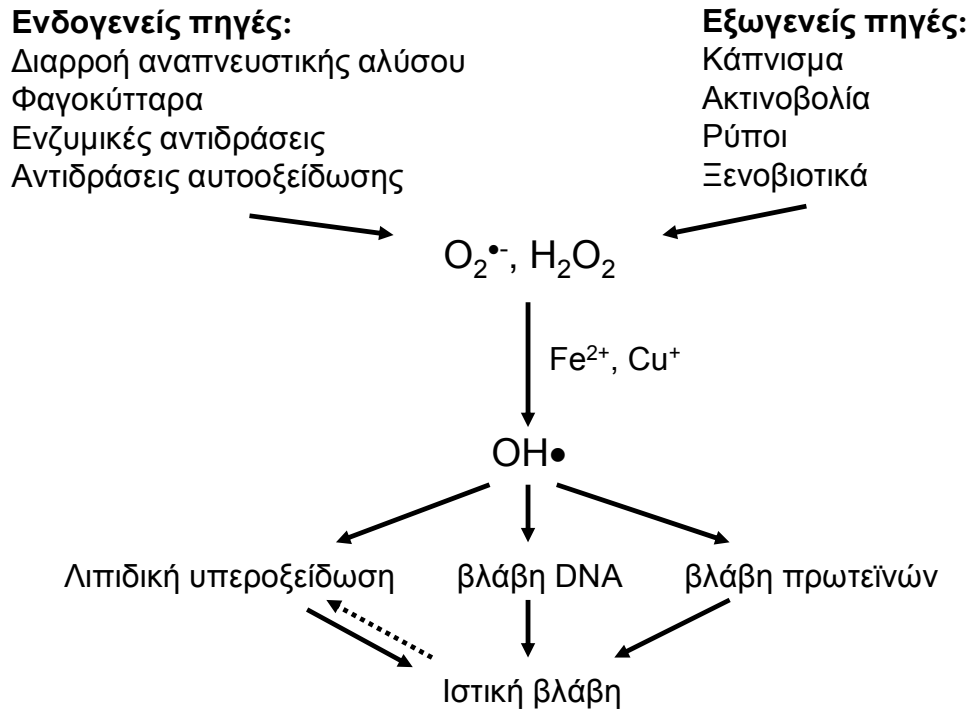
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1



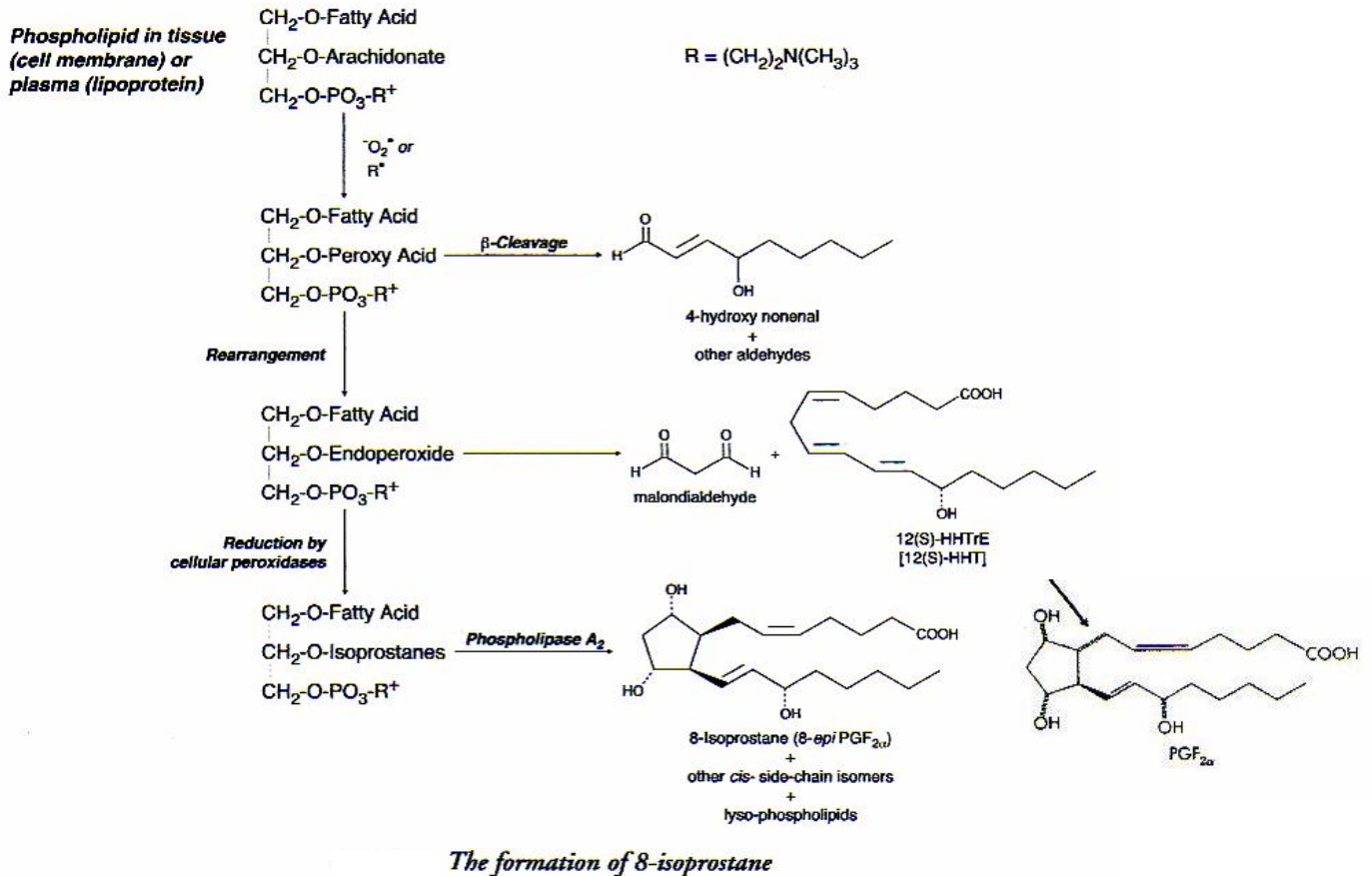
Εικόνα 1: Γενικό διάγραμμα οξειδώσεως των μορίων-καυσίμων (εικόνα από την βιβλιογραφική αναφορά #3).

Εικόνα 2



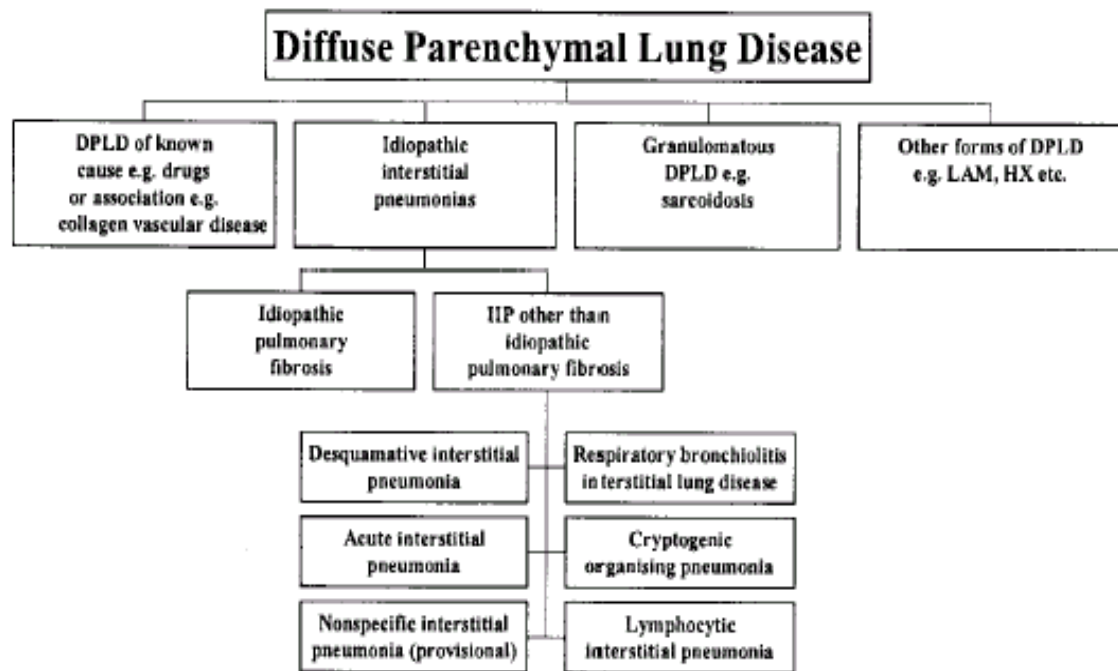
Εικόνα 2: Συνοπτικό διάγραμμα όπου φαίνεται η προέλευση των ενεργών μεταβολιτών οξυγόνου in vivo και η τοξική επίδρασή τους στους ιστούς.

Εικόνα 3

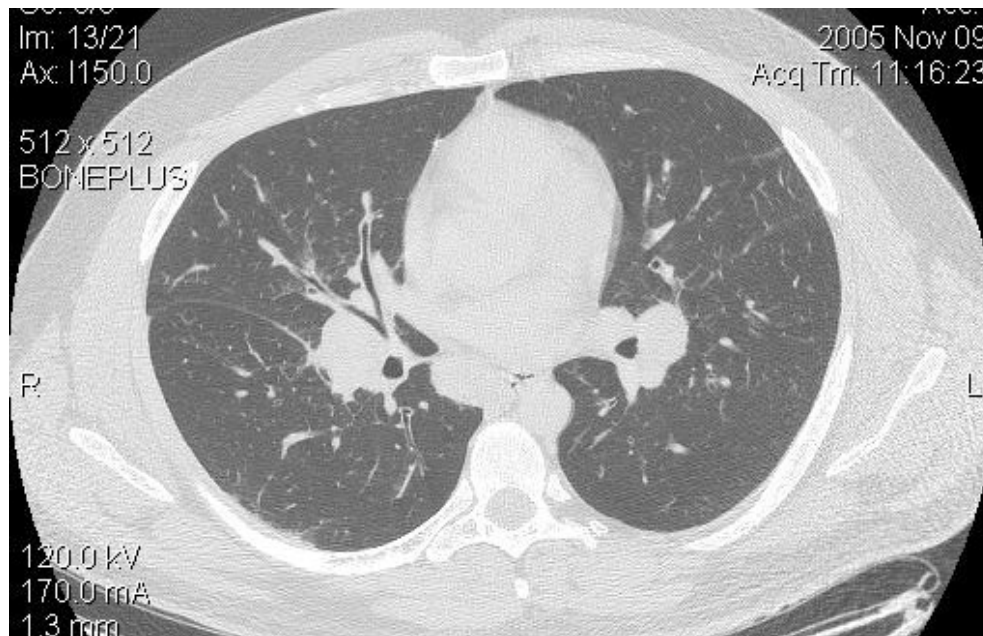


Εικόνα 3: Γενικό διάγραμμα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Φαίνεται ο σχηματισμός και η χημική δομή του 8-ισοπροστανίου. Δίπλα στο 8-ισοπροστανίου παρατείνεται το μόριο της PGF $_{2\alpha}$ για σύγκριση. Με έντονο μαύρο είναι οι χημικοί δεσμοί με κατεύθυνση προς τον αναγνώστη, ενώ με λιγότερο έντονο αυτοί που έχουν αντίθετη κατεύθυνση. Το επίπεδο του προστανικού δακτυλίου αντιστοιχεί στο επίπεδο του χαρτιού. Στην PGF $_{2\alpha}$ οι δύο μακριές αλυσεις στις θέσεις 8 (βέλος) και 12 έχουν αντίθετες κατευθύνσεις (trans). Στο 8-ισοπροστανίου οι δύο αλυσεις έχουν την ίδια κατεύθυνση (cis).

Εικόνα 4

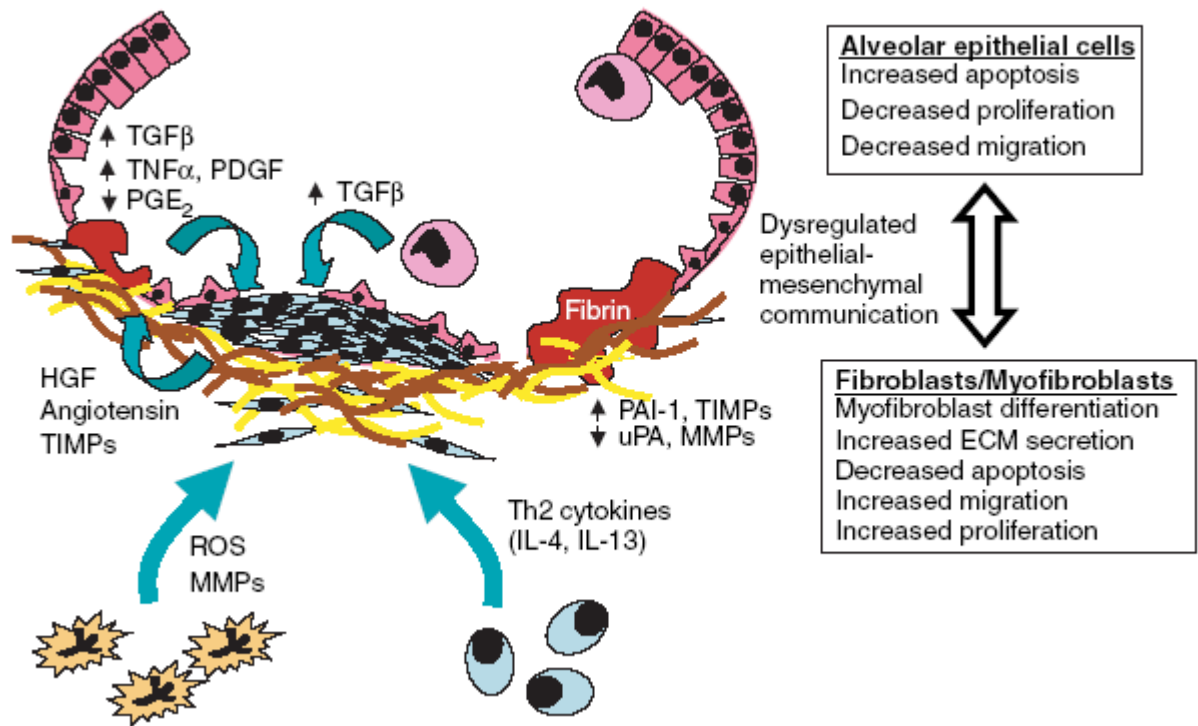


Εικόνα 4: Η ταξινόμηση των διάχυτων παρεγχυματικών πνευμονοπαθειών (από την βιβλιογραφική αναφορά #76).

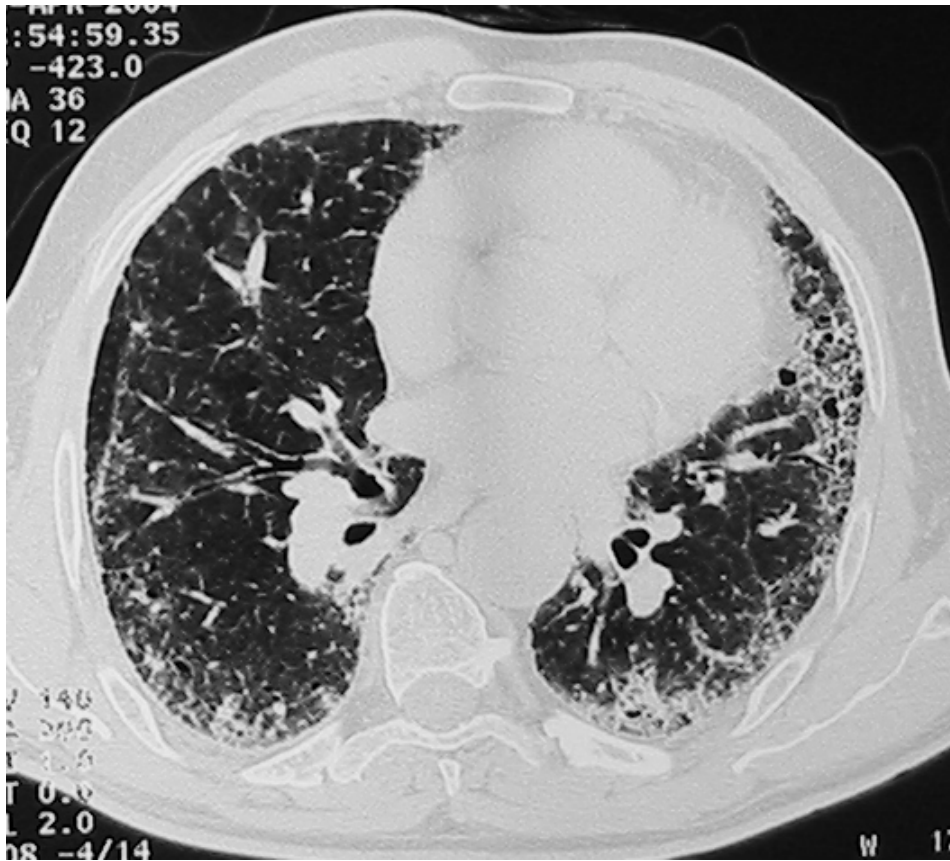
Εικόνα 5

Εικόνα 5: Αξονική τομογραφία θώρακα ασθενούς με σαρκοείδωση. Διακρίνεται η διόγκωση των πυλών αμφοτερόπλευρα και η πάχυνση των βρογχαγγειακών δεματίων δεξιά από συρρέοντα οζίδια (ίδια περίπτωση).

Εικόνα 6

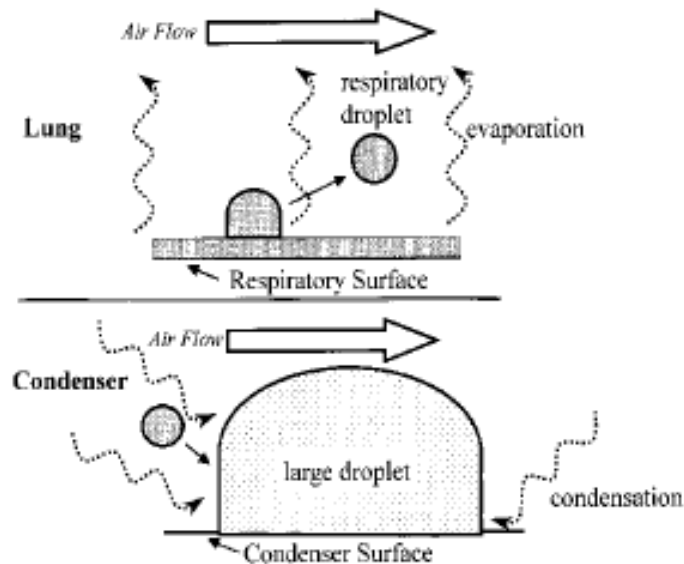


Εικόνα 6: Παραστατική απεικόνιση της θεωρίας γύρω από την παθογένεια της IPF. Η αλληλουχία των γεγονότων περιγράφεται στο κείμενο, &2.4 (από την βιβλιογραφική αναφορά #95).

Εικόνα 7

Εικόνα 7: Υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία θώρακα σε ασθενή με IPF. Διακρίνεται το διάμεσο πρότυπο και η πάχυνση των μεσολοβιδίων διαφραγματίων. Συνυπάρχουν βρογχεκτασίες εξ έλξεως, καθώς και υποϋπεζωκοτικές περιοχές μελισσοκηρύθρας (ιδία περίπτωση).

Εικόνα 8

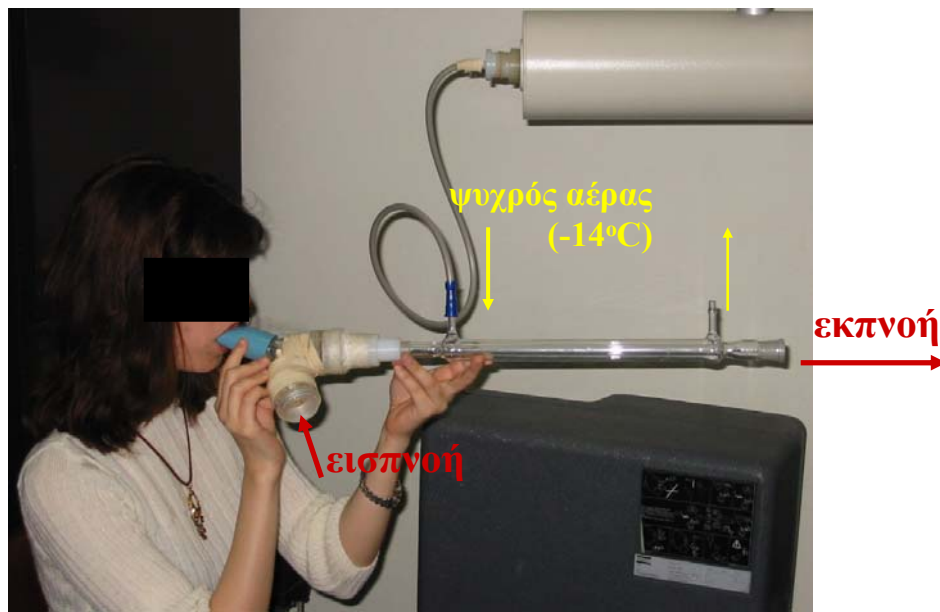


Εικόνα 8: Η επικρατούσα άποψη σχετικά με τον σχηματισμό του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα (EBC).

Lung: Το μεγαλύτερο ποσοστό του EBC αποτελείται από υδρατμούς (evaporation). Κατά την εκπνοή συμπαρασύρονται σταγονίδια από την υγρή στιβάδα που επικαλύπτει το αναπνευστικό επιθήλιο (epithelial lining fluid – ELF), που εμπεριέχουν και μη πτητικά μόρια. Τα σταγονίδια αυτά σχηματίζουν αερόλυμα (aerosol) και εκπνέονται προς τα έξω μαζί με τους υδρατμούς.

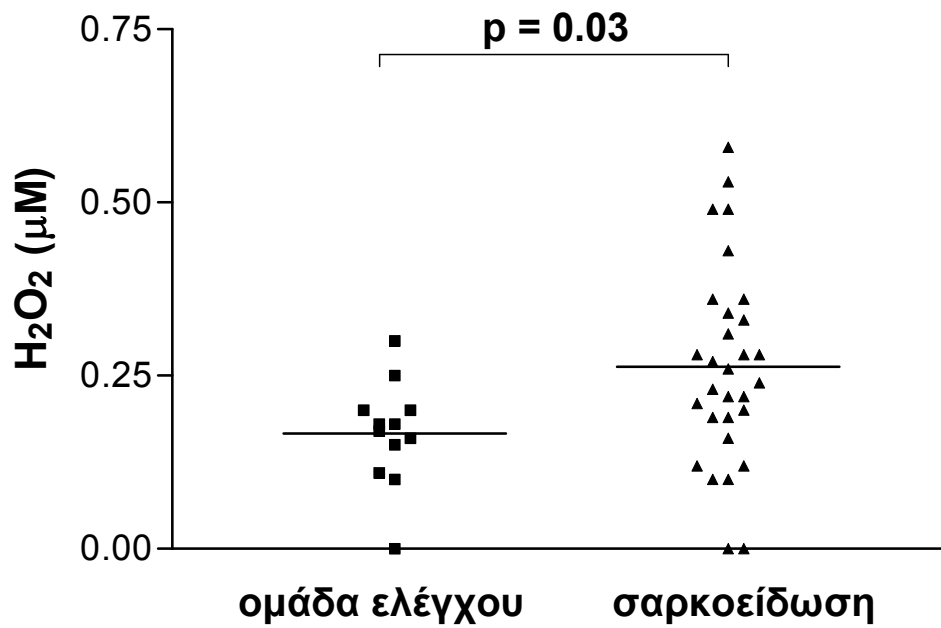
Condenser: Στη συσκευή συμπύκνωσης, οι υδρατμοί υγροποιούνται (condensation), συμπαρασύροντας μαζί τους τα σταγονίδια του αερολύματος. Η υγρή φάση που τελικά συλλέγεται (large droplet) είναι ένα υδατικό διάλυμα που εμπεριέχει διαλελυμένα πτητικά και μη πτητικά μόρια που προέρχονται από το ELF (από την βιβλιογραφική αναφορά #177).

Εικόνα 9



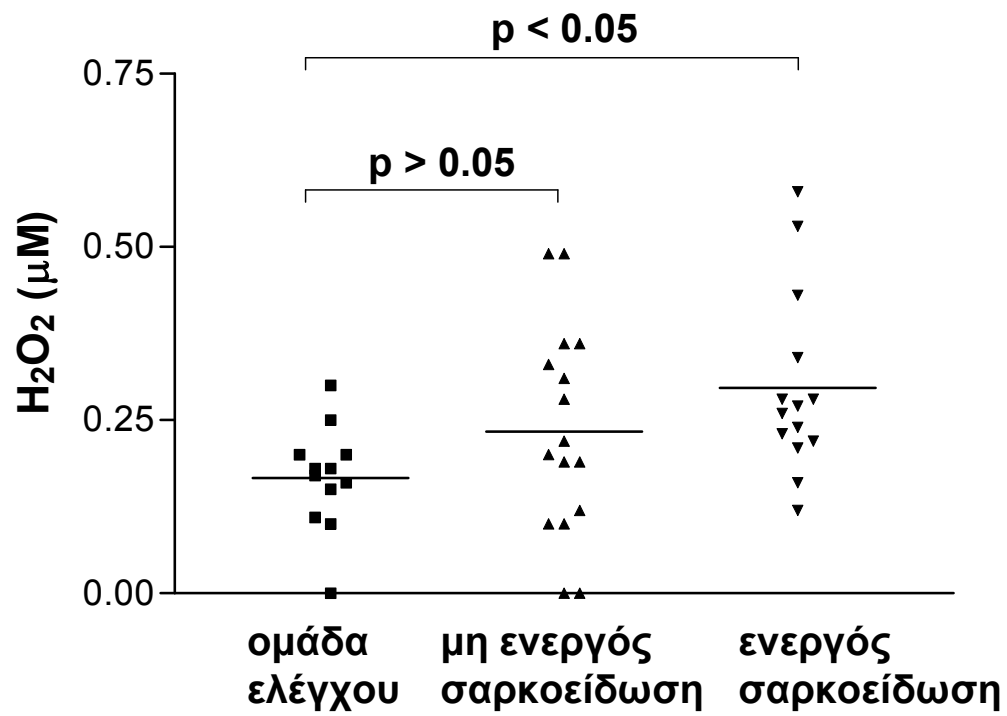
Εικόνα 9: Απεικονίζεται το σύστημα συλλογής του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα που χρησιμοποιήθηκε. Διακρίνεται ο σωληνίσκος που οδηγεί τον ψυχρό αέρα, από τη συσκευή πρόκλησης με ψυχρό αέρα, στον εξωτερικό αυλό του σωλήνα συμπύκνωσης και η πορεία του ψυχρού αέρα προς τα έξω. Φαίνεται επίσης η βαλβίδα διπλής κατεύθυνσης και η διαδρομή του εισπνεόμενου και εκπνεόμενου αέρα προς και από τον ασθενή. Ο εκπνεόμενος αέρας εξέρχεται από τον εσωτερικό αυλό του σωλήνα προς τα έξω (βλ. κείμενο: Ειδικό Μέρος &1.1.3).

Εικόνα 10



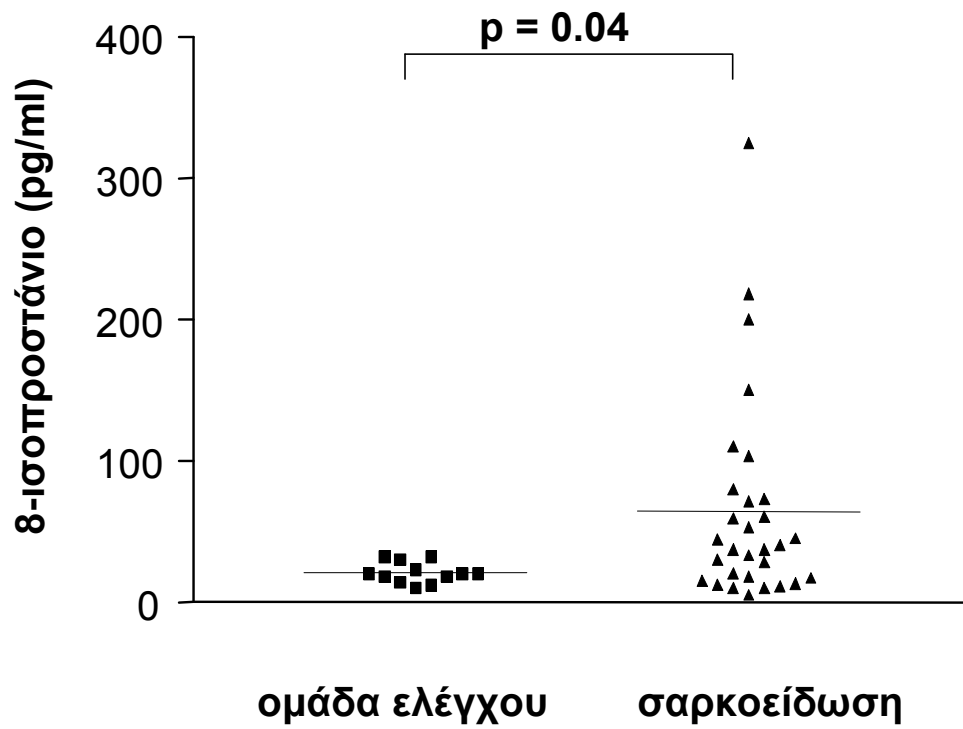
Εικόνα 10: Οι συγκεντρώσεις του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με σαρκοείδωση (ανεξάρτητα από την ενεργότητα της νόσου).

Εικόνα 11



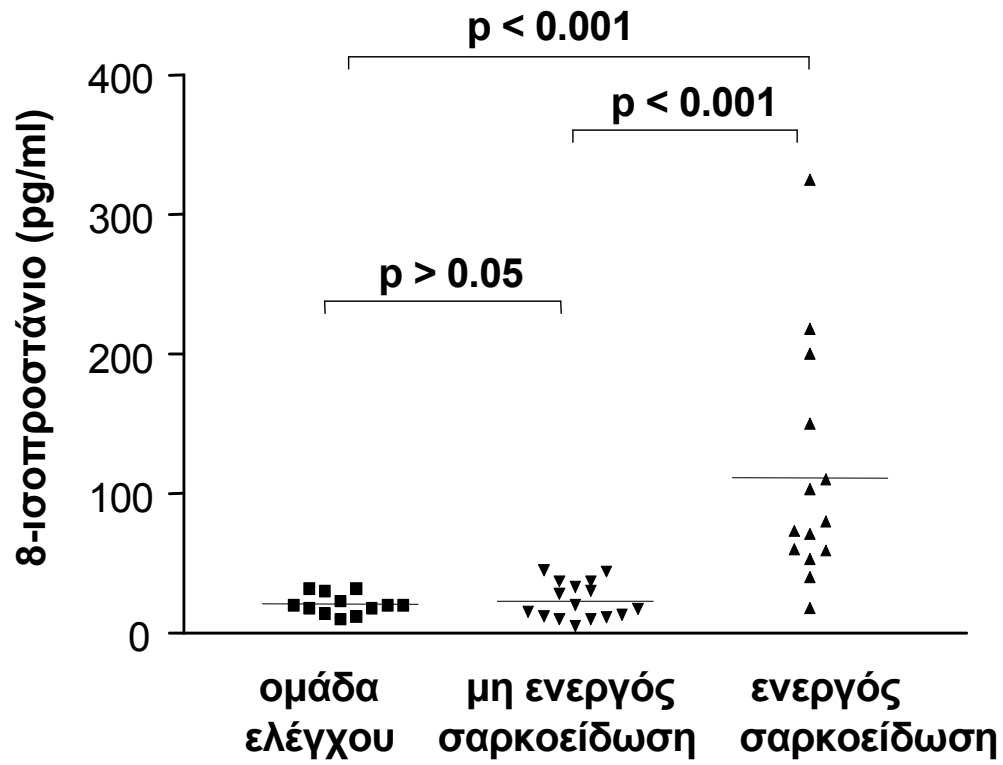
Εικόνα 11: Οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με μη ενεργό και ενεργό σαρκοείδωση.

Εικόνα 12



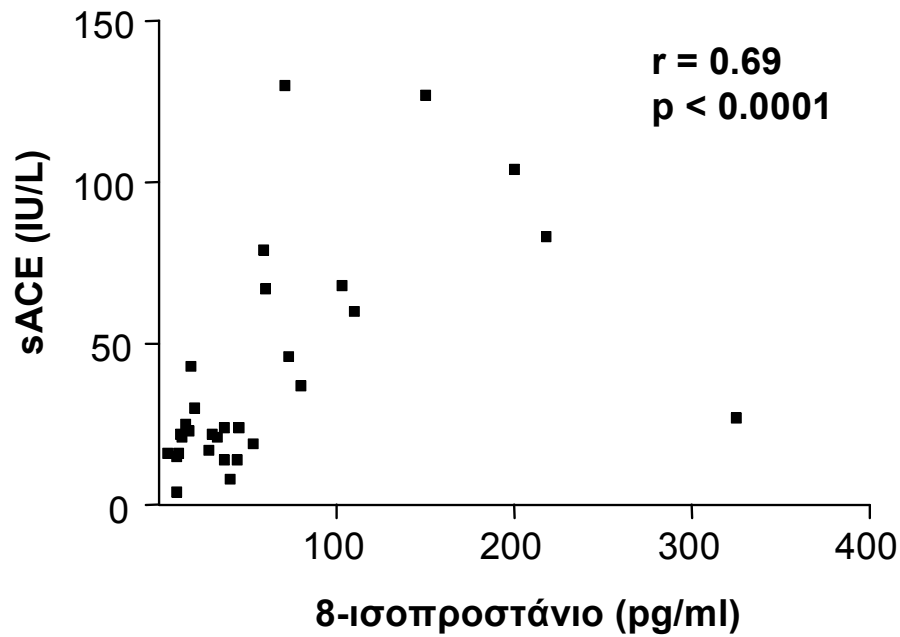
Εικόνα 12: Οι συγκεντρώσεις του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με σαρκοείδωση (ανεξάρτητα από την ενεργότητα της νόσου).

Εικόνα 13



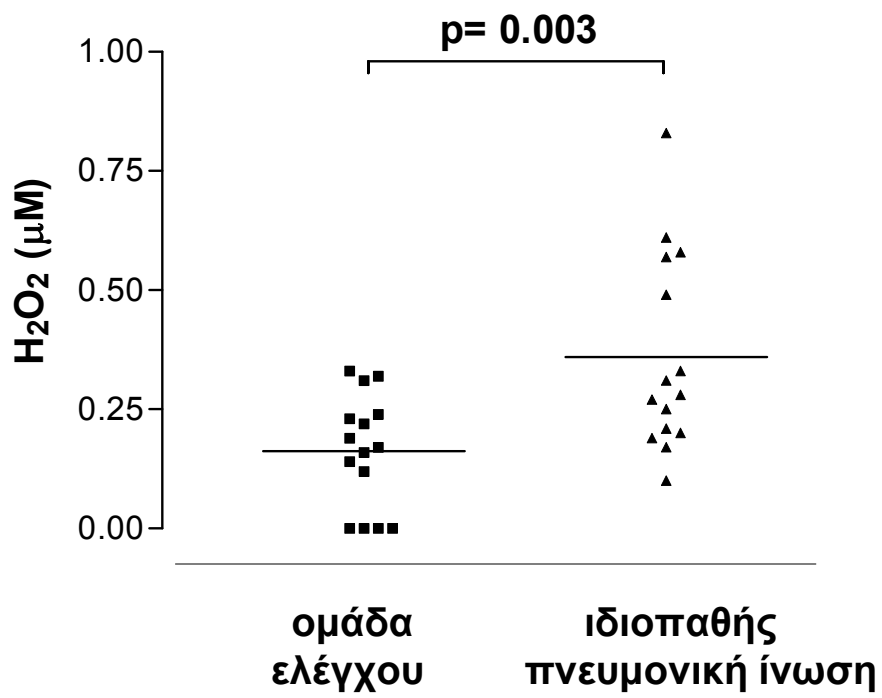
Εικόνα 13: Οι συγκεντρώσεις του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με μη ενεργό και ενεργό σαρκοείδωση.

Εικόνα 14



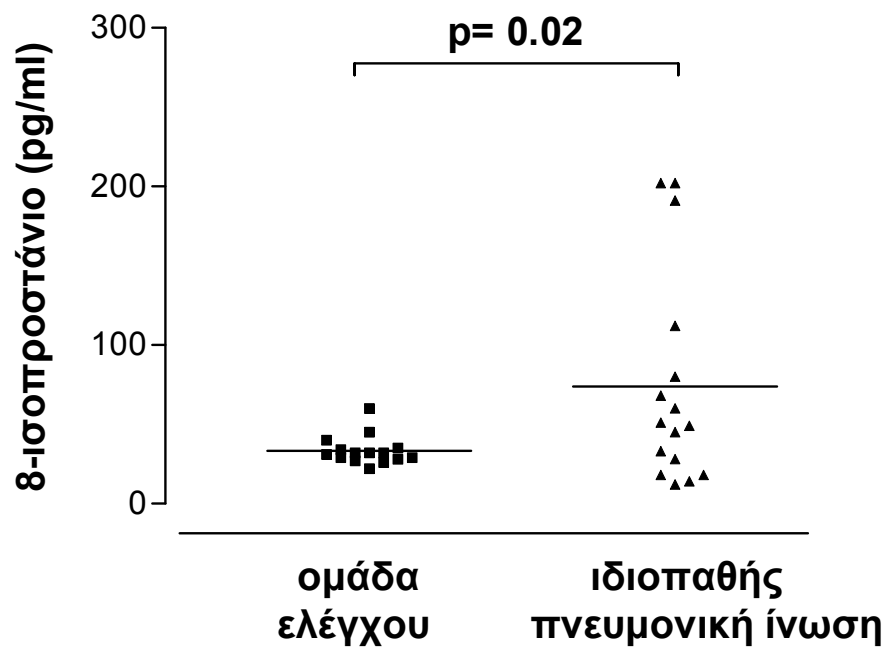
Εικόνα 14: Συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης στον ορό (sACE) και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στους ασθενείς με σαρκοειδωση.

Εικόνα 15



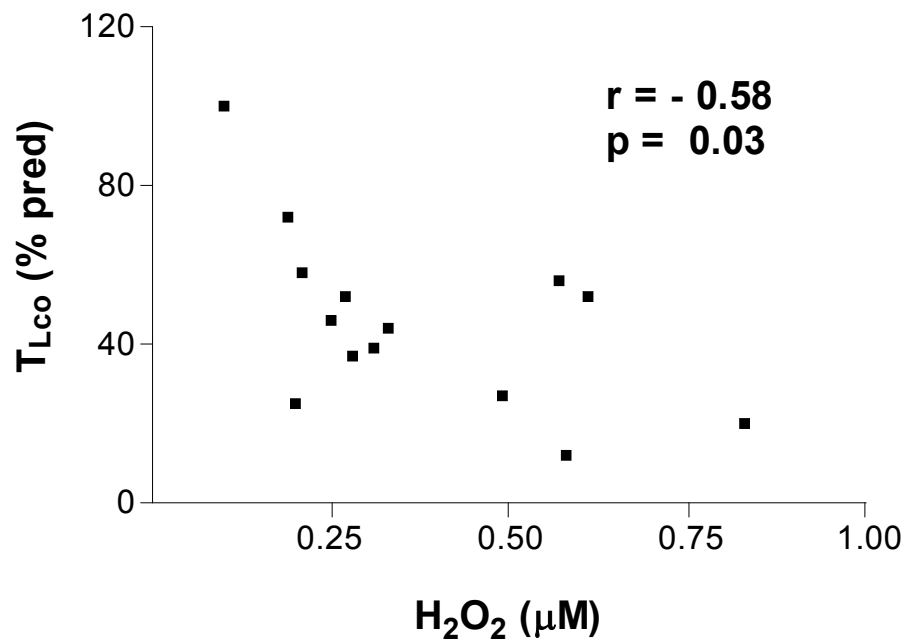
Εικόνα 15: Οι συγκεντρώσεις του H₂O₂ στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.

Εικόνα 16



Εικόνα 16: Οι συγκεντρώσεις του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.

Εικόνα 17



Εικόνα 17: Συσχέτιση μεταξύ της διαχυτικής ικανότητας του πνεύμονα για το μονοξείδιο του άνθρακα (T_{Lco}) με τις συγκεντρώσεις του H_2O_2 στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στους ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (%pred: ποσοστό επί της προβλεπόμενης τιμής).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, Bouros D. 8-isoprastane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004; 125: 1005-1011.
2. Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, Siafakas NM, Bouros D. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 362-367.