

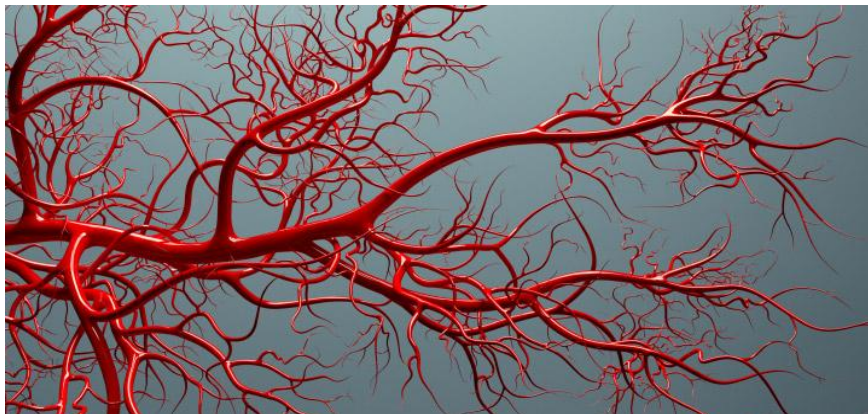
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ
ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΟΣ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ»**

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗ

Ιατρός - Αναισθησιολόγος



ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

Τυπώθηκε στο Τυπογραφείο ΚΥΒΟΣ

Ηράκλειο Νοέμβριος 2015

Στην Ιωάννα και τον Δημήτρη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπουσα:

Ελένη Ασκητοπούλου, Ομότιμος Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Νικόλαος Σιαφάκας, Ομότιμος Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΚ

Ιωάννης Ματαλλιωτάκης, Αν. Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΚ

Επταμελής επιτροπή

1. **Ελένη Ασκητοπούλου**, Ομότιμος Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, ΠΚ

2. **Νικόλαος Σιαφάκας**, Ομότιμος Καθηγητής Πνευμονολογίας, ΠΚ

3. **Ιωάννης Ματαλλιωτάκης**, Αν. Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, ΠΚ

4. **Οδυσσέας Ζώρας**, Καθηγητής Χειρουργικής, ΠΚ

5. **Νικόλαος Τζανάκης**, Αν. Καθηγητής Κλινικής Επιδημιολογίας, Δημόσιας Υγείας, ΠΚ

6. **Παναγιώτης Αγγουριδάκης**, Επ. Καθηγητής Επείγουσας Ιατρικής, ΠΚ

7. **Αλεξάνδρα Παπαϊωάννου**, Επ. Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, ΠΚ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
<i>Αγγειογένεση</i>	8
Αγγειογεντικοί Παράγοντες	13
Αγγειογένεση & Μυική Άσκηση	15
<i>Αναπνευστικοί Μύες</i>	18
Διάφραγμα	18
Ανατομία Διαφράγματος.....	18
Λειτουργία Διαφράγματος	20
<i>Μηχανικός Αερισμός</i>	21
Ενδείξεις – Τύποι Μηχανικού Αερισμού	21
Ελεγχόμενος Μηχανικός Αερισμός	21
Μηχανικός Αερισμός Υποβοηθούμενης Πίεσης.....	23
Επιπλοκές Μηχανικού Αερισμού	25
Οξεία Βλάβη Πνεύμονα (Acute Lung Injury, ALI)	25
Δυσλειτουργία του διαφράγματος.....	26
(α) Μελέτες σε πειραματόζωα	26
(β) Μελέτες σε ανθρώπους.....	28
Δυσκολία στον απογαλακτισμό (weaning).....	30
Μοντέλα Υποβοηθούμενα Αερισμού	30
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
<i>Εισαγωγικά</i>	34
Σκοπός της Διατριβής.....	36
<i>Υλικό & Μέθοδος</i>	37
Ασθενείς	37
Τεχνική Γενικής Αναισθησίας.....	37
Καταγραφές	40
Συλλογή δειγμάτων.....	40
Εκχύλιση mRNA και μεταγραφή cDNA.....	41
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	42
Στατιστική Ανάλυση	44
<i>Αποτελέσματα</i>	45

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

<i>Συζήτηση</i>	54
Αγγειογένεση & Μηχανικό Stress	54
Διάφραγμα	54
Είδη μηχανικών δυνάμεων.....	56
Αγγειογενετικοί Παράγοντες & Μηχανικό Stress σε καλλιέργειες κυττάρων	57
Νευρομυική Λειτουργία & Μηχανικός Αερισμός.....	59
Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Μελέτης.....	62
Τελικά Συμπεράσματα & Μελλοντικές Προοπτικές	63
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	65
SUMMARY	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	75
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	89

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτριά μου, κ. Ελένη Ασκητοπούλου, που μου εμπιστεύθηκε το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Με την ακούραστη προσπάθεια και τον αδιάκοπο επιστημονικό της ζήλο αποτελεί για όλους τους γιατρούς της πηγή έμπνευσης και καθοδήγησης στην ιατρική τους πορεία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους Καθηγητές κ. Νικόλαο Σιαφάκα για την καίρια επιστημονική του καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και την άψογη ανθρώπινη συμπεριφορά του στις αντιξοότητες που εμφανίστηκαν και κ. Ιωάννη Ματαλλιωτάκη για τη συνεχή προσφορά του στην πραγματοποίηση των επεμβάσεων και την ηθική του υποστήριξη.

Στη φίλη Πνευμονολόγο κ. Ελένη Τζωρτζάκη χρωστάω πολλά για την πολύτιμη υποστήριξή της σε επιστημονικό και ηθικό επίπεδο. Επίσης ευχαριστώ την Ειρήνη Νεοφύτου και τον Νίκο Σουλιτζή για την υψηλή επιστημονική τους επάρκεια ο καθένας στο αντικείμενό του.

Η εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής μου έδωσε την ευκαιρία να συναντήσω σπουδαίους επιστήμονες και να συναναστραφώ ανθρώπους σε μία σχέση αμοιβαίας εκτίμησης, σεβασμού και εμπιστοσύνης.

Ηράκλειο 2015

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

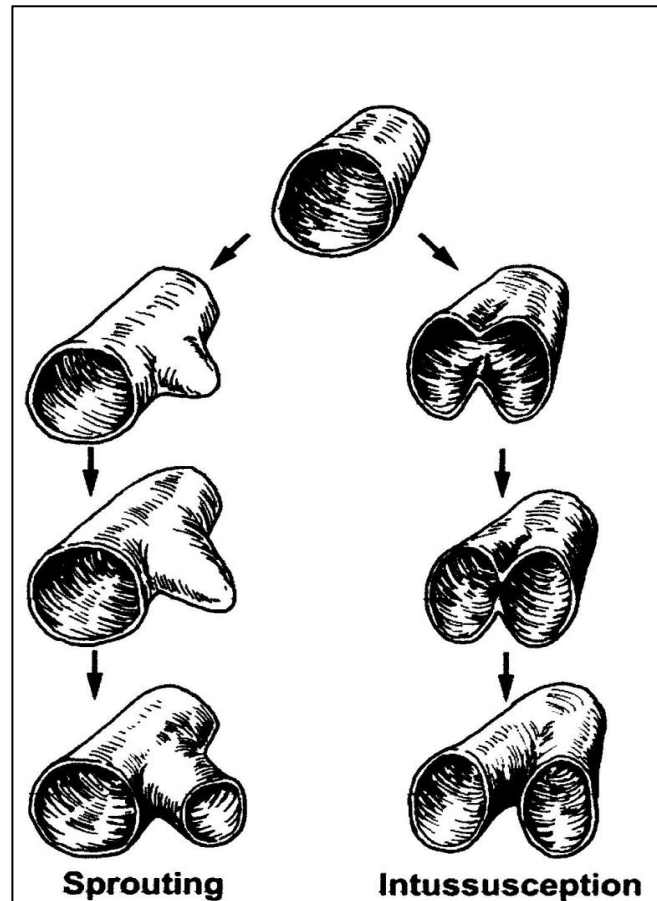
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιείται για να εκφράσει τη δημιουργία νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα.

Όπως υποστηρίζεται από πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών, αυξημένη αγγειογένεση εμφανίζεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ισχαιμία του μυοκαρδίου και πλήθος άλλες [1-7]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι μία διαδικασία που συμβαίνει στο σώμα στη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου στις γυναίκες, στην κύηση για τον σχηματισμό του πλακούντα, στην επούλωση του τραύματος και κατά την άσκηση των σκελετικών μυών. Σε πειραματικές και κλινικές μελέτες έχει αποσαφηνιστεί, αν και όχι με απόλυτη ακρίβεια, η πολύπλοκη διαδικασία της αγγειογένεσης που εξελίσσεται σταδιακά και συντονισμένα με παρόμοιο τρόπο σε όλους τους ιστούς [8, 9].

Υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων που δρουν στην εξωτερική (abluminal) και την εσωτερική (luminal) επιφάνεια του αυλού των αγγείων, η βασική μεμβράνη (basic membrane) και το εξωκυττάριο στρώμα του ενδοθηλίου (extracellular matrix) αποδομούνται επιτρέποντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον διάμεσο χώρο όπου πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν 'εκβλαστήσεις' (sprouts). Περικύτταρα (pericytes) μεταναστεύουν κατά μήκος των αγγειακών κλάδων και συνδέονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην εξωτερική επιφάνεια του αυλού.

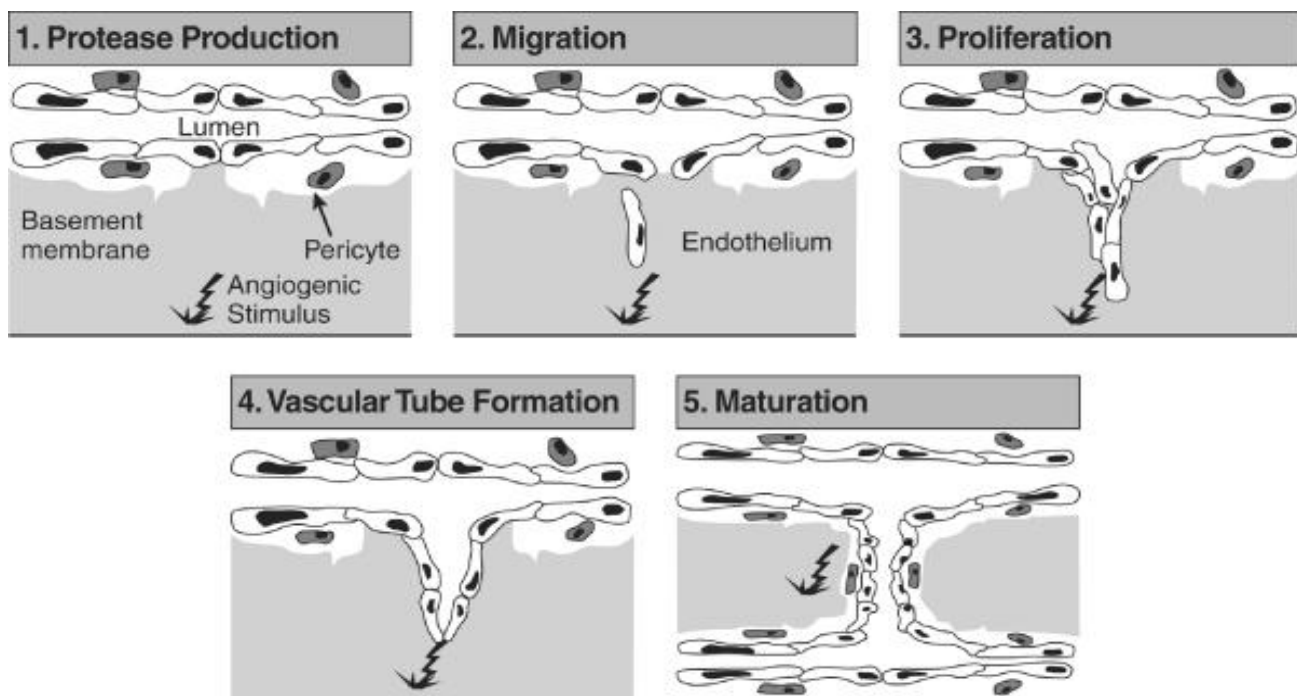
Τα νεοσχηματισθέντα αγγεία αποκτούν βασική μεμβράνη που συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα και στο τέλος συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά με το υπάρχον αγγειακό δίκτυο (capillary network) [10, 11] (Σχήματα 1 & 2).



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση της αγγειογένεσης με τη δημιουργία εκβλαστήσεων (*sprouting*), σε σύγκριση με την αγγειογένεση που συντελείται με την επιμήκη διαίρεση του υπάρχοντος αγγείου και τη δημιουργία δύο ανεξάρτητων αυλών (*intussusception*).

Για την έναρξη και το συντονισμό της πολύπλοκης διαδικασίας της αγγειογένεσης είναι απαραίτητη η επικράτηση των προ-αγγειογενετικών και άλλων ενισχυτικών παραγόντων έναντι των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων που στόχο έχουν τη σταθεροποίηση των ήδη υπάρχοντων

αγγείων. Η μυική άσκηση αντοχής, δηλαδή η άσκηση χαμηλής αντίστασης και μεγάλης επαναληψιμότητας (endurance training), αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για τη δημιουργία νέων αγγείων, τόσο στην καρδιά όσο και στους σκελετικούς μύες, με σκοπό να αυξηθεί η αιματική τους ροή και να ανταποκριθούν στις αυξημένες μεταβολικές τους ανάγκες [12-15].



Σχήμα 2. Τα στάδια του ‘καταρράκτη’ της αγγειογένεσης (sprouting). 1) Διάσπαση της βασικής μεμβράνης με τη δράση πρωτεασών. 2) Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο διάμεσο χώρο. 3) Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων. 4) Δημιουργία διακλαδώσεων. 5) Σταθεροποίηση των νέων αγγείων & σύνδεση με το υπάρχον αγγειακό δίκτυο.

Παραμένει δύσκολος ο σχεδιασμός μελετών για την *in vivo* εκτίμηση και ποσοτική αξιολόγηση όλων των παραγόντων που πυροδοτούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης στους σκελετικούς μύες σε συνθήκες αυξημένου μυικού έργου. *In vitro* μελέτες σε πειραματόζωα συμφωνούν ότι η έναρξη της αγγειογένεσης στους μύες πυροδοτείται από μεταβολές που υφίστανται τα αγγεία κατά τη διάρκεια της μυικής σύσπασης όπως (α) μηχανικές από τη σύσπαση των

γειτονικών μυικών ινών (mechanical stretch), (β) αιμοδυναμικές, (γ) μεταβολικές, όπως η τοπική υποξία, (δ) ορμονικές κ.α. [14, 16-20].

Οι μηχανικές δυνάμεις που δρουν στα αγγεία και προάγουν την αγγειογένεση εφαρμόζονται (α) στην εσωτερική πλευρά των αγγείων, δηλαδή στο ενδοθήλιο (luminal side) και (β) στην εξωτερική πλευρά (abluminal side) των αγγείων.

Στην πρώτη περίπτωση, η αυξημένη αιματική ροή προκαλεί αύξηση της τάσης του αγγειακού τοιχώματος (wall tension) λόγω αυξημένου διαμέτρου του αγγείου και αυξημένης υδροστατικής πίεσης (σύμφωνα με το νόμο του Laplace: $T = P \times r$, όπου: T = wall tension, P = υδροστατική πίεση και r = ακτίνα του αγγείου) [21, 22]. Επιπλέον αυξάνονται και οι δυνάμεις τριβής που δρουν κατ'εφαπτομένη στο τοίχωμα του αγγείου (shear stress) λόγω της αυξημένης ταχύτητας και γλοιότητας του αίματος (σύμφωνα με την εξίσωση: $\tau = 2n \times v/r$, όπου: τ = shear stress, n = γλοιότητα του αίματος, v = ταχύτητα του αίματος και r = ακτίνα του αγγείου) [23, 24]. Η επακόλουθη 'βλάβη' του ενδοθηλίου αποτελεί το ισχυρό ερέθισμα για την ενεργοποίηση του 'καταρράκτη' της αγγειογένεσης μέσω της απελευθέρωσης πρωτεασών καθώς και αγγειογενετικών παραγόντων (bFGF), προσταγλανδινών και νιτρικού οξέος (NO) [25, 26]. Η βασική μεμβράνη διασπάται και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν και πολλαπλασιάζονται σε γειτονικές θέσεις.

Στη δεύτερη περίπτωση, οι μηχανικές δυνάμεις ασκούνται στο τοίχωμα των αγγείων από την εξωτερική πλευρά και προέρχονται από τη σύσπαση των γειτονικών μυικών ινών. Το αγγειακό δίκτυο των μυών, μέσω του εξωκυττάριου στρώματος (extracellular matrix) και των στοιχείων του συνδετικού ιστού είναι εκτεθειμένο στις ελαστικές δυνάμεις που προέρχονται από τη μηχανική

δραστηριότητα των μυικών ινών. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα τριχοειδή αγγεία υφίστανται επαναλαμβανόμενη, άλλοτε άλλου βαθμού, επιμήκη ελαστική έκταση (διάταση) και κάμψη ακολουθώντας αντίστοιχα τη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυικών ινών. Οι Ellis και συν. κατέδειξαν σε ποντίκια πως αυξάνεται το μήκος των τριχοειδών όταν συσπάται ο μακρύς εκτείνων το δάκτυλο μυς και πως μειώνεται το μήκος τους όταν ο μυς βρίσκεται σε χάλαση [27]. Η απελευθέρωση του παράγοντα bFGF από τη βασική μεμβράνη όταν αυτή υφίσταται μηχανικό stress έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την πυροδότηση της δημιουργίας νέων αγγείων [28, 29].

Η τοπική ιστική υποξία είναι γνωστό ότι αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για τη δημιουργία νέων αγγείων στους ιστούς, όπως στο μυοκάρδιο, στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και στη διαβητική αγγειογένεση [30-33]. Όσον αφορά στους σκελετικούς μύες, η τάση του ενδοκυττάρου O_2 ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της άσκησης, από τα 30mmHg (στην ηρεμία) σε ~3-4mmHg [34] και ακόμα περισσότερο όταν η μυική άσκηση γίνεται σε συνθήκες περιορισμένης αιματικής ροής ή μειωμένης εισπνεόμενης συγκέντρωσης O_2 [34, 35]. Η μείωση του ιστικού O_2 στους μύες πειραματόζωων και ανθρώπων φαίνεται ότι αυξάνει την έκφραση του γονιδίου που ελέγχει τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF [34, 36-38] μέσω της αύξησης του παράγοντα HIF-1α και HIF-1β. Ο παράγον HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) είναι μία ετεροδιμερής βασική πρωτεΐνη με δομή έλικα-αγκύλη-έλικα, που αποτελείται από δύο υποομάδες (HIF-1α και HIF-1β). Λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για την παραγωγή ερυθροποιητίνης στα ανθρώπινα υποξικά κύτταρα αλλά και για τη μεταγραφή του VEGF σε συνθήκες υποξίας [32, 39, 40]. Τα παραπάνω δεν ισχύουν για τον παράγοντα bFGF ο οποίος δεν φαίνεται να επάγεται από την υποξία, όπως έχουν δείξει μελέτες in vitro και in vivo [36, 41].

Αγγειογεντικοί Παράγοντες

Για να λάβει χώρα η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι απαραίτητοι οι ειδικοί αυξητικοί παράγοντες αγγειογένεσης.

Ο παράγοντας **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)** που ανακαλύφθηκε το 1979 από τον Dvorak [42] και αρχικά ονομάστηκε Vascular Permeability Factor, είναι απαραίτητος για την έναρξη και το συντονισμό της πολύπλοκης διαδικασίας της αγγειογένεσης. Είναι πρωτεΐνη-διαβιβαστής (signal protein) που παράγεται από τα κύτταρα και διεγείρει τον de novo σχηματισμό νέων αγγείων κατά την εμβρυική ανάπτυξη (vasculogenesis) καθώς και το σχηματισμό νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα (angiogenesis). Ο VEGF συνιστά μέρος του συστήματος που αποκαθιστά την παροχή O₂ στους ιστούς σε συνθήκες αυξημένου μεταβολικού έργου ή μειωμένης αιματικής ροής. Αποτελεί μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς (VEGF receptors) στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ένα μονοπάτι Tyrosine Kinase που οδηγεί τελικά στην αγγειογένεση. Έχει τις ακόλουθες επιδράσεις: (α) διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία αγγειακών 'εκβλαστήσεων', (β) προάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [43-46], (γ) διεγείρει την παραγωγή πρωτεασών, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), από τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα, που βοηθούν στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης που αποτελεί το αρχικό στάδιο της αγγειογένεσης [47, 48], (δ) ενεργοποιεί και άλλα ένζυμα, εκτός από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, που είναι απαραίτητα για την πρωτεόλυση της βασικής μεμβράνης, όπως το πλασμινογόνο, οι ενεργοποιητές του ιστικού πλασμινογόνου (tPA) και του πλασμινογόνου της ουροκινάσης (uPA) [49-51], (ε) προάγει την αγγειοδιαστολή προκαλώντας

απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου (NO) από το τοίχωμα των αγγείων, μέσω κινητοποίησης του ενδοκυττάρου Ca [52] και (στ) βοηθά στον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωσή των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας την αιματική τους ροή μέσω της αγγειογένεσης. Η φαρμακευτική αναστολή της δράσης του παράγοντα VEGF αποτελεί τρόπο αντιμετώπισης της ανάπτυξης του καρκίνου [53].

Η ευρύτερη οικογένεια των **Fibroblast Growth Factors (FGFs)** κατέχει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφορετικών τύπων κυττάρων και ιστών. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 23 διαφορετικά μόρια που σχετίζονται δομικά μεταξύ τους.

Ο **basic FGF (bFGF)** ή **FGF-2** αποτελεί ισχυρό μιτογόνο παράγοντα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες [28, 29, 54, 55]. Συντίθεται από το ενδοθήλιο των αγγείων και αποθηκεύεται στη βασική μεμβράνη και τον υπενδοθηλιακό εξωκυττάριο χώρο. Οποιαδήποτε μηχανική βλάβη στο ενδοθήλιο (από αυξημένο wall stress ή shear stress) ή στη βασική μεμβράνη (από εξωαγγειακούς μηχανικούς παράγοντες) προκαλεί την απελευθέρωση του bFGF. Ο bFGF προκαλεί με τη σειρά του περαιτέρω αύξηση του παράγοντα VEGF και απελευθέρωση του NO από το ενδοθήλιο [56-58]. Επιπλέον, συμμετέχει στη de novo οργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε σωληνωτές (tube-like) δομές.

Ο **Transforming Growth Factor (TGF)** (αναφέρεται και ως Tumor Growth Factor) περιλαμβάνει δύο οικογένειες αυξητικών παραγόντων. Οι οικογένειες TGFα και TGFβ έχουν διαφορετική δομή και λειτουργικότητα και συνδέονται με διαφορετικούς τύπους υποδοχέων. Ο παράγοντας TGFα, όταν αυξηθεί στους ιστούς, προκαλεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Ο παράγοντας TGFβ, που περιγράφηκε αρχικά το 1983, αποτελεί ρυθμιστική πρωτεΐνη και ταξινομείται σε TGFβ1, TGFβ2 και TGFβ3. Ελέγχει πολυάριθμες λειτουργίες διαφορετικών τύπων κυττάρων, μεταξύ των οποίων τον πολλαπλασιασμό, τη

διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και την προσκόλλησή τους. Στη διαδικασία της αγγειογένεσης, ο TGFβ1 παράγεται από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και, εκτός από τη μιτογόνο δράση του, συμμετέχει στη στρατολόγηση περικυττάρων για την ολοκλήρωση και σταθεροποίηση των νεοσχηματισθέντων τριχοειδών [46, 59].

Αγγειογένεση & Μυϊκή Άσκηση

Οι Breen και συν. πρώτοι διαπίστωσαν την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, FGF και TGF στο γαστροκνήμιο μυ ποντικών μετά από τρέξιμο διάρκειας μιας ώρας [36]. Η άσκηση διπλασίασε έως τετραπλασίασε τα επίπεδα mRNA των αγγειογενετικών παραγόντων φτάνοντας τη μέγιστη τιμή τέσσερις ώρες μετά την άσκηση και με επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα εικοσιτέσσερις ώρες μετά. Η άσκηση σε υποξικές συνθήκες (12% εισπνεόμενη συγκέντρωση O₂) αύξησε περαιτέρω τα επίπεδα mRNA του VEGF, χωρίς να επηρεάσει τους παράγοντες FGF και TGF. Επίσης, η ηλεκτρική διέγερση μυών σε πειραματόζωα προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF, είτε αμέσως μετά σε συνδυασμό με την αύξηση του HIF-1α [60], είτε μετά από τέσσερις ή επτά ημέρες [61]. Η φαρμακευτική στέρηση των μυϊκών ινών από τον VEGF είχε ως αποτέλεσμα την κατάργηση της αγγειογενετικής απάντησης στη μυϊκή άσκηση, τη μείωση των τριχοειδών κατά 50% και τη μείωση της αντοχής στην άσκηση κατά 80% [62]. Αν και δεν είναι εξακριβωμένο το είδος των κυττάρων, που κυρίως ευθύνεται για την παραγωγή του (μυοκύτταρα, ενδοθηλιακά, ή άλλα), ο παράγοντας VEGF είναι απαραίτητος για την καλή συσταλτικότητα των σκελετικών μυών και χωρίς αυτόν η λειτουργική απόδοση και η αντοχή

τους είναι σημαντικά επηρεασμένες. Για τον παραπάνω λόγο, η μυϊκή άσκηση αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για την παραγωγή του VEGF καθώς και των άλλων αγγειογενετικών παραγόντων.

Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε ανθρώπους. Η μελέτη των Gustafsson και συν. έδειξε τριπλάσια αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF (αλλά όχι του bFGF) στο γαστροκνήμιο μυ, 45min μετά από άσκηση αντοχής, δηλαδή χαμηλής αντίστασης και υψηλής επαναληψιμότητας. Η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF ήταν κλιμακούμενα μεγαλύτερη, αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, σε συνθήκες μειωμένης αιματικής ροής στο μυ και επομένως αυξημένου μεταβολικού stress. Η αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF ήταν παράλληλη με την αύξηση των επιπέδων mRNA των παραγόντων εκείνων που σχετίζονται με την υποξία, όπως είναι οι HIF-1α και HIF-1β [37]. Στη μελέτη των Richardson και συν. διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του παράγοντα VEGF στον εκτείνοντα την κνήμη μυ μία ώρα μετά από άσκηση, σε συνθήκες φυσιολογικής εισπνεόμενης συγκέντρωσης O₂ (νορμοξία) ή μειωμένης εισπνεόμενης συγκέντρωσης O₂ (υποξία). Δεν υπήρχε στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα mRNA του VEGF και στην τιμή της ενδοκυττάριας μερικής πίεσης του O₂, που ήταν σημαντικά μειωμένη όταν η μυϊκή άσκηση έλαβε χώρα σε συνθήκες υποξίας. Σε αντίθεση με τον VEGF, η γονιδιακή έκφραση του παράγοντα bFGF δεν αυξήθηκε μετά από την μυϊκή άσκηση [63].

Συμπερασματικά, ο αγγειογενετικός παράγοντας VEGF είναι απαραίτητος μεσολαβητής για την προκαλούμενη από τη μυϊκή άσκηση αύξηση της αγγειογένεσης που παρατηρείται στους σκελετικούς μύες. Είναι πιθανόν ότι η τοπική ιστική υποξία αποτελεί σημαντικό ερέθισμα για την πυροδότηση της αγγειογένεσης και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τιμής-ουδού (threshold) στην ενδοκυττάρια μερική πίεση του O₂, κάτω από την οποία δεν αυξάνεται περισσότερο ο VEGF και η αγγειογένεση. Η μυϊκή άσκηση σε συνθήκες φυσιολογικής εισπνεόμενης συγκέντρωσης O₂ φαίνεται

ότι επιτυγχάνει αυτή την τιμή-ουδό και για το λόγο αυτό δεν ενισχύεται περαιτέρω το ερέθισμα για αγγειογένεση σε συνθήκες υποξίας.

ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΙ ΜΥΕΣ

Οι αναπνευστικοί μύες στον άνθρωπο διαιρούνται σε εισπνευστικούς και εκπνευστικούς, ανάλογα με τη φάση της αναπνοής στην οποία συμμετέχουν. Οι εισπνευστικοί μύες περιλαμβάνουν το διάφραγμα που αποτελεί τον κύριο αναπνευστικό μυ, τον στερνοκλειδομαστοειδή, τον τραπεζοειδή, τους σκαληνούς, και τους έξω μεσοπλεύριους. Οι εκπνευστικοί μύες περιλαμβάνουν τους έσω μεσοπλεύριους, τον εγκάρσιο θωρακικό και τους μύες του κοιλιακού τοιχώματος: τον ορθό κοιλιακό, τον έσω και έξω λοξό και τον εγκάρσιο κοιλιακό μυ. Ο κύριος μύς της αναπνοής είναι το διάφραγμα που αποτελεί από εμβρυολογικής, μορφολογικής και λειτουργικής πλευράς, σκελετικό μυ. Η ιδιαιτερότητά του είναι ότι απαιτείται η δια βίου συνεχής και επαναλαμβανόμενη σύσπασή του, αφού είναι μύς απαραίτητος για την αναπνοή και επομένως για τη συντήρηση της ζωής. Οι υπόλοιποι αναπνευστικοί μύες δεν λειτουργούν κατά τη διάρκεια της ήρεμης και απρόσκοπτης αναπνοής, αλλά επιστρατεύονται σε συνθήκες αυξημένου αναπνευστικού έργου.

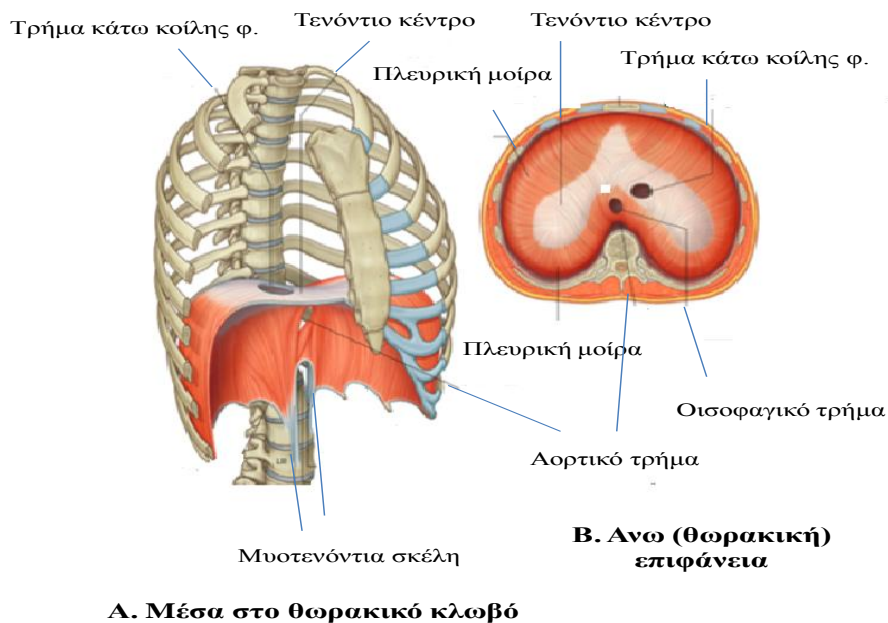
Διάφραγμα

Ανατομία Διαφράγματος

Μορφολογικά το διάφραγμα αποτελεί ένα ινομυώδες πέταλο με θολωτό σχήμα που χωρίζει την θωρακική από την κοιλιακή κοιλότητα (Σχήμα 3). Σχηματίζει το έδαφος της θωρακικής κοιλότητας και την οροφή της κοιλιακής και διαπερνάται από δομές που διέρχονται από τον θώρακα στην κοιλιά διαμέσου ειδικών τρημάτων. Όταν το βλέπει κανείς από μπροστά, το διάφραγμα σχηματίζει δύο θόλους, ο δεξιός φτάνει μέχρι το άνω χείλος της πέμπτης πλευράς και ο αριστερός φτάνει μέχρι το κάτω χείλος της πέμπτης πλευράς. Αποτελείται από την περιφερική (μυική) μοίρα

και την κεντρική (τενόντια). Ανάλογα με το σημείο έκφυσης των μυϊκών ινών, η περιφερική μοίρα υποδιαιρείται σε:

1. Στερνική μοίρα, που εκφύεται από την οπίσθια επιφάνεια της ξιφοειδούς απόφυσης.
2. Πλευρική μοίρα, που εκφύεται με έξι οδοντώματα από την έσω επιφάνεια των έξι κατωτέρων πλευρικών χόνδρων.
3. Οσφυϊκή μοίρα, που εκφύεται από τους οσφυϊκούς σπονδύλους (με δύο μυοτενόντια σκέλη) και από τον έσω και έξω τοξοειδή σύνδεσμο, που αποτελούν μέρος της περιτονίας που καλύπτει την πρόσθια επιφάνεια του ψοίτη μυός και του τετράγωνου οσφυϊκού μυός αντίστοιχα.



Σχήμα 3. Το διάφραγμα, όπως φαίνεται μέσα στο θωρακικό κλωβό, σε οβελιαίο επίπεδο (Α) και από την άνω (θωρακική) πλευρά, σε εγκάρσιο επίπεδο (Β).

Οι μυικές ίνες που σχηματίζουν την περιφερική μοίρα συγκλίνουν ακτινωτά σε ισχυρό, πλατύ τένοντα ή απονεύρωση που λέγεται τενόντιο κέντρο και έχει τριφυλλοειδές σχήμα. Βρίσκεται στο ύψος της στερνοξίφοειδούς άρθρωσης. Η άνω επιφάνεια του τενόντιου κέντρου συνέχεια μερικώς με την κάτω επιφάνεια του ινώδους περικαρδίου.

Λειτουργία Διαφράγματος

Η κύρια λειτουργία του διαφράγματος είναι η αναπνοή. Κατά την διάρκεια της εισπνοής το διάφραγμα κατέρχεται καθώς συσπάται, ενώ κατά τη διάρκεια της εκπνοής ανέρχεται καθώς χαλαρώνει. Όταν συσπάται το διάφραγμα, ο δεξιός και αριστερός θόλος του κινούνται προς τα κάτω, η κυρτότητά του επιπεδώνεται και η κατακόρυφη διάμετρος της θωρακικής κοιλότητας αυξάνεται. Αυξάνεται έτσι ο όγκος της θωρακικής κοιλότητας (σε αυτό συμβάλλουν και οι έξω μεσοπλεύριοι μύες) με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενδοθωρακική πίεση και να εισέρχεται αέρας στους πνεύμονες. Επιπλέον, εξαιτίας της πρόσφυσης της πλευρικής μοίρας στο άνω χείλος των έξι κατωτέρων πλευρών, όταν αυτή συσπάται προκαλεί και την ανύψωση με προς τα έξω στροφή των κατωτέρων πλευρών, αυξάνοντας έτσι και την προσθιοπίσθια διάμετρο του θώρακα. Με τη σύσπαση του διαφράγματος, παρόλο που το μέγεθος της κοιλιακής κοιλότητας μειώνεται, η ενδοκοιλιακή πίεση αυξάνεται μόνο σε μικρό βαθμό επειδή το πρόσθιο και τα πλάγια κοιλιακά τοιχώματα κινούνται προς τα έξω. Κατά τη διάρκεια της εκπνοής το διάφραγμα χαλαρώνει και ο αέρας εξέρχεται από τους πνεύμονες λόγω των ελαστικών ιδιοτήτων του πνεύμονα και του θωρακικού κλωβού. Στη βίαιη εκπνοή συμμετέχουν και οι έσω μεσοπλεύριοι μύες και οι μύες του κοιλιακού τοιχώματος. Καθώς το διάφραγμα συσπάται και χαλαρώνει, κινείται μόνο ο θόλος του, επειδή η περιφερική του μοίρα προσφύεται στο θωρακικό κλωβό και στους ανώτερους οσφυϊκούς σπονδύλους.

ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΑΕΡΙΣΜΟΣ

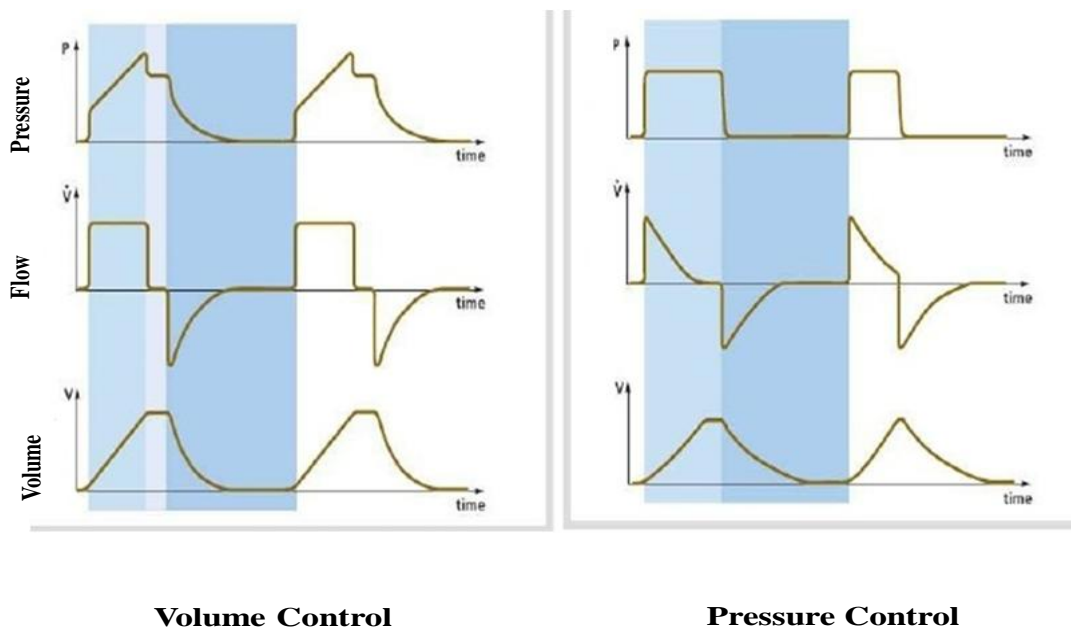
Ενδείξεις – Τύποι Μηχανικού Αερισμού

Ο μηχανικός αερισμός αποτελεί σωτήρια για τη ζωή υποστηρικτική μέθοδο σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως η αναπνευστική ανεπάρκεια, η κρανιοεγκεφαλική κάκωση, η σήψη και άλλα είδη shock που απαιτούν μείωση του έργου των αναπνευστικών μυών. Διακρίνεται σε αερισμό με: (α) θετικές πιέσεις (Positive-Pressure Ventilation) και (β) αρνητικές πιέσεις (Negative-Pressure Ventilation). Ανάλογα με τον αν ο ασθενής διατηρεί την αυτόματη αναπνοή, ο μηχανικός αερισμός ταξινομείται σε: (α) ελεγχόμενο (controlled mechanical ventilation, CMV), όπου ο αναπνευστήρας αναλαμβάνει εξ' ολοκλήρου το έργο της αναπνοής και απαλλάσσει τελείως τους αναπνευστικούς μύες από το έργο τους και β) υποβοηθούμενο μηχανικό αερισμό (assist ή support mechanical ventilation), όπου ο αναπνευστήρας υποβοηθά την αυτόματη αναπνοή, αναλαμβάνοντας ένα μικρό ή μεγάλο μέρος του έργου των αναπνευστικών μυών.

Ελεγχόμενος Μηχανικός Αερισμός

Ο ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός μπορεί να είναι ελεγχόμενου όγκου (volume-controlled, VC) ή ελεγχόμενης πίεσης (pressure-controlled, PC). Στον αερισμό τύπου VC, ο αναπνευστήρας δίνει στον ασθενή σε κάθε αναπνευστικό κύκλο ένα προκαθορισμένο αναπνεύσιμο όγκο (tidal volume, V_t), με καθορισμένη αναπνευστική συχνότητα (respiratory rate, RR) και σχέση εισπνοής: εκπνοής (inspiration: expiration ratio, I:E). Οι ρυθμίσεις αυτές καθορίζουν τον πραγματικό χρόνο της εισπνοής και την εισπνευστική ροή που είναι σταθερή (inspiratory time & flow) σε όλη τη διάρκεια της εισπνοής. Οι εισπνευστικές πιέσεις (peak, mean, plateau inspiratory pressure) που

αναπτύσσονται εξαρτώνται από τις μηχανικές ιδιότητες του αναπνευστικού συστήματος του ασθενούς, δηλαδή τις αντιστάσεις των αεραγωγών και την ενδοτικότητα του συστήματος πνευμόνων-θωρακικού τοιχώματος. Αφού παρέλθει ο εισπνευστικός χρόνος και η τελικο-εισπνευστική φάση, ο αναπνευστήρας, ανοίγοντας την εκπνευστική βαλβίδα, επιτρέπει στον ασθενή να εκπνεύσει παθητικά κατά τη διάρκεια του εκπνευστικού χρόνου (cycling from inspiration to expiration) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Οι κυματομορφές της πίεσης, της ροής και του όγκου στον μηχανικό αερισμό ελεγχόμενου όγκου (volume control) και ελεγχόμενης πίεσης (pressure control) κατά τη φάση της εισπνοής (μεσαίο γαλάζιο) και της εκπνοής (έντονο γαλάζιο).

Στον αερισμό τύπου PC ο αναπνευστήρας δημιουργεί μία προκαθορισμένη εισπνευστική πίεση και ο αναπνεόμενος όγκος καθορίζεται ανάλογα με τις αντιστάσεις των αεραγωγών και την

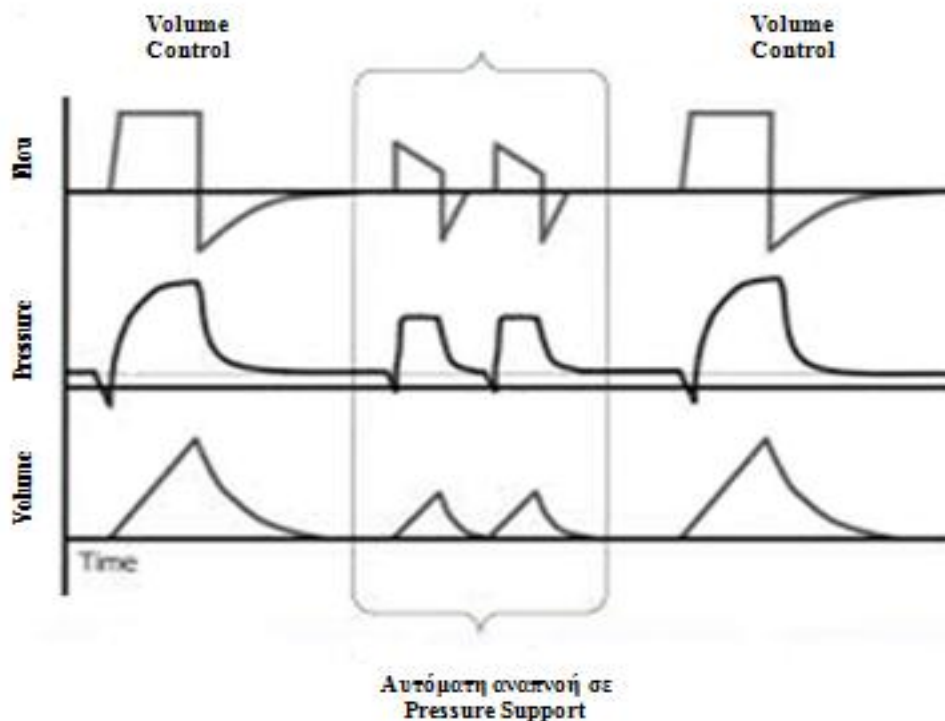
ενδοτικότητα των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος. Προκαθορίζονται η αναπνευστική συχνότητα και η σχέση εισπνοής: εκπνοής, ενώ η εισπνευστική ροή είναι επιβραδυνόμενη (decelerating flow pattern). Οι εισπνευστικές πιέσεις των αεραγωγών παραμένουν σταθερές. Αφού παρέλθει ο εισπνευστικός χρόνος, ο αναπνευστήρας επιτρέπει στον ασθενή να εκπνεύσει παθητικά (Σχήμα 4).

Μηχανικός Αερισμός Υποβοηθούμενης Πίεσης

Στο μοντέλο αερισμού υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support ventilation, PSV) ο ασθενής διεγείρει τον αναπνευστήρα σε κάθε δική του εισπνευστική προσπάθεια. Ο αναπνευστήρας δημιουργεί ροή αέρα προς τον ασθενή με σταθερή εισπνευστική πίεση, ανάλογα με το προκαθορισμένο επίπεδο πίεσης (pressure support level) πάνω από το PEEP. Ο αναπνεύμενος όγκος εξαρτάται από το προκαθορισμένο επίπεδο πίεσης και τις μηχανικές ιδιότητες του αναπνευστικού συστήματος του ασθενούς. Ο ίδιος ο ασθενής καθορίζει την αναπνευστική του συχνότητα, ανάλογα με την εντολή που δίνει το αναπνευστικό του κέντρο (αναπνευστικό drive) [64]. Όταν η προοδευτικά μειούμενη εισπνευστική ροή φτάσει σε μία προκαθορισμένη τιμή, συνήθως στο 25% της μέγιστης τιμής, ανοίγει η εκπνευστική βαλβίδα του κυκλώματος και ο ασθενής αφήνεται να εκπνεύσει (Σχήμα 5).

Ο μηχανικός αερισμός υποβοηθούμενης πίεσης αποτελεί έναν τύπο αερισμού μερικής υποστήριξης της αναπνοής (partial support ventilation), σε αντιδιαστολή με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό που παρέχει πλήρη αναπνευστική υποστήριξη (full support ventilation). Το επίπεδο της αναπνευστικής υποστήριξης αυξάνει όσο αυξάνει το επίπεδο της εισπνευστικής πίεσης που δημιουργεί ο αναπνευστήρας κατά την εισπνοή (pressure support level). Χαμηλά επίπεδα

pressure support (5-10cmH₂O) χρησιμεύουν στο να μειώσουν τις αντιστάσεις από τον ενδοτραχειακό σωλήνα, το αναπνευστικό κύκλωμα και τον αναπνευστήρα. Μειώνουν το έργο και το φορτίο των αναπνευστικών μυών και κατά συνέπεια το έργο της αναπνοής σε ασθενείς με μειωμένη αναπνευστική ικανότητα [65, 66]. Αυξάνονται, έτσι, η αποτελεσματικότητα της αυτόματης αναπνοής και η συνεργασία του ασθενούς με τον αναπνευστήρα. Τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί, μαζί με άλλα μοντέλα μερικής υποστήριξης της αναπνοής, ιδανικό τρόπο απογαλακτισμού των ασθενών από τον μηχανικό αερισμό στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας [67].



Σχήμα 5. Αυτόματη αναπνοή σε υποβοηθούμενη πίεση (pressure support) (μέσα στο πλαίσιο) παρεμβάλλεται σε υποχρεωτικές αναπνοές ελεγχόμενου όγκου (volume control) από τον αναπνευστήρα. Απεικονίζονται οι κυματομορφές της ροής, της πίεσης και του όγκου στο pressure support και στο volume control μοντέλο.

Υψηλότερα επίπεδα pressure support (10-40 cmH₂O) αναλαμβάνουν κατά μεγάλο μέρος το έργο της αναπνοής, ως εναλλακτική μέθοδο του ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού, σε ασθενείς που έχουν επαρκές αναπνευστικό drive και σταθερές μηχανικές ιδιότητες του αναπνευστικού συστήματος. Στους χειρουργικούς ασθενείς, αυτός ο τύπος αερισμού εφαρμόζεται εφόσον δεν απαιτείται χορήγηση νευρομυϊκού αποκλειστή για τις ανάγκες της χειρουργικής επέμβασης και ο ασθενής διατηρεί την αυτόματη αναπνοή. Το PS αυξάνει τον αναπνεόμενο όγκο, μειώνει τις αντιστάσεις που προέρχονται από τον ενδοτραχειακό σωλήνα, το αναπνευστικό κύκλωμα και τον αναπνευστήρα και μειώνει το έργο της αναπνοής.

Σε αντίθεση με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό που καθιστά το διάφραγμα τόσο νευρωνικά όσο και μηχανικά ανενεργές, στο PS διατηρείται κάποιος βαθμός μηχανικής και νευρικής δραστηριότητας του διαφράγματος και των άλλων αναπνευστικών μυών. Η μηχανική φόρτιση και η κατανάλωση ενέργειας του διαφράγματος είναι φυσικά μικρότερες από την αυτόματη αναπνοή, όπως φαίνεται και από τις μετρήσεις του tension time index (TTI) [68, 69].

Επιπλοκές Μηχανικού Αερισμού

Οξεία Βλάβη Πνεύμονα (Acute Lung Injury, ALI)

Ο μηχανικός αερισμός συνδέεται με αρκετές επιπλοκές, όπως λοίμωξη του αναπνευστικού, βαροτραύμα, τραύμα του αεραγωγού και αιμοδυναμική αστάθεια. Το 1974 περιγράφηκε η προκαλούμενη από τον μηχανικό αερισμό οξεία βλάβη του πνεύμονα (ventilator induced lung injury, VILI), η βαρύτητα της οποίας εξαρτάται από το κυψελιδικό stress και strain και την ευαισθησία ενός ήδη 'προσβεβλημένου' από άλλα αίτια πνεύμονα [70-72]. Η νοσολογική οντότητα διερευνήθηκε

εκτενώς και τα τελευταία χρόνια έχουν καθιερωθεί στρατηγικές αερισμού προστατευτικές των πνευμόνων με χαμηλές εισπνευστικές πιέσεις ή/και χαμηλούς αναπνεόμενους όγκους, με αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της έκβασης των βαρέως πασχόντων καθώς και των ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [73, 74].

Δυσλειτουργία του διαφράγματος

Τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας η επίπτωση του μηχανικού αερισμού, εκτός από το πνευμονικό παρέγχυμα, στους αναπνευστικούς μύες και κυρίως στο διάφραγμα. Η πλήρης διακοπή της μηχανικής και νευρικής δραστηριότητας (unloading) του διαφράγματος κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της λειτουργικής διαταραχής του διαφράγματος. Το 2004 οι Vassilakopoulos και Petrof εισήγαγαν τον όρο ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) για να περιγράψουν τη μειωμένη συσταλτική ικανότητα του διαφράγματος καθώς και τις ιστολογικές και βιοχημικές μεταβολές που παρατηρούνται στο μυ μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό [75].

(α) Μελέτες σε πειραματόζωα

Η πρώτη προοπτική μελέτη σε πειραματόζωα έγινε από τους Le Bourdelles και συν. και απέδειξε σημαντική μείωση της συσταλτικής ικανότητας του διαφράγματος ποντικών μετά από 48 ώρες μηχανικού αερισμού [76]. Πλήθος από μεταγενέστερες μελέτες που δημοσιεύτηκαν στο χρονικό διάστημα 1997-2003 επιβεβαίωσαν τη λειτουργική έκπτωση του διαφράγματος μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό. Η ικανότητα του διαφράγματος να διατηρήσει τη συσταλτική του δύναμη σε συνθήκες αυξημένου εισπνευστικού φορτίου (endurance) μειώνεται επίσης σημαντικά στον παρατεταμένο μηχανικό αερισμό [7, 77-81]. Η έκπτωση της λειτουργικής ικανότητας του

διαφράγματος δεν μπορεί να αποδοθεί σε βλάβη του κεντρικού ή του περιφερικού συστήματος μετάδοσης των νευρικών ερεθισμάτων, ούτε σε μεταβολές στους πνευμονικούς όγκους ή στην κοιλιακή ενδοτικότητα [7, 80, 82]. Η λειτουργική διαταραχή του διαφράγματος εμφανίζεται γρήγορα, μέσα σε 12 ώρες από την έναρξη του μηχανικού αερισμού και επιδεινώνεται προοδευτικά καθώς αυξάνει η διάρκεια του μηχανικού αερισμού [79, 83].

Εκτός από τη λειτουργική διαταραχή, ποικίλες ιστολογικές και βιοχημικές μεταβολές έχουν περιγραφεί στο διάφραγμα πειραματόζωων με VIDD. Έχει περιγραφεί ατροφία των μυϊκών ινών τύπου I και II, ως αποτέλεσμα της αυξημένης πρωτεϊνόλυσης, της μειωμένης πρωτεϊνοσύνθεσης και της αυτοφαγίας (autophagy) [7, 76, 78, 82-88]. Συστήματα πρωτεασών, όπως calpain και caspase ενεργοποιούνται από τον μηχανικό αερισμό και αποδιατάσσουν τα συμπλέγματα ακτίνης-μυοσίνης καθιστώντας τα έτσι ευάλωτα στο πρωτεολυτικό σύστημα ubiquitin-proteasome. Λαμβάνουν χώρα, επίσης, τραυματισμός και ένα είδος remodelling των μυϊκών ινών, όπως αποδεικνύεται από τη διάσπαση των μυοϊνιδίων, την παρουσία ενδοκυττάρων κενοδοπιών και άτυπων μιτοχονδρίων [81, 82, 84, 88-91]. Οι παραπάνω ιστολογικές και βιοχημικές μεταβολές έχουν αποδοθεί στο αυξημένο οξειδωτικό stress που παρατηρείται στο διάφραγμα μετά από 6 ώρες (ποντίκια) ή 72 ώρες (γουρούνια) μηχανικού αερισμού [92, 93]. Η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών N-acetylcysteine και Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού έχει αποδειχτεί ότι προλαμβάνει την ενεργοποίηση των πρωτεασών και τη μυϊκή ατροφία σε διάφραγμα ποντικών [94-97].

(β) Μελέτες σε ανθρώπους

Οι μελέτες σε ανθρώπους επαλήθευσαν τα δεδομένα από τα πειραματόζωα και επιβεβαίωσαν τις ιστολογικές και βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο ανθρώπινο διάφραγμα κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Πρώτοι οι Knisely και συν. μελέτησαν ιστοτεμάχια από το διάφραγμα 39 νεογνών που πέθαναν μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό και διαπίστωσαν μυϊκή ατροφία του διαφράγματος στα νεογνά που είχαν λάβει μηχανικό αερισμό ≥ 12 ημέρες, σε αντίθεση με τα νεογνά που είχαν λάβει μηχανικό αερισμό ≤ 7 ημέρες [98]. Στην πολύ σημαντική μελέτη των Levine και συν. διαπιστώθηκε μείωση κατά 50% των μυϊκών ινών τύπου I και II στο διάφραγμα 14 δωρητών οργάνων σώματος μετά από μηχανικό αερισμό διάρκειας 18-69 ωρών, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που την αποτελούσαν 8 θωρακοχειρουργικοί ασθενείς που έλαβαν μηχανικό αερισμό διάρκειας 2-3 ωρών [99]. Ακολούθησαν άλλες δύο σημαντικές μελέτες, με παρόμοια μεθοδολογία, από τους Hussain και Jaber. Οι συγγραφείς επιβεβαίωσαν τη μυϊκή ατροφία του διαφράγματος σε ασθενείς της ΜΕΘ μετά από 15-276 και 24-249 ώρες μηχανικού αερισμού, αντίστοιχα, σε σύγκριση με θωρακοχειρουργικούς ασθενείς που έλαβαν μηχανικό αερισμό για 2-4 ώρες [100, 101]. Η μυϊκή ατροφία του διαφράγματος οφείλεται, με βάση τα ευρήματα, σε βιοχημικές μεταβολές ανάλογες με αυτές που παρατηρήθηκαν στα πειραματόζωα, όπως αυξημένο οξειδωτικό stress, ενεργοποίηση πρωτεολυτικών συστημάτων (caspases, calpains, ubiquitin-proteasome) και πυροδότηση αυτοφαγικών μηχανισμών με κύριο πρωταγωνιστή τα λυσοσώματα. Αξιοσημείωτο είναι ότι μυϊκή ατροφία δεν παρατηρήθηκε – τουλάχιστον στον ίδιο βαθμό με το διάφραγμα – σε άλλες μυϊκές ομάδες στους ίδιους ασθενείς. Η βαρύτητα της μυϊκής ατροφίας του διαφράγματος είναι ανάλογη με τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού [100-102]. Επίσης, η μελέτη των Jaber και συν.

κατέδειξε για πρώτη φορά σε ανθρώπους και τη διαταραχή της φυσιολογικής διάταξης και οργάνωσης των μυοϊνιδίων.

Η λειτουργική διαταραχή, δηλαδή η μειωμένη συσταλτική ικανότητα και αντοχή του διαφράγματος, μετά από τον μηχανικό αερισμό έχει αποδειχτεί και στους ανθρώπους επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα από τα πειραματόζωα. Οι Hermans και συν. διαπίστωσαν σε ασθενείς που βρίσκονταν σε μηχανικό αερισμό μειωμένη διαδιαφραγματική πίεση (Twitch Transdiaphragmatic Pressure, TwPdi) μετά από αμφοτερόπλευρη μαγνητική διέγερση των φρενικών νεύρων, ενδεικτική της μειωμένης ικανότητας του διαφράγματος να συσπαστεί. Η διάρκεια του μηχανικού αερισμού συνδέθηκε με λογαριθμική μείωση της TwPdi, τόσο σε pressure control όσο και σε pressure support μοντέλο [103]. Στη μελέτη των Jaber και συν. η συσταλτική δύναμη του διαφράγματος εκτιμήθηκε από την πίεση που αναπτύσσεται μέσα στην τραχεία (twitch tracheal airway pressure, TwPtr), ως αποτέλεσμα της μαγνητικής διέγερσης των φρενικών νεύρων. Η TwPtr ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς που βρίσκονταν σε μηχανικό αερισμό > 6 ημέρες, κατά 32% σε σχέση με τις baseline τιμές και κατά 50% σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν μηχανικό αερισμό διάρκειας 1-2 ωρών [101]. Η ίδια μελέτη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατέδειξε εκσεσημασμένη μυϊκή ατροφία και τραυματισμό των μυϊκών ινών στους ασθενείς που έλαβαν μηχανικό αερισμό διάρκειας 24-249 ωρών, σε σύγκριση με τους θωρακοχειρουργικούς ασθενείς που έλαβαν μηχανικό αερισμό διάρκειας 2-3 ωρών.

Δυσκολία στον απογαλακτισμό (weaning)

Η μυϊκή ατροφία και η επακόλουθη δυσλειτουργία του διαφράγματος στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς των ΜΕΘ που υποβάλλονται σε παρατεταμένο μηχανικό αερισμό ευθύνεται σε μεγάλο ποσοστό για τη δυσκολία απογαλακτισμού από τον αναπνευστήρα (weaning). Δυσκολία στη διακοπή του μηχανικού αερισμού παρατηρείται στο 20-25% των μηχανικά αεριζόμενων ασθενών και αντιστοιχεί στο 40% περίπου του συνολικού χρόνου παραμονής στον αναπνευστήρα [104-108]. Οδηγεί σε παράταση του χρόνου παραμονής στη ΜΕΘ, υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα και αυξημένο κόστος νοσηλείας [109]. Η δυσκολία στον απογαλακτισμό από τον αναπνευστήρα, λόγω της αδυναμίας των αναπνευστικών μυών να αναλάβουν το έργο της αναπνοής, μπορεί να οφείλεται και σε πλήθος άλλων παραγόντων που συνυπάρχουν στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς, όπως η σήψη, η χορήγηση κορτικοστεροειδών, αντιβιοτικών, κατασταλτικών φαρμάκων, αποκλειστών της νευρομυϊκής σύναψης καθώς και σε διαταραχές θρέψης [110-112]. Πλήθος φαρμακολογικών παραγόντων και μοντέλων υποβοηθούμενου αερισμού έχουν δοκιμαστεί τις τελευταίες δεκαετίες με στόχο τον ταχύτερο απογαλακτισμό από τον αναπνευστήρα (weaning) [108, 113, 114].

Μοντέλα Υποβοηθούμενα Αερισμού

Η υπόθεση ότι η διατήρηση κάποιου βαθμού νευρικής και μηχανικής δραστηριότητας του διαφράγματος κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μυϊκής ατροφίας και της λειτουργικής έκπτωσης του διαφράγματος έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες σε πειραματόζωα, αλλά και σε ανθρώπους.

Η μελέτη των Ayas και συν. ήταν η πρώτη μελέτη σε ανθρώπους προς αυτή την κατεύθυνση και αφορούσε ασθενή που βρισκόταν σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό (PC) επί 8 μήνες λόγω

τραυματικής κάκωσης του νωτιαίου μυελού στο επίπεδο A₃. Η σύσπαση του δεξιού ημιδιαφράγματος με την εφαρμογή ηλεκτρικής διέγερσης στο σύστοιχο φρενικό νεύρο για 30 min ημερησίως οδήγησε σε μειωμένη μυική ατροφία και υψηλότερο αναπνεόμενο όγκο του ημιδιαφράγματος, σε σχέση με το αριστερό ημιδιάφραγμα που ήταν τελείως ανενεργές [115].

Στη μελέτη των Sassoon και συν. τα πειραματόζωα που αερίστηκαν επί τρεις ημέρες με μοντέλο υποβοηθούμενου αερισμού assist control είχαν μειωμένη έκφραση του MAF-box, γονιδίου που σχετίζεται με τη μυική ατροφία, σε σχέση με τα πειραματόζωα που αερίστηκαν με ελεγχόμενο μοντέλο αερισμού της ίδιας διάρκειας. Επίσης, τα ίδια πειραματόζωα εμφάνισαν μικρότερη μείωση της συσπαστικής δύναμης του διαφράγματος, όπως καταδείχθηκε από την ικανότητα του διαφράγματος για τετανική σύσπαση (tetanic force), με αποτέλεσμα τη μείωση του tetanic force κατά 14% στο assist control, έναντι 48% στον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό [116].

Οι Futier και συν. κατέδειξαν ότι η υποβοηθούμενη αυτόματη αναπνοή ποντικών με pressure support 5-7 cmH₂O, σε αντίθεση με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό, δεν προκάλεσε σημαντική μείωση στη σύνθεση πρωτεϊνών, ούτε σημαντική αύξηση στην πρωτεόλυση, ανεξάρτητα από τη διάρκεια (6 ή 18 ώρες). Το PSV εξασφάλισε, επομένως, καλύτερο ισοζύγιο πρωτεϊνών του διαφράγματος, παρά το γεγονός ότι η μεγάλη διάρκειά του (> 18 ώρες) συνοδεύτηκε από αυξημένο οξειδωτικό stress σε επίπεδα συγκρίσιμα με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό [117].

Στη μελέτη των Jung και συν. αποδείχτηκε η διατήρηση των ιδιοτήτων του διαφράγματος in vivo και in vitro σε πειραματόζωα που αερίστηκαν με Adaptive Support Ventilation (ASV) διάρκειας 72 ωρών, σε σύγκριση με αυτά που αερίστηκαν με ελεγχόμενο μοντέλο ίσης διάρκειας. Στον ASV η

διαδιαφραγματική πίεση (Pdi), όπως μετρήθηκε in vivo, δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε όλη τη διάρκεια του αερισμού, ενώ στο ελεγχόμενο μοντέλο μειώθηκε σημαντικά μετά τις 48 ώρες αερισμού. Στην in vitro ιστολογική εξέταση του διαφράγματος διαπιστώθηκε εκσεσημασμένη μυϊκή ατροφία μόνο στην ομάδα του ελεγχόμενου αερισμού που αφορούσε τόσο τις slow - όσο και τις fast - twitch ίνες της μυοσίνης [118].

Οι Gayan-Ramirez και συν. απέδειξαν ότι η αυτόματη αναπνοή, όταν επιτρεπόταν διαλειπόντως κατά τη διάρκεια του ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού διάρκειας 24 ωρών σε πειραματόζωα, μείωσε τις βλαπτικές συνέπειες του μηχανικού αερισμού, όσον αφορά στη συσταλτική ικανότητα του διαφράγματος, στο μέγεθος των μυικών ινών και στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων [119].

Οι Hudson και συν. διαπίστωσαν τη δυσλειτουργία του διαφράγματος σε πειραματόζωα μετά από αερισμό με high-level PS (> 8 cmH₂O) διάρκειας 12 και 18 ωρών, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό αντίστοιχης διάρκειας. Η μέγιστη ικανότητα τετανικής σύσπασης μειώθηκε κατά 16% μετά από 18 ώρες PS, ενώ μειώθηκε κατά 24% μετά από ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό ίσης διάρκειας. Επίσης, η αύξηση του οξειδωτικού stress και του καταβολισμού των πρωτεϊνών και η επακόλουθη μυϊκή ατροφία συνέβησαν με βραδύτερο ρυθμό στον αερισμό με pressure support και μόνο μετά από τις 18 ώρες [68].

Συμπερασματικά, διάφορα μοντέλα υποβοηθούμενου αερισμού, όπως το pressure support, το assist control και το adaptive support [120, 121] έχουν αποδειχτεί ότι μειώνουν τις βλαβερές συνέπειες του μηχανικού αερισμού πάνω στην ιστολογία και τη λειτουργία του διαφράγματος και τα τελευταία χρόνια αποτελούν την πρώτη επιλογή σε ασθενείς που έχουν ανάγκη μηχανικού αερισμού, χωρίς να απαιτείται η χορήγηση νευρομυϊκού αποκλειστή. Αποτελεί ανοιχτό πεδίο έρευνας στο

μέλλον να αποδειχτεί ότι και άλλοι νεότεροι τύποι αερισμού έχουν πλεονεκτικότερη επίδραση πάνω στο διάφραγμα, σε σχέση με τον συμβατικό ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Αγγειογένεση σημαίνει την πολύπλοκη διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα. Στους σκελετικούς μύες η αγγειογένεση αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό κατά τη διάρκεια της μυϊκής άσκησης προκειμένου να αυξηθεί η παροχή O_2 και επομένως, να αυξηθεί η λειτουργική τους απόδοση. Χωρίς να έχουν εξακριβωθεί πλήρως οι συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η αγγειογένεση, φαίνεται ότι πυροδοτείται από ερεθίσματα μεταβολικά, όπως η ιστική υποξία και μηχανικά. Τα τελευταία ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: (α) τους αιμοδυναμικούς παράγοντες που δρουν πάνω στο τοίχωμα των αγγείων από την εσωτερική πλευρά (luminal side), δηλαδή στο ενδοθήλιο, όπως η τάση (wall stress) και οι δυνάμεις τριβής (shear stress) και (β) τις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στο τοίχωμα των αγγείων από την εξωτερική πλευρά (abluminal side) και προέρχονται από την επαναλαμβανόμενη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυϊκών ινών [21, 22, 26, 38, 41, 122]. Η διαδικασία της αγγειογένεσης περιλαμβάνει την αποδόμηση της βασικής μεμβράνης (basic membrane) και του εξωκυττάριου ιστού του ενδοθηλίου (extracellular matrix) και την επακόλουθη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον διάμεσο χώρο, όπου πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν αγγειακές 'εκβλαστήσεις' (sprouts). Στο τέλος τα νεοσχηματισθέντα αγγεία συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά με το υπάρχον αγγειακό δίκτυο.

Για την έναρξη και το συντονισμό των παραπάνω πολύπλοκων διεργασιών απαιτείται η δράση των ειδικών αυξητικών παραγόντων. Ο παράγοντας **VEGF** (Vascular Endothelial Growth

Factor) είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [43-46]. Διεγείρει την παραγωγή πρωτεασών που είναι απαραίτητες για τη διάσπαση της βασικής μεμβάνης στο αρχικό στάδιο της αγγειογένεσης [49]. Ο **bFGF** (basic Fibroblast Growth Factor) αποτελεί ισχυρό μιτογόνο παράγοντα για τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Επίσης, οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση του παράγοντα VEGF [28, 29, 54, 57]. Ο παράγοντας **TGF-β1** (Transforming Growth Factor-β1) που παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενισχύει την αγγειογένεση στρατολογώντας περικύτταρα που συνδέονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην εξωτερική επιφάνεια του αυλού, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση των νεοσχηματισθέντων τριχοειδών [46, 59].

Οι αναπνευστικοί μύες είναι σκελετικοί μύες που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά των σκελετικών μυών, δηλαδή αυξάνουν την πυκνότητα των αγγείων τους σε συνθήκες αυξημένων μεταβολικών αναγκών, όπως η μυϊκή άσκηση αντοχής (endurance training). Το διάφραγμα έχει ζωτική σημασία για τη λειτουργία της αναπνοής καθώς συσπάται ρυθμικά καθόλη τη διάρκεια της ζωής σε συνθήκες που προσομοιάζουν με life-long endurance training. Εφόσον η δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια των αναπνευστικών μυών, ιδιαίτερα του διαφράγματος, αποτελεί κατάσταση απειλητική για τη ζωή, η αγγειογένεση των μυών αυτών σε συνθήκες αυξημένης ή μειωμένης συσταλτικής δραστηριότητας αποτελεί σημαντικό πεδίο επιστημονικής έρευνας.

Ο μηχανικός αερισμός προκαλεί τη μηχανική αποφόρτιση (unloading) και τη νευρική αδράνεια του διαφράγματος. Οι μυϊκές ίνες του διαφράγματος δεν συσπώνται ενεργητικά, αλλά υφίστανται παθητικά κυκλικές μεταβολές κάμψης και έκτασης κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κύκλων. Τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους, έχουν παρατηρηθεί μυϊκή ατροφία (disuse

atrophy) και μείωση της συσταλτικής ικανότητας του διαφράγματος μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό [75, 101, 123]. Λίγα δεδομένα υπάρχουν μέχρι σήμερα για το πώς επηρεάζεται η λειτουργία της αγγειογένεσης στο διάφραγμα σε συνθήκες μειωμένης συσταλτικής δραστηριότητας, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Η μελέτη της αγγειογένεσης του διαφράγματος, σε συνάρτηση με τη μηχανική του δραστηριότητα, κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού, θα αποτελέσει μία νέα παράμετρο για την κατανόηση και την αντιμετώπιση της λειτουργικής διαταραχής του διαφράγματος σε ασθενείς που βρίσκονται σε παρατεταμένο μηχανικό αερισμό.

Σκοπός της Διατριβής

Σκοπός της διατριβής ήταν να διερευνήσει τη μεταβολή της αγγειογένεσης στο διάφραγμα ασθενών που βρίσκονται υπό γενική αναισθησία, κατά τη διάρκεια διαφορετικών τύπων αερισμού, οι οποίοι συνεπάγονται διαφορετικό βαθμό ενεργητικής σύσπασης και μηχανικής φόρτισης του διαφράγματος. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των παραγόντων αγγειογένεσης VEGF, bFGF και TGF- β 1 στο διάφραγμα, ως ανταπόκριση στην: α) ενεργητική σύσπαση του διαφράγματος κατά τη διάρκεια αυτόματης αναπνοής σε μοντέλο αερισμού υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support ventilation, PSV) και β) παθητική κίνηση του διαφράγματος κατά τη διάρκεια ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού (controlled mechanical ventilation, CMV), με ή χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό. Η υπόθεση της μελέτης ήταν ότι η διατήρηση της ενεργητικής σύσπασης του διαφράγματος στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης οδηγεί σε αύξηση της διαδικασίας της αγγειογένεσης, σε αντίθεση με την παθητική σύσπαση του διαφράγματος στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό.

ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μελέτη έχει εγκριθεί από την επιτροπή ηθικής δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και όλοι οι ασθενείς έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση μετά από σχετική ενημέρωση για το είδος της μελέτης και την εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Πρόκειται για τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη.

Ασθενείς

Μελετήθηκαν ασθενείς γυναίκες που ανήκαν στις κατηγορίες I-II κατά ASA και υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη ολική υστερεκτομή. Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν: (α) η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το άσθμα, οι διάμεσες και άλλες πνευμονοπάθειες, (β) η σκολίωση της θωρακικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης, (γ) η μυασθένεια και άλλες νευρομυικές νόσοι, (δ) ο σακχαρώδης διαβήτης, (ε) η παχυσαρκία (BMI > 35) και (στ) η θεραπεία με κορτικοστεροειδή ή αναβολικά.

Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες, ανάλογα με το τύπο του αερισμού που έλαβαν διεγχειρητικά. Στην ομάδα Α έλαβαν ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό με νευρομυικό αποκλειστή, στην ομάδα Β ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυικό αποκλειστή και στην ομάδα Γ μηχανικό αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης.

Τεχνική Γενικής Αναισθησίας

Όλες οι ασθενείς είχαν υποβληθεί στον συνήθη προεγχειρητικό εργαστηριακό και παρακλινικό έλεγχο (γενική αίματος, βιοχημικός έλεγχος και ψευδοχοληνηστεράση πλάσματος,

έλεγχος πηκτικότητας, ΗΚΓμα, α/α θώρακος). Επιπλέον έγιναν μέτρηση των αερίων αρτηριακού αίματος και σπιρομέτρηση (FEV_1 , FVC, FEV_1/FVC) σε όλες τις ασθενείς 24 ώρες πριν και 48 ώρες μετά την επέμβαση. Οι ασθενείς έλαβαν συνδυασμένη γενική και επισκληρίδιο θωρακική αναισθησία.

Όλοι οι ασθενείς ενυδατώθηκαν προεγχειρητικά με 1000 ml Ringer's Lactated και 500 ml κολλοειδούς διαλύματος προκειμένου να αποτραπεί η υπόταση κατά την εισαγωγή και τη συντήρηση της αναισθησίας. Διεγχειρητικά, εφαρμόστηκε το βασικό μη επεμβατικό monitoring [ΗΚΓ, παλμική οξυμετρία (SpO_2), καпноγραφία, θερμοκρασία οισοφάγου] καθώς και αιματηρή μέτρηση της αρτηριακής πίεσης. Επισκληρίδιος καθετήρας τοποθετήθηκε στο μεσοσπονδύλιο διάστημα Θ_{9-10} πριν την εισαγωγή στην αναισθησία. Για την εισαγωγή στην αναισθησία χορηγήθηκαν φεντανύλη 2-3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, προποφόλη 2 mg Kg^{-1} και ένας νευρομυϊκός αποκλειστής ανάλογα με την ομάδα της τυχαιοποίησης. Για τη διεγχειρητική αναλγησία χορηγήθηκε τοπικό αναισθητικό (ροπιβακαΐνη 0.5%) επισκληριδίως (12-15 ml εφάπαξ και 5-6 ml h^{-1}). Η συντήρηση της αναισθησίας έγινε με πτητικό αναισθητικό (σεβοφλουράνιο) τιτλοποιημένο ανάλογα με το Διφασματικό Δείκτη (Bispectral Index-BIS monitor, Aspect Medical Systems, Norwood, MA) [125]. Διεγχειρητικά, οι ασθενείς στις ομάδες Α και Β είχαν BIS 40 ± 5 που αντιστοιχεί σε χειρουργικό βάθος αναισθησίας, ενώ οι ασθενείς στην ομάδα Γ είχαν BIS 60 ± 5 , που αντιστοιχεί σε ελαφρύ βάθος αναισθησίας, προκειμένου να αποφευχθεί η καταστολή του αναπνευστικού κέντρου και να διατηρείται η αυτόματη αναπνοή. Προκειμένου να διαπιστωθεί διεγχειρητικά αν το διάφραγμα συσπάται ενεργητικά ή ακολουθεί παθητικά τους αναπνευστικούς κύκλους από τον αναπνευστήρα τοποθετήθηκε σε όλους τους ασθενείς ένας καθετήρας με μπαλόνι στο κατώτερο τριτημόριο του οισοφάγου και ένας δεύτερος καθετήρας στο στομάχι. Η τοποθέτηση των καθετήρων έγινε πριν την εισαγωγή στην

αναισθησία και επιβεβαιωνόταν η κατάλληλη θέση των καθετήρων με την εκούσια εισπνευστική προσπάθεια των ασθενών [126]. Όλοι οι ασθενείς ανέπνεαν μίγμα O_2 / αέρα με εισπνεόμενη συγκέντρωση O_2 35-50%, ώστε να έχουν παλμική οξυμετρία $SpO_2 > 97\%$. Σε περίπτωση μείωσης της συστολικής αρτηριακής πίεσης πάνω από 20% της τιμής baseline για περισσότερο από 10 min χορηγούνταν μία εφάπαξ δόση ενός αγγειοσυσπαστικού παράγοντα (εφεδρίνη). Ανάλογα με τον τύπο του μηχανικού αερισμού που έλαβαν διεγχειρητικά, οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες.

Ομάδα Α: Ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός με νευρομυϊκό αποκλειστή. Οι ασθενείς έλαβαν ένα μη αποπλωτικό νευρομυϊκό αποκλειστή μέσης διάρκειας δράσης (ροκουρόνιο 0.5 mg Kg^{-1}) για την ενδοτραχειακή διασωλήνωση και τέθηκαν σε μηχανικό αερισμό ελεγχόμενου όγκου (Volume control) με αναπνεόμενο όγκο $6-8 \text{ ml Kg}^{-1}$ ιδεώδους σωματικού βάρους, αναπνευστική συχνότητα $12-14 \text{ αναπνοές min}^{-1}$, PEEP $6-8 \text{ mmHg}$ και ροή φρέσκων αερίων 2 L min^{-1} . Εφαρμόστηκε monitoring της νευρομυϊκής σύναψης με περιφερικό νευροδιεγέρτη για διατήρηση του Train of Four (TOF) [124] 0, προκειμένου να εξασφαλιστούν συνθήκες βαθέος νευρομυϊκού αποκλεισμού σε όλη τη διάρκεια της επέμβασης .

Ομάδα Β: Ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός χωρίς νευρομυϊκό αποκλειστή. Οι ασθενείς έλαβαν για την ενδοτραχειακή διασωλήνωση σουκινυλοχολίνη (1 mg Kg^{-1}) που είναι αποπλωτικός νευρομυϊκός αποκλειστής με βραχεία διάρκεια δράσης (3-5 min). Μέχρι το τέλος της επέμβασης δεν χορηγήθηκε άλλος νευρομυϊκός αποκλειστής. Ο αερισμός των ασθενών έγινε με μοντέλο μηχανικού αερισμού ελεγχόμενου όγκου (Volume control) στις ίδιες ρυθμίσεις με την προηγούμενη ομάδα.

Ομάδα Γ: Μηχανικός αερισμός υποβοηθούμενης πίεσης (PSV): Οι ασθενείς έλαβαν σουκινυλοχολίνη (1mg Kg^{-1}) για την ενδοτραχειακή διασωλήνωση και κανένα άλλο νευρομυϊκό αποκλειστή. Ανέπνεαν αυτόματα σε PSV σε όλη τη διάρκεια της επέμβασης. Η ευαισθησία (trigger) του αναπνευστήρα ρυθμίστηκε σε $1-1.5\text{ L min}^{-1}$ και το επίπεδο του PS τιτλοποιήθηκε ώστε να επιτυγχάνεται αναπνεόμενος όγκος $6-8\text{ ml Kg}^{-1}$ ιδεώδους σωματικού βάρους.

Καταγραφές

Κατά τη διεγχειρητική περίοδο, καταγράφονταν κάθε 15 min διάφορες αιμοδυναμικές παράμετροι, όπως καρδιακή συχνότητα, συστολική & μέση αρτηριακή πίεση, καθώς και αναπνευστικές όπως αναπνευστική συχνότητα, αναπνεόμενος όγκος, κατά λεπτό αερισμός, μέγιστη (peak) & plateau εισπνευστική πίεση και θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP). Καταγράφονταν οι κυματομορφές της γαστρικής πίεσης (P_{ga}), της οισοφαγικής πίεσης (P_{es}) και της διαδιαφραγματικής πίεσης ($P_{di} = P_{ga} - P_{es}$). Η καταγραφή των κυματομορφών των παραπάνω πιέσεων χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ως ποιοτική μέθοδος ανίχνευσης των ενεργητικών συσπάσεων του διαφράγματος και δεν γινόταν ποσοτική μέτρηση των πιέσεων. Γινόταν ανάλυση αερίων αρτηριακού αίματος στους ίδιους χρόνους και καταγράφονταν οι μερικές πιέσεις του O_2 & CO_2 και το SaO_2 .

Συλλογή δειγμάτων

Σε κάθε ασθενή λαμβάνονταν 2 δείγματα ($1-1.5\text{ cm}^3$) από την ίδια περιοχή της πλευρικής μοίρας του διαφράγματος σε δύο χρόνους: 30 min μετά την εισαγωγή στην αναισθησία (t_1 , χρόνος ελέγχου) και 90 min αργότερα (t_2). Όλα τα δείγματα λαμβάνονταν από τον ίδιο χειρουργό και αμέσως μετά τη

λήψη τους μεταφέρονταν με υγρό άζωτο στους -80°C όπου και αποθηκεύονταν μέχρι την ανάλυσή τους.

Εκχύλιση mRNA και μεταγραφή cDNA

Σε όλα τα ιστοτεμάχια έγινε εκχύλιση ολικού mRNA με τη χρήση του πρωτοκόλλου του TRIzol (Invitrogen, Carlsband, CA). Οι ιστοί ομογενοποιούνται παρουσία του TRIzol και το mRNA εκχυλίζεται με τη βοήθεια χλωροφορμίου, κατακρημνίζεται με τη χρήση ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με 75% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 20 μl DEPC (diethyl pyrocarbonate) treated H_2O . Για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του mRNA κάθε δείγματος, έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 260 και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του mRNA προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 260 nm, ενώ η καθαρότητα (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών ή και DNA) προσδιορίζεται από το λόγο απορρόφησης στα 260 και 280 nm (260/280). Για τη σύνθεση του cDNA μέσω της ανάστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το RETROscript[®] kit (Ambion, Austin, TX) με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (random decamers). Αναλυτικότερα, 2.5 μg ολικού mRNA και 5 μM τυχαίων εκκινητών θερμαίνονται στους 80°C για 3 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο μέχρι την προσθήκη του μίγματος για τη σύνθεση του cDNA, που περιλαμβάνει 1 \times RT Buffer, 0.5 mM dNTPs Mix, 10 μονάδες αναστολέα της RNAάσης και 100 μονάδες MMLV – RT αντίστροφη μεταγραφάση. Το τελικό μίγμα (όγκος 20 μl) κατακρημνίζεται στους 55°C για 60 min. Η αντίδραση τερματίζεται θερμαίνοντας το τελικό μίγμα στους 92°C για 10 min. Το cDNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η έκφραση του mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF και TGF-β1 μετρήθηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) πραγματικού χρόνου (Real-Time) με τη χρήση SYBR Green I dye. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Οι ειδικοί mRNA εκκινητές (primers) σχεδιάστηκαν με το Lasergene 7.0 software (DNASTAR, Madison, WI), ώστε κάθε εκκινητής να ανήκει σε διαφορετικό εξώνιο και το ιντρόνιο να είναι μεγαλύτερο από 800 bp (Πίνακας 1).

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Αναφορά (bp)
VEGF	ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG	91
	CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG	
bFGF	CTGGCTATGAAGGAAGATGGA	149
	TGCCCAGTTCGTTTCAGTG	
TGF-β1	AAGGACCTCGGCTGGAAGTG	137
	CCCGGGTTATGCTGGTTGTA	
β-ακτίνη	CGGCATCGTCACCAACTG	70
	GGCACACGCAGCTCATTG	

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική Real-time PCR.

Μετά από τα πρώτα πειράματα, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η θερμοκρασία πρόσδεσης (annealing) των εκκινητών, 1 µl cDNA από τα ληφθέντα δείγματα στους χρόνους t_1 και t_2 ενισχύθηκε σε PCR αντίδραση που περιείχε $2 \times$ Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, που περιέχει 2.5 mM MgCl₂) και 300 nM από κάθε εκκινητή σε ένα τελικό όγκο 20 µl. Οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου στόχου και της β-ακτίνης έγιναν σε διαφορετικά 96-well plates. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν

στο Mx3000 Real-Time Thermal Cycler (Stratagene) software 4.10 με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 min για την αποδιάταξή τους και την ενεργοποίηση της hot-start πολυμεράσης, 40 κύκλοι ενίσχυσης που περιλαμβάνουν αποδιάταξη στους 95°C για 20 sec, υβριδισμός των εκκινητών στους 60°C (ο VEGF, ο TGFβ1 και η β-ακτίνη) ή στους 55°C (ο bFGF) για 30 sec και πολυμερισμός στους 72°C για 30 sec. Μετά το πέρας των κύκλων του πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους από τους 55°C στους 95°C με ρυθμό 0.2 °C/sec.

Η συλλογή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης και του πολυμερισμού, με δύο μετρήσεις σε κάθε βήμα, και σε όλες τις στιγμές κατά τη διάρκεια της melt curve ανάλυσης. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση ενδεικτικά κάποιων δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2 %, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφιση των PCR προϊόντων κάτω από υπεριώδες φως (UV). Προκειμένου να διασφαλιστεί η ακρίβεια των ποσοτικών μετρήσεων μία αντιπροσωπευτική δεξαμενή από όλα τα δείγματα υποβλήθηκε σε 6 διαδοχικές 2 × αραιώσεις και χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της standard καμπύλης.

Χρησιμοποιώντας τις standard καμπύλες και τα Ct values των δειγμάτων υπολογίστηκε η έκφραση mRNA των γονιδίων των αγγειογενετικών παραγόντων. Δείγματα χωρίς καμπύλη ενίσχυσης που εμφάνιζαν σχηματισμό διμερών των εκκινητών ή παραπροϊόντων αποκλείστηκαν. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης του mRNA έγινε ο προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας τόσο του αγγειογενετικού παράγοντα (VEGF, bFGF, TGFβ1) όσο και της β-ακτίνης και υπολογίστηκε ο λόγος τους. Αναλογίες δειγμάτων μεγαλύτερες από 2 θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση του γονιδίου, ενώ μικρότερες του 0.5 θεωρήθηκαν ως υποέκφραση. Σε κάθε αντίδραση PCR συμπεριλήφθηκαν

δύο αρνητικά control δείγματα, ένα χωρίς cDNA και ένα χωρίς επεξεργασία με αντίστροφη μεταγραφάση. Όλες οι μετρήσεις της qPCR πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες.

Στατιστική Ανάλυση

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών καθώς και οι σπυρομετρικές και διεγχειρητικές (αναπνευστικές και αιμοδυναμικές) παράμετροι εξετάστηκαν με το one-sample Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit προκειμένου να διαπιστωθεί αν ακολουθούν κανονική κατανομή ή όχι. Οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων ανάμεσα στις τρεις ομάδες συγκρίθηκαν με το Kruskal Wallis H test και προσδιορίστηκαν τα p_g , ενώ ανάμεσα στους χρόνους t_1 και t_2 σε κάθε ομάδα συγκρίθηκαν με το Mann-Whitney U test (2-tailed) και προσδιορίστηκαν αντίστοιχα τα p_t . Τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, bFGF και TGF- β 1 συγκρίθηκαν στις ομάδες, ανάμεσα στους χρόνους t_1 και t_2 , χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (2-tailed). Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 95% με $p < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη συμπεριέλαβε 32 γυναίκες: 13 στην ομάδα Α, 10 στην ομάδα Β και 9 στην ομάδα Γ. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες, σχετικά με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και τις προεγχειρητικές τιμές FEV₁ και FEV₁/FVC των ασθενών, όπως φαίνεται από τις τιμές των p_g (Πίνακας 2).

Παράμετρος	Ομάδα Α (n=13)	Ομάδα Β (n=10)	Ομάδα Γ (n=9)	p _g [*]
Ηλικία (έτη)	50.3±6.0	51.2±7.7	53.0±7.8	0.81
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)	32.6±3.7	30.1±3.1	30.8±5.5	0.45
Κάπνισμα (pack/years)	12.7±14.2	8.3±13.3	12.0±4.5	0.35
FEV ₁ (% pred)	112.6±14.0	105.4±10.4	94.4±5.7	0.07
FEV ₁ /FVC	85.6±8.6	81.4±11.8	82.0±2.3	0.77

Πίνακας 2. Δημογραφικά στοιχεία & σπυρομετρικές παράμετροι των ασθενών. [Όπου: *P_g = p-value ανάμεσα στις τρεις ομάδες (Kruskal-Wallis H test), FEV₁ = Βίαια εκπνεόμενος όγκος σε 1 sec, FVC = Βίαιη ζωτική χωρητικότητα].

Οι τιμές των αναπνευστικών παραμέτρων (αναπνεόμενος όγκος, αναπνευστική συχνότητα, P_{peak}, P_{plateau}, PEEP, PaCO₂, PaO₂) και των αιμοδυναμικών παραμέτρων (συστολική & μέση αρτηριακή πίεση), διεγχειρητικά, ήταν συγκρίσιμες ανάμεσα στις ομάδες και στους δύο χρόνους, t₁ και t₂ (όπως φαίνεται από τις τιμές των p_g) αλλά και ανάμεσα στους χρόνους t₁ και t₂, στους ασθενείς της ίδιας ομάδας (όπως φαίνεται από τις τιμές των p_t) (Πίνακες 3 & 4)

Παράμετρος		Ομάδα Α (n=13)	Ομάδα Β (n=10)	Ομάδα Γ (n=9)	P_g^*
V_T (ml)	't ₁ '	560.0±83.2	528.3±34.3	500.4±63.0	0.33
	't ₂ '	516.7±51.7	518.3±19.4	538.0±41.5	0.41
	P_t^\dagger	0.19	0.57	0.21	
RR (min⁻¹)	't ₁ '	12.0±1.0	11.8±1.0	11.8±1.9	0.65
	't ₂ '	11.6±1.4	11.7±1.0	11.6±1.5	0.35
	P_t	0.35	0.54	0.67	
P_{peak} (cmH₂O)	't ₁ '	23.1± 0.5	23.2±0.4	22.4±0.3	0.61
	't ₂ '	22.4±0.2	21.2±0.4	22.5±0.2	0.63
	P_t	0.32	0.42	0.20	
P_{plateau} (cmH₂O)	't ₁ '	18.3±0.8	19.0±0.5	19.2±0.8	0.64
	't ₂ '	18.5±0.6	19.2±0.8	20.2±0.6	0.54
	P_t	0.35	0.32	0.55	
PaO₂ (mmHg)	't ₁ '	143.1±38.3	169.0±61.0	140.0±53.8	0.48
	't ₂ '	139.8±22.8	161.7±40.0	132.0±32.4	0.51
	P_t	0.72	0.87	0.92	
PaCO₂ (mmHg)	't ₁ '	35.2±3.5	37.5±5.3	40.3±6.5	0.11
	't ₂ '	37.7±3.8	38.7±2.7	37.1±4.3	0.83
	P_t	0.14	0.46	0.30	
pH	't ₁ '	7.46±0.03	7.45±0.04	7.42±0.02	0.19
	't ₂ '	7.44±0.04	7.44±0.02	7.43±0.04	0.67
	P_t	0.62	0.68	0.34	

Πίνακας 3: Διεγχειρητικές αναπνευστικές παράμετροι των ασθενών. [Όπου: * P_g = p-value ανάμεσα στις τρεις ομάδες (Kruskal-Wallis H test), $^\dagger P_t$ = p-value ανάμεσα στους χρόνους t_1 (χρόνος 1^{ου} δείγματος, ελέγχου) και t_2 (χρόνος 2^{ου} δείγματος) μέσα σε κάθε ομάδα (2-tailed Mann-Whitney U test), TV = Αναπνεόμενος όγκος, RR = Αναπνευστική συχνότητα, PaO₂ = Μερική πίεση O₂ στο αρτηριακό αίμα, PaCO₂ = Μερική πίεση CO₂ στο αρτηριακό αίμα].

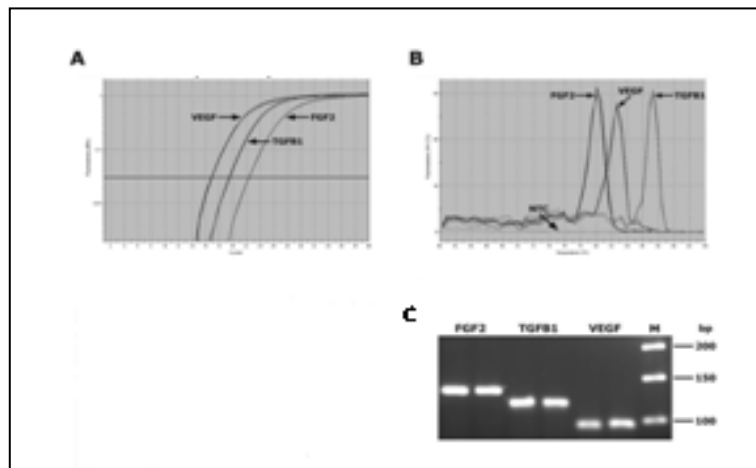
Παράμετρος		Ομάδα Α (n=13)	Ομάδα Β (n=10)	Ομάδα Γ (n=9)	P_g^*
ΣΑΠ (mmHg)	't ₁ '	105.9±17.3	98.2±9.4	106.4±10.2	0.43
	't ₂ '	97.6±18.4	101.2±7.1	105.2±12.2	0.19
P_t^\dagger		0.29	0.52	0.92	
ΜΑΠ (mmHg)	't ₁ '	77.3±13.4	74.0±5.1	71.2±7.3	0.73
	't ₂ '	69.3±16.2	74.5±7.6	73.2±10.5	0.26
P_t		0.19	0.81	0.92	

Πίνακας 4: Διεγχειρητικές αιμοδυναμικές παράμετροι των ασθενών. [Όπου: * P_g = p-value ανάμεσα στις τρεις ομάδες (Kruskal-Wallis H test), $^\dagger P_t$ = p-value ανάμεσα στους χρόνους t₁ (χρόνος 1^ο δείγματος, ελέγχου) και t₂ (χρόνος 2^ο δείγματος) μέσα σε κάθε ομάδα (2-tailed Mann-Whitney U test), ΣΑΠ = Συστολική αρτηριακή Πίεση, ΜΑΠ = Μέση Αρτηριακή Πίεση].

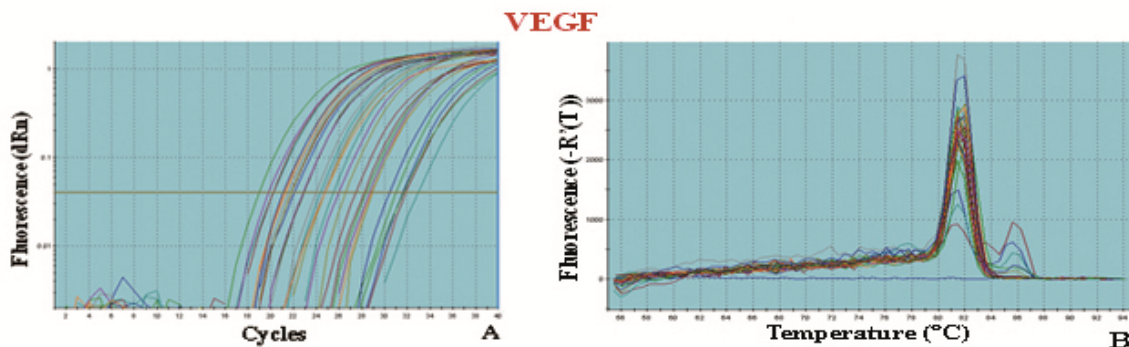
Η καταγραφή των κυματομορφών των πιέσεων Pga, Pes και Pdi κατέδειξε ότι στους ασθενείς των ομάδων Α και Β, που έλαβαν ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό, δεν υπήρχαν ενεργητικές συσπάσεις του διαφράγματος σε όλο το διάστημα μεταξύ των χρόνων t₁ και t₂. Αντίθετα, στους ασθενείς της ομάδας Γ, που ανέπνεαν αυτόματα σε pressure support, το διάφραγμα συσπώταν ενεργητικά σε όλο το παραπάνω χρονικό διάστημα. Όλοι οι ασθενείς είχαν SpO₂ > 97% και ήταν αιμοδυναμικά σταθεροί σε όλη τη διάρκεια της επέμβασης. Οι απώλειες αίματος ήταν 200-300 ml και κανένας ασθενής δεν χρειάστηκε να του χορηγηθεί αγγειοσυσπαστικός παράγοντας.

Τα επίπεδα mRNA για τους τρεις αγγειογενετικούς παράγοντες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ποσοτικής Real-Time PCR σε δύο ιστοτεμάχια διαφράγματος για τον κάθε ασθενή, στους χρόνους t₁ και t₂. Τα αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR και πιο συγκεκριμένα, τα γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots), οι καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves) και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε UV των προϊόντων PCR σε

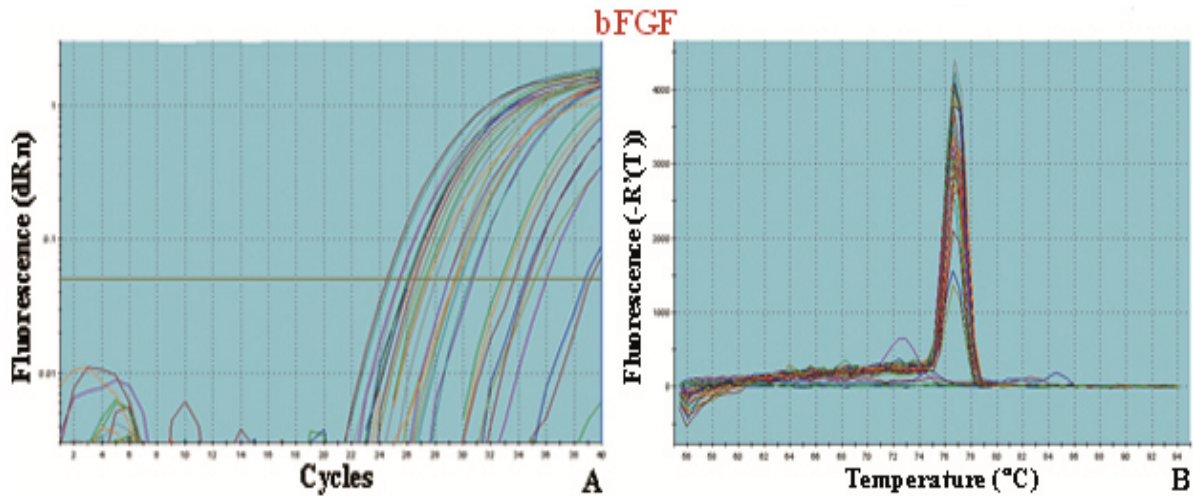
πήκτωμα αραρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, απεικονίζονται συγκεντρωτικά για τους παράγοντες VEGF, bFGF και TGF- β 1 (Σχήμα 4) και για τον κάθε παράγοντα χωριστά (Σχήματα 5-8). Στα τελευταία σχήματα απεικονίζονται και τα αντίστοιχα αποτελέσματα της Real-Time PCR για το γονίδιο της β -ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου.



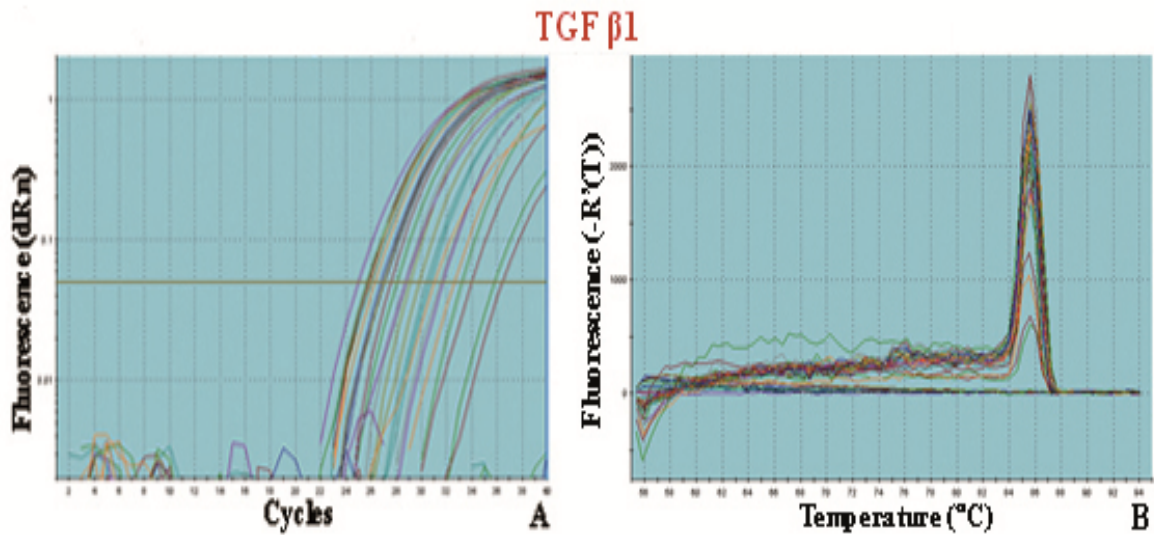
Σχήμα 4. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR[®] Green, για τους παράγοντες VEGF, bFGF και TGF- β 1. (A) Γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots) (B) Καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves) (C) Δείγματα μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. NTC: Non-template control. M: 50-bp DNA διάταξη.



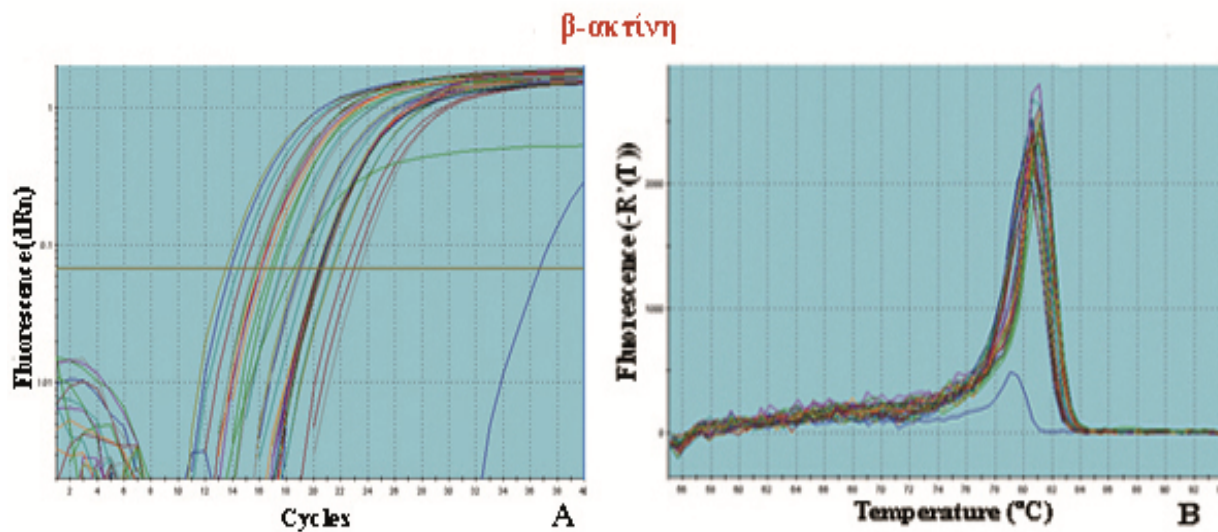
Σχήμα 5. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR για τον VEGF με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR[®] Green I: (A) Γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots) (B) Καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves).



Σχήμα 6. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR για τον bFGF με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR[®] Green I: (A) Γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots) (B) Καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves).



Σχήμα 7. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR για τον TGF- β1 με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR[®] Green I: (A) Γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots) (B) Καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves).



Σχήμα 8. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ποσοτικής Real-Time PCR για την β-ακτίνη με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR[®] Green I: (A) Γραφήματα ενίσχυσης (amplification plots) (B) Καμπύλες διαχωρισμού (dissociation curves).

Στην ομάδα A και οι τρεις αγγειογενετικοί παράγοντες εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα mRNA στο χρόνο t_2 σε σχέση με το χρόνο t_1 , χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά (**VEGF**: 1.75 ± 0.21 vs. 1.40 ± 0.19 , $p=0.29$, **bFGF**: 1.39 ± 0.19 vs. 1.17 ± 0.13 , $p=0.44$; **TGF- β 1**: 1.51 ± 0.12 vs. 1.36 ± 0.12 , $p=0.44$) (Πίνακας 5, Γραφήματα 5 & 6).

Στην ομάδα Γ, επίσης, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA και των τριών αγγειογενετικών παραγόντων, στο χρόνο t_2 σε σχέση με το χρόνο t_1 , μη στατιστικά σημαντική (**VEGF**: 1.63 ± 0.21 vs. 1.32 ± 0.12 , $p=0.17$, **bFGF**: 1.27 ± 0.17 vs. 0.99 ± 0.15 , $p=0.31$ **TGF- β 1**: 1.31 ± 0.26 vs. 0.97 ± 0.08 , $p=0.60$) (Πίνακας 5, Γραφήματα 5 & 6).

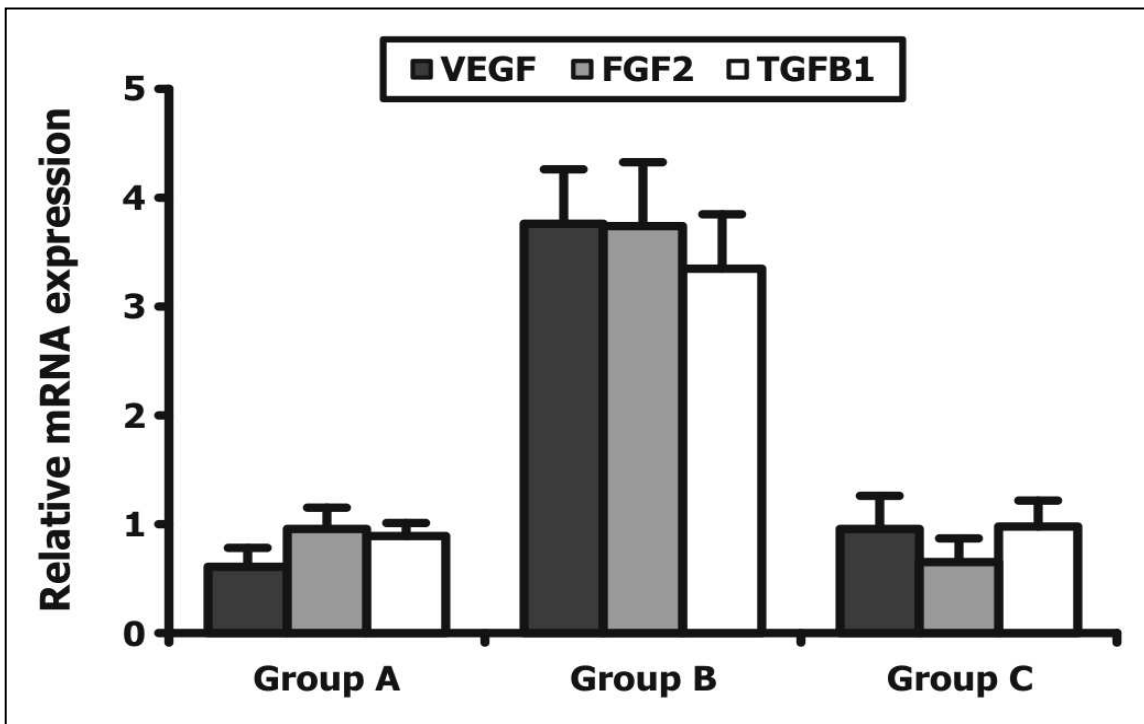
Αντιθέτως, στην ομάδα B τα επίπεδα mRNA του παράγοντα VEGF αυξήθηκαν κατά 3.7 φορές, στο χρόνο t_2 σε σχέση με το χρόνο t_1 (0.69 ± 0.11 vs. 2.54 ± 0.53), ενώ για τους παράγοντες bFGF και TGF- β 1 τα επίπεδα mRNA αυξήθηκαν κατά 2.1 φορές (**bFGF**: 1.53 ± 0.22 vs. 3.20 ± 0.56 ,

TGF-β1: 0.42±0.07 vs. 0.90±0.08). Η αύξηση των επιπέδων mRNA ήταν στατιστικά σημαντική για όλους τους αγγειογενετικούς παράγοντες ($p_{VEGF}=0.003$; $p_{bFGF}=0.028$; $p_{TGF-\beta1}=0.001$) (Πίνακας 5, Γραφήματα 5 & 6).

	No δείγματος	VEGF		bFGF		TGF-β1	
		t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂
Ομάδα Α	1	0.90	1.12	1.59	1.24	2.12	1.89
	2	1.35	1.23	0.89	1.02	0.87	1.05
	8	1.63	0.85	0.66	0.50	0.95	0.89
	13	1.98	1.45	1.48	0.95	1.54	1.32
	14	3.79	2.37	0.75	1.41	1.72	1.59
	15	1.55	1.34	2.22	1.69	1.78	1.24
	16	1.18	0.37	1.28	1.12	1.28	1.23
	18	0.89	1.57	0.95	1.02	0.98	0.87
	5	1.28	1.34	0.79	0.76	1.77	1.43
	23	1.80	2.15	3.07	2.22	2.24	1.95
	24	2.18	2.44	1.44	1.44	1.73	1.94
	25	2.43	0.31	1.63	0.71	1.15	0.55
	17	1.75	1.66	1.33	1.12	1.47	1.68
	Av.	1.75	1.40	1.39	1.17	1.51	1.36
	S.D.	0.77	0.67	0.67	0.45	0.44	0.44
	S.E.M.	0.21	0.19	0.19	0.13	0.12	0.12
p	0.29		0.44		0.44		
Ομάδα Β	3	1.10	5.37	2.01	6.57	0.32	1.12
	4	0.29	0.73	0.32	1.17	0.18	0.75
	7	0.78	5.06	2.44	4.78	0.58	1.45
	11	0.16	0.65	1.78	2.65	0.09	0.49
	12	1.23	3.45	0.97	2.17	0.52	0.78
	26	0.85	1.33	1.16	1.54	0.84	0.91
	27	0.93	1.28	0.82	1.11	0.27	0.77
	28	0.54	3.12	1.97	3.68	0.38	1.02
	29	0.37	2.44	1.58	4.42	0.44	0.88
	30	0.67	1.98	2.21	3.87	0.62	0.84
	Av.	0.69	2.54	1.53	3.20	0.42	0.90
	S.D.	0.35	1.69	0.68	1.78	0.22	0.26
	S.E.M.	0.11	0.53	0.22	0.56	0.07	0.08
	p	0.003		0.028		0.001	

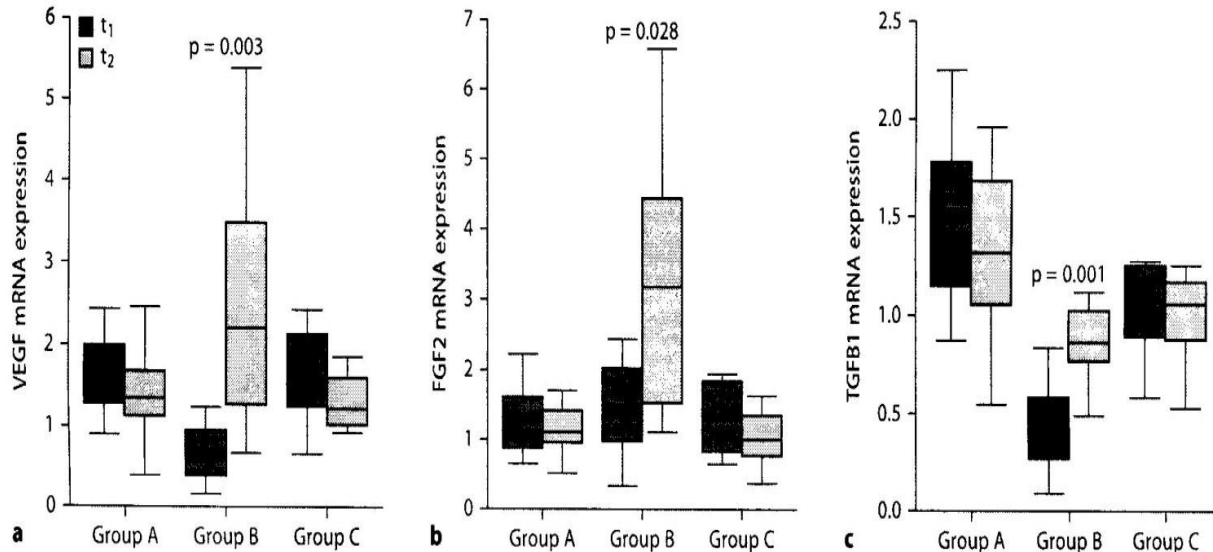
	No δείγματος	VEGF		bFGF		TGF- β 1	
		t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂
Ομάδα Γ	6	2.42	1.58	1.84	0.77	2.05	1.12
	9	2.12	1.56	1.01	0.37	3.08	1.19
	10	1.25	1.74	0.99	1.03	0.97	1.25
	19	1.63	0.92	1.91	1.34	0.89	0.90
	20	2.16	0.99	1.94	1.62	0.76	0.53
	21	0.70	1.04	0.84	0.83	0.58	1.06
	22	0.66	1.22	0.66	1.11	1.25	1.17
	31	1.77	1.85	1.39	1.47	1.03	0.88
	32	1.98	1.01	0.84	0.36	1.15	0.67
	Av.	1.63	1.32	1.27	0.99	1.31	0.97
	S.D.	0.64	0.36	0.51	0.45	0.78	0.25
	S.E.M.	0.21	0.12	0.17	0.15	0.26	0.08
	p-		0.17		0.31		0.60

Πίνακας 5. Τα επίπεδα των παραγόντων VEGF, bFGF και TGF- β 1 mRNA στις τρεις ομάδες στους χρόνους t₁ και t₂. [Όπου: Av= Average, S.D. = Standard Deviation, S.E.M. = Standard Error of the Mean].



Γράφημα 5. Κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA των παραγόντων VEGF, bFGF και TGF- β 1 στις τρεις ομάδες. (Ομάδα A: ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός με νευρομικό αποκλεισμό, Ομάδα B: ελεγχόμενος μηχανικός

αερισμός χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό, Ομάδα Γ: μηχανικός αερισμός υποβοηθούμενης πίεσης, *pressure support*). Επίπεδα mRNA μεγαλύτερα του 2 σημαίνουν υπερέκφραση του γονιδίου, μικρότερα του 0.5 σημαίνουν υποέκφραση, ενώ κοντά στο 1 σημαίνουν καμία ουσιαστική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου.



Γράφημα 6. Box and Whisker plots για τα κανονικοποιημένα επίπεδα των παραγόντων VEGF (a), bFGF (b) και TGF-β1(c) στις τρεις ομάδες (Ομάδα A: ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός με νευρομυϊκό αποκλεισμό, Ομάδα B: ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό, Ομάδα Γ: μηχανικός αερισμός υποβοηθούμενης πίεσης, *pressure support*). Μόνο στην ομάδα B τα επίπεδα mRNA όλων των παραγόντων ήταν αυξημένα στο χρόνο t₂ σε σχέση με το χρόνο t₁, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p_{VEGF}=0.003$, $p_{bFGF}=0.028$, $p_{TGF-\beta1}=0.001$, 2-tailed Mann-Whitney U test).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε αυξημένη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, bFGF και TGF- β 1, 120 min μετά την έναρξη του μηχανικού αερισμού (χρόνος t_2), σε σχέση με το χρόνο ελέγχου (30 min μετά την έναρξη του μηχανικού αερισμού, χρόνος t_1), στο διάφραγμα ασθενών, υπό γενική αναισθησία, που έλαβαν ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό για την πραγματοποίηση επέμβασης κάτω κοιλίας. Αντίθετα, η γονιδιακή έκφραση των παραγόντων αγγειογένεσης δεν αυξήθηκε στους παραπάνω χρόνους στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε (α) ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό με χορήγηση νευρομυϊκού αποκλεισμού και (β) μηχανικό αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support). Επομένως, δεν επιβεβαιώθηκε η αρχική μας υπόθεση ότι η διατήρηση της ενεργητικής σύσπασης του διαφράγματος κατά τον υποβοηθούμενο αερισμό με Pressure Support θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειογένεσης.

Αγγειογένεση & Μηχανικό Stress

Διάφραγμα

Η αυξημένη αγγειογένεση στους σκελετικούς μύες, ως απάντηση στη σύσπαση των σκελετικών μυϊκών ινών έχει μελετηθεί τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους και μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τα αίτια και τους μηχανισμούς της [36, 37, 63]. Σχετικά με την αγγειογένεση στο διάφραγμα, πρώτοι οι καθηγητές Σιαφάκας και συν. διαπίστωσαν την αυξημένη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF (3 φορές) και bFGF (1.5 φορές) σε πειραματόζωα που διατήρησαν την αυτόματη αναπνοή και είχαν αυξημένη ενεργητική σύσπαση του διαφράγματος λόγω υπεραερισμού σε συνθήκες υποξίας ή/και υπερκαπνίας [127]. Αντιθέτως, τα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε μηχανικό αερισμό με παραλυμένο διάφραγμα δεν

εμφάνισαν αυξημένη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων, στα ίδια επίπεδα pH, οξυγόνωσης και μερικής πίεσης αρτηριακού CO₂ με την προηγούμενη ομάδα. Οι συγγραφείς απέδωσαν το ερέθισμα για την αυξημένη αγγειογένεση στην αυξημένη μυϊκή τάση (stress) του διαφράγματος λόγω αυξημένου μηχανικού έργου.

Στη μοναδική μέχρι τώρα μελέτη σε ανθρώπους οι Αλεξοπούλου και συν. κατέδειξαν αυξημένα mRNA επίπεδα του VEGF στο διάφραγμα ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια καθώς και ασθενών με παχυσαρκία, σε σχέση με τους υγιείς ενήλικες, με στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [128]. Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA για τους παράγοντες bFGF και TGF-β1, τόσο στους ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, όσο και στους παχύσαρκους δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους υγιείς. Η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF αποδίδεται στο αυξημένο έργο του διαφράγματος, λόγω μεταβολής των μηχανικών ιδιοτήτων του αναπνευστικού συστήματος και της χρόνιας υποξαιμίας που παρατηρούνται στους χρόνιους αποφρακτικούς και στους παχύσαρκους ασθενείς [129-133].

Οι DeRuisseau και συν. μελέτησαν την έκφραση 354 γονιδίων του διαφράγματος σε πειραματόζωα, μετρώντας τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA στο διάφραγμα. Διαπίστωσαν ότι ο μηχανικός αερισμός προκαλεί σημαντικές και ποικίλες γονιδιακές μεταβολές μετά από 6 και 18 ώρες [91]. Σχεδόν για όλα τα γονίδια, η μεταβολή της έκφρασης ήταν μεγαλύτερη μετά από τις 18 ώρες μηχανικού αερισμού, σε σχέση με τις 6 ώρες. Αυξήθηκε η έκφραση (up regulation) των γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress, τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση του ασβεστίου. Η διαταραχή στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου ασβεστίου αποτελεί ένα ακόμη παράγοντα που

ευθύνεται για τη μυϊκή ατροφία. Η γονιδιακή έκφραση του παράγοντα VEGF ήταν επίσης μειωμένη μετά από 6 ώρες και πολύ περισσότερο μετά από 18 ώρες μηχανικού αερισμού. Οι μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων στο διάφραγμα των πειραματόζωων ενοχοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για τη μυϊκή ατροφία και τη μείωση της συσταλτικής δύναμης του διαφράγματος που προκαλούνται από τον μηχανικό αερισμό.

Είδη μηχανικών δυνάμεων

Το αγγειακό δίκτυο των μυών είναι ένας εξαιρετικά προσαρμοστικός μηχανισμός και υπόκειται σε μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές, ως απάντηση σε βιοχημικά και μηχανικά ερεθίσματα. Τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί εκτενώς η αναδιάταξη (remodelling) των αγγείων που λαμβάνει χώρα υπό την επίδραση μηχανικών δυνάμεων. Οι μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται τόσο στην εσωτερική πλευρά των αγγείων, δηλαδή στο ενδοθήλιο (luminal side), όσο και στην εξωτερική πλευρά τους (abluminal side) προάγουν την αγγειογένεση [16, 134]. Στην πρώτη περίπτωση, οι μηχανικές δυνάμεις προέρχονται από αιμοδυναμικούς παράγοντες, όπως είναι η τάση του αγγειακού τοιχώματος (wall tension) και οι δυνάμεις που δρουν κατ'εφαπτομένη στο τοίχωμα των αγγείων (shear stress) όταν η αιματική ροή είναι αυξημένη. Στη δεύτερη περίπτωση, το αγγειακό δίκτυο δέχεται ελαστικές δυνάμεις που προέρχονται από την επαναλαμβανόμενη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυϊκών ινών, μέσω του εξωκυττάριου στρώματος (extracellular matrix) και των στοιχείων του συνδετικού ιστού. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα τριχοειδή αγγεία υφίστανται επαναλαμβανόμενη, άλλοτε άλλου βαθμού, επιμήκη ελαστική έκταση και κάμψη ακολουθώντας τη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυϊκών ινών [122]. Οι Ellis και συν. κατέδειξαν σε ποντίκια την αύξηση του μήκους των τριχοειδών όταν διατείνεται ο μακρύς εκτείνων το δάκτυλο μυς και τη σμίκρυνση των τριχοειδών όταν χαλαρώνουν οι μυϊκές ίνες [27].

Ο απαραίτητος ρόλος της σύσπασης των γειτονικών μυϊκών ινών πάνω στο ενδοθήλιο των αγγείων για την παραγωγή των αγγειογενετικών παραγόντων αποδείχτηκε στη μελέτη των Roca και συν. [17]. Στη μελέτη αυτή, η παθητική αύξηση της αιματικής ροής (χωρίς να συνοδεύεται από μυϊκή σύσπαση), 5.4 έως 5.9 φορές πάνω από το επίπεδο ηρεμίας στους σκελετικούς μύες του πειραματόζωου, για μία ώρα, δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των VEGF και bFGF αλλά μία μικρή αύξηση (κατά 14%) του παράγοντα TGF-β1. Αντίθετα, η ίδια αύξηση στην αιματική ροή μετά από ηλεκτρική διέγερση των σκελετικών μυών προκάλεσε μεγαλύτερη από τριπλάσια αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι (α) οι αιμοδυναμικές μεταβολές δηλαδή η αύξηση του ‘wall tension’ και του ‘shear stress’ που επιδρούν πάνω στο αγγειακό τοίχωμα, λόγω της αυξημένης αιματικής ροής, δεν είναι ικανές από μόνες τους να προκαλέσουν την αύξηση της αγγειογένεσης και (β) η σύσπαση των σκελετικών μυϊκών ινών είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης, λόγω αυξημένων μεταβολικών αναγκών και αυξημένου μηχανικού φορτίου πάνω στο τοίχωμα των αγγείων.

Αγγειογενετικοί Παράγοντες & Μηχανικό Stress σε καλλιέργειες κυττάρων

Η μεταβολή στη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων σε σχέση με το μηχανικό stress έχει μελετηθεί εκτενώς σε καλλιέργειες κυττάρων.

Αυξημένη γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνική σύνθεση του παράγοντα VEGF λόγω αυξημένου μηχανικού stress έχει αποδειχθεί in vitro σε καλλιέργειες διαφορετικών τύπων κυττάρων. Σε καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας που υποβλήθηκαν σε μηχανικό stress αποδείχθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA των VEGF (1.8 φορές) και bFGF (1.9 φορές) με μέγιστη τιμή στις 24 ώρες [135]. Στα μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρών η γονιδιακή έκφραση του

VEGF αυξήθηκε 2.4 φορές μετά από την εφαρμογή μηχανικού stress, με μέγιστη τιμή στις 6 ώρες [136]. Στα μυοκαρδιακά κύτταρα, όπου έχει τεκμηριωθεί ότι οι αυξημένες μεταβολικές ανάγκες ή / και χρόνια ισχαιμία προκαλούν αύξηση του VEGF [32, 137-139], αποδείχτηκε ότι και μηχανικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση του αγγειογενετικού παράγοντα [140]. Στη μελέτη των Li και συν. σε μοντέλο καρδιάς Langendorff η διάταση των μυοκαρδιακών κυττάρων από την εφαρμογή ενός φουσκωμένου μπαλονιού μέσα στην κοιλότητα της αριστερής κοιλίας στα 35mmHg για 30 min είχε ως αποτέλεσμα την εξαπλάσια αύξηση των παραγόντων VEGF και TGF-β. Επιπλέον, ο παράγοντας TGF-β φαίνεται ότι έπαιξε ρόλο απαραίτητου μεσολαβητή, επειδή η αναστολή του TGF-β μετά από χορήγηση αντισωμάτων έναντι του παράγοντα εμπόδισε την αύξηση του VEGF [141]. Σε καλλιέργεια μυοκαρδιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων των στεφανιαίων αγγείων που εκτέθηκαν σε μηχανικό stress παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση των παραγόντων VEGF και TGF-β, μεγαλύτερη από το διπλάσιο σε μία ώρα. Και εδώ η αναστολή του παράγοντα TGF-β με χορήγηση αντισωμάτων εμπόδισε την αύξηση του παράγοντα VEGF [142, 143].

Σχετικά με τον παράγοντα bFGF, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν αποτύχει να αποδείξουν αύξηση της γονιδιακής του έκφρασης σε συνθήκες αυξημένου μηχανικού stress σε καλλιέργειες μυοκαρδιακών κυττάρων, σκελετικών μυικών κυττάρων και νεφρικών μεσαγγειακών κυττάρων [142, 144, 145]. Αύξηση (1.9 φορές) του bFGF λόγω αυξημένου μηχανικού stress καταδείχθηκε μόνο στα λεία μυικά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας στη μελέτη των Quinn και συν. [135].

Όσο για τον παράγοντα TGF, αυξάνεται η έκκριση του από τα λεία μυικά κύτταρα του τοιχώματος της αορτής [146], τα μυοκαρδιακά [141] και τα μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρών [147], όταν αυτά εκτεθούν σε κυκλικό μηχανικό stress. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο TGF-β είναι

απαραίτητος μεσολαβητής για την αύξηση της έκφρασης του VEGF όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε μηχανικό stress [140, 141].

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δηλαδή η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τους αγγειογενετικούς παράγοντες VEGF, bFGF και TGF-β1 στην ομάδα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό μπορούν να αποδοθούν μόνο στα μηχανικά αίτια που αναλύθηκαν παραπάνω, καθώς οι ασθενείς της μελέτης δεν εκτέθηκαν σε άλλους παράγοντες που θα μπορούσαν να μεταβάλουν τα αποτελέσματα. Δεν εμφανίστηκαν διεγχειρητικά αιμοδυναμική αστάθεια, υποξαιμία ή οξυαιμία, παράγοντες που λειτουργούν ως ερέθισμα για αυξημένη αγγειογένεση [10, 14, 148]. Επιλέχθηκε ώστε οι ασθενείς της μελέτης να υποβάλλονται σε επέμβαση κάτω κοιλίας διότι αυτό το είδος των επεμβάσεων έχει την ελάχιστη επίπτωση πάνω στην αναπνευστική και διαφραγματική λειτουργία, σε σχέση με τις επεμβάσεις άνω κοιλίας και θώρακα [149].

Νευρομυϊκή Λειτουργία & Μηχανικός Αερισμός

Τις τελευταίες δεκαετίες η νευρομυϊκή διαταραχή έχει αναγνωριστεί ως μείζον πρόβλημα των βαρέως πασχόντων ασθενών στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας και, όπως δείχνουν ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες, προσβάλλονται παράλληλα τόσο οι περιφερικοί όσο και οι αναπνευστικοί μύες [150-152]. Η αδράνεια των σκελετικών μυών κατά την ακινησία των ασθενών στις ΜΕΘ οδηγεί σε διαταραχή της νευρομυϊκής λειτουργίας με αποτέλεσμα την μικτή νευροπάθεια και μυοπάθεια (Intensive care unit acquired paresis, ICUAP). Ο παρατεταμένος μηχανικός αερισμός

με μέση διάρκεια τις 16 ημέρες αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μυϊκής πάρεσης στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς [153].

Το διάφραγμα, που είναι ο κύριος αναπνευστικός μυς, εμφανίζει οκτώ φορές πιο γρήγορα ατροφία και δυσλειτουργία, σε σχέση με τους μύες των άκρων κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού [91]. Η διαφορά ανάμεσα στο διάφραγμα και τους σκελετικούς μύες οφείλεται στο ότι η λειτουργική μυϊκή αδράνεια κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού πλήττει σε μεγαλύτερο βαθμό το διάφραγμα που έχει κατασκευαστεί να λειτουργεί ασταμάτητα καθόλη τη διάρκεια της ζωής, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους σκελετικούς μύες που λειτουργούν διαλειπόντως και με μικρότερο φορτίο. Με τη σειρά της η μυοπάθεια οδηγεί σε δυσκολία στον απογαλακτισμό (weaning) από τον μηχανικό αερισμό που παρατηρείται στο 20-30% των ασθενών μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό. Η παράταση του χρόνου αποδέσμευσης από τον μηχανικό αερισμό έχει ως συνέπεια την αύξηση του χρόνου παραμονής στη ΜΕΘ και επηρεάζει αρνητικά την τελική έκβαση των βαρέως πασχόντων ασθενών [154-156]. Στη μελέτη των De Jonghe και συν. οι ασθενείς με νευρομυϊκή πάρεση είχαν μέση διάρκεια weaning 6 ημέρες (1-22 ημέρες), ενώ οι ασθενείς χωρίς νευρομυϊκή πάρεση είχαν αντίστοιχη μέση διάρκεια 3 ημέρες (1-7 ημέρες) [155].

Η χορήγηση των νευρομυϊκών αποκλειστών, φαρμάκων που εμποδίζουν τη μετάδοση των ερεισμάτων στη νευρομυϊκή σύναψη, αποτελεί ένα ακόμη παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη μυοπάθειας στους ασθενείς στις ΜΕΘ. Η χορήγηση των παραγόντων αυτών αποσκοπεί στη διευκόλυνση του μηχανικού αερισμού και την καλύτερη συνεργασία ασθενούς – αναπνευστήρα με σκοπό την καλύτερη ανταλλαγή αερίων. Επίσης, χρησιμοποιούνται στη μείωση της ενδοκράνιας πίεσης, στη μείωση της κατανάλωσης O_2 σε συνθήκες κυκλοφορικής καταπληξίας, στη θεραπευτική υποθερμία, όταν εφαρμόζεται για την εγκεφαλική προστασία καθώς και στη θεραπεία των μυϊκών

σπασμών και του status asthmaticus [156]. Νευρομυικοί αποκλειστές χορηγούνται στο 13% περίπου των ασθενών που βρίσκονται σε μηχανικό αερισμό με μέση διάρκεια χορήγησης 2 ημέρες, αλλά η συχνότητα χορήγησής τους διαφέρει ανάμεσα στις ΜΕΘ [154]. Η διάρκεια της χορήγησης των νευρομυικών αποκλειστών έχει σημαντική επίδραση στο βαθμό βαρύτητας της μυοπάθειας [157, 158], για την οποία έχουν ενοχοποιηθεί και οι δύο κατηγορίες των νευρομυικών αποκλειστών, τόσο τα αμινοστεροειδή, όσο και τα παράγωγα βενζυλισοκινολίνης [159-164]. Οι νευρομυικοί αποκλειστές χρησιμοποιούνται ευρέως στη χειρουργική αίθουσα για να διευκολύνουν τον μηχανικό αερισμό και να βελτιώσουν τις χειρουργικές συνθήκες.

Με βάση τα ευρήματα της μελέτης, η χορήγηση του νευρομυικού αποκλεισμού στην ομάδα Α κατάργησε τον μυϊκό τόνο του διαφράγματος προκαλώντας τη μηχανική αποφόρτιση των μυϊκών ινών κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Στην ομάδα αυτή δεν αυξήθηκε η γονιδιακή έκφραση κανενός από τους τρεις αγγειογενετικούς παράγοντες, σε διάρκεια 90 min μηχανικού αερισμού. Αντίθετα, στην ομάδα Β, που δεν έλαβε νευρομυικό αποκλεισμό και έτσι διατηρήθηκε το μηχανικό stress του διαφράγματος, δημιουργήθηκε το ερέθισμα για την αύξηση της αγγειογένεσης, τουλάχιστον σε γονιδιακό επίπεδο. Ο υποβοηθούμενος αερισμός σε pressure support (ομάδα Γ) δεν επηρέασε το μηχανικό φορτίο του διαφράγματος και δεν προκάλεσε μεταβολή στο ‘γονιδιακό σήμα’ για την αγγειογένεση.

Συμπερασματικά, η γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, bFGF και TGF-β1 στο διάφραγμα αυξήθηκε στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυικό αποκλεισμό, όπως μετρήθηκαν τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA σε Real-time qPCR. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA των ίδιων παραγόντων δεν μεταβλήθηκαν στους ασθενείς

που έλαβαν ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό με νευρομυϊκό αποκλεισμό ή αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support). Το γονιδιακό σήμα για την αυξημένη αγγειογένεση στο διάφραγμα κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού δημιουργήθηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (90 min).

Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Μελέτης

Η διατριβή αποτελεί τη δεύτερη σε σειρά μελέτη σε ανθρώπους που μελετάει την αγγειογένεση στο διάφραγμα. Η πρώτη μελέτη ήταν των Αλεξοπούλου και συν. που μέτρησαν τη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων, VEGF, bFGF, TGF-β1, στο διάφραγμα ασθενών που υποβλήθηκαν σε θωρακοχειρουργικές επεμβάσεις υπό γενική αναισθησία, σε σχέση με τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και την παχυσαρκία. Η διατριβή διερεύνησε για πρώτη φορά πως μεταβάλλεται η γονιδιακή έκφραση των παραπάνω αγγειογενετικών παραγόντων στο διάφραγμα ασθενών που υποβάλλονται σε επέμβαση κάτω κοιλίας, υπό γενική αναισθησία, σε σχέση με τον τύπο του μηχανικού αερισμού.

Τα ιστοτεμάχια του διαφράγματος λήφθηκαν με μικρή χρονική διαφορά μεταξύ τους (90 min) και έτσι διαπιστώθηκε η ταχύτατη μεταβολή στο 'γονιδιακό σήμα' για την αγγειογένεση. Η αύξηση των επιπέδων mRNA για την παραγωγή των αγγειογενετικών παραγόντων στο διάφραγμα συντελέστηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα, διάρκειας 90 min ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό. Είναι, επομένως, προφανές ότι οι γονιδιακές και βιοχημικές μεταβολές που πυροδοτούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης στους μύες λαμβάνουν χώρα νωρίς. Αποτελεί αναπάντητο ακόμα ερώτημα εάν και σε πόσο χρόνο αυτό το 'γονιδιακό σήμα' για αυξημένη αγγειογένεση θα μεταφραστεί σε πραγματική δημιουργία νέων αγγείων. .

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της μελέτης είναι η εργαστηριακή μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων mRNA των τριών αγγειογενετικών παραγόντων. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time PCR, qReal-Time PCR). Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι (α) τα αποτελέσματά της είναι αξιόπιστα, καθώς η ποσοτικοποίηση δεν πραγματοποιείται κατά τους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης της PCR, αλλά στους αρχικούς κύκλους και έτσι δεν παρεμβαίνουν ανασταλτικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τις μετρήσεις, (β) είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης, επειδή η συλλογή των δεδομένων γίνεται με Laser και (γ) η ποσοτικοποίηση των δεδομένων γίνεται αυτόματα, σε πραγματικό χρόνο από το λογισμικό του μηχανήματος και έτσι είναι περισσότερο ακριβής.

Η τεχνική δυσκολία εφαρμογής του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου αποτελεί ένα από τα μειονεκτήματα της διατριβής. Η προσπέλαση του διαφράγματος από το χειρουργό με χειρουργική τομή στην κάτω κοιλία για τη λήψη ιστοτεμαχίων υπήρξε δυσχερής και ενείχε τον κίνδυνο τραυματισμού ενδοκοιλιακών οργάνων. Κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης του κλινικού μέρους της διατριβής δεν σημειώθηκε κανένα ανάλογο σύμβαμα.

Τελικά Συμπεράσματα & Μελλοντικές Προοπτικές

Η παρούσα διατριβή κατέδειξε την αυξημένη γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων στο διάφραγμα όταν αυτό εκτέθηκε σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό σε ασθενείς υπό γενική αναισθησία. Τα ευρήματα αυτά αποδόθηκαν στη διατήρηση του μυϊκού τόνου του διαφράγματος και επομένως στο αυξημένο μηχανικό stress από την εφαρμογή

θετικών πιέσεων κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Η χορήγηση νευρομυϊκού αποκλεισμού, κατά τη διάρκεια του ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση ή και εκμηδένιση της μηχανικής φόρτισης του διαφράγματος και έτσι δεν δημιουργήθηκε το ερέθισμα για αυξημένη αγγειογένεση. Ο αερισμός υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support) δεν επηρέασε το μηχανικό stress του διαφράγματος και δεν προκάλεσε μεταβολή στο 'γονιδιακό σήμα' για την αγγειογένεση.

Η απουσία μηχανικής φόρτισης του διαφράγματος (unloading) έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί την κύρια αιτία της μυϊκής ατροφίας και τη μειωμένης συσταλτικής ικανότητας του, κυρίως μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό. Με βάση τα αποτελέσματα της διατριβής η αγγειογένεση, τουλάχιστον σε γονιδιακό επίπεδο, αυξάνεται όταν αυξάνεται το μηχανικό stress στο διάφραγμα κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού. Νέες μελέτες χρειάζονται στο μέλλον να διερευνήσουν την επίδραση της αυξημένης αγγειογένεσης πάνω στη λειτουργία του διαφράγματος μετά την εφαρμογή τόσο του ελεγχόμενου μηχανικού αερισμού όσο και των νεότερων μοντέλων υποβοηθούμενου αερισμού. Πιθανόν η αγγειογένεση να αποτελέσει παράγοντα που τροποποιεί την επίδραση του μηχανικού αερισμού στη λειτουργία του διαφράγματος. Η ενίσχυση της αγγειογένεσης στο διάφραγμα, όταν διατηρείται κάποιος βαθμός μηχανικού stress, πιθανόν να συμβάλλει στην πρόληψη της μυϊκής ατροφίας και δυσλειτουργίας του διαφράγματος που προκαλούνται από τον μηχανικό αερισμό. Η χορήγηση των νευρομυϊκών αποκλειστών είναι μία παράμετρος που χρειάζεται να εξεταστεί προς αυτή την κατεύθυνση. Όλες οι προσπάθειες συγκλίνουν στον ταχύτερο και ασφαλέστερο απογαλακτισμό από τον αναπνευστήρα των ασθενών στις ΜΕΘ, με απώτερο σκοπό το μικρότερο χρόνο παραμονής στις ΜΕΘ και τη βελτίωση της κλινικής τους έκβασης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιείται για να εκφράσει τη δημιουργία νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα. Υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων που δρουν στην εξωτερική και την εσωτερική επιφάνεια του αυλού των αγγείων, η βασική μεμβράνη και το εξωκυττάριο στρώμα του ενδοθηλίου αποδομούνται επιτρέποντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον διάμεσο χώρο, όπου πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν 'εκβλαστήσεις'. Τα νεοσχηματισθέντα αγγεία αποκτούν βασική μεμβράνη που συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα και στο τέλος συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά με το υπάρχον αγγειακό δίκτυο. Για την έναρξη και το συντονισμό των παραπάνω πολύπλοκων διεργασιών είναι απαραίτητοι οι ειδικοί αυξητικοί παράγοντες αγγειογένεσης. Ο παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) είναι απαραίτητος για τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης των αγγείων καθώς και για τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) αποτελεί ισχυρό μιτογόνο παράγοντα για τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Ο TGF-β1 (Transforming Growth Factor-β1), που παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγει την αγγειογένεση στρατολογώντας περικύτταρα για την ολοκλήρωση και σταθεροποίηση των νεοσχηματισθέντων αγγειακών σχηματισμών. Ως αποτέλεσμα μελετών σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους, η αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για τη δημιουργία νέων αγγείων, τόσο στο μυοκάρδιο όσο και στους σκελετικούς μύες, με σκοπό να αυξηθεί η αιματική τους ροή και να ανταποκριθούν στις αυξημένες μεταβολικές τους ανάγκες.

Η έναρξη της αγγειογένεσης κατά τη μυική άσκηση πυροδοτείται από μεταβολές που υφίστανται τα αγγεία, όπως μεταβολικές (τοπική υποξία) και μηχανικές (μηχανικό stress). Οι μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στην εσωτερική πλευρά των αγγείων, δηλαδή στο ενδοθήλιο, προέρχονται από την αύξηση της τάσης του αγγειακού τοιχώματος (wall tension) και των δυνάμεων τριβής που δρουν κατ'εφαπτομένη στο τοίχωμα (shear stress), λόγω της αυξημένης αιματικής ροής. Οι μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στο τοίχωμα των αγγείων από την εξωτερική πλευρά προέρχονται από τη σύσπαση των γειτονικών μυικών ινών. Τα τριχοειδή αγγεία των μυών υφίστανται, μέσω του εξωκυττάριου στρώματος (extracellular matrix) και του συνδετικού ιστού, επιμήκη ελαστική έκταση και κάμψη ακολουθώντας αντίστοιχα τη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυικών ινών. Η επακόλουθη 'τραυματική βλάβη' του ενδοθηλίου αποτελεί το ισχυρό ερέθισμα για την ενεργοποίηση του 'καταρράκτη' της αγγειογένεσης, μέσω της απελευθέρωσης των αγγειογενετικών παραγόντων.

Το διάφραγμα που κατέχει ζωτική σημασία για τη λειτουργία της αναπνοής και συσπάται ρυθμικά καθόλη τη διάρκεια της ζωής εμφανίζει τα χαρακτηριστικά των σκελετικών μυών. Σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους αυξήθηκε η γονιδιακή έκφραση των παραγόντων αγγειογένεσης στο διάφραγμα, όπως μετρήθηκε από τα επίπεδα mRNA των VEGF, bFGF και TGF-β1, όταν αυτό εκτέθηκε σε αυξημένο αναπνευστικό έργο (λόγω υποξυγοναιμίας ή / και υπερκαπνίας) ή σε αυξημένο μηχανικό φορτίο (λόγω χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας ή παχυσαρκίας).

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να εξετάσει τη γονιδιακή έκφραση των κυριότερων παραγόντων αγγειογένεσης (VEGF, bFGF, TGF-β1) στο ανθρώπινο διάφραγμα, κατά τη διάρκεια γενικής αναισθησίας, πριν και μετά την εφαρμογή διαφορετικών τύπων αερισμού: (α) υποβοηθούμενης πίεσης με ενεργητική σύσπαση του διαφράγματος και (β) ελεγχόμενου μηχανικού

αερισμού, με ή χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό, που συνεπάγεται παθητική κίνηση του διαφράγματος στη διάρκεια των αναπνευστικών κύκλων. Η υπόθεση της μελέτης ήταν η διατήρηση των ενεργητικών συσπάσεων του διαφράγματος κατά τον αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης, σε ασθενείς υπό γενική αναισθησία, πυροδοτούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης, σε αντίθεση με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό. Μελετήθηκαν γυναίκες ASA I-II που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη επέμβαση κάτω κοιλίας (ολική υστερεκτομή) με συνδυασμένη γενική και επισκληρίδιο θωρακική αναισθησία. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες, ανάλογα με τον τύπο του αερισμού που έλαβαν διεγχειρητικά. Η ομάδα Α τέθηκε σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό με ταυτόχρονη χορήγηση νευρομυϊκού αποκλεισμού, η ομάδα Β σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό, ενώ η ομάδα Γ διατήρησε την αυτόματη αναπνοή σε μοντέλο αερισμού υποβοηθούμενης πίεσης (pressure support). Σε κάθε ασθενή, λαμβάνονταν 2 δείγματα (1 - 1.5 cm³) από την ίδια περιοχή της πλευρικής μοίρας του διαφράγματος σε δύο χρόνους: 30 min μετά την εισαγωγή στην αναισθησία (t₁) και 90 min αργότερα (t₂). Η γονιδιακή έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, bFGF και TGF-β1 μετρήθηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR). Τα επίπεδα mRNA των παραπάνω παραγόντων συγκρίθηκαν ανάμεσα στις ομάδες, στους χρόνους t₁ και t₂, χρησιμοποιώντας το Student's t-test και το Mann-Whitney U test (2-tailed).

Η παρούσα μελέτη έδειξε στην ομάδα Β αυξημένα επίπεδα mRNA για τον παράγοντα VEGF (3.7 φορές) και για τους παράγοντες bFGF και TGF-β1 (2.1 φορές) στο χρόνο t₂, σε σχέση με το χρόνο t₁. Η αύξηση των επιπέδων mRNA ήταν στατιστικά σημαντική για όλους τους αγγειογενετικούς παράγοντες. Αντίθετα, στις ομάδες Α και Γ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων

mRNA και των τριών αγγειογενετικών παραγόντων στο χρόνο t_2 , σε σχέση με το χρόνο t_1 , μη στατιστικά σημαντική.

Η αυξημένη γονιδιακή έκφραση των τριών αγγειογενετικών παραγόντων στους ασθενείς που τέθηκαν σε ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό (ομάδα Β) μπορεί να αποδοθεί στο αυξημένο μηχανικό stress του διαφράγματος. Η επίδραση των μηχανικών δυνάμεων από την επαναλαμβανόμενη σύσπαση και χάλαση των γειτονικών μυϊκών ινών στο αγγειακό δίκτυο του διαφράγματος, κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού, έδωσε το ερέθισμα για αυξημένη αγγειογένεση τουλάχιστον σε γονιδιακό επίπεδο. Αντίθετα, στην ομάδα Α που έλαβε επίσης ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό, η χορήγηση του νευρομυϊκού αποκλεισμού κατάργησε τον μυϊκό τόνο του διαφράγματος ελαχιστοποιώντας το μηχανικό stress και έτσι δεν πυροδοτήθηκε η διαδικασία της αγγειογένεσης. Στην ομάδα Γ, προφανώς, δεν σημειώθηκε καμία μεταβολή στο μηχανικό stress του διαφράγματος πριν και κατά την εφαρμογή του pressure support.

Η παρούσα διατριβή πρόσθεσε ως νέο δεδομένο ότι ο ελεγχόμενος μηχανικός αερισμός χωρίς νευρομυϊκό αποκλεισμό προκαλεί το γονιδιακό ερέθισμα για αυξημένη αγγειογένεση στο διάφραγμα, σε αντίθεση με τον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό με τη χορήγηση νευρομυϊκού αποκλεισμού και τον αερισμό υποβοηθούμενης πίεσης. Η διαφορά στην αγγειογένεση αποδόθηκε στην αύξηση του μηχανικού φορτίου (stress) που δέχεται το διάφραγμα στον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό χωρίς τη χορήγηση νευρομυϊκού αποκλεισμού. Αντίθετα, η απουσία μηχανικής φόρτισης (unloading) του διαφράγματος είναι γνωστό ότι αποτελεί τον κύριο παράγοντα για τη μυϊκή ατροφία και τη μειωμένη συσταλτική ικανότητα που παρατηρούνται στο μυ μετά από παρατεταμένο μηχανικό αερισμό. Επομένως, διαφαίνεται η πιθανή συμμετοχή της αγγειογένεσης στην επίδραση του τύπου του μηχανικού αερισμού στη λειτουργία του διαφράγματος. Η αποφυγή χορήγησης

νευρομυϊκού αποκλεισμού για τη διατήρηση του μυϊκού τόνου του διαφράγματος, κατά την εφαρμογή του μηχανικού αερισμού, μπορεί να αποτρέψει τη λειτουργική διαταραχή του μυός.

Νέες μελέτες στο μέλλον θα βοηθήσουν ώστε να αποσαφηνιστεί η επίδραση της αγγειογένεσης του διαφράγματος πάνω στη λειτουργία του διαφράγματος, τόσο στον ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό, όσο και στα νεότερα μοντέλα υποβοηθούμενου αερισμού. Πιθανόν η ενίσχυση της διαδικασίας της αγγειογένεσης να βοηθήσει στην πρόληψη της μυϊκής ατροφίας και της δυσλειτουργίας του διαφράγματος. Νέες στρατηγικές και θεραπευτικές μέθοδοι σχετικές με την αγγειογένεση του διαφράγματος μπορεί να αναπτυχθούν με στόχο τον ταχύτερο και ασφαλέστερο απογαλακτισμό από τον μηχανικό αερισμό των ασθενών στις ΜΕΘ.

SUMMARY

The term angiogenesis is used to describe the formation of new capillaries from existing ones. In response to various stimuli acting both on luminal and abluminal surface of the existing vessels, the basic membrane and the extracellular matrix underlying the endothelium are dissolved allowing the endothelial cells to migrate into extravascular space. There they proliferate and form sprouts that subsequently acquire newly formed basic membrane and are encircled by pericytes. The sprouts become functional on anatomic connection to the already existing segments of capillary network. Specific angiogenic growth factors have been well documented to initiate and promote this extremely complex process. Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) stimulates the migration and proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells as well as the production of proteases that are essential for the dissolution of the basic membrane of the vessels. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) is a potent mitogenic factor for endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. It also upregulates VEGF and NO. Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), mainly produced by activated endothelial cells, promotes angiogenesis by recruiting pericytes to complete and stabilize the newly formed capillaries.

It has been well documented in numerous animal and human studies that increased muscle activity consists a powerful stimulus for the formation of new capillaries in both skeletal muscles and heart muscle in order to meet their increased metabolic demands. Angiogenesis in response to increased muscle activity has been attributed to either metabolic stimuli, such as tissue hypoxia, or mechanical forces. The latter can be classified as (a) hemodynamic, acting on the luminal surface of

the vessels i.e. wall tension and shear stress, due to increased blood flow and (b) extravascular, acting on the abluminal surface, as a result of muscular fiber contraction and relaxation. Mechanical forces associated with shortening and relaxation of the myocytes are imparted to the microvascular network via the extracellular matrix and connective tissue elements. Any mechanical injury caused to the endothelium by the above stimuli is sufficient to initiate the process of angiogenesis, through the release of the angiogenic factors.

The diaphragm, the main respiratory muscle that is longlife continuously and rhythmically contracting demonstrates characteristics of the skeletal muscles. It has been shown in animal and human studies that it exhibits the same angiogenic response to increased workload as locomotive muscles. Siafakas et al demonstrated increased VEGF and bFGF mRNA diaphragmatic levels in rats after 1 hour of increased ventilation due to hypercapnia and hypoxaemia, in contrast to animals with paralysed diaphragms. Increased mRNA expression of the VEGF was also found in the diaphragm of COPD and obese patients, compared to normal subjects, due to consequent increased respiratory workload.

The aim of the present study was to assess the gene expression of the three major angiogenic factors (VEGF, bFGF and TGF- β 1) in the human diaphragm before and after the application of different modes of mechanical ventilation. The study investigated the mRNA levels of the above angiogenic factors in the diaphragm of patients receiving general anaesthesia in relation to (a) active diaphragmatic contractions during spontaneous breathing with partial support and (b) passive diaphragmatic movement during controlled mechanical ventilation (CMV) with and without muscle relaxation.

SUMMARY

Women ASA physical status I-II scheduled for elective lower abdominal surgery (total hysterectomy) were enrolled in the study. All patients underwent combined general and thoracic epidural anaesthesia and were randomized in three groups according to the mode of ventilation intraoperatively. Group A received CMV with simultaneous administration of a neuromuscular blocking agent. Group B received also CMV but without neuromuscular blocking agent. Group C maintained spontaneous breathing on pressure support ventilation (PSV) mode. Diaphragmatic specimens ($1-1.5\text{cm}^3$) were obtained from each patient at two different time points, 30 min after the induction of anaesthesia (t_1) and 90 min subsequently (t_2). The mRNA levels of VEGF, bFGF and TGF β 1 were measured using the Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real Time qPCR). Normalized mRNA levels of each angiogenic factor were statistically compared in groups A, B and C between the two time points, using the Student's t-test and Mann-Whitney U test (2-tailed).

The present study showed increased diaphragmatic mRNA levels of VEGF (3.7-fold), bFGF and TFG- β 1 (2.1-fold), at time t_2 compared to t_1 , in patients receiving controlled mechanical ventilation without muscle relaxation (group B). In contrast, the gene expression of the above factors did not exhibit significant changes, either during controlled mechanical ventilation with muscle relaxation, or pressure support ventilation (groups A & C, respectively).

The increased angiogenic response in patients receiving CMV without muscle relaxation can be attributed to the increased mechanical stress that the diaphragm experienced during the positive pressure mechanical ventilation. The mechanical forces from the repetitive muscle fiber contraction and relaxation applied on the diaphragmatic capillaries, in parallel with respiratory cycles, created a powerful stimulus for diaphragmatic angiogenesis, at least at gene level. On the contrary, the administration of a neuromuscular blocking agent in patients who also received CMV diminished the

muscle tone and subsequently the mechanical stress of the diaphragm and there was no signal for increased angiogenesis. In patients who breathed spontaneously, there was no apparent change in mechanical stimulus applied on the diaphragm, before and following PS ventilation. Our results cannot be attributed to other factors, since our patients did not exhibit haemodynamic instability, hypoxaemia or acidosis that would possibly affect the process of angiogenesis.

In conclusion, the present study demonstrated that controlled mechanical ventilation without neuromuscular blockade stimulated the angiogenic response, at least at gene level, contrary to controlled mechanical ventilation with simultaneous neuromuscular blockade as well as spontaneous breathing with PS. The different effect on angiogenesis was attributed to the different mechanical stress that the diaphragm experienced during the three different modes of ventilation. The absence of mechanical stress (unloading) of the diaphragm during controlled mechanical ventilation has been proved as the main factor leading to the so-called Ventilator Induced Diaphragmatic Dysfunction (VIDD), an entity including both muscular atrophy and contractile dysfunction.

Our results shed light into the effect of the mode of mechanical ventilation on the angiogenesis of the diaphragm. Further studies are needed to investigate any potential relation between angiogenesis and diaphragmatic function during and after discontinuation of mechanical ventilation. Possibly, angiogenesis be a potential factor that modulates the impact of different modes of either controlled or assisted mechanical ventilation on diaphragmatic biology and function. Whether increased angiogenic response of a mechanically overloaded, non-paralysed diaphragm may be a preventive measure against mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and muscle atrophy is a question to be answered in future studies. New therapeutic strategies may be

SUMMARY

developed under this consideration, aiming at the faster and safer weaning of critically ill patients from mechanical ventilation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Wood, P. A., Bove, K., You, S., Chambers, A. & Hrushesky, W. J. (2005) Cancer growth and spread are saltatory and phase-locked to the reproductive cycle through mediators of angiogenesis, *Molecular cancer therapeutics*. **4**, 1065-75.
2. Wu, Y., Hooper, A. T., Zhong, Z., Witte, L., Bohlen, P., Rafii, S. & Hicklin, D. J. (2006) The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma, *International journal of cancer Journal international du cancer*. **119**, 1519-29.
3. Gariano, R. F. & Gardner, T. W. (2005) Retinal angiogenesis in development and disease, *Nature*. **438**, 960-6.
4. Heilmann, C., Kostic, C., Giannone, B., Grawitz, A. B., Armbruster, W., Lutter, G., Beyersdorf, F. & Gobel, H. (2006) Improvement of contractility accompanies angiogenesis rather than arteriogenesis in chronic myocardial ischemia, *Vascular pharmacology*. **44**, 326-32.
5. Maruotti, N., Cantatore, F. P., Crivellato, E., Vacca, A. & Ribatti, D. (2006) Angiogenesis in rheumatoid arthritis, *Histology and histopathology*. **21**, 557-66.
6. Onesto, C., Hannoun-Levi, J. M., Chamorey, E., Formento, J. L., Ramaioli, A. & Pages, G. (2006) Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance, *British journal of cancer*. **94**, 1516-23.
7. Anzueto, A., Peters, J. I., Tobin, M. J., de los Santos, R., Seidenfeld, J. J., Moore, G., Cox, W. J. & Coalson, J. J. (1997) Effects of prolonged controlled mechanical ventilation on diaphragmatic function in healthy adult baboons, *Critical care medicine*. **25**, 1187-90.
8. Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987) Angiogenic factors, *Science*. **235**, 442-7.
9. D'Amore, P. A. & Thompson, R. W. (1987) Mechanisms of angiogenesis, *Annual review of physiology*. **49**, 453-64.
10. Hudlicka, O., Brown, M. & Egginton, S. (1992) Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle, *Physiological reviews*. **72**, 369-417.
11. Ausprunk, D. H. & Folkman, J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis, *Microvascular research*. **14**, 53-65.
12. Prior, B. M., Lloyd, P. G., Yang, H. T. & Terjung, R. L. (2003) Exercise-induced vascular remodeling, *Exercise and sport sciences reviews*. **31**, 26-33.

13. Hudlicka, O. (1990) The response of muscle to enhanced and reduced activity, *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. **4**, 417-39.
14. Prior, B. M., Yang, H. T. & Terjung, R. L. (2004) What makes vessels grow with exercise training?, *Journal of applied physiology*. **97**, 1119-28.
15. White, F. C., Bloor, C. M., McKirnan, M. D. & Carroll, S. M. (1998) Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart, *Journal of applied physiology*. **85**, 1160-8.
16. Brown, M. D. & Hudlicka, O. (2003) Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases, *Angiogenesis*. **6**, 1-14.
17. Roca, J., Gavin, T. P., Jordan, M., Sifakas, N., Wagner, H., Benoit, H., Breen, E. & Wagner, P. D. (1998) Angiogenic growth factor mRNA responses to passive and contraction-induced hyperperfusion in skeletal muscle, *Journal of applied physiology*. **85**, 1142-9.
18. Adair, T. H., Gay, W. J. & Montani, J. P. (1990) Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis, *The American journal of physiology*. **259**, R393-404.
19. Jensen, L., Bangsbo, J. & Hellsten, Y. (2004) Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle, *The Journal of physiology*. **557**, 571-82.
20. Rivilis, I., Milkiewicz, M., Boyd, P., Goldstein, J., Brown, M. D., Egginton, S., Hansen, F. M., Hudlicka, O. & Haas, T. L. (2002) Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis, *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. **283**, H1430-8.
21. Bevan, R. D. (1976) An autoradiographic and pathological study of cellular proliferation in rabbit arteries correlated with an increase in arterial pressure, *Blood vessels*. **13**, 100-28.
22. Bevan, R. D., van Marthens, E. & Bevan, J. A. (1976) Hyperplasia of vascular smooth muscle in experimental hypertension in the rabbit, *Circulation research*. **38**, 58-62.
23. Ando, J., Nomura, H. & Kamiya, A. (1987) The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells, *Microvascular research*. **33**, 62-70.
24. Lehoux, S. & Tedgui, A. (1998) Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall, *Hypertension*. **32**, 338-45.
25. Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987) Vascular physiology. A family of angiogenic peptides, *Nature*. **329**, 671-2.
26. Hudlicka, O. (1998) Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation?, *Microcirculation*. **5**, 7-23.
27. Ellis, C. G., Mathieu-Costello, O., Potter, R. F., MacDonald, I. C. & Groom, A. C. (1990) Effect of sarcomere length on total capillary length in skeletal muscle: in vivo evidence for longitudinal stretching of capillaries, *Microvascular research*. **40**, 63-72.

28. Gajdusek, C. M. & Carbon, S. (1989) Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium, *Journal of cellular physiology*. **139**, 570-9.
29. Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C. & Gospodarowicz, D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth, *Nature*. **325**, 257-9.
30. Sabri, M. N., DiSciascio, G., Cowley, M. J., Alpert, D. & Vetrovec, G. W. (1991) Coronary collateral recruitment: functional significance and relation to rate of vessel closure, *American heart journal*. **121**, 876-80.
31. Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. & Risau, W. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo, *Nature*. **359**, 845-8.
32. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, *Nature*. **359**, 843-5.
33. Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E. & et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders, *The New England journal of medicine*. **331**, 1480-7.
34. Richardson, R. S., Noyszewski, E. A., Kendrick, K. F., Leigh, J. S. & Wagner, P. D. (1995) Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport, *The Journal of clinical investigation*. **96**, 1916-26.
35. Sundberg, C. J. & Kaijser, L. (1992) Effects of graded restriction of perfusion on circulation and metabolism in the working leg; quantification of a human ischaemia-model, *Acta physiologica Scandinavica*. **146**, 1-9.
36. Breen, E. C., Johnson, E. C., Wagner, H., Tseng, H. M., Sung, L. A. & Wagner, P. D. (1996) Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise, *Journal of applied physiology*. **81**, 355-61.
37. Gustafsson, T., Puntschart, A., Kaijser, L., Jansson, E. & Sundberg, C. J. (1999) Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle, *The American journal of physiology*. **276**, H679-85.
38. Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S. & Caro, J. (1994) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **71**, 374-9.
39. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. & Semenza, G. L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Molecular and cellular biology*. **16**, 4604-13.

40. Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia, *The Journal of biological chemistry*. **272**, 23659-67.
41. Brogi, E., Wu, T., Namiki, A. & Isner, J. M. (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only, *Circulation*. **90**, 649-52.
42. Dvorak, H. F., Orenstein, N. S., Carvalho, A. C., Churchill, W. H., Dvorak, A. M., Galli, S. J., Feder, J., Bitzer, A. M., Rypysc, J. & Giovinco, P. (1979) Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products, *Journal of immunology*. **122**, 166-74.
43. Cucina, A., Borrelli, V., Randone, B., Coluccia, P., Sapienza, P. & Cavallaro, A. (2003) Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells, *The Journal of surgical research*. **109**, 16-23.
44. Ferrara, N. (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis, *American journal of physiology Cell physiology*. **280**, C1358-66.
45. Gustafsson, T. & Kraus, W. E. (2001) Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **6**, D75-89.
46. Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. (2001) VEGF receptor signal transduction, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. **2001**, re21.
47. Lamoreaux, W. J., Fitzgerald, M. E., Reiner, A., Hasty, K. A. & Charles, S. T. (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro, *Microvascular research*. **55**, 29-42.
48. Wang, H. & Keiser, J. A. (1998) Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1, *Circulation research*. **83**, 832-40.
49. Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M. & Sato, Y. (1996) Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells, *Journal of cellular physiology*. **169**, 522-31.
50. Mandriota, S. J. & Pepper, M. S. (1997) Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor, *Journal of cell science*. **110 (Pt 18)**, 2293-302.
51. Mandriota, S. J., Seghezzi, G., Vassalli, J. D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, R., Mignatti, P. & Pepper, M. S. (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells, *The Journal of biological chemistry*. **270**, 9709-16.

52. Cunningham, S. A., Tran, T. M., Arrate, M. P., Bjercke, R. & Brock, T. A. (1999) KDR activation is crucial for VEGF₁₆₅-mediated Ca²⁺ mobilization in human umbilical vein endothelial cells, *The American journal of physiology*. **276**, C176-81.
53. Folkman, J. (2003) Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs, *Cancer biology & therapy*. **2**, S127-33.
54. Gospodarowicz, D. (1989) Expression and control of vascular endothelial cells: proliferation and differentiation by fibroblast growth factors, *The Journal of investigative dermatology*. **93**, 39S-47S.
55. Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. & Klagsbrun, M. (1987) Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**, 2292-6.
56. Goto, F., Goto, K., Weindel, K. & Folkman, J. (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **69**, 508-17.
57. Stavri, G. T., Zachary, I. C., Baskerville, P. A., Martin, J. F. & Erusalimsky, J. D. (1995) Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia, *Circulation*. **92**, 11-4.
58. Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Monge, J. C., Mohamed, F., Bendeck, M. P. & Stewart, D. J. (1998) Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor, *Circulation research*. **82**, 1007-15.
59. Darland, D. C. & D'Amore, P. A. (2001) TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells, *Angiogenesis*. **4**, 11-20.
60. Tang, K., Breen, E. C., Wagner, H., Brutsaert, T. D., Gassmann, M. & Wagner, P. D. (2004) HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius, *Respiratory physiology & neurobiology*. **144**, 71-80.
61. Amaral, S. L., Linderman, J. R., Morse, M. M. & Greene, A. S. (2001) Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF, *Microcirculation*. **8**, 57-67.
62. Wagner, P. D. (2011) The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow, *Biochemical Society transactions*. **39**, 1556-9.
63. Richardson, R. S., Wagner, H., Mudaliar, S. R., Henry, R., Noyszewski, E. A. & Wagner, P. D. (1999) Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise, *The American journal of physiology*. **277**, H2247-52.

64. MacIntyre, N. R., Cook, D. J., Ely, E. W., Jr., Epstein, S. K., Fink, J. B., Heffner, J. E., Hess, D., Hubmayer, R. D., Scheinhorn, D. J., American College of Chest, P., American Association for Respiratory, C. & American College of Critical Care, M. (2001) Evidence-based guidelines for weaning and discontinuing ventilatory support: a collective task force facilitated by the American College of Chest Physicians; the American Association for Respiratory Care; and the American College of Critical Care Medicine, *Chest*. **120**, 375S-95S.
65. Brochard, L., Pluskwa, F. & Lemaire, F. (1987) Improved efficacy of spontaneous breathing with inspiratory pressure support, *The American review of respiratory disease*. **136**, 411-5.
66. Sanders, R. C., Jr., Thurman, T. L., Holt, S. J., Taft, K. & Heulitt, M. J. (2001) Work of breathing associated with pressure support ventilation in two different ventilators, *Pediatric pulmonology*. **32**, 62-70.
67. Brochard, L., Harf, A., Lorino, H. & Lemaire, F. (1989) Inspiratory pressure support prevents diaphragmatic fatigue during weaning from mechanical ventilation, *The American review of respiratory disease*. **139**, 513-21.
68. Hudson, M. B., Smuder, A. J., Nelson, W. B., Bruells, C. S., Levine, S. & Powers, S. K. (2012) Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy, *Critical care medicine*. **40**, 1254-60.
69. Klawitter, P. F. & Clanton, T. L. (2004) Tension-time index, fatigue, and energetics in isolated rat diaphragm: a new experimental model, *Journal of applied physiology*. **96**, 89-95.
70. Dreyfuss, D. & Saumon, G. (1998) Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **157**, 294-323.
71. Webb, H. H. & Tierney, D. F. (1974) Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure, *The American review of respiratory disease*. **110**, 556-65.
72. Pinheiro de Oliveira, R., Hetzel, M. P., dos Anjos Silva, M., Dallegrave, D. & Friedman, G. (2010) Mechanical ventilation with high tidal volume induces inflammation in patients without lung disease, *Critical care*. **14**, R39.
73. (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, *The New England journal of medicine*. **342**, 1301-8.
74. Phoenix, S. I., Paravastu, S., Columb, M., Vincent, J. L. & Nirmalan, M. (2009) Does a higher positive end expiratory pressure decrease mortality in acute respiratory distress syndrome? A systematic review and meta-analysis, *Anesthesiology*. **110**, 1098-105.
75. Vassilakopoulos, T. & Petrof, B. J. (2004) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **169**, 336-41.
76. Le Bourdelles, G., Viires, N., Boczkowski, J., Seta, N., Pavlovic, D. & Aubier, M. (1994) Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **149**, 1539-44.

77. Capdevila, X., Lopez, S., Bernard, N., Rabischong, E., Ramonatxo, M., Martinazzo, G. & Prefaut, C. (2003) Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits, *Intensive care medicine*. **29**, 103-10.
78. Gayan-Ramirez, G., de Paepe, K., Cadot, P. & Decramer, M. (2003) Detrimental effects of short-term mechanical ventilation on diaphragm function and IGF-I mRNA in rats, *Intensive care medicine*. **29**, 825-33.
79. Powers, S. K., Shanely, R. A., Coombes, J. S., Koesterer, T. J., McKenzie, M., Van Gammeren, D., Cicale, M. & Dodd, S. L. (2002) Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm, *Journal of applied physiology*. **92**, 1851-8.
80. Radell, P. J., Remahl, S., Nichols, D. G. & Eriksson, L. I. (2002) Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function, *Intensive care medicine*. **28**, 358-64.
81. Sassoon, C. S., Caiozzo, V. J., Manka, A. & Sieck, G. C. (2002) Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation, *Journal of applied physiology*. **92**, 2585-95.
82. Yang, L., Luo, J., Bourdon, J., Lin, M. C., Gottfried, S. B. & Petrof, B. J. (2002) Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **166**, 1135-40.
83. McClung, J. M., Kavazis, A. N., DeRuisseau, K. C., Falk, D. J., Deering, M. A., Lee, Y., Sugiura, T. & Powers, S. K. (2007) Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **175**, 150-9.
84. Bernard, N., Matecki, S., Py, G., Lopez, S., Mercier, J. & Capdevila, X. (2003) Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits, *Intensive care medicine*. **29**, 111-8.
85. Shanely, R. A., Zergeroglu, M. A., Lennon, S. L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A. & Powers, S. K. (2002) Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **166**, 1369-74.
86. DeRuisseau, K. C., Kavazis, A. N., Deering, M. A., Falk, D. J., Van Gammeren, D., Yimlamai, T., Ordway, G. A. & Powers, S. K. (2005) Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm, *Journal of applied physiology*. **98**, 1314-21.
87. McClung, J. M., Van Gammeren, D., Whidden, M. A., Falk, D. J., Kavazis, A. N., Hudson, M. B., Gayan-Ramirez, G., Decramer, M., DeRuisseau, K. C. & Powers, S. K. (2009) Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation, *Critical care medicine*. **37**, 1373-9.

88. Zhu, E., Sassoon, C. S., Nelson, R., Pham, H. T., Zhu, L., Baker, M. J. & Caiozzo, V. J. (2005) Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm, *Journal of applied physiology*. **99**, 747-56.
89. Radell, P., Edstrom, L., Stibler, H., Eriksson, L. I. & Ansved, T. (2004) Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets, *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. **48**, 430-7.
90. Racz, G. Z., Gayan-Ramirez, G., Testelmans, D., Cadot, P., De Paepe, K., Zador, E., Wuytack, F. & Decramer, M. (2003) Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **168**, 297-304.
91. DeRuisseau, K. C., Shanely, R. A., Akunuri, N., Hamilton, M. T., Van Gammeren, D., Zergeroglu, A. M., McKenzie, M. & Powers, S. K. (2005) Diaphragm unloading via controlled mechanical ventilation alters the gene expression profile, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **172**, 1267-75.
92. Jaber, S., Sebbane, M., Koechlin, C., Hayot, M., Capdevila, X., Eledjam, J. J., Prefaut, C., Ramonatxo, M. & Matecki, S. (2005) Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm, *Intensive care medicine*. **31**, 1427-33.
93. Zergeroglu, M. A., McKenzie, M. J., Shanely, R. A., Van Gammeren, D., DeRuisseau, K. C. & Powers, S. K. (2003) Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm, *Journal of applied physiology*. **95**, 1116-24.
94. Agten, A., Maes, K., Smuder, A., Powers, S. K., Decramer, M. & Gayan-Ramirez, G. (2011) N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation, *Critical care medicine*. **39**, 777-82.
95. Betters, J. L., Criswell, D. S., Shanely, R. A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K. C., Deering, M., Yimlamai, T. & Powers, S. K. (2004) Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **170**, 1179-84.
96. McClung, J. M., Kavazis, A. N., Whidden, M. A., DeRuisseau, K. C., Falk, D. J., Criswell, D. S. & Powers, S. K. (2007) Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling, *The Journal of physiology*. **585**, 203-15.
97. Whidden, M. A., Smuder, A. J., Wu, M., Hudson, M. B., Nelson, W. B. & Powers, S. K. (2010) Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm, *Journal of applied physiology*. **108**, 1376-82.
98. Knisely, A. S., Leal, S. M. & Singer, D. B. (1988) Abnormalities of diaphragmatic muscle in neonates with ventilated lungs, *The Journal of pediatrics*. **113**, 1074-7.
99. Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M. E., Budak, M. T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L. R., Rubinstein, N. A., Powers, S. K. & Shrager, J. B. (2008)

Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans, *The New England journal of medicine*. **358**, 1327-35.

100. Hussain, S. N., Mofarrahi, M., Sigala, I., Kim, H. C., Vassilakopoulos, T., Maltais, F., Bellenis, I., Chaturvedi, R., Gottfried, S. B., Metrakos, P., Danialou, G., Matecki, S., Jaber, S., Petrof, B. J. & Goldberg, P. (2010) Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **182**, 1377-86.

101. Jaber, S., Petrof, B. J., Jung, B., Chanques, G., Berthet, J. P., Rabuel, C., Bouyabrine, H., Courouble, P., Koechlin-Ramonatxo, C., Sebbane, M., Similowski, T., Scheuermann, V., Mebazaa, A., Capdevila, X., Mornet, D., Mercier, J., Lacampagne, A., Philips, A. & Matecki, S. (2011) Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **183**, 364-71.

102. Levine, S., Biswas, C., Dierov, J., Barsotti, R., Shrager, J. B., Nguyen, T., Sonnad, S., Kucharchzuk, J. C., Kaiser, L. R., Singhal, S. & Budak, M. T. (2011) Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **183**, 483-90.

103. Hermans, G., Agten, A., Testelmans, D., Decramer, M. & Gayan-Ramirez, G. (2010) Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study, *Critical care*. **14**, R127.

104. Chevrolet, J. C. (1990) Difficult weaning from mechanical ventilation, *Lung*. **168 Suppl**, 829-32.

105. Daniel Martin, A., Smith, B. K. & Gabrielli, A. (2013) Mechanical ventilation, diaphragm weakness and weaning: a rehabilitation perspective, *Respiratory physiology & neurobiology*. **189**, 377-83.

106. Esteban, A., Ferguson, N. D., Meade, M. O., Frutos-Vivar, F., Apezteguia, C., Brochard, L., Raymondos, K., Nin, N., Hurtado, J., Tomicic, V., Gonzalez, M., Elizalde, J., Nightingale, P., Abroug, F., Pelosi, P., Arabi, Y., Moreno, R., Jibaja, M., D'Empaire, G., Sandi, F., Matamis, D., Montanez, A. M., Anzueto, A. & Group, V. (2008) Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **177**, 170-7.

107. Esteban, A., Alia, I., Ibanez, J., Benito, S. & Tobin, M. J. (1994) Modes of mechanical ventilation and weaning. A national survey of Spanish hospitals. The Spanish Lung Failure Collaborative Group, *Chest*. **106**, 1188-93.

108. Esteban, A., Frutos, F., Tobin, M. J., Alia, I., Solsona, J. F., Valverdu, I., Fernandez, R., de la Cal, M. A., Benito, S., Tomas, R. & et al. (1995) A comparison of four methods of weaning patients from mechanical ventilation. Spanish Lung Failure Collaborative Group, *The New England journal of medicine*. **332**, 345-50.

109. Dasta, J. F., McLaughlin, T. P., Mody, S. H. & Piech, C. T. (2005) Daily cost of an intensive care unit day: the contribution of mechanical ventilation, *Critical care medicine*. **33**, 1266-71.

110. Decramer, M., Lacquet, L. M., Fagard, R. & Rogiers, P. (1994) Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **150**, 11-6.
111. Segredo, V., Caldwell, J. E., Matthay, M. A., Sharma, M. L., Gruenke, L. D. & Miller, R. D. (1992) Persistent paralysis in critically ill patients after long-term administration of vecuronium, *The New England journal of medicine*. **327**, 524-8.
112. Jubran, A. & Tobin, M. J. (1997) Pathophysiologic basis of acute respiratory distress in patients who fail a trial of weaning from mechanical ventilation, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **155**, 906-15.
113. Harikumar, G., Egberongbe, Y., Nadel, S., Wheatley, E., Moxham, J., Greenough, A. & Rafferty, G. F. (2009) Tension-time index as a predictor of extubation outcome in ventilated children, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **180**, 982-8.
114. Vassilakopoulos, T., Zakyntinos, S. & Roussos, C. (1998) The tension-time index and the frequency/tidal volume ratio are the major pathophysiologic determinants of weaning failure and success, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **158**, 378-85.
115. Ayas, N. T., McCool, F. D., Gore, R., Lieberman, S. L. & Brown, R. (1999) Prevention of human diaphragm atrophy with short periods of electrical stimulation, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **159**, 2018-20.
116. Sassoon, C. S., Zhu, E. & Caiozzo, V. J. (2004) Assist-control mechanical ventilation attenuates ventilator-induced diaphragmatic dysfunction, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **170**, 626-32.
117. Futier, E., Constantin, J. M., Combaret, L., Mosoni, L., Roszyk, L., Sapin, V., Attaix, D., Jung, B., Jaber, S. & Bazin, J. E. (2008) Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm, *Critical care*. **12**, R116.
118. Jung, B., Constantin, J. M., Rossel, N., Le Goff, C., Sebbane, M., Coisel, Y., Chanques, G., Futier, E., Hugon, G., Capdevila, X., Petrof, B., Matecki, S. & Jaber, S. (2010) Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an in vivo and in vitro study, *Anesthesiology*. **112**, 1435-43.
119. Gayan-Ramirez, G., Testelmans, D., Maes, K., Racz, G. Z., Cadot, P., Zador, E., Wuytack, F. & Decramer, M. (2005) Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects, *Critical care medicine*. **33**, 2804-9.
120. Ambrosino, N. & Rossi, A. (2002) Proportional assist ventilation (PAV): a significant advance or a futile struggle between logic and practice?, *Thorax*. **57**, 272-6.
121. Terzi, N., Piquilloud, L., Roze, H., Mercat, A., Lofaso, F., Delisle, S., Jolliet, P., Sottiaux, T., Tassaux, D., Roesler, J., Demoule, A., Jaber, S., Mancebo, J., Brochard, L. & Richard, J. C. (2012) Clinical review: Update on neurally adjusted ventilatory assist--report of a round-table conference, *Critical care*. **16**, 225.

122. Groom, A. C., Ellis, C. G. & Potter, R. F. (1984) Microvascular geometry in relation to modeling oxygen transport in contracted skeletal muscle, *The American review of respiratory disease*. **129**, S6-9.
123. Tobin, M. J., Laghi, F. & Jubran, A. (2010) Narrative review: ventilator-induced respiratory muscle weakness, *Annals of internal medicine*. **153**, 240-5.
124. Ali, H. H., Savarese, J. J., Lebowitz, P. W. & Ramsey, F. M. (1981) Twitch, tetanus and train-of-four as indices of recovery from nondepolarizing neuromuscular blockade, *Anesthesiology*. **54**, 294-7.
125. March, P. A. & Muir, W. W. (2005) Bispectral analysis of the electroencephalogram: a review of its development and use in anesthesia, *Veterinary anaesthesia and analgesia*. **32**, 241-55.
126. Laporta, D. & Grassino, A. (1985) Assessment of transdiaphragmatic pressure in humans, *Journal of applied physiology*. **58**, 1469-76.
127. Siafakas, N. M., Jordan, M., Wagner, H., Breen, E. C., Benoit, H. & Wagner, P. D. (2001) Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia, *The European respiratory journal*. **17**, 681-7.
128. Alexopoulou, C., Mitrouska, I., Arvanitis, D., Tzanakis, N., Chalkiadakis, G., Melissas, J., Zervou, M. & Siafakas, N. (2005) Vascular-specific growth factor mRNA levels in the human diaphragm, *Respiration; international review of thoracic diseases*. **72**, 636-41.
129. Aliverti, A. & Macklem, P. T. (2001) How and why exercise is impaired in COPD, *Respiration; international review of thoracic diseases*. **68**, 229-39.
130. Potter, W. A., Olafsson, S. & Hyatt, R. E. (1971) Ventilatory mechanics and expiratory flow limitation during exercise in patients with obstructive lung disease, *The Journal of clinical investigation*. **50**, 910-9.
131. Sampson, M. G. & Grassino, A. E. (1983) Load compensation in obese patients during quiet tidal breathing, *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. **55**, 1269-76.
132. Sassoon, C. S., Lodia, R., Light, R. W. & Mahutte, C. K. (1990) Maximum inspiratory muscle endurance capacity during resistive loading in chronic obstructive pulmonary disease, *Respiration; international review of thoracic diseases*. **57**, 343-50.
133. Zerah, F., Harf, A., Perlemuter, L., Lorino, H., Lorino, A. M. & Atlan, G. (1993) Effects of obesity on respiratory resistance, *Chest*. **103**, 1470-6.
134. Skalak, T. C. & Price, R. J. (1996) The role of mechanical stresses in microvascular remodeling, *Microcirculation*. **3**, 143-65.

135. Quinn, T. P., Schlueter, M., Soifer, S. J. & Gutierrez, J. A. (2002) Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells, *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. **282**, L897-903.
136. Gruden, G., Thomas, S., Burt, D., Lane, S., Chusney, G., Sacks, S. & Viberti, G. (1997) Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells: mechanisms of signal transduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 12112-6.
137. Harada, K., Friedman, M., Lopez, J. J., Wang, S. Y., Li, J., Prasad, P. V., Pearlman, J. D., Edelman, E. R., Sellke, F. W. & Simons, M. (1996) Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia, *The American journal of physiology*. **270**, H1791-802.
138. Sharma, H. S., Wunsch, M., Schmidt, M., Schott, R. J., Kandolf, R. & Schaper, W. (1992) Expression of angiogenic growth factors in the collateralized swine myocardium, *Exs*. **61**, 255-60.
139. Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H. & Keshet, E. (1993) Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis, *The Journal of clinical investigation*. **91**, 2235-43.
140. Seko, Y., Seko, Y., Takahashi, N., Shibuya, M. & Yazaki, Y. (1999) Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes, *Biochemical and biophysical research communications*. **254**, 462-5.
141. Li, J., Hampton, T., Morgan, J. P. & Simons, M. (1997) Stretch-induced VEGF expression in the heart, *The Journal of clinical investigation*. **100**, 18-24.
142. Zheng, W., Brown, M. D., Brock, T. A., Bjercke, R. J. & Tomanek, R. J. (1999) Bradycardia-induced coronary angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor, *Circulation research*. **85**, 192-8.
143. Zheng, W., Seftor, E. A., Meininger, C. J., Hendrix, M. J. & Tomanek, R. J. (2001) Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta, *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. **280**, H909-17.
144. Egginton, S., Hudlicka, O., Brown, M. D., Walter, H., Weiss, J. B. & Bate, A. (1998) Capillary growth in relation to blood flow and performance in overloaded rat skeletal muscle, *Journal of applied physiology*. **85**, 2025-32.
145. Kato, H., Osajima, A., Uezono, Y., Okazaki, M., Tsuda, Y., Tanaka, H., Oishi, Y., Izumi, F. & Nakashima, Y. (1999) Involvement of PDGF in pressure-induced mesangial cell proliferation through PKC and tyrosine kinase pathways, *The American journal of physiology*. **277**, F105-12.
146. Li, Q., Muragaki, Y., Hatamura, I., Ueno, H. & Ooshima, A. (1998) Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta, *Journal of vascular research*. **35**, 93-103.

147. Riser, B. L., Cortes, P., Yee, J., Sharba, A. K., Asano, K., Rodriguez-Barbero, A. & Narins, R. G. (1998) Mechanical strain- and high glucose-induced alterations in mesangial cell collagen metabolism: role of TGF-beta, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* **9**, 827-36.
148. Ding, H., Liu, Q., Hua, M., Ding, M., Du, H., Zhang, W., Li, Z. & Zhang, J. (2011) Polymorphisms of hypoxia-related genes in subjects susceptible to acute mountain sickness, *Respiration; international review of thoracic diseases.* **81**, 236-41.
149. Siafakas, N. M., Mitrouska, I., Bouros, D. & Georgopoulos, D. (1999) Surgery and the respiratory muscles, *Thorax.* **54**, 458-65.
150. De Jonghe, B., Cook, D., Sharshar, T., Lefaucheur, J. P., Carlet, J. & Outin, H. (1998) Acquired neuromuscular disorders in critically ill patients: a systematic review. Groupe de Reflexion et d'Etude sur les Neuromyopathies En Reanimation, *Intensive care medicine.* **24**, 1242-50.
151. Maher, J., Rutledge, F., Remtulla, H., Parkes, A., Bernardi, L. & Bolton, C. F. (1995) Neuromuscular disorders associated with failure to wean from the ventilator, *Intensive care medicine.* **21**, 737-43.
152. Witt, N. J., Zochodne, D. W., Bolton, C. F., Grand'Maison, F., Wells, G., Young, G. B. & Sibbald, W. J. (1991) Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure, *Chest.* **99**, 176-84.
153. De Jonghe, B., Sharshar, T., Lefaucheur, J. P., Authier, F. J., Durand-Zaleski, I., Boussarsar, M., Cerf, C., Renaud, E., Mesrati, F., Carlet, J., Raphael, J. C., Outin, H., Bastuji-Garin, S. & Groupe de Reflexion et d'Etude des Neuromyopathies en, R. (2002) Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study, *Jama.* **288**, 2859-67.
154. Arroliga, A., Frutos-Vivar, F., Hall, J., Esteban, A., Apezteguia, C., Soto, L., Anzueto, A. & International Mechanical Ventilation Study, G. (2005) Use of sedatives and neuromuscular blockers in a cohort of patients receiving mechanical ventilation, *Chest.* **128**, 496-506.
155. De Jonghe, B., Bastuji-Garin, S., Sharshar, T., Outin, H. & Brochard, L. (2004) Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation?, *Intensive care medicine.* **30**, 1117-21.
156. Murray, M. J., Cowen, J., DeBlock, H., Erstad, B., Gray, A. W., Jr., Tescher, A. N., McGee, W. T., Prielipp, R. C., Susla, G., Jacobi, J., Nasraway, S. A., Jr., Lumb, P. D. & Task Force of the American College of Critical Care Medicine of the Society of Critical Care Medicine, A. S. o. H.-S. P. A. C. o. C. P. (2002) Clinical practice guidelines for sustained neuromuscular blockade in the adult critically ill patient, *Critical care medicine.* **30**, 142-56.
157. Behbehani, N. A., Al-Mane, F., D'Yachkova, Y., Pare, P. & FitzGerald, J. M. (1999) Myopathy following mechanical ventilation for acute severe asthma: the role of muscle relaxants and corticosteroids, *Chest.* **115**, 1627-31.
158. Marinelli, W. A. & Leatherman, J. W. (2002) Neuromuscular disorders in the intensive care unit, *Critical care clinics.* **18**, 915-29, x.

159. Davis, N. A., Rodgers, J. E., Gonzalez, E. R. & Fowler, A. A., 3rd (1998) Prolonged weakness after cisatracurium infusion: a case report, *Critical care medicine*. **26**, 1290-2.
160. Leatherman, J. W., Fluegel, W. L., David, W. S., Davies, S. F. & Iber, C. (1996) Muscle weakness in mechanically ventilated patients with severe asthma, *American journal of respiratory and critical care medicine*. **153**, 1686-90.
161. Olivieri, L. & Plourde, G. (2005) Prolonged (more than ten hours) neuromuscular blockade after cardiac surgery: report of two cases, *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. **52**, 88-93.
162. Sessler, C. N. (2005) Sedation, analgesia, and neuromuscular blockade for high-frequency oscillatory ventilation, *Critical care medicine*. **33**, S209-16.
163. Testelmans, D., Maes, K., Wouters, P., Gosselin, N., Deruisseau, K., Powers, S., Sciot, R., Decramer, M. & Gayan-Ramirez, G. (2006) Rocuronium exacerbates mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction in rats, *Critical care medicine*. **34**, 3018-23.
164. Tousignant, C. P., Bevan, D. R., Eisen, A. A., Fenwick, J. C. & Tweedale, M. G. (1995) Acute quadriplegia in an asthmatic treated with atracurium, *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. **42**, 224-7.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Α. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο	Δερμιτζάκη Δέσποινα
Ημερομηνία Γέννησης	19 Αυγούστου 1970
Τόπος Γέννησης	Ηράκλειο
Οικογενειακή Κατάσταση	Έγγαμος, μητέρα 2 παιδιών
Διεύθυνση Κατοικίας	Κ. Παλαμά 4, Ηράκλειο, ΤΚ 71306
e-mail	despinadermitzaki@yahoo.com

Β. ΣΠΟΥΔΕΣ

Μέση Εκπαίδευση:	1976-1988 Γ' Γυμνάσιο - Λύκειο Ηρακλείου
Ανώτατη Εκπαίδευση:	1989-1995 Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ξένες Γλώσσες:	Αγγλικά.

Γ. ΤΙΤΛΟΙ-ΥΠΗΡΕΣΙΑ

1. **Πτυχίο Ιατρικής:** Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, 30-11-1995.
2. **Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος:** Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου, 11-12-1995.
3. **Υπηρεσία υπαίθρου:** Περιφερειακό Ιατρείο Μελιδονίου, Κέντρο Υγείας Περάματος Ρεθύμνου, 17-01-1996 έως 17-03-1997.
4. **Άσκηση στην ειδικότητα της Αναισθησιολογίας:** Πανεπιστημιακή Αναισθησιολογική κλινική ΠΑΓΝΗ, 4-12-1997 έως 11-12-2002.
5. **Τίτλος ειδικότητας Αναισθησιολογίας:** Ηράκλειο 1-4-2003.
6. **Ευρωπαϊκό Δίπλωμα Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας (DEAA):** 19-10-2003.

7. Επικουρικός ιατρός στην Αναισθησιολογική κλιν. ΠΑΓΝΗ: 13-6-2003 έως και 12-6 2004.
8. Επικουρικός ιατρός στην Αναισθησιολογική κλιν.ΓΝ Αγ. Νικολάου: 5-11-2004 έως και 4-3-2005.
9. Επικουρικός ιατρός στην Αναισθησιολογική κλινική ΠΑΓΝΗ: 23-5-2005 έως και 22-5-2006.
10. **Επιμελήτρια Β΄ Αναισθησιολογίας**, Αναισθησιολογική κλινική, ΠΑΓΝΗ, 23-5-2006.
11. **Επιμελήτρια Α΄ Αναισθησιολογίας**, Αναισθησιολογική κλινική, ΠΑΓΝΗ, 8-9-2011, έως σήμερα.

Δ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1. Clinical Fellow, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών. Συμμετοχή στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών ανταλλαγών (LEONARDO DA VINCI) για την απόκτηση εμπειρίας στην οργάνωση και λειτουργία του Τμήματος Επειγόντων Περιστατικών σε δύο νοσοκομεία του Εξωτερικού:

A) Gasthuisberg Καθολικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Leuven, Βέλγιο:

21-2-2000 έως 17-3- 2000, Διευθυντής Prof. Dr Delooz.

B) Hope Hospital, Salford, Manchester, Μεγάλη Βρετανία: 25-8-2001 έως 6-10-2001,

Διευθυντής Prof. Dr Yates.

2. Εκπαίδευση στην καρδιοαναισθησία στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό κέντρο: 14-01-2014 έως 14-02-2014.

Ε. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. Ως εκπαιδευόμενη

1. Συμμετοχή με παρουσιάσεις μαθημάτων στο πρόγραμμα «Συνεχιζόμενη Ιατρική Εκπαίδευση» της Αναισθησιολογικής κλινικής ΠΑΓΝΗ σε όλη τη διάρκεια της ειδικότητας, ως επικουρικός ιατρός και ως επιμελήτρια Β΄ και Α΄.

2. Παρακολούθηση του 5^{ου} Μετεκπαιδευτικού Προγράμματος Επείγουσας Προνοσοκομειακής Ιατρικής του Ε.Κ.Α.Β., διάρκειας 1 έτους, εκπαιδευτικής περιόδου 1999-2000 και λήψη πιστοποιητικού επαρκείας κατόπιν εξετάσεων.

3. Παρακολούθηση με επιτυχία του προγράμματος ATLS (Advanced Trauma Life Support) provider course, υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης (ERC), Αθήνα, Μάρτιος 2001.

4. Παρακολούθηση με επιτυχία του προγράμματος APLS (Advanced Pediatric Life Support) provider course, υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης (ERC), Ηράκλειο, Ιούνιος 2002.

5. Παρακολούθηση με επιτυχία του προγράμματος BLS (Basic Life Support) / AED (Automated External Defibrillator) provider course, υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης (ERC), Ηράκλειο, Μάιος 2002.

6. Παρακολούθηση με επιτυχία του προγράμματος ALS (Advanced Life Support) provider course, υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης (ERC), Ηράκλειο, Οκτώβριος 2003.

2. Ως εκπαιδύτρια

1. Διαπιστευμένη από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης (ERC) εκπαιδύτρια (**full instructor**) στο πρόγραμμα BLS / AED provider course και συμμετοχή στα αντίστοιχα προγράμματα εκπαίδευσης φοιτητών, ιατρών, νοσηλευτών και εθελοντών του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού.

2. Διαπιστευμένη από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης (ERC) εκπαιδύτρια (**full instructor**) στο πρόγραμμα ALS (Advanced Life Support) provider course και συμμετοχή στα αντίστοιχα προγράμματα εκπαίδευσης ιατρών και νοσηλευτών.

3. Διαπιστευμένη εκπαιδύτρια (**full instructor**) στο πρόγραμμα APLS (Advanced Paediatric Life Support) provider course και συμμετοχή στα αντίστοιχα προγράμματα εκπαίδευσης ιατρών.

4. Διαπιστευμένη εκπαιδύτρια (**full instructor**) στο πρόγραμμα PLS (Paediatric Life Support) provider course και συμμετοχή στα αντίστοιχα προγράμματα εκπαίδευσης ιατρών και νοσηλευτών.

5. Συμμετοχή με διαλέξεις στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα των εθελοντών του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού.

ΣΤ. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά

1. Anagnostis A, Neofytou E, Soultziz N, Kampas D, Drositis I, **Dermitzaki D**, Tzanakis N, Schiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Molecular profiling of EGFR family in chronic obstructive pulmonary disease: correlation with airway obstruction. *Eur J Clin Invest* 2013;43(12):1299-306.

2. **Dermitzaki D**, Tzortzaki E, Soultziz N, Neofytou E, Prinianakis G, Matalliotakis I, Askitopoulou H, Siafakas NM. Molecular response of the human diaphragm on different modes of mechanical ventilation. *Respiration* 2013;85(3): 228-35.

3. Vardas PE, Manios EG, Kanoupakis EM, **Dermitzaki DN**, Mavrakis HE, Kallergis EM. Atrial defibrillation threshold in humans minutes after atrial fibrillation induction; "A stitch in time saves nine". Eur Heart J 2001; 22 (17): 1613-7.
4. Manios EG, Kanoupakis EM, Mavrakis HE, Kallergis EM, **Dermitzaki DN**, Vardas PE. Sinus pacemaker function after cardioversion of chronic atrial fibrillation: is sinus node remodeling related with recurrence? J Cardiovasc Electrophysiol. 2001; 12(7): 800-6.
5. Manios EG, Mavrakis HE, Kanoupakis EM, Kallergis EM, **Dermitzaki DN**, Kambouraki DC, Vardas PE. Effects of amiodarone and diltiazem on persistent atrial fibrillation conversion and recurrence rates: a randomized controlled trial. Cardiovasc Drugs Ther. 2003; 17(1):31-9.
6. Matalliotakis IM, Cakmak H, Krasonikolakis GD, **Dermitzaki D**, Fragouli Y, Vlastos G, Arici A. Endometriosis related to family history of malignancies in the Yale series. Surg Oncol 2010; 19(1): 33-7.
7. Matalliotakis I, Cakmak H, **Dermitzaki D**, Zervoudis S, Goumenou A, Fragouli Y. Increased rate of endometriosis and spontaneous abortion in an in vitro fertilization program: no correlation with epidemiological factors. Gynecol Endocrinol 2008; 24(4): 194-8.

2. Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Φ. Χανιωτάκη, **Δ. Δερμιτζάκη**, Κ. Καυκαλάκη, Γ. Σολιδάκης, Ο. Φραιδάκης, Α. Παπαιωάννου, Ε. Ασκητοπούλου. *Δείκτες Ποιότητας Περιεγχειρητικής Περιόδου*. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Κως 12-16 Μαΐου 1999. **Δ. Δερμιτζάκη**, Φ. Χανιωτάκη, Ι. Καμαριανάκης, Α. Παπαιωάννου, Ο.Φραιδάκης, Ε.Ασκητοπούλου. *Συσχέτιση Κατηγορίας ASA και Μετεγχειρητικού Πόνου με Μετεγχειρητικές Καρδιαγγειακές και Αναπνευστικές Επιπλοκές*. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Θεσσαλονίκη, 9-13 Μαΐου 2001.
3. Α. Ζουμπρούλη, Α. Χατζημιχάλη, Τ. Λεφάκη, **Δ. Δερμιτζάκη**, Γ. Φραντζέσκος, Ε. Ασκητοπούλου. *Αναισθησιολογική Αντιμετώπιση Ασθενούς με Βαριά Ισχαιμική Καρδιοπάθεια και Μη-Ελεγχόμενη Θυρεοτοξική Κρίση*. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Θεσσαλονίκη, 9-13 Μαΐου 2001.
4. Μ. Φιλιππάκη, Μ. Αναστασάκη, **Δ. Δερμιτζάκη**, Α. Τσιφτσή, Ε. Γερωμαρκάκη, Δ. Γεωργόπουλος, Ε. Ασκητοπούλου. *Μη προγραμματισμένες εισαγωγές στη ΜΕΘ μετά από προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις*. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Αθήνα 17-17 Οκτωβρίου 2003.
5. Κ. Κατσανούλας, Α. Ηλιάδης, Α.Μ. Σπανάκη, Μ. Χαντζάρα, **Δ. Δερμιτζάκη**, Ε. Μανουσάκη, Σ. Σμπυράκης. *Κερανοβόλος ηπατική ανεπάρκεια σε ασθενή με νόσο Wilson*. 41^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος 13-15 Ιουνίου 2003.
6. **Δ. Δερμιτζάκη**, Μ. Νεονάκη, Π. Γεωργογιαννάκη, Ε. Καλλέργης, Γ. Τσαγκαράκη, Ε. Ασκητοπούλου. *Καισαρική τομή υπό γενική ή υπαραχνοειδή αναισθησία; Απάντηση του*

Αυτονόμου Νευρικού Συστήματος. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Μύκονος 11-15 Μαΐου 2005.

7. **Δ.Δερμιτζάκη**, Κ. Σγουρού, Γ. Πρινιανάκης, Ε. Τζωρτζάκη, Ν. Τζανάκης, Ε. Ασκητοπούλου. *Η επίδραση του τύπου του αερισμού στην αναπνευστική λειτουργία μετά από αναισθησία*. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Ρόδος 6-10 Μαΐου 2009.

8. Μ. Καλογριδάκη, Μ. Μαρούλη, Δ. Κυριαζής, **Δ. Δερμιτζάκη**. *Εισπνευστική εισαγωγή στην αναισθησία και τοποθέτηση ΕΤΣ διπλού αυλού σε ασθενή με σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας*. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Αλεξανδρούπολη 12-15 Μαΐου 2011. Πρώτο βραβείο στο ΒΗΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΩΝ.

9. **Δ. Δερμιτζάκη**, Φ. Χανιωτάκη, Μ. Χριστοφάκη, Ξ. Σουβατζή, Κ. Δεμριτζόγλου, Α. Παπαιωάννου. *Περιεγχειρητική αντιμετώπιση ασθενούς με συγγενή ανεπάρκεια FXI που υποβλήθηκε σε προγραμματισμένη αντικατάσταση αορτικής βαλβίδας*. 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Αλεξανδρούπολη 23-26 Απριλίου 2015.

3. Διαλέξεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. *Ιδιαιτερότητες στην αναισθησία στις ενδοσκοπικές γυναικολογικές επεμβάσεις*. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης & 3^ο Συμπόσιο Ενδοσκόπησης, Ηράκλειο 17-19 Οκτωβρίου 2008.

2. *Is there a place for Pressure Support during anaesthesia?*. Συμπόσιο «What makes the difference in naesthesia?», Αναισθησιολογική Κλινική, ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 15-18 Μαΐου 2008.

3. *Σχέσεις αλληλεξάρτησης του Τμήματος Επειγόντων Περιστατικών με τους οικογενειακούς γιατρούς στο Εθνικό Σύστημα Υγείας στη Μεγάλη Βρετανία*. Ημερίδα για το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο 8 Ιουνίου 2002.

4. Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. F. Haniotaki, **D. Dermitzaki**, K. Kafkalaki, G. Solidakis, A. Papaioannou, H. Askitopoulou. *Evaluation of Measures of Quality of Peri-operative Care*. 21st Annual Meeting of European Academy of Anaesthesiolog, Βουδαπέστη, 26-29 Αυγούστου 1999.

2. A. Petrou, M. Marketou, G. Kohiadakis, **D. Dermitzaki**, M. Zeaki, A. Chatzimichali, P. Agouridakis, D. Michaloudis. *Heart rate variability and QT variability during volatile induction of anaesthesia*. Annual Congress of European Society of Anaesthesiologists, Άμστερνταμ, 29 Μαΐου -1 Ιουνίου 1999.

3. **D. Dermitzak**, F. Haniotaki, O. Fraidakis, A. Papaioannou, H. Askitopoulou. *Scale of Quality of Post-Operative Care*. 8th Annual Meeting of European Society of Anaesthesiologists, Βιέννη, 1-4 Απριλίου 2000.
4. **D. Dermitzaki**, F. Chaniotaki, J. Kamarianakis, O. Fraidakis, A. Papaioannou, H. Askitopoulou. *ASA and Severity of Postoperative Pain are Prognostic Factors for Postoperative Cardiovascular & Respiratory Complications*. 23rd Annual Meeting of European Academy of Anaesthesiology, Γκράτς, 30 Αυγούστου - 1 Σεπτεμβρίου 2001.
5. E. Kanoupakis, E. Manios, H. Mavrakis, E. Kallergis, A. Patrianakos, D. Kambouraki, **D. Dermitzaki**, P. Vardas. *Atrioventricular node function following internal cardioversion of chronic atrial fibrillation*. Europace Supplements Vol 2, June 2001; 694 pB107.
6. E.M. Kanoupakis, E.G. Manios, E.M. Kallergis, H.E. Mavrakis, D.C. Kambouraki, **D.N. Dermitzaki**, P.E. Vardas. *Time course of ventricular electrical remodeling after conversion of chronic atrial fibrillation*. European Heart Journal Vol 22, Abstr. Suppl. 2001, p 332.
7. E. Kondili, E. Metaxari, J. Romanos, **D. Dermitzaki**, D. Tsiftsis, H. Askitopoulou, D. Georgopoulos. *Effects of Aortic Stop Flow and Total Abdominal Ischemic Perfusion on Respiratory System Mechanics*. 5th State-Of-The-Art, Interdisciplinary Review Course, Αθήνα, 6-8 Απριλίου 2001.
8. E.M. Kanoupakis, E.G. Manios, H.E. Mavrakis, E.M. Kallergis, **D.N. Dermitzaki**, D.C. Kambouraki, P.E. Vardas. *Clinical predictors of successful cardioversion of persistent AF with a balloon-tipped internal cardioversion catheter*. American Heart Association Scientific Sessions 2002, Σικάγο ΗΠΑ, 17-20 Νοεμβρίου 2002.
9. E.M. Kanoupakis, E.G. Manios, H.E. Mavrakis, E.M. Kallergis, **D.N. Dermitzaki**, P.E. Vardas. *Internal cardioversion as an alternative option to external cardioversion of AF in patients with congestive heart failure*. XXIV ESC Annual Congress, Βερολίνο, 31 Αυγούστου- 4 Σεπτεμβρίου 2002.
10. E.M. Kanoupakis, E.G. Manios, H.E. Mavrakis, E.M. Kallergis, D.C. Kambouraki, **D.N. Dermitzaki**, P.E. Vardas. *Diltiazem and Amiodarone pretreatment and AF cardioversion*. Cardiostim 2002, Νίκαια, 19-22 Ιουνίου 2002.
11. **D. Dermitzaki**, M. Neonaki, P. Georgogiannaki, E. Kallergis, H. Askitopoulou. *Heart Rate Variability Changes During Caesarean Section Under General or Spinal Anaesthesia*. uroanaesthesia, Λισσαβόνα, 5-8 Ιουνίου 2004.
12. **D. Dermitzaki**, E. Neofytou, I. Matalliotakis, E. Tzortzaki, H. Askitopoulou. *Diaphragmatic angiogenic growth factors mRNA levels in response to mode of ventilation during general anaesthesia*. Euroanaesthesia, Μιλάνο 6-9 Ιουνίου 2009.
13. **D. Dermitzaki**, M. Karatzi, V. Nyktari, G. Krasonikolakis, H. Askitopoulou. *Effect of mode of ventilation during anaesthesia on postoperative respiratory function*. Euroanaesthesia, Ελσίνκι 12-15 Ιουνίου 2010.

5. Παρακολούθηση ελληνικών συνεδρίων & σεμιναρίων

1. Συμπόσιο «Οξύς Πόνος», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 9-11 Μαΐου 1996.
2. Ημερίδα «Αθηροθρόμβωση, νεότεροι παράγοντες κινδύνου», Παθολογική & Αγγειοχειρουργική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 24 Οκτωβρίου 1998.
3. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Κως, 12-16 Μαΐου 1999.
4. 1^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Ύπνος και διαταραχές του». Ηράκλειο, 2 Οκτωβρίου 1999.
5. Διήμερο «Μυστικά Παιδιατρικής Αναισθησίας», Αθήνα, 13-14 Νοεμβρίου 1999.
6. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Αθήνα 7-10 Οκτωβρίου 1999.
7. 9^ο Πανελλήνιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Ηράκλειο, 30-31 Ιανουαρίου 1999.
8. Συμπόσιο «The Evolving Profile of Emergency Medicine», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 20-22 Οκτωβρίου 2000.
9. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο, 9-12 Νοεμβρίου 2000.
10. 10^ο Διήμερο Συμπόσιο Καρδιολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 1-2 Ιουλίου 2000
11. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Θεσσαλονίκη, 9-13 Μαΐου 2001.
12. 11^ο Συμπόσιο Καρδιολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 30 Ιουνίου-1 Ιουλίου 2001.
13. Συμπόσιο «Τελευταίες εξελίξεις στην αντιμετώπιση της Αρτηριακής Υπέρτασης», Γ' Παθολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών, Ηράκλειο, Οκτώβριος 2001.
14. Ημερίδα «Αντισύλληψη, νεότερα δεδομένα», Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 18 Δεκεμβρίου 2002.
15. Μεταπτυχιακό Σεμινάριο «Αποτρέψιμοι θάνατοι στην Επείγουσα Ιατρική», Ρέθυμνο, 30-31 Μαρτίου 2002. Συμπόσιο «Perioperative Management of the High Risk Patient», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 10-12 Μαΐου 2002.
16. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Χερσόνησος, 14-18 Μαΐου 2003.
17. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Αθήνα 17-19 Οκτωβρίου 2003.
18. 41^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 13-15 Ιουνίου 2003.
19. Συμπόσιο «The Impact of Anaesthesia on Organ Protection», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 20-23 Μαΐου 2004.
20. 6^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ», Κλινική Εντατικής Θεραπείας, ΠΑΓΝΗ, 6-7 Νοεμβρίου 2004.

21. Κλινικό Φροντιστήριο «Περιοχική διοισοφάγειος υπερηχοκαρδιογραφία», 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Μύκονος 11-15 Μαΐου 2005.
22. Κλινικό Φροντιστήριο «Θωρακική επισκληρίδιος-περιφερικοί νευρικοί αποκλεισμοί-περιοχική ανααισθησία στα παιδιά», 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Μύκονος 11-15 Μαΐου 2005.
23. Ημερίδα «ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ κατά την ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ: Η διαχείριση της κρίσης», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, 28 Ιανουαρίου 2006.
24. Συμπόσιο «What makes the difference in Anaesthesia?», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, 15-18 Μαΐου 2008.
25. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Ρόδος, 6-10 Μαΐου 2009.
26. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Αλεξανδρούπολη, 12-15 Μαΐου 2011.
27. 20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, Αθήνα, 25-27 Απριλίου 2013.
28. Ημερίδα «Περιεγχειρητική χορήγηση υγρών», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ 29-06-2013.
29. Ημερίδα «Εισαγωγή στην προσομοίωση», Αναισθησιολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, 28-09-2013.
30. Ημερίδα «Περιεγχειρητική αιμορραγία-Μείζον θέμα μεταξύ Αναισθησιολόγων και Χειρουργών», Θεσσαλονίκη, 22-11-2013.
31. Ημερίδα «Εξελιξείς που άλλαξαν την ανααισθησιολογία», Θεσσαλονίκη 7-12-2013.
32. Κλινικό φροντιστήριο «Διεγχειρητική Ηχοκαρδιογραφία», Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο, 14-15 Φεβρουαρίου 2015.

6. Παρακολούθηση ξένων συνεδρίων

1. 10th Annual Meeting of Academy of Anaesthesiology «The expanding Frontiers of Anaesthesiology», Ηράκλειο, 3-5 Σεπτεμβρίου 1998.
2. Συμπόσιο «Emergency Medicine in Europe: Looking into the Future», 20th Annual Meeting of European Academy of Anaesthesiology, Ηράκλειο, 2 Σεπτεμβρίου 1998.
3. «Pain in a Mediterranean Corner», Hellenic Pain Society & Israel Pain Association & Turkish Society of Algology, Ηράκλειο, 24-28 Μαρτίου 1999.
4. 8th Annual Meeting of European Society of Anaesthesiologists, Βιεννη, 1-4 Απριλίου 2000.
5. «JOINT ESRA-ESOA Congress 2000», 2nd Mediterranean & Balkan Congress of Regional naesthesia and Pain Therapy & VII European congress of Obstetric Anaesthesia, Αθήνα 18-21 Μαΐου 2000.
6. Euroanaesthesia, Λισσαβόνα 5-8 Ιουνίου 2004.

7. Euroanaesthesia, Μιλάνο 6-9 Ιουνίου 2009.
8. 7th International Symposium on the History of anaesthesia «Anaesthesia & Analgesia from Antiquity to the 20th century», Ηράκλειο 1-3 Οκτωβρίου 2009.
9. Euroanaesthesia, Ελσίνκι 12-15 Ιουνίου 2010.

Z. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

1. Συγγραφή κεφαλαίου στο βιβλίο «Οργάνωση Τμημάτων Επειγόντων Περιστατικών. Η εμπειρία από το Manchester και το Leuven με το πρόγραμμα LEONARDO DA VINCI». Ηράκλειο 2003.
2. Κάτοχος του Ευρωπαϊκού διπλώματος Αναισθησιολογίας από την Committee for European Education in Anaesthesiology (CEEAA).
3. Τακτικό μέλος σε: Ελληνική Αναισθησιολογική Εταιρεία & Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος.
4. Δίπλωμα επάρκειας στη βασική & εξειδικευμένη διαχείριση του αεραγωγού, Ελληνική Εταιρεία Διαχείρισης Αεραγωγού (ΕΕΔΑ), Αθήνα 30-08-2013 έως 1-12-2014.
5. Συμμετοχή στη διεθνή πολυκεντρική μελέτη ISOS (International Surgical Outcomes Study), 2014.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ