ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΩΤΙΟΣ ΚΑΛΦΑΡΕΝΤΖΟΣ
&
ΚΑΡΔΙΟΘΩΡΑΚΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΔΟΥΓΕΝΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ
ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΧΟΙΡΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ
ΑΥΤΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ
ΜΕ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ Ν. ΚΩΛΕΤΣΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΚΑΡΔΙΟΘΩΡΑΚΟΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ 2003

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΩΤΙΟΣ ΚΑΛΦΑΡΕΝΤΖΟΣ
&
ΚΑΡΔΙΟΘΩΡΑΚΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΔΟΥΓΕΝΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ
ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΧΟΙΡΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ
ΑΥΤΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ
ΜΕ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ**

ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ Ν. ΚΩΛΕΤΣΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΚΑΡΔΙΟΘΩΡΑΚΟΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ 2003

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Ανδρουλάκης:	Καθηγητής Χειρουργικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Επιβλέπων Καθηγητής Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.
Δημήτριος Δουγένης:	Καθηγητής Καρδιο-θωρακοχειρουργικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Εξεταστικής Επιτροπής.
Διονύσιος Σ. Μπονίκος:	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Εξεταστικής Επιτροπής.
Κωσταντίνος Σπυρόπουλος:	Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.
Μαρία Μελαχρινού:	Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.
Ευάγγελος Μαρίνος:	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.
Ευαγγελία Παπαδημητρίου:	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Στο Νίκο που έφυγε.
Στο Νίκο που ήρθε.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας περιεχομένων.....	vii
Ευχαριστίες.....	ix
Ευρετήριο εικόνων.....	xi
Ευρετήριο Πινάκων.....	xiii
Ευρετήριο Σχημάτων.....	xv
Γενικό Μέρος.....	1
Κεφάλαιο I: Επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα	
Στοιχεία ιστολογίας του περιφερικού αεραγωγού.....	3
Εισαγωγή στην έννοια της επιφανειακής τάσης.....	5
Η κυψελίδα ως μοντέλο συνενωμένων φυσαλίδων	7
Συμπύεση, αναδιπλώση και παραμόρφωση της κυψελίδας.....	10
Επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα στο φυσιολογικό πνεύμονα.....	12
Φυσιολογία του επιφανειοδραστικού παράγοντα πνεύμονα	12
Σύνθεση και ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα πνεύμονα.....	15
Υπότυποι και μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	18
Μηχανισμοί ρύθμισης του μεταβολισμού του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	20
Συμπεράσματα.....	21
Κεφάλαιο II: Επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα	
στη μεταμόσχευση πνεύμονα.....	23
Βλάβες της βιοφυσικής δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά την οξεία πνευμονική βλάβη.....	23
Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας στις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις.....	25
Χειρισμός δότη.....	25
Αποθήκευση του πνευμονικού μοσχεύματος.....	28
Πνευμονική επαναιμάτωση.....	31
Θεραπεία με επιφανειοδραστικό παράγοντα στην πνευμονική μεταμόσχευση.....	37
Συμπεράσματα.....	40
Ειδικό μέρος.....	43
Κεφάλαιο III: Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μεταμόσχευσης πνεύμονα.....	45
Εισαγωγή.....	45
Σκοπός.....	46
Μεθοδολογία-Υλικό.....	47
Πειραματικό πρωτόκολλο.....	47
Αναισθησιολογικό πρωτόκολλο.....	48
Χειρουργικό πρωτόκολλο.....	49
Μεθοδολογία μετρήσεων - Συλλογή των αποτελεσμάτων.....	56
Αιμοδυναμική.....	56
Μηχανική του πνεύμονα.....	57
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα.....	57
Ιστολογική μελέτη και μορφομετρία.....	58
Μετρική νιτριτών ιόντων (NO).....	59
Μετρική ενεργότητας ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης (EPO).....	59

Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	60
Κεφάλαιο IV: Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	63
Περιγραφή αποτελεσμάτων.....	63
Αιμοδυναμικές παράμετροι.....	63
Μηχανική του πνεύμονα.....	66
Συγκέντρωση Νιτρικού Οξειδίου (NO).....	68
Ενεργότητα ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης.....	70
Ιστολογία – Μορφομετρία Πνεύμονα.....	74
Συζήτηση.....	81
Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου.....	81
Η επίδραση της άμεσης χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα στο υποψήφιο μόσχευμα.....	88
Κεφάλαιο IV: Σύνοψη Πειραματικού Πρωτοκόλλου.....	99
Περίληψη.....	103
Summary.....	107
Index.....	113
Βιβλιογραφία.....	117

Η πρώτη μου επαφή με τις μεταμοσχεύσεις πνεύμονα έγινε το 1992 όταν τότε ο κ. Δημήτριος Δουγένης ξεκίνησε την πρώτη σειρά μεταμοσχεύσεων πνεύμονα σε πειραματόζωα και είχα την ευκαιρία να συμμετάσχω σε όλη αυτή την προσπάθεια όντας ακόμα φοιτητής στο τελευταίο έτος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών. Εντυπωσιάστηκα. Όταν πολύ αργότερα βρέθηκα νεαρός ειδικευόμενος στον ‘Ευαγγελισμό’ είχα την ευκαιρία να ζήσω από κοντά τις μεταμοσχεύσεις καρδιάς που η ομάδα του κ. Χ. Λόλα έχει υπό εξέλιξη. Είναι φανταστικό να βλέπεις ασθενείς χωρίς καμία ελπίδα ζωής να ανακάμπτουν και να τους δίνεται μια δεύτερη ευκαιρία ζωής. Νομίζω ότι οφείλουμε ως χώρα να συντονίσουμε τις δυνατότητές μας και να ακολουθήσουμε άλλες όπως η Ισπανία και να δημιουργήσουμε ένα δυναμικό πρόγραμμα μεταμοσχεύσεων.

Ο αρχικός ενθουσιασμός μου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ειδικότητάς μου ωρίμασε και αποφάσισα να τον μετατρέψω σε γνώση και μια τέτοια ευκαιρία θα ήταν η εκτέλεση μιας διατριβής με αυτό το θέμα. Ο κ. Δουγένης, ο άνθρωπος που ως φοιτητή με ενέπνευσε να ακολουθήσω αυτή την ειδικότητα, στάθηκε πάλι πολύτιμος αρωγός και με βοήθησε να στήσω ένα τέτοιο πολύπλοκο πειραματικό μοντέλο. Η διακριτική βοήθειά του τόσο σε πρακτικό επίπεδο όσο και σε θεωρητικό, βοήθησε τον ενθουσιασμό και την επιμονή μου για να έλθει σε αίσιο τέλος αυτή η πραγματικά δύσκολη προσπάθεια για τα ελληνικά δεδομένα. Μια τέτοια προσπάθεια, όπως άλλωστε και οι κλινικές μεταμοσχεύσεις, απαιτούν τη συνεργασία πολλών ειδικοτήτων και νοσηλευτικού προσωπικού. Ο ενθουσιασμός δεν έλειψε από μια μεγάλη ομάδα ανθρώπων που είτε συμμετείχαν ενεργά είτε έφτασαν στην Πάτρα απλά για να δουν την όλη προσπάθεια. Εδώ θα πρέπει να ευχαριστήσω:

Τον Καθηγητή Χειρουργικής Ιωάννη Ανδρουλάκη και δάσκαλό μου στα πρώτα χρόνια της εκπαίδευσής μου ως χειρουργό.

Τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Διονύσιο Μπονίκο για την αγάπη του στην εκπαίδευση που από τα φοιτητικά μου χρόνια στάθηκε κυρίαρχος καταλύτης των επιλογών μου, αλλά και τις κατευθυντήριες οδηγίες που έδωσε.

Τον Επιμελητή Α’ Θωρακοχειρουργικής Αντώνιο Χατζημιχάλη για την υπομονή του και την συνεπέστατη και πολύτιμη βοήθειά του σε όλη την εξέλιξη της προσπάθειας.

Το Διευθυντή μου Ίωνα Μπελλένη για τις ‘απαιτητικές’ παραινήσεις του και την ολόψυχη βοήθειά του.

Το Διευθυντή Αναισθησιολόγο κ. Κυριάκο Κοκκίνη για την πολύτιμη βοήθειά του.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Μαρίνο για τη βοήθειά του στη μορφομετρία.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Μαρία Μελαχρινού για τις άοκνες προσπάθειές της στην κλασική ιστολογία.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Ευαγγελία Παπαδημητρίου για τις πολύτιμες συζητήσεις και τις μετρήσεις NO και EPO.

Τη Βιολόγο Ευριδίκη Παναγοπούλου για την προετοιμασία των δειγμάτων για την υπολογιστική μορφομετρία.

Τον Επιμελητή Α΄ Καρδιοχειρουργό Ευστράτιο Αποστολάκη για τις διορθώσεις κατά τη συγγραφή του κειμένου.

Τη Φιλόλογο Σπυριδούλα Μακρυγιάννη για τις γλωσσικές, φιλολογικές παρεμβάσεις.

Τέλος ευχαριστώ τη σύζυγό μου Φιλόλογο Ξανθίπη Φωτοπούλου για τις γλωσσικές υποδείξεις, τη βοήθειά της στην επεξεργασία των εικόνων, την αμέριστη υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόησή της κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών προσπάθειας.

Θα ήταν παράληψη να μην αναφέρω τους συντελεστές της χειρουργικής αίθουσας που συνέβαλαν σε αυτήν την εργοβόρα προσπάθεια:

Αναισθησιολογική Ομάδα:

- Αλεξάνδρα Καραδήμου (φοιτήτρια Ιατρικής)
- Κατερίνα Προκόπη (Νοσηλεύτρια ΜΕΘ)
- Γεώργιος Ντελής (Νοσηλευτής ΜΕΘ)

Χειρουργική Ομάδα:

- Αντώνιος Χατζημιχάλης (Επιμελητής Α΄ Θωρακοχειρουργικής)
- Βασίλειος Φωτόπουλος (Ειδικευόμενος Χειρουργός)

Νοσηλευτική Ομάδα:

- Βασιλική Αντωνοπούλου (Προϊσταμένη Χειρουργείου)
- Σίλβια Γεωργοπούλου (Εργαλειοδότρια Χειρουργείου)

<i>Αριθμός</i>	<i>Σελίδα</i>
1. Δομή τελικού βρογχιολίου	3
2. Φυσική της φυσαλίδας αέρα	5
1. Υγρό σε λεία επιφάνεια στερεού	6
2. Ορισμός του νόμου του Laplace σε φυσαλίδα αέρα	6
3. Εφαρμογή του νόμου του Laplace σε φυσαλίδες αέρα	7
4. Τελικά βρογχιόλια	7
5. Μηχανική της αναπνοής	8
6. Εφαρμογή του νόμου του Laplace στη κυψελίδα	9
7. Επιφανειοδραστικός παράγοντας στη φυσιολογική κυψελίδα	10
8. Μονομοριακό στρώμα επιφανειοδραστικού παράγοντα	10
9. Απέκκριση του surfactant (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)	12
10. Παραγωγή και απέκκριση του surfactant (καλλιτεχνική αναπαράσταση)	13
11. Σύνθεση του surfactant	14
12. Πνευμονοκύτταρο τύπου II χοίρου (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)	19
13. Τραχειοστομία	48
14. Βρογχοσκόπηση	48
15. Τοποθέτηση κεντρικών γραμμών	49
16. Πύλη πνεύμονα χοίρου in situ	51
17. Χορήγηση διαλύματος συντήρησης	53
18. Διάγραμμα της τεχνικής διατήρησης	54
19. Συντήρηση του μοσχεύματος	55
20. Βρογχοσκοπική εικόνα αριστερού κυρίου βρόγχου	55
21. Καρδιοπνευμονικό παρασιεύσμα	55
22. Τοίχωμα κυψελίδας χοίρου. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	76
23. Φυσιολογική κυψελίδα. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	78
24. Ιστολογική εικόνα μεταμοσχευμένου πνεύμονα	79

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Αριθμός</i>	<i>Σελίδα</i>
1. Σύνθεση λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα	15
2. Αλλαγές στον surfactant μετά από μεταμόσχευση	
2-1. (Συγκριτικός σχηματικός πίνακας).	24
2-2. (Συγκριτικός πίνακας).....	36
3. PVRI ανάλυση βασικής τιμής.....	65
4. PVRI μετά την επαναιμάτωση.....	65
5. Cstat, ανάλυση βασικής τιμής.....	66
6. Cstat μετά την επαναιμάτωση.....	67
7. EPO αίματος. Ομάδα Α.....	70
8. EPO αίματος. Ομάδα Β.....	71
9. EPO στο BALF Ομάδα Α.....	72
10. EPO στο BALF Ομάδα Β.....	72
11. Πάχος λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος.	
Περιγραφική στατιστική.....	75
12. Στατιστική ανάλυση πάχους λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος	75
13. Πάχος βασικής μεμβράνης	77
14. Στατιστική ανάλυση πάχους βασικής μεμβράνης	77
15. Συγκεντρωτικός πίνακας πειραματικών μοντέλων μεταμόσχευσης πνεύμονα	
87	

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<i>Αριθμός</i>	<i>Σελίδα</i>
1. PVRI.....	64
2. Cstat.....	67
3. NO ορού συστηματικού αίματος.....	68
4. NO BALF.....	69
5. EPO ορού συστηματικού αίματος.....	71
6. EPO στο BALF.....	73
7. Πάχος παχέος μεσοκυψελιδικού διαστήματος μετά από επαναιμάτωση τριών ωρών.....	78
8. Αιτίες θανάτου μετά από πνευμονική μεταμόσχευση. (0-30 ημέρες) Διεθνής ετήσια αναφορά 2002.....	82

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο I

ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Στοιχεία ιστολογίας του περιφερικού αεραγωγού.

Το τελικό βρογχιόλιο καταλήγει στο περιφερικό τελικό αναπνευστικό δέντρο, που σχετίζεται με την ανταλλαγή των αερίων. Το πρώτο στοιχείο αυτού του συστήματος είναι το αναπνευστικό βρογχιόλιο που καλύπτεται από κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα και περιβάλλεται από σπείρες λείων

Εικόνα 1

Διάγραμμα που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ του τελικού βρογχιολίου του κυψελωτού πόρου, των αεροθυλάκιων και των κυψελίδων.

μυϊκών κυττάρων. Στα τοιχώματα αυτών των σωληνίσκων βρίσκονται ανοίγματα σακοειδών χώρων που γεμίζουν με αέρα και ονομάζονται κυψελίδες (alveoli). Οι κυψελίδες στο φυσιολογικό πνεύμονα είναι 150-400 εκατομύρια και προσφέρουν μια μεγάλη επιφάνεια ($70-80 \text{ m}^2$) ανταλλαγής αερίων (surface area).

Κάθε κυψελίδα έχει πολυγωνικό σχήμα με διάμετρο, όταν είναι φυσιολογικά φουσκωμένη, περίπου $250 \mu\text{m}$.

Έχει λεπτό τοίχωμα που περιέχει πνευμονικά τριχοειδή αγγεία και

σχηματίζει το φραγμό αέρα / αίματος. Οι περισσότερες κυψελίδες επικοινωνούν με τα αεροθυλάκια (alveolar sacs), ή επικοινωνούν με τους κυψελιδικούς πόρους (alveolar ducts), πολύ λιγότερες κυψελίδες επικοινωνούν με αναπνευστικά ή τελικά βρογχιόλια. (terminal bronchiole)¹ (Εικόνα 1). Μικροί πόροι (pores of Kohn) διαμέτρου

1-12μm επιτρέπουν την επικοινωνία ανάμεσα σε γειτονικές κυψελίδες. Τα κυτταρικά στοιχεία των κυψελίδων είναι τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και II, τα οποία βρίσκονται πάνω στη βασική μεμβράνη της κυψελίδας, και τα κυψελιδικά μακροφάγα.

Πνευμονοκύτταρο Τυπού II

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αντιπροσωπεύουν το 60% του κυτταρικού πληθυσμού της κυψελίδας αριθμητικά, αλλά καταλαμβάνουν μόνο το

5-10% της κυψελιδικής επιφάνειας. Σε αντίθεση με τα λεπτά και αποπλατισμένα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι σφαιρικά και συνήθως βρίσκονται στις οξείες γωνίες της πολυγωνικής κυψελίδας. Το κυτταρόπλασμά τους είναι πλούσιο σε μιτοχόνδρια και περιέχει τόσο τραχύ όσο και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Περιέχουν μεγάλα σφαιρικά κυστίδια που κατά την ηλεκτρονική μικροσκοπία παρουσιάζονται με μεμβρανώδες περιεχόμενο και είναι σκιερά. Περιέχουν φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και γλυκοζοαμινογλυκάνες και σχηματίζουν τη βάση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ζώα όπως ο σκύλος και το κουνέλι σχηματίζουν μεμβρανώδη εικόνα παράλληλης δομής, ενώ στον άνθρωπο σχηματίζουν ομόκεντρους κύκλους. Όταν το αναπνευστικό επιθήλιο εκτίθεται σε τοξικές επιδράσεις, ιδιαίτερα όταν υπάρχει καταστροφή των πνευμονοκυττάρων τύπου I, τότε τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αυξάνουν σε αριθμό και μέγεθος. Πιστεύεται ότι τα πνευμονοκύτταρα τύπου II λειτουργούν ως πρόδρομα στελέχη των πνευμονοκυττάρων τύπου I.

Εισαγωγή στην έννοια της επιφανειακής τάσης

Οι ακτινολογικές εικόνες του πνεύμονα περιλαμβάνουν την παρατήρηση σκιών που προκαλούνται από την προσωρινή ή μόνιμη σύμπτωση περιοχών του, που ορίζονται ως ατελεκτασία. Η εικόνα της ατελεκτασίας μπορεί καλύτερα να εξηγηθεί από τη μελέτη των κυψελιδικών μηχανισμών. Η φυσιολογία του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβάλλει στη βιοφυσική συμπεριφορά της κυψελίδας κατά μεγάλο μέρος. Η επιφανειακή τάση είναι το αποτέλεσμα μη αντίρροπων δυνάμεων ανάμεσα στα μόρια ή στα συσσωματώματα ενός υγρού ή διαλύματος στη διαχωριστική επιφάνεια δύο ρευστών. Εξαιτίας των λιγότερων διαμοριακών συνεκτικών δυνάμεων που δρουν ανάμεσα στα μόρια της επιφάνειας ενός υγρού, χρειάζεται να καταναλωθεί ενέργεια για να έρθουν περισσότερα μόρια στη διαχωριστική επιφάνεια όταν αυτή αυξάνεται. Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες μειώνουν αυτές τις

Εικόνα 2

Φυσική τις φυσαλίδας.

Συμπεριφορά των επιφανειακών μορίων κατά την άνοδο μιας φυσαλίδας αέρα στην επιφάνεια ενός υγρού.

επιφανειακές δυνάμεις και επιτρέπουν τη δημιουργία δομών όπως είναι οι σαπουνόφουσκες που αλλιώς θα ήταν ιδιαίτερα ασταθείς².

Εάν φανταστούμε μία φυσαλίδα

αέρα να ανεβαίνει στην επιφάνεια ενός υγρού, (εικόνα 2) καθώς μειώνεται το βάθος που βρίσκεται, μειώνεται η εξωτερική πίεση και η

φυσαλίδα συνεχώς διαστέλλεται. Οι φυσαλίδες θα γίνουν ασταθείς,

εκτός εάν η λεπτή διαχωριστική επιφάνεια μπορεί να μετατοπιστεί και να απορροφήσει τις μεταβολές της πίεσεως, τις θερμικές ή άλλες δυνάμεις. Η πιθανότητα να ραγεί μειώνεται, εάν η αναδυόμενη φυσαλίδα μπορεί να αυξήσει την έκταση της διαχωριστικής επιφάνειας, χωρίς να

Εικόνα 3.

Σταγόνα υγρού πάνω σε επιφάνεια στερεού, → μικρότερη επιφανειακή τάση

καταναλωθεί πολύ έργο στο επιφανειακό στρώμα. Τότε η αύξηση του όγκου της φυσαλίδας θα εξισώσει τη διαφορά πίεσης ανάμεσα στον αέρα που περιέχει και στον

αέρα που την περιβάλλει³. Σε λείες επιφάνειες, οι ίδιες εσωτερικές δυνάμεις θα οδηγήσουν ένα υγρό να δημιουργήσει μια σταγόνα παρά να

Εικόνα 4.

Ορισμός του νόμου του Laplace σε φυσαλίδες αέρα σε υγρό

εκταθεί ως ένα λεπτό στρώμα σε όλη την επιφάνεια. Το πάχος της σταγόνας εξαρτάται από την επιφανειακή τάση του υγρού και το ειδικό του βάρος (εικόνα 3).

Η παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα ή σαπουνιού θα μειώσει τις συνεκτικές δυνάμεις των μορίων του υγρού στο διαχωριστικό όριο, με αποτέλεσμα τη μείωση της

επιφανειακής τάσης, ώστε ή να επιτρέψει στο νερό να καλύψει τις επίπεδες επιφάνειες ή στις φυσαλίδες να σταθεροποιηθούν⁴.

Τι θα συμβεί εάν δυο σαπουνόφουσκες ενωθούν; Ο νόμος του Laplace (εικόνα 4) μας λέει ότι σε μία σφαιρική κατασκευή με επιφανειακή τάση, όπως είναι μια φυσαλίδα, η πίεση είναι αντιστρόφως

ανάλογη της ακτίνας της σφαίρας ($P = 4T/r$ για μια σφαίρα με δύο διαχωριστικές επιφάνειες υγρού αερίου, όπως είναι μια σαπουνόφουσκα, και $P = 2T/r$, εάν πρόκειται για μια σφαίρα με μία διαχωριστική επιφάνεια υγρού αερίου, όπως στην περίπτωση της πνευμονικής κυψελίδας P = πίεση, T = επιφανειακή τάση και r = ακτίνα). Η πίεση στις φυσαλίδες εξαρτάται από την ακτίνα τους. Αν υποθέσουμε ότι η επιφανειακή τάση είναι ίδια για κάθε φυσαλίδα τότε αν δύο διαφορετικού μεγέθους φυσαλίδες ενωθούν, η μικρότερη θα αδειάσει στη μεγαλύτερη (εικόνα 5)⁵.

Η κυψελίδα ως μοντέλο συνενωμένων φυσαλίδων

Ο πνεύμονας είναι η περιοχή όπου χωρίζονται τα σωματικά υγρά από τον

Εικόνα 6. Τελικά βρογχιόλια ως συνενωμένες φυσαλίδες.

αέρα και περιέχει πολλούς διαφορετικού μεγέθους ασκούς που αλλάζουν διαστάσεις κατά την αναπνοή. Αν υποθέσουμε ότι οι πνεύμονες είναι σε μία σταθερή κατάσταση κατά τη μέση θέση, δεδομένου ότι ολόκληρος ο

Εικόνα 7.

Μηχανική της αναπνοής. Επάνω εισπνοή, κάτω εκπνοή. Ο πνεύμονας ακολουθεί παθητικά τις κινήσεις του θωρακικού κλωβού.

πνεύμονας και εν δυνάμει όλες οι κοιλότητες του επικοινωνούν στη μέση θέση (εικόνα 6), κάθε φυσιολογικά διατεταμένη κυψελίδα θα έχει την ίδια πίεση αέρα και τις ίδιες διαστατικές δυνάμεις, που ξεκινούν από την αρνητική ενδοθωρακική πίεση και επηρεάζονται από την ελαστικότητα του περιβάλλοντα ιστού (εικόνα 7). Από τη στιγμή που, οι ελαστικές δυνάμεις του τοιχώματος είναι ίσες και η ακτίνα ποικίλει για να ισχύσει η

ισορροπία του λόγου πίεσης προς ακτίνα πρέπει να μεταβάλλεται η επιφανειακή τάση μεταξύ κυψελίδων διαφορετικού μεγέθους ή να υπάρχει πλήρης μηδενισμός της επιφανειακής τάσης της κυψελίδας. Αν και η μεγάλη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης στο οξυγόνο επιτρέπει μεγάλο φυσιολογικό εύρος αερισμού και αιμάτωσης, δε χρησιμοποιούνται όλες οι πνευμονικές υπο-ομάδες στην ίδια έκταση την ίδια χρονική στιγμή. Η αδυναμία πρόβλεψης κατά την εκπνοή της κυψελίδας που θα συμπίσει είναι ανάλογη με την αδυναμία πρόβλεψης του μεγέθους των φυσαλίδων ενός σφουγγαριού όταν συμπιέζεται. Για να διατηρηθεί ο φυσιολογικός κορεσμός οξυγόνου, όλες οι φυσιολογικά αιματούμενες κυψελίδες, πρέπει να διατηρήσουν διαστάσεις τέτοιες που να επιτρέπουν τη διάχυση του αέρα και την ανταλλαγή οξυγόνου.⁶ Ο Gill περιέγραψε τη διαδοχική σύμπτωση, όπως και τη μείωση του μεγέθους των κυψελίδων του

πνεύμονα κατά την εκπνοή.⁷ Η αναδίπλωση του τοιχώματος των κυψελίδων εξηγείται από την αδυναμία συμπίεσης των κυττάρων αλλά, όπως θα περιγράψουμε, επιδρά στον επιφανειοδραστικό παράγοντα.⁸ Κάποιες κυψελίδες πρέπει να συμπίπτουν μερικώς στην ήρεμη αναπνοή. Αυτό σημαίνει ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας του πνεύμονα δεν συμπεριφέρεται τόσο απλά, όπως οι φυσαλίδες ενός απορρυπαντικού.

Η κυψελίδα ως συνενωμένες φυσαλίδες

Αν η τιμή της επιφανειακής τάσης παραμένει σταθερή ($T_1=T_2$) τότε για κυψελίδες διαφορετικής ακτίνας η εφαρμογή του νόμου του Laplace: $r_1=2r_2$ $P_2>2P_1$ Αποτέλεσμα η μικρή κυψελίδα θα αδειάσει στη μεγάλη

Στο πνευμονικό surfactant όταν μικραίνει η ακτίνα της κυψελίδας μικραίνει και η επιφανειακή τάση ($T_1<T_2$) ώστε η $P_2=P_1$ Αποτέλεσμα οι κυψελίδες παραμένουν σταθερές

Πίεση (P) = κόκκινα βέλη, μπλε βέλη (T) = επιφανειακή τάση, πράσινο = επιφανειοδραστικός παράγοντας, r = ακτίνα

Εικόνα 8.

Εφαρμογή του νόμου του Laplace πνευμονικές κυψελίδες διαφορετικής διαμέτρου με την επίδραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο καλύτερος τρόπος για να κατανοήσουμε το παραπάνω είναι να φανταστούμε φυσαλίδες οριακά μικρών διαστάσεων. Όταν η ακτίνα τείνει στο μηδέν, η δύναμη που απαιτείται για να διασταλεί μια φυσαλίδα πλησιάζει το άπειρο. Ξέρουμε όμως ότι η επανεμφύσηση του πνεύμονα είναι δυνατή. Η πρώτη αναπνοή του παιδιού είναι ένα άλλο καλό παράδειγμα. Παρά την ίδια πίεση σε όλες τις κυψελίδες, τη θεωρία των συνενωμένων φυσαλίδων και την κανονική κατανομή των κυψελιδικών διαστάσεων, κατά τη βαθιά εισπνοή όλες οι κυψελίδες θα εκπτυχθούν.

Αυτή η ποικιλότητα του κυψελιδικού αερισμού και του κυψελιδικού μεγέθους κατά την εισπνοή, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ιδιότητες της επιφανειοδραστικής μεμβράνης δεν παραμένουν σταθερές (εικόνα 8).⁹

Συμπίεση, αναδίπλωση και παραμόρφωση της κυψελίδας

Εικόνα 9

Μονομοριακό στρώμα επιφανειοδραστικού παράγοντα (βέλος)

Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ψηφιακή επεξεργασία με ψευδοχρωματισμό, X 56000

Εικόνα 10

Μονομοριακό στρώμα επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συμπίεση και απομάκρυνση των μορίων του. Διακρίνεται ο προσανατολισμός των επιφανειακών μορίων του.

Μικρογραφίες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα αναδεικνύουν ότι είναι κυρίως μια μονοστοιβάδα στην κυψελίδα που αφορίζει το κυψελιδικό υγρό από τον αέρα και βρίσκεται σχεδόν σε επαφή με το κυψελιδικό πνευμονοκύτταρο (εικόνα 9). Η μονοστοιβάδα αυτή

μετατρέπεται σε διπλή στις περιοχές που η υποκείμενη κυψελίδα αναδιπλώνεται ¹⁰ . Η παρουσία πρωτεϊνών στα βιολογικά επιφανειοδραστικά στρώματα φαίνεται ότι σταθεροποιεί ή και προδιαθέτει στην ικανότητα αναδίπλωσης. Καθώς το επιφανειοδραστικό σώμα συμπίεζεται, τα μόριά του επαναπροσανατολίζονται (εικόνα 10), με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι συμπιεστικές δυνάμεις που χρειάζονται για να δημιουργηθεί μια πειραματική κοιλάδα αναδίπλωσης¹¹.

Η εκσεσημασμένη συμπίεση μπορεί να εκτοπίσει τις πρωτεΐνες από το επιφανειοδραστικό στρώμα, αλλά δεν έχει πλήρως περιγραφεί ποια είναι η πλήρης σημασία αυτού του μηχανισμού *in vivo*. Άλλες επιπλέον ουσίες μπορούν να επιδρούν στις δυνάμεις τριβής κατά τη μετακίνηση στα επιφανειακά στρώματα ¹² . Ο εμπλουτισμός με επιφανειοδραστική πρωτεΐνη πνεύμονα σε πειραματική επιφάνεια στρώματος μακράς αλύσου φωσφατιδυλοχολίνης σε νερό, επιτυγχάνει μείωση του έργου που απαιτείται για τη συμπίεση της επιφάνειας¹³ . Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ειδικές περιπτώσεις δυαδικών μονοστοιβάδων επιφανειακών στρωμάτων (λιπιδικές διπλοστοιβάδες). Η αναδίπλωση των μεμβρανών επηρεάζει τις παραγόμενες από το κύτταρο πρωτεΐνες, αλλά και οι πρωτεΐνες επηρεάζουν την ικανότητα αναδίπλωσης των μεμβρανών. Η έκκριση των πρωτεϊνών από το κύτταρο επηρεάζεται από την επιφανειακή χημεία της κυτταρικής μεμβράνης και η χημεία της κυτταρικής μεμβράνης αλλάζει από συνδυασμούς πρωτεϊνών. Ο μεσολαβητικός μηχανισμός έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην κυτταρική μεμβράνη πιθανόν είναι μέσω κυκλικής 3'5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης.¹⁴

Επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα στο φυσιολογικό πνεύμονα:

Φυσιολογία του επιφανειοδραστικού παράγοντα - Βιοφυσική δράση

Ο Επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα παράγεται και εκκρίνεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (εικόνες 11 & 12), από την 24 εβδομάδα της κύησης, επικαλύπτει την πνευμονική κυψελίδα και τα μικρά βρογχιόλια

Εικόνα 11

Απέκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το ενδοπλασματικό δίκτυο του πνευμονοκυττάρου τύπου II, → πυκνό σωματίο. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ψηφιακή επεξεργασία με ψευδοχρωματισμό, X 20000

μειώνοντας την επιφανειακή τάση στην επιφάνεια επαφής μεταξύ κυψελιδικού υγρού και αέρα (εικόνα 9). Η δράση του αυτή επιτυγχάνεται από τη δημιουργία μιας σταθερής μονοστοιβάδας από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Η μείωση της επιφανειακής τάσης σε όλη την έκταση του

πνεύμονα οδηγεί στην αύξηση της ολικής πνευμονικής ευενδοτότητας (compliance)¹⁵.

Εικόνα 12

Παραγωγή και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το ενδοπλασματικό δίκτυο του πνευμονοκυττάρου τύπου II. (Καλλιτεχνική αναπαράσταση).

Επιπλέον σταθεροποιεί τις ποικίλου μεγέθους κυψελίδες, αντίθετα με τον νόμο του Laplace για επικοινωνούσες φυσαλίδες διαφορετικού μεγέθους. Όπως περιγράφεται προηγουμένως, όσο μειώνεται η ακτίνα της κυψελίδας, τόσο μειώνει την επιφανειακή τάση σε αυτή. Το αποτέλεσμα είναι να σταθεροποιούνται οι κυψελιδικοί χώροι κατά την εκπνοή, χωρίς να απορροφώνται οι μικρού διαμέτρου κυψελίδες από τις μεγαλύτερες και βέβαια αποτρέπεται η σύμπτωση των κυψελίδων. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται από τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την αποφυγή της εικόνας της ατελεκτασίας και τη διατήρηση της

απαραίτητης επιφάνειας ανταλλαγής αερίων¹⁶. Καλό παράδειγμα της σημαντικότητας του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των παιδιών. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας παράγεται σχετικά αργά στην εμβρυϊκή ηλικία, με αποτέλεσμα τα πρόωρα (ανώριμα) ή λιποβαρή νεογνά να κινδυνεύουν από σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας, που είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας σε αυτή την ομάδα ασθενών. Η ύπαρξη του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην πνευμονική κυψελίδα πιθανόν δημιουργεί φραγμό στην εξαγωγή μακρομορίων του πλάσματος στον κυψελιδικό χώρο^{17 18}.

Εικόνα 13

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας σχηματίζεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο των πνευμονοκυττάρων τύπου II, σχηματίζει τα πυκνά (μεμβρανώδη) σωματίδια, όπου προστίθενται τα λιπίδια και εκκρίνεται, όταν αυτά συγχωνεύονται με την κυτταρική μεμβράνη.

Σύνθεση και ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα πνεύμονα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας πνεύμονα αποτελείται από ένα μείγμα φωσφολιπιδίων μακριάς αλύσου και τουλάχιστον τέσσερις επιφανειοδραστικές αποπρωτεΐνες (surfactant proteins), SP-A, SP-B, SP-C και SP-D¹⁹ και εκκρίνεται από τα πνευμονοκύτταρά τύπου II (εικόνα 13).

Το κύριο επιφανειοδραστικό φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδιλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC, και κυρίως στην κορεσμένη μορφή της διπαλμιτική φωσφατιδιλοχολίνη (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC), έχει τη μοναδική ιδιότητα να δημιουργεί μια σταθερή μονοστοιβάδα. Η παρουσία των υπόλοιπων λιπιδίων (πίνακας 1) και των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την διατήρηση της μονοστοιβάδας του DPPC κατά τη διάρκεια του αναπνευστικού κύκλου²⁰.

Πίνακας 1

Σύνθεση λιπιδίων επιφανειοδραστικού παράγοντα. Gunther et al. Surfactant Alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome and cardiogenic lung edema. Am J Respir Crit Care Med.1996;153:176-184.

Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν το 10% της μάζας του και βελτιώνουν την κατανομή του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην επιφάνεια επαφής υγρού-αερίου (saline-air interface) παράλληλα βελτιώνουν την επαναπρόσληψή του από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και τα μακροφάγα²¹. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες οι SP-A και SP-D είναι υδρόφιλες, ενώ οι SP-B και SP-C υδρόφοβες.

Οι υδρόφοβες, μικρού μοριακού βάρους (8000-4000 Da), επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες SP-B SP-C ενισχύουν τη μεταφορά των λιπιδίων στην επιφάνεια επαφής υγρού-αερίου δημιουργώντας μία σταθερή λιπιδική μονοστοιβάδα. Η δράση τους είναι να βελτιώνουν την προσαρμοστικότητα αυτού του στρώματος συνεισφέροντας στη μείωση των δυνάμεων συνοχής μεταξύ των επιφανειακών μορίων της²², με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της επιφανειακής τάσης της κυψελίδας κατά τον αναπνευστικό κύκλο²³.

Η SP-B είναι μια ομοδιμερική πρωτεΐνη που φαίνεται να συνδέεται στενά με τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στον κυψελιδικό χώρο. Φαίνεται να παίζει ρόλο στην οργανογένεση των πυκνών (μεμβρανωδών) σωματιδίων, στη δομική μετατροπή των επιφανειοδραστικών λιπιδίων μετά την έκκρισή τους σε σωληνώδη μυελίνη και τέλος στη γρήγορη κατανομή των φωσfolιπιδίων στην επιφανειοδραστική επιφάνεια. Η μεγάλη σημασία του στην ανθρώπινη βιολογία προκύπτει από το γεγονός ότι η γενετική του έλλειψη οδηγεί σε θανατηφόρα αναπνευστική ανεπάρκεια²⁴.

Η SP-C φαίνεται να είναι το μόνο συστατικό στοιχείο του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα που είναι μοναδικό γεγονός που προσδίδει σημαντικές και μοναδικές δράσεις. Το μέγεθος του μορίου ταιριάζει ακριβώς στο πάχος της μονοστοιβάδας· όλο το υδρόφοβο τμήμα τις πρωτεϊνικής τεταρτοταγούς δομής ταιριάζει στην ακυλ-αλυσίδα του

στρώματος, γεγονός που οδηγεί σε συγκεκριμένο προσανατολισμό του μορίου²⁵.

Τα βαρύτερα μόρια SP-A και SP-D είναι γλυκοπρωτεΐνες. Η SP-A και η SP-D φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του πνεύμονα και ονομάζονται κολεκτίνες (collectins)²⁶. Η SP-A έχει προστατευτικό και ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία ρύθμισης της επιφανειακής τάσης συνδεόμενη με τα φωσφολιπίδια²⁷. *In vitro* παρατηρήσεις έδειξαν ότι η SP-A συνδέεται με τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, αναστέλλοντας την έκκριση και ευοδώνοντας την επαναπρόσληψη λιπιδίων. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της ανακύκλωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα²⁸. Η παρατήρηση ότι στελέχη ποντικών χωρίς SP-A (SP-A -/- mice) έχουν σχετικά φυσιολογικές τιμές επιφανειοδραστικού παράγοντα οδηγεί στην υπόθεση ότι είτε *in vivo* υπάρχουν άλλοι επικρατούντες ρυθμιστικοί μηχανισμοί, είτε οι ιδιότητες αυτές δεν έχουν σημαντικό ρόλο *in vivo* στο πειραματόζωο που δεν υποβάλλεται σε stress²⁹. Η SP-A συνδέεται με μια σειρά από παθογόνα μικρόβια, ιούς και μύκητες, αλλά και με εισπνεόμενες γλυκοσυγκολιτίνες. Έχουν περιγραφεί SP-A υποδοχείς στα φαγοκύτταρα που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία απομάκρυνσης των παθογόνων. Ο ρόλος στην άμυνα του ενήλικα οργανισμού φαίνεται να σχετίζεται με την μη ειδική άμυνα σε παθογόνα με τα οποία δεν έχει έρθει σε επαφή· αντίθετα για τον ανώριμο οργανισμό έχει σημαντικό ρόλο στην άμυνα, αφού το αμυντικό σύστημα δεν έχει έρθει σε επαφή με μια σειρά από παθογόνα. Επιπλέον φαίνεται ότι πιθανόν περιορίζει τη φλεγμονώδη διεργασία στον πνεύμονα προστατεύοντας το ευαίσθητο επιθήλιο. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η SP-A όπως και η συγγενής SP-D μετατρέπει την αλλεργική απάντηση σε εισπνεόμενα γλυκοζυλιωμένα αντιγόνα³⁰.

Η SP-D συνδέεται ασθενώς με φωσφολιπίδια. Η SP-D φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα της άμυνας του πνεύμονα σε παθογόνα. Μπορεί να συνδεθεί με μια σειρά υδατανθρακικών δομών που φέρουν οι ιοί, μικρόβια, μύκητες και ζύμες μέσω των πολλαπλών C-type τομέων λεκτινών που φέρει, με αποτέλεσμα τη συγκόλληση των παθογόνων και την φαγοκυττάρωσή τους από φαγοκύτταρα που φέρουν SP-D υποδοχείς. Πρόσφατη θεωρία προτείνει ως ρόλο τους την απομάκρυνση όλων των εισπνεόμενων σωματιδίων χωρίς την ενεργοποίηση χαρακτηριστικών φλεγμονής στο φυσιολογικό πνεύμονα³¹. Ο ανοσολογικός ρόλος των πνευμονοκυττάρων τύπου II υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι παράγουν πρωτεΐνες που προκαλούν χημειοταξία των ουδετερόφιλων. Οι SP-A και SP-D αναγνωρίστηκαν πρόσφατα και σε μια σειρά άλλες θέσεις εκτός του πνεύμονα, όπως στο πεπτικό βλεννογόνο, γεγονός που υποστηρίζει ότι παίζουν γενικότερο ρόλο στην άμυνα των βλεννογόνων στα παθογόνα³².

Υπότυποι και μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Κατά τον αναπνευστικό κύκλο τα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα χάνονται και, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση της ισορροπίας της επιφανειακής τάσης, πρέπει να επαναπληρωθούν³³. Αυτή η δυναμική διαδικασία τελείται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Φαίνεται ότι αυτά όχι μόνο συνθέτουν και εκκρίνουν τα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα αλλά και επαναπροσλαμβάνουν τα εναπομείναντα συστατικά, με αποτέλεσμα να ανακυκλώνουν τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια³⁴. Τα φωσφολιπίδια, η SP-B και η SP-C εκκρίνονται μαζί μέσω των πυκνών σωματιδίων (lamellar bodies)³⁵. Η SP-A πιθανόν εκκρίνεται ανεξάρτητα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II³⁶ και από τα Clara cells^{37 38}. Μέσα στο υγρό

που καλύπτει την κυψελίδα τα πυκνά σωμάτια μετατρέπονται σε σωληνώδη μυελίνη (tubular myelin), όπου η SP-A ενσωματώνεται ³⁹. Η σωληνώδης μυελίνη μπορεί να θεωρηθεί ως εξωκυτταρικό απόθεμα ή αποθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η σωληνώδης μυελίνη τροφοδοτεί τη μονοστοιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με φωσφολιπίδια και την προστατεύει από την απενεργοποίηση. Η σωληνώδης μυελίνη και τα πυκνά σωμάτια καλούνται βαρύς υπότυπος

Εικόνα 14.

Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας X 20000. Πνευμονοκύτταρο τύπου II χοίρου, ➡ σωληνώδης μυελίνη, βαρύς υπότυπος του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

του επιφανειοδραστικού παράγοντα (heavy subtype) λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους (εικόνα 14).

Τα ανενεργά υπολείμματα των σωματιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνιστούν μικρότερα και ελαφρότερα μη ελασματοειδή σωματίδια (unilamellar vesicles), λόγω του μικρότερου μοριακού βάρους καλούνται ελαφρύς υπότυπος (light subtype) .

Ο ελαφρύς υπότυπος του επιφανειοδραστικού παράγοντα περιέχει μειωμένα ποσά από τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι επιφανειοδραστικά ανενεργές⁴⁰. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας που εναπομένει επαναπροσλαμβάνεται και ανακυκλώνεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II ενώ σε ένα ποσοστό 5-10% απομακρύνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα⁴¹.

Μηχανισμοί ρύθμισης του μεταβολισμού του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας έχει υψηλό ρυθμό ανακύκλωσης και αντικαθίσταται με χρόνο ημιζωής 10 ώρες. Η σύνθεση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα ρυθμίζεται από πολλαπλές ουσίες και παράγοντες. Η κορτιζόνη φαίνεται ότι επιδρά θετικά στη σύνθεσή του. Η απελευθέρωσή του εξαρτάται από την πνευμονική έκπτυξη και από τοπική βήτα αδρενεργική δραστηριότητα (beta-adrenergic stimulation) μέσω δράσης της κυκλικής 3'5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία είναι κοινός μεσολαβητής στις επιδράσεις των ορμονών με την κυτταρική μεμβράνη⁴². Η SP-A που βρίσκεται στο υγρό που επαλείφει την κυψελίδα φαίνεται ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιόσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα όσον αφορά την έκκριση και επαναρρόφησή του από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αλλά και τη δημιουργία της σωληνώδους μυελίνης. Η SP-A φαίνεται ότι μπορεί να συνδεθεί σε υποδοχείς του πνευμονοκύτταρου τύπου II και να δρα

ανασταλτικά στην παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η SP-A φαίνεται ότι έχει συνεργικό ρόλο στο ρυθμιστικό ρόλο της SP-B σε σχέση με την απορρόφηση των επιφανειοδραστικών λιπιδίων από το υγρό που επικαλύπτει τις κυψελίδες^{43 44 45}. Ο κύκλος μετατροπής της σωληνώδους μυελίνης σε μη μεμβρανώδη κυστίδια παρέχοντας ταυτόχρονα τα υλικά σχηματισμού της επιφανειακής μονοστοιβάδας φαίνεται ότι ρυθμίζεται από την SP-B. Η δράση της SP-B συνδέεται με μία πρωτεάση της σερίνης που ονομάζεται κονβερτάση (convertase). Η ενζυμική δραστηριότητα της κονβερτάσης, που μετατρέπει του βαρύ υπότυπο σε ελαφρύ υπότυπο του επιφανειοδραστικού παράγοντα, φαίνεται ότι επηρεάζεται από την αλλαγή του κυψελιδικού εμβαδού κατά την αναπνευστική λειτουργία και από την αυτόνομη νεύρωση του πνεύμονα^{46 47}.

Συμπεράσματα

Η συζήτηση για τον επιφανειοδραστικό παράγοντα εύκολα γίνεται σύνθετη, επειδή πολλά πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω. Από τη μελέτη των φυσαλίδων που συνενώνονται, γνωρίζουμε ότι στο φυσιολογικό πνεύμονα η επιφανειακή τάση πρέπει να διαφέρει ή να είναι εξ'ολοκλήρου απύσχα σε διαφορετικού μεγέθους κυψελίδες. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας φαίνεται να είναι φυσιολογικά σε δυναμικά σταθερή κατάσταση, με συνεχή αλλαγή, μετασχηματισμό και πολλές δυνατές επιδράσεις^{48 49}:

Ραδιοϊσοτοπικές μελέτες δείχνουν ότι ο πνευμονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας απομακρύνεται από τα μακροφάγα και σε ένα μικρότερο βαθμό από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Οι συστατικές του πρωτεΐνες απορροφώνται με διαφορετικό ρυθμό από τα μακροφάγα.

Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα ευοδώνουν τη φαγοκυττάρωση των λιπιδίων του από τα μακροφάγα και προάγουν την επαναπρόσληψή του από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Η παρουσία

ανακυκλωμένης πρωτεΐνης SP-A μπορεί να μειώσει την έκκριση νέου επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Από τη στιγμή της έκκρισης των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα η αναλογία τους στη διαχωριστική επιφάνεια υγρού / αερίου δε μένει σταθερή. Πειραματικό μοντέλο συμπίεσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα έδειξε ότι οι πρωτεΐνες του απομακρύνονται από τη διαχωριστική επιφάνεια. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη συστολή της διαχωριστικής επιφάνειας αερίου-υγρού της κυψελίδας κατά την εκπνοή, δημιουργήσε τη θεωρητική άποψη ότι η ίδια η αναπνοή καταναλώνει το λειτουργικό επιφανειοδραστικό παράγοντα. Αν και έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα αυξάνεται μετά από μια μεγάλη αναπνοή ή σύντομο υπεραερισμό, οι ενεχόμενοι βιοχημικοί μηχανισμοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Υποστηρίζεται ότι η αυξομείωση της διαχωριστικής επιφάνειας υγρού αερίου στην κυψελίδα κατά την αναπνοή μετατρέπει το χημικό ερέθισμα της έκκρισης από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Παράλληλα τα πνευμονοκύτταρα τύπου II επηρεάζονται από τη διαστολή της κυψελίδας⁵⁰.

Κάθε κυψελίδα περιέχει τεράστιο συνδυασμό ανοσοσφαιρινών, κυτοκινών, ανασταλτικού παράγοντα μετανάστευσης μικροφάγων και επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών. Ο συνδυασμός των παραγόντων αυτών επηρεάζει την επιφανειοδραστική λειτουργικότητα. Δεν πρέπει να εκπλήσσει ότι για κάθε υποκείμενη πνευμονική νόσο η ακριβής πρόβλεψη της συσσώρευσης κυττάρων της φλεγμονής είναι τόσο δύσκολη^{51 52}.

Κεφάλαιο II

ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Βλάβες της βιοφυσικής δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά την οξεία πνευμονική βλάβη

Σε κάθε οξεία πνευμονική βλάβη η βιοφυσική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται ότι παραβλάπτεται με πολλούς μηχανισμούς⁵³.

Ο πρώτος υποστηριζόμενος μηχανισμός προέρχεται από τη δράση των εξαγγειωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος, που διαπερνούν την κυψελιδοτριχοειδική μεμβράνη και εισχωρούν στο υγρό που καλύπτει την κυψελίδα. Φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες του πλάσματος αναστέλλουν άμεσα την απορρόφηση της DPPC από το κυψελιδικό υγρό και επιπλέον ανταγωνίζονται τη διάταξη της DPPC στη διαχωριστική επιφάνεια του υγρού με τον αέρα. Έτσι η μονοστοιβάδα της DPPC γίνεται ασταθής όταν μειώνεται η διάμετρος της κυψελίδας κατά την εκπνοή.

Ο δεύτερος μηχανισμός που οδηγεί στη δημιουργία ασταθούς μονοστοιβάδας οφείλεται σε αλλαγή των συγκεντρώσεων των επιφανειοδραστικών φωσφολιπιδίων. Τέτοιες αλλαγές είναι η μείωση της PC, DPPC και φωσφατιδιλογλυκερόλης και η αύξηση της λυσοφωσφατιδιλογολίνης⁵⁴.

Ένας τρίτος μηχανισμός προέρχεται από τα μειωμένα ποσά της SP-A που φαίνεται να συνοδεύουν την οξεία πνευμονική βλάβη. Έχειδειχθεί *in vivo* ότι η SP-A μετατρέπει την ανασταλτική δράση των πρωτεϊνών του πλάσματος, ενώ η καταστροφή της από αντισώματα κατά αυτής ενισχύει την καταστροφή της επιφανειοδραστικής δράσης του

Φυσιολογική κυψελίδα

Κυψελίδα μετά από μεταμόσχευση

Πίνακας 2-1

Συγκριτικός σχηματικός πίνακας. Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων στον επιφανειοδραστικό παράγοντα πνεύμονα στο επίπεδο της κυψελίδας μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα.

επιφανειοδραστικού παράγοντα από το ινωδογόνο^{55 56}. *In vitro* μελέτες ενισχύουν τα ευρήματα αυτά αποδεικνύοντας ότι η SP-A βελτιώνει τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες των λιπιδίων και μετατρέπει την ανασταλτική δράση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Παράλληλα δείχνουν ότι ο συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης SP-A και αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεϊνών πλάσματος είναι καταστροφικός για την επιφανειοδραστική δράση του surfactant. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του SP-A φαίνεται ότι οδηγούν όχι μόνο σε έναν ασταθή επιφανειοδραστικό παράγοντα, αλλά και τον κάνουν πιο ευαίσθητο στην ανενεργοποίηση⁵⁷. Είναι πιθανό ότι η SP-A προστατεύει τον επιφανειοδραστικό παράγοντα από την απενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να υποστηρίζονται και από *in vivo* μελέτες^{58 59}.

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας στις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις

Χειρισμός του δότη

Το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο μόσχευμα φαίνεται ότι επηρεάζεται από μία σειρά από αιτίες που σχετίζονται με τις ίδιες τις ενδείξεις λήψης μοσχεύματος. Αν και δεν έχουν μελετηθεί τα αποτελέσματα της διαδικασίας λήψης πνευμονικού μοσχεύματος στον επιφανειοδραστικό παράγοντα άμεσα, έχει μελετηθεί η επίδραση στον επιφανειοδραστικό παράγοντα σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, που εμφανίζονται και κατά τη λήψη του μοσχεύματος. Τέτοιες καταστάσεις είναι η εγκεφαλική βλάβη και ο εγκεφαλικός θάνατος, η διαταραχή της ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών, ο μηχανικός αερισμός, και η διακοπή της παρασυμπαθητικής νευρώσης (πνευμονογαστρικό).

Εγκεφαλική βλάβη και εγκεφαλικός θάνατος

Η σχέση της εγκεφαλικής βλάβης ή του εγκεφαλικού θανάτου με τη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν έχει εκτενώς μελετηθεί. Είναι γνωστό όμως ότι ο εγκεφαλικός θάνατος ή η εγκεφαλική βλάβη οδηγεί σε κυψελιδικό οίδημα ⁶⁰. Πειραματικά δεδομένα σε πρωτεύοντα που υποβλήθηκαν σε μηχανική εγκεφαλική βλάβη, τέτοια που οδήγησε σε εγκεφαλικό θάνατο, έδειξαν ότι υπήρχε μαζική διαφυγή πρωτεϊνών πλάσματος στον πνεύμονα που οδηγούσε σε αναστολή της βιοφυσικής δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα πειραματόζωα αυτά παρουσίασαν παράλληλα και δυσλειτουργία του πνεύμονα ⁶¹. Οι Soifer και Gelb έδειξαν, ότι ιδιαίτερα σε νεαρούς δότες ηλικίας 13-30 ετών ο εγκεφαλικός θάνατος συνδέεται με νευρογενές πνευμονικό οίδημα ως αποτέλεσμα τις απότομης αύξησης των κυκλοφορούντων κατεχολαμινών⁶². Η χρήση συμπαθητικολυτικών φαρμάκων φαίνεται ότι μειώνει τη διαφυγή των πρωτεϊνών του πλάσματος, με αποτέλεσμα να είναι προστατευτικά στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Αιμοδυναμική κατάσταση και ισορροπία υγρών ηλεκτρολυτών

Στους δότες με εγκεφαλικό θάνατο παρατηρείται: πολουρία ως αποτέλεσμα ελάττωσης της αντιδιουρητικής ορμόνης (98% σε μερικές σειρές) ⁶³, οσμωτική διούρηση λόγω υπεργλυκαιμίας και δευτερογενής απώλεια υγρών λόγω υπερθερμίας. Η προσπάθεια διατήρησης ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών είναι δύσκολη, παρά τα προτεινόμενα πρωτόκολλα (35% κολλοειδή και 65% κρυσταλλοειδή). Η ισορροπία αυτή είναι ιδιαίτερα ασταθής με αποτέλεσμα την εύκολη εγκατάσταση πνευμονικού οιδήματος, διαφυγή πρωτεϊνών πλάσματος, παράμετρος που οδηγεί σε δυσλειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα ⁶⁴.

Μηχανικός αερισμός

Οι επίδραση του μηχανικού αερισμού επί της έκκρισης ή της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην κυψελίδα φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διάρκεια και το είδος του αερισμού. Η απλή εμφύσηση αυξάνει το ποσό του κυψελιδικού επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η παρατεταμένη διατήρηση μηχανικού αερισμού σε εκταμένους ή *in situ* πνεύμονες φαίνεται ότι οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα που οδηγεί σε αυξημένα ποσά φωσφολιπιδίων στο κυψελιδικό υγρό^{65 66 67 68 69}. Ο J. J. Ennema και συνεργάτες σε πειραματικό μοντέλο κονίκλων απέδειξαν ότι ο μηχανικός αερισμός αυξάνει τη *de novo* σύνθεση και μειώνει την ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, χωρίς να αυξάνει την έκκρισή του⁷⁰. Λεπτομερέστερες μελέτες ανέδειξαν ότι σε εκταμένους πνεύμονες το ποσό του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα αυξάνεται κατά το μηχανικό αερισμό, ωστόσο ο μηχανικός αερισμός σε *in situ* πνεύμονες φαίνεται ότι αυξάνει την μετατροπή του βαρέος υπότυπου σε ελαφρύ⁷¹ με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση του ποσού του βαρέος υπότυπου. Μελέτες σε πειραματόζωα⁷² έχουν δείξει ότι μηχανικός αερισμός με υψηλό αναπνεόμενο όγκο αυξάνει τη μετατροπή του βαρέος υπότυπου σε ελαφρύ με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Είναι επιπλέον γνωστό ότι ο μηχανικός αερισμός προκαλεί την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό, όταν δε ο μηχανικός αερισμός γίνεται με αυξημένους αναπνευστικούς όγκους και χωρίς θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP), η εξαγγείωση γίνεται εντονότερη⁷³. Συνοψίζοντας, η μείωση του ποσού του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα και η αύξηση των πρωτεϊνών του πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό φαίνεται ότι επηρεάζει τις βιοφυσικές δράσεις του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνευμονικού μοσχεύματος.

Διακοπή της παρασυμπαθητικής νεύρωσης

Η υψηλή αυχενική διακοπή της παρασυμπαθητικής νεύρωσης αν και δεν επηρεάζει άμεσα τον επιφανειοδραστικό παράγοντα προκαλεί όμως μαζική έξοδο πρωτεϊνών του πλάσματος στην κυψελίδα ^{74 75}, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε επιδρούν αρνητικά στις βιοφυσικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Είναι προφανές από την ανάλυση των παραπάνω βιβλιογραφικών αναφορών ότι το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει επηρεαστεί αρνητικά ήδη από τη στιγμή που τίθεται η δυνατότητα λήψης του μοσχεύματος. Σε αυτή τη φάση η κυριότερη αιτία καταστροφής του είναι η διαφυγή πρωτεϊνών πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό. Ο μηχανικός αερισμός χαμηλών όγκων με τη χρήση PEEP, η χρήση λίγων υψηλών όγκων πριν από τη λήψη του μοσχεύματος και η προσεκτική διατήρηση της ισορροπίας των υγρών του δότη μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιβοηθητικός στη διατήρηση ικανοποιητικού μοσχεύματος ⁷⁶.

Αποθήκευση του πνευμονικού μοσχεύματος

Κατά τη διατήρηση του πνευμονικού μοσχεύματος τα πνευμονοκύτταρα παθαίνουν βλάβες τέτοιες που οδηγούν σε αλλαγές του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η θερμή όπως και η ψυχρή ισχαιμία μετά από ικανό χρονικό διάστημα επηρεάζει τη βιωσιμότητα των πνευμονικών κυττάρων πιθανώς λόγω συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών ⁷⁷. Για να προστατευτεί η βιωσιμότητα των πνευμονικών κυττάρων, η πιο συχνή κλινική μέθοδος περιλαμβάνει την έκπλυση του πνευμονικού μοσχεύματος από την πνευμονική αρτηρία με κρύα διαλύματα συντήρησης και τη διατήρηση του μοσχεύματος σε θερμοκρασία 4-10° C. Το διάστημα που θεωρείται ασφαλές είναι έως 8 h ισχαιμίας. Τα σημεία που είναι υπό έρευνα είναι η δημιουργία ενός

βέλτιστου διαλύματος συντήρησης και η διατήρηση του μοσχεύματος σε κατάσταση εκπνοής ή εισπνοής^{78 79 80}.

Διατήρηση του μοσχεύματος σε κατάσταση εισπνοής ή εκπνοής

Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από δύο ώρες θερμής ισχαιμίας χωρίς τη χρήση διαλυμάτων συντήρησης εμφανίζεται κυτταρικός θάνατος με αποτέλεσμα ο επιφανειοδραστικός παράγοντας να αναμειγνύεται με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης⁸¹. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II διατηρείται, σε θερμή ισχαιμία πνεύμονα με χρήση διαλύματος συντήρησης, όταν ο πνεύμονας διατηρείται σε εισπνοή με ατμοσφαιρικό αέρα⁸². Η ενεργητική έκκριση φαίνεται ότι επάγεται από τον πνευμονικό αερισμό ή από την πνευμονική έκπλυση⁸³. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι η ικανότητα της έκκρισης επιφανειοδραστικού παράγοντα αναστέλλεται, όταν οι πνεύμονες διατηρούνται σε εισπνοή με άζωτο ή σε κατάσταση εκπνοής. Φαίνεται ότι η παρουσία οξυγόνου κατά τη διάρκεια της θερμής διατήρησης είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της έκκρισης επιφανειοδραστικού παράγοντα, ενώ η διατήρηση του πνευμονικού μοσχεύματος κάτω από τους 13° C προκαλεί διακοπή της έκκρισης^{68 83}. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό του βαρέος υπότυπου και η σύνθεση των φωσφολιπιδίων του κυψελιδικού επιφανειοδραστικού παράγοντα παραμένουν ουσιαστικά ανεπηρέαστα για διάστημα έως 2h στην περίπτωση θερμής ισχαιμίας⁸⁴ και για διάστημα έως και 24h στην περίπτωση ψυχρής ισχαιμίας^{85 86}. Ωστόσο, νεότερες μελέτες σε ποντίκια ανέδειξαν ταχεία μείωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη διατήρηση του πνευμονικού μοσχεύματος σε ψυχρή διατήρηση⁸⁷. Ο Hausen και συνεργάτες το 1996 ανακοίνωσαν ότι το ολικό ποσό του DPPC μειώνεται άμεσα κατά τη διαδικασία της διατήρησης (διάλυμα Eurocollins). Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση κατά την αποθήκευση, ενώ παράλληλα

το ποσοστό του βαρέος υπότυπου μειώνεται (περίπου 50%) στις 4 και 8 ώρες αποθήκευσης ανεξάρτητα αν διατηρούνται τα πνευμονικά μοσχεύματα σε κατάσταση εισπνοής ή εκπνοής. Το μεγαλύτερο δε ποσοστό μείωσης παρατηρήθηκε, όταν ο πνεύμονας διατηρήθηκε για διάστημα 8 ωρών σε κατάσταση εκπνοής⁸⁰.

Η επίδραση της διατήρησης του μοσχεύματος στο ποσοστό της SP-A δεν έχει μελετηθεί κατά τη θερμή ισχαιμία, ενώ κατά την ψυχρή φαίνεται ότι εμφανίζεται μείωση του ποσοστού του κατά 50% μετά από 12 ώρες ισχαιμίας και κατά 75% μετά από 20 ώρες ισχαιμίας (εκπτυγμένοι πνεύμονες με $FiO_2 = 0.5$)⁸⁵.

Η βιοφυσική δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα παραμένει *in vitro* φυσιολογική ανεξάρτητα από το αν συντηρηθεί υπό εισπνοή ή εκπνοή, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι δεν υπάρχει συσσώρευση πρωτεϊνών πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό^{84 85}. Όταν τα επίπεδα των πρωτεϊνών του πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό αυξάνουν κατά τη διατήρηση του μοσχεύματος, τότε και η *in vitro* βιοφυσική δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα παραβλάπτεται^{80 82 87}.

Διαλύματα συντήρησης

Άμεση σύγκριση διαλυμάτων συντήρησης σε σχέση με την επίδραση τους στον επιφανειοδραστικό παράγοντα ανακοινώθηκε από τον Veldhuizen και συν. (1993) σε σκύλους ανάμεσα στα διαλύματα Belzer (University of Wisconsin) και Eurocollins. Το διάλυμα Eurocollins αποδεικνύεται ότι διατηρεί μικρότερα ποσά PC και μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF). Έμμεση σύγκριση της αποτελεσματικότητας στη διατήρηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να γίνει από μελέτες τις ερευνητικής ομάδας του Hausen στο ίδιο πειραματικό μοντέλο ποντικών⁸⁸. Φαίνεται ότι το νεότερο διάλυμα συντήρησης Perfadex διατηρεί το

ποσοστό του βαρέος υπότυπου για διάστημα ψυχρής ισχαιμίας 16h, ενώ το κλασικό διάλυμα συντήρησης Eurocollins μόνο για 4h.

Συμπερασματικά, η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να παραμείνει σταθερή και ο παράγοντας δραστικός για διάστημα έως 2 ώρες, όταν γίνεται θερμή διατήρηση και έως 24h στην περίπτωση της ψυχρής διατήρησης. Παράλληλα, κατά τη διατήρηση του πνευμονικού μοσχεύματος, πιθανόν λόγω της μεθόδου διατήρησης του μοσχεύματος, εμφανίζονται καταστροφικές αλλαγές στον επιφανειοδραστικό παράγοντα, κυρίως όταν διατηρείται το μόσχευμα σε θέση εκπνοής για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τέλος, διαλύματα όπως το Eurocollins φαίνεται ότι έχουν καταστροφική επίδραση στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Είναι φανερό ότι περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της επίδρασης των διαφορετικών διαλυμάτων συντήρησης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα.

Πνευμονική επαναιμάτωση

Η επίδραση της επαναιμάτωσης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα εξαρτάται από το βαθμό της πνευμονικής βλάβης του δότη, τη μέθοδο της διατήρησης, το χρόνο της και τη μέθοδο της συντήρησης (ψυχρής ή θερμής) και το είδος του διαλύματος συντήρησης. Ο βαθμός της προηγηθείσης πνευμονικής βλάβης εμφανίζεται μετά την επαναιμάτωση. Ο πίνακας 2-2 περιγράφει τις αδρές αλλαγές που εμφανίζονται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα κατά τη πνευμονική μεταμόσχευση.

Θερμή αποθήκευση και επαναιμάτωση

Η επαναιμάτωση μετά από μια ώρα θερμής ισχαιμίας προκαλεί σημαντική απώλεια των πυκνών ελασματομόρφων σωματιδίων των πνευμονοκυττάρων τύπου II⁸⁹. Παράλληλα, σε άλλη μελέτη φαίνεται ότι μειώνεται το ποσοστό της κυψελιδικής φωσφατιδιλοχολίνης με παράλληλη αύξηση των μη επιφανειοδραστικών φωσφολιπιδίων και των πρωτεϊνών πλάσματος, με αποτέλεσμα αρνητική επίδραση στην ελαστικότητα της κυψελίδας. Αύξηση του χρόνου θερμής ισχαιμίας σε δύο ώρες οδηγεί σε περαιτέρω επιδείνωση των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων του κυψελιδικού υγρού.

Ψυχρή αποθήκευση και επαναιμάτωση

Όταν τα πνευμονικά μοσχεύματα διατηρούνται για μικρά διαστήματα ισχαιμίας διάρκειας έως και δύο ωρών, ο κυψελιδικός επιφανειοδραστικός παράγοντας φαίνεται πρακτικά να μην επηρεάζεται. Σε πειραματικό μοντέλο σκύλων, μετά από δύο ώρες ψυχρής διατήρησης του πνευμονικού μοσχεύματος (με διάλυμα συντήρησης Eurocollins) σε εισπνοή και έξι ώρες επαναιμάτωσης, δε φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά το ποσοστό της φωσφατιδιλοχολίνης και της SP-A, ενώ το ποσοστό του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται να μειώνεται κατά 27% περίπου· παράλληλα οι βιοφυσικές ιδιότητες φαίνεται να παραμένουν σταθερές (πίνακας 1-2). Μετά από 4 ώρες διατήρησης σε εισπνοή και επαναιμάτωση για 24 ώρες, φαίνεται ότι το ποσοστό της DPPC σε σχέση με την ολική PC μειώνεται κατά 3%, ενώ οι τιμές του PaO₂ είναι ελαφρά μικρότερες σε σχέση με τις προεγχειρητικές. Ο Hausen και οι συνεργάτες το 1996 ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα ενός πειραματικού μοντέλου σε ποντίκια που συνέκρινε τη διατήρηση του πνεύμονα σε κατάσταση εισπνοής ή εκπνοής

χρησιμοποιώντας διάλυμα Eurocollins. Φαίνεται ότι το ποσοστό του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα μειώνεται περισσότερο όταν διατηρείται ο πνεύμονας σε κατάσταση εκπνοής. Τα αποτελέσματα αυτά δεν προκαλούνται κατά την επαναιμάτωση, αλλά είναι ήδη παρόντα κατά τη διατήρηση. Παρά ταύτα φαίνεται ότι η βιοφυσική κατάσταση του πνεύμονα διατηρείται ικανοποιητική. Όταν ο χρόνος ψυχρής διατήρησης φτάνει τις 4 ώρες εμφανίζονται σαφώς σοβαρές βλάβες στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και πολλές φορές σοβαρά ελλείμματα στην πνευμονική λειτουργία. Ο Veldhuizen και οι συνεργάτες το 1993 έδειξαν ότι για διαστημα συντήρησης 12 ωρών, το ποσοστό του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα μειώνεται στο 61% του φυσιολογικού, όταν η διατήρηση γίνεται με διάλυμα Eurocollins, ενώ μειώνεται στο 51% κατά τη συντήρηση με διάλυμα U Wisconsin. Στην ίδια μελέτη το ποσό του SP-A μειώνεται άμεσα κατά τη διατήρηση και παραμένει στα ίδια χαμηλά επίπεδα κατά την επαναιμάτωση (και για τα δύο διαλύματα συντήρησης). Το ποσοστό της PG ελαττώνεται μη σημαντικά (και για τα δύο διαλύματα), ενώ το ποσοστό της PC μειώνεται μόνο στην περίπτωση διατήρησης με Eurocollins. Ομοίως, το ποσοστό της σφιγγομυελίνης (SM) μειώνεται σημαντικά και για τα δύο διαλύματα , (πίνακας 2-2). Η μείωση του ποσοστού του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα προκαλεί παράλληλα και μείωση της επιφανειακής δράσης του, με αποτέλεσμα την αρνητική επίδραση επί των αναπνευστικών παραμέτρων του μεταμοσχευμένου πνεύμονα . Αποτελέσματα από την ίδια ομάδα το 1996 σε μεγαλύτερους χρόνους ισχαιμίας (38 ώρες) έδειξαν ότι ο βαρύς υπότυπος μειώνεται σε ποσοστό 40%, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της πνευμονικής λειτουργικότητας ⁹⁰. Η συγκριτική μελέτη των Hausen και συνεργατών του το 1996 που προαναφέρθηκε έδειξε ότι η αύξηση του χρόνου ισχαιμίας από 4 σε 8 ώρες οδήγησε σε μείωση του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού

παράγοντα τουλάχιστον κατά 300%. Αυτή η μείωση δεν ακολουθήθηκε από μείωση της επιφανειοδραστικής λειτουργίας *in vitro*, αλλά υπήρξε μείωση της λειτουργικότητας του μοσχεύματος. Στην ίδια μελέτη τα μοσχεύματα που συντηρήθηκαν σε εκπνοή κατά τη φάση συντήρησης εμφάνισαν πλήρη δυσλειτουργία. Σε άλλη συγκριτική μελέτη σε ποντίκια με 6 και 20 ώρες ισχαιμίας και διατήρησης σε εκπνοή με διάλυμα συντήρησης φυσιολογικό ορό και επαναιμάτωση μίας ώρας παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό του βαρέος υπότυπου μειώνεται κατά 50%, το ποσοστό του SP-A μειώνεται κατά 90%, ενώ το ποσοστό της PC μειώνεται ελάχιστα⁹¹. Η λειτουργικότητα των πνευμονικών μοσχευμάτων φαίνεται να περιορίζεται όταν ο χρόνος ισχαιμίας υπερβαίνει τις 6 ώρες. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν σε διατήρηση 16 ωρών με Perfadex και με επαναιμάτωση 2 ωρών. Παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού του βαρέος υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά 80% και σοβαρός περιορισμός της λειτουργικότητας του μοσχεύματος. Η χορήγηση προστακυκλίνης στο δότη και προσθήκη της στο Perfadex βελτίωσε τη λειτουργικότητα του μοσχεύματος χωρίς όμως να έχει καμία δράση στο ποσοστό του βαρέος υπότυπου. Τα αποτελέσματα επί του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη μεταμόσχευση φαίνεται ότι διατηρούνται για μία εβδομάδα μετά τη μεταμόσχευση σε μοντέλο ποντικών⁹².

Είναι πολύ σημαντικό να σημειώσουμε ότι οι αλλαγές στη σύνθεση και λειτουργικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά και της λειτουργικότητας του μοσχεύματος είναι ευθέως ανάλογες του ποσού της διαφυγής πρωτεϊνών πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό. Η μαζική έξοδος πρωτεϊνών πλάσματος φαίνεται ότι αναστέλλει ισχυρά τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες όπως περιγράφεται και στο ARDS. Η διαφυγή των πρωτεϊνών του πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό είναι μέρος της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης που συμβαίνει κατά τη μεταμόσχευση^{53 84 85 91 93} προκαλώντας βλάβη στη

σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και δυσλειτουργία στο πνευμονικό μόσχευμα .

Συμπερασματικά, ο πνευμονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας επηρεάζεται μετά από σύντομα διαστήματα ισχαιμίας, όταν το μόσχευμα διατηρείται σε συνθήκες θερμής ισχαιμίας, ενώ για να εμφανιστούν οι βλάβες αυτές σε συνθήκες ψυχρής ισχαιμίας χρειάζονται σημαντικά μεγαλύτεροι χρόνοι συντήρησης. Όμοιες βλάβες εμφανίζονται εάν το μόσχευμα υποβάλλεται σε μηχανικό αερισμό υψηλού αναπνεόμενου όγκου αέρα (tidal volume). Οι βλάβες αυτές στο σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα εμφανίζονται ανεξάρτητα εάν το μόσχευμα συντηρείται σε συνθήκες εισπνοής ή εκπνοής με μια ποικιλία διαλυμάτων συντήρησης. Ωστόσο, κάποια δεδομένα υποστηρίζουν ότι η διατήρηση του μοσχεύματος σε φάση εισπνοής διατηρεί καλύτερα το επιφανειοδραστικό σύστημα της κυψελίδας. Οι βλάβες στον επιφανειοδραστικό παράγοντα μπορεί να οφείλονται είτε σε διαταραχή του μεταβολισμού του (μείωση της ενδοκυττάριας σύνθεσής του ή αύξηση της ενζυμικής μετατροπής από βαρύ σε ελαφρύ υπότυπο), είτε σε άμεση καταστροφή των συστατικών του. Η απουσία των ενδοκυττάρων μεμβρανικών πυκνών σωματιδίων υποστηρίζει την υπόθεση ότι πιθανόν συμβαίνει και βλάβη στο μηχανισμό σύνθεσής του. Είναι σημαντικό να προσθέσουμε ότι οι αλλαγές στο μηχανισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβαίνουν παράλληλα με την αύξηση των πρωτεϊνών του πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό, οι οποίες επιβαρύνουν τη δράση του και πιθανόν επιδρούν στην μετατροπή του βαρέος υπότυπου σε ελαφρύ ⁹⁴.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Συντήρησης			PC % PL	Βαρύς υπότυπος % PL	SP-A % PL	Ελάχιστη επιφανειακή τάση (mN/m)
Εκπνευστική	Erasmus et al [53]	Φυσιολογικό, (n=4)	75.5±1.3	69.3±1.5	7.5±1.6	<1
		6 ώρες, (n=4) φυσιολογικός ορός	53.6±1.8	29.7±0.9	0.7±0.1	-
		20 ώρες, (n=5) φυσιολογικός ορός,	61.2±4.7	25.5±0.7	0.3±0.1	20±4
Εισπνευστική	Veldhuizen et al [46]	Φυσιολογικό	72.4±2.2	88.3±2.4	4.5±0.5	<5
		2 ώρες, EC, n=5	71.3±2.3	68.8±4.1	4.3±1	<5
		12 ώρες, EC, n=5	71.5±3.1	54.6±9	2.1±0.6	<5
		12 ώρες, UW, n=5	70.9±3.6	45.5±1.7	2.1±0.6	<5
	Novick et al [52]	Δότης , n=13	-	77.5±2.9		-
		36 ώρες EC, n=5	-	45.3±8.5		-
	Erasmus et al [57]	Φυσιολογικό, n=4	83±1.4	68.6±5.3	5.7±0.2	-
		20ώρες, n=5, φυσιολογικός ορός	62.5±14.9	34.3±5.2	2.3±0.2	-
Εκπνευστική vs. εισπνευστική	Hausen et al [41]	4 ώρες, εκπνοή, n=5	-	29	-	<5
		4 ώρες εισπνοή, n=5	-	56	-	<5
		8 ώρες εισπνοή, n=6	-	18	-	10±6

Πίνακας 2-2

Τιμές παραμέτρων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα στο BALF σε μεταμοσχευμένους πνεύμονες μετά από ψυχρή διατήρηση. Συγκριτικός πίνακας.

Θεραπεία με επιφανειοδραστικό παράγοντα στην πνευμονική μεταμόσχευση

Η γνώση του γεγονότος ότι κατά την μεταμόσχευση πνεύμονα επηρεάζεται τόσο η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα όσο και οι βιοφυσικές ιδιότητες του πνεύμονα, οδηγεί στην υπόθεση ότι η εξωγενής χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα θα βελτιώσει την ενδογενή σύνθεσή του, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας.

Κατά το μοντέλο της οξείας πνευμονικής βλάβης η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με επιφανειοδραστικό παράγοντα εξαρτάται από παραμέτρους όπως: το ποσό και ο τρόπος της χορήγησης, η επιλογή του χρόνου χορήγησης, η βλάβη του πνευμονικού ιστού κατά το χρόνο χορήγησης και τέλος, το είδος του επιφανειοδραστικού παράγοντα που θα χορηγηθεί. Είναι προφανής η υπόθεση ότι τα ίδια ερωτήματα ισχύουν και στην περίπτωση των πνευμονικών μεταμοσχεύσεων. Οι μελέτες που έχουν γίνει σε σχέση με τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις δεν έχουν απαντήσει σε αυτά τα ερωτήματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις χορηγούνται μεγάλα ποσά φυσικού τροποποιημένου επιφανειοδραστικού παράγοντα λίγο πριν από την επαναιμάτωση, ενώ σε μία μελέτη προχορηγήθηκε προκειμένου να μειώσει τις βλάβες του μηχανικού αερισμού υψηλών όγκων, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Αποτελέσματα στον κυψελιδικό επιφανειοδραστικό παράγοντα

Μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε εξωγενής επιφανειοδραστικός παράγοντας σε αυξημένες δόσεις (50mg/kg BW ανά πνεύμονα) πριν από την επαναιμάτωση έδειξαν ότι: αλλάζει η σύνθεση των φωσφολιπιδίων, και αυξάνεται η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών φωσφολιπιδίων καθώς και το κλάσμα του βαρέος υπότυπου σε δειγματοληψίες ως και 6

ώρες μετά τη μεταμόσχευση^{91 93}. Επιπλέον η θεραπεία με εξωγενή επιφανειοδραστικό παράγοντα διατηρεί τις τιμές του ενδογενούς SP-A. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι οδηγούν σε ομαλή βιοφυσική δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε in vitro μετρήσεις σε ποντίκια που έχουν υποβληθεί σε σοβαρή βλάβη επαναιμάτωσης μετά από 20 ώρες πνευμονικής ισχαιμίας. Μελέτες του Semik και συν. (1994) σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε μια ώρα θερμή ισχαιμία έδειξαν ότι η χορήγηση εξωγενή επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτρέπει την εξαφάνιση των ελασματόμορφων (πυκνών) σωματιδίων των πνευμονοκυττάρων τύπου II, γεγονός που μπορεί να σημαίνει βελτίωση του μεταβολισμού του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Αποτελέσματα της χορήγησης του εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα στον ενδογενή, σε σχέση με το χρόνο χορήγησης

Η ποσότητα του χορηγούμενου επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται ότι συνδέεται άμεσα με το ποσοστό ενσωμάτωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα με τον πνευμονικό ιστό. Το φαινόμενο αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο εξωγενώς χορηγούμενος παράγοντας επαναρροφάται από το πνευμονοκύτταρο, όπως άλλωστε συμβαίνει και με τον ενδογενώς παραγόμενο. Η μελέτη του Novick και των συνεργατών απέδειξε έμμεσα αυτή την ικανότητα του πνευμονοκυττάρου δείχνοντας ότι, εάν χορηγηθεί επιφανειοδραστικός παράγοντας στο δότη και ακολούθως χορηγηθεί και στο λήπτη πριν από την επαναιμάτωση τότε η ενσωμάτωσή του είναι σαφώς μεγαλύτερη από το να χορηγηθεί μόνο στη μια μόνο φάση. Μελέτη της ίδιας ομάδας έδειξε ότι η πολύ πρόωπη χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα με νεφελοποίηση σε μοντέλο οξείας πνευμονικής βλάβης προστατεύει τη σύνθεση του ενδογενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το μοντέλο περιελάμβανε χορήγηση εξωγενή επιφανειοδραστικού

παράγοντα και ακολούθως μηχανικό αερισμό υψηλών όγκων για 8 ώρες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οξείας πνευμονικής βλάβης. Ο εξωγενής επιφανειοδραστικός παράγοντας φαίνεται ότι μειώνει την έξοδο πρωτεϊνών πλάσματος στο κυψελιδικό υγρό, διατηρεί το ποσοστό του βαρέος υπότυπου και μειώνει τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων. Οι δράσεις αυτές διατηρούνται ακόμη και μετά από 17 ώρες ψυχρής συντήρησης που ακολουθείται από 6 ώρες επαναιμάτωσης. Σε άλλη μελέτη φαίνεται ότι οι προστατευτικές δράσεις του εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα όσο αφορά τη συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων, διατηρούνται για διάστημα μιας εβδομάδας μετά από μεταμόσχευση που ακολούθησε 20 ώρες ισχαιμίας .

Δράσεις του εξωγενούς επιφανειοδραστικού στη λειτουργία του μεταμοσχευμένου πνεύμονα

Μελέτη της ομάδας του Novick έδειξε ότι μετά από 38 ώρες ψυχρής ισχαιμίας η εξωγενής χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα βελτίωσε την πνευμονική λειτουργία του μοσχεύματος σε 3 από τους 8 σκύλους. Η βελτίωση αυτή φαίνεται να εμφανίζεται 3 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Μελέτη από την ίδια ομάδα έδειξε ότι η χορήγηση εξωγενή επιφανειοδραστικού παράγοντα πριν από την επαναιμάτωση δε βελτιώνει την πνευμονική λειτουργικότητα, όμως η επανάληψη της χορήγησης με εκνέφωμα φαίνεται ότι οδηγεί σε άμεση βελτίωση των τιμών της compliance και των αερίων αίματος. Εργασία σε ποντίκια έδειξε ότι η παράταση του χρόνου ισχαιμίας μειώνει την προστατευτική δράση του εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα. Στην ομάδα που υποβλήθηκε σε ισχαιμία έξι ωρών σε εκπνοή, η χορήγηση του εξωγενή επιφανειοδραστικού παράγοντα εξασφάλισε μεγαλύτερο ποσοστό βελτίωσης των αναπνευστικών παραμέτρων σε σχέση με την ομάδα 20 ωρών συντήρησης. Η χορήγηση πριν από την επαναιμάτωση σύμφωνα με άλλη μελέτη, δε βοηθά άμεσα τη λειτουργικότητα του πνεύμονα.

Όμως αντίθετα μετά την πρώτη εβδομάδα της μεταμόσχευσης, η πνευμονική λειτουργικότητα ήταν βελτιωμένη στην ομάδα των ποντικών που έλαβαν εξωγενή επιφανειοδραστικό παράγοντα (μοντέλο 20 ωρών ισχαιμίας). Η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα εμπλουτισμένου με SP-A, στοχεύοντας στην εξουδετέρωση της ανασταλτικής δράσης των εξαγγειωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος, δε φαίνεται να πλεονεκτεί.

Η πρόωπη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο δότη φαίνεται ότι προστατεύει το πνευμονικό μόσχευμα και μετά την επαναιμάτωση και βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία. Πιθανή εξήγηση της προστατευτικής δράσης είναι ότι προστατεύει το μόσχευμα από τις βλάβες που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός.

Οι παραπάνω μελέτες επισημαίνουν ότι η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι πιθανόν μια δυνατότητα βελτίωσης της λειτουργίας του πνευμονικού μοσχεύματος μετά τη διαδικασία ισχαιμίας-επαναιμάτωσης κατά τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις.

Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο η μελέτη εστιάστηκε στην ανάλυση της σύνθεσης και της βιοφυσικής δράσης του συστήματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συσχετίσαμε την παθογένεια του μηχανισμού ισχαιμίας - επαναιμάτωσης κατά τη μεταμόσχευση πνεύμονα με βιοχημικές βλάβες στο σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα και την επίδρασή τους στις βιοφυσικές ιδιότητες του πνεύμονα. Άλλες δράσεις του επιφανειοδραστικού παράγοντα που σχετίζονται με την άμυνα του πνεύμονα καθώς και οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητές του θα συζητηθούν παρακάτω. Ανακεφαλαιώνοντας μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω γενικά συμπεράσματα.

Ο προσεκτικός χειρισμός του δότη, κυρίως η χρήση μηχανικού αερισμού χαμηλών όγκων, φαίνεται να είναι σημαντικός για να διατηρήσει το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε βέλτιστη κατάσταση και την καλή πνευμονική λειτουργία μετά από πνευμονική μεταμόσχευση.

Η ισχαιμική φάση διατήρησης του μοσχεύματος μέσα σε συγκεκριμένα χρονικά όρια δε βλάπτει απαραίτητα την ακεραιότητα του συστήματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα όσον αφορά τη σύστασή του ή την λειτουργικότητά του.

Η φάση επαναιμάτωσης όμως φαίνεται να βλάπτει τον επιφανειοδραστικό παράγοντα στο βαθμό που εξαρτάται από τη διάρκεια και τη μέθοδο συντήρησης του μοσχεύματος.

Η ψυχρή ισχαιμία σε φάση εισπνοής πλεονεκτεί και επιτυγχάνει καλύτερους χρόνους ισχαιμίας, με αποτέλεσμα συγκριτικά καλύτερης ποιότητας μοσχεύματα, με καλύτερη λειτουργία του επιφανειοδραστικού μηχανισμού και επίτευξη καλύτερων αναπνευστικών και βιοφυσικών παραμέτρων μετά την επαναιμάτωση του μοσχεύματος.

Χρειάζεται περισσότερη έρευνα όσον αφορά το βέλτιστο διάλυμα συντήρησης σε σχέση με την επίτευξη βέλτιστης πνευμονικής λειτουργίας. Φαίνεται ότι η πρόωγη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία. Όμως είναι αναγκαίο να απαντηθεί το ερώτημα ποιος είναι ο βέλτιστος χρόνος χορήγησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα και με ποια μέθοδο.

Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο III

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Εισαγωγή

Η μεταμόσχευση του πνεύμονα είναι πλέον μια ευρείας αποδοχής μέθοδος αντιμετώπισης ασθενών με πνευμονική νόσο τελικού σταδίου ⁹⁵. Η πρόωμη δυσλειτουργία του μοσχεύματος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας. Η βλάβη εξ επαναιματώσεως φαίνεται να είναι ο κυριότερος αιτιολογικός μηχανισμός ^{96 97 98}. Η ακριβής παθογένεια του συνδρόμου ισχαιμίας - επαναιμάτωσης στις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη ^{96 97}. Τα ως τώρα εφαρμοζόμενα πειραματικά πρωτόκολλα φαίνεται ότι δεν μπορούν να αναπαράγουν την πλήρη κλινική εικόνα του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης, όπως είναι η υποξία, η σοβαρή βλάβη του ενδοθηλίου των πνευμονικών αγγείων, η αύξηση της τριχοειδικής διαπερατότητας και το εκσεσημασμένο κυψελιδικό οίδημα ^{99 100 101}. Η επιτυχημένη μεταμόσχευση πνεύμονα προϋποθέτει βέλτιστη προστασία και διατήρηση του μοσχεύματος ^{102 103}. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα πνευμονοκύτταρα τύπου II επηρεάζονται σοβαρά όχι μόνο κατά τη διαδικασία διατήρησης, αλλά και κατά τη φάση της επαναιμάτωσης ^{104 105}. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν αποδείξει ότι κατά τις μεταμοσχεύσεις πνεύμονα ο επιφανειοδραστικός παράγοντας επηρεάζεται τόσο κατά τη σύνθεσή του, όσο και κατά τις ιδιότητές του. Συγκεκριμένα, αν και η ολική συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων παραμένει σταθερή, παρουσιάζονται μια σειρά από αλλαγές: 1) μείωση του ποσοστού του βαρύ υπότυπου του επιφανειοδραστικού παράγοντα, 2) μείωση του ποσοστού της φωσφατιδιλοχολίνης σε σχέση με τα ολικά λιπίδια και 3) μείωση του ποσού της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης Α (SP-A). Επιπρόσθετα, οι εξαγγειωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος στην κυψελίδα μειώνουν σημαντικά τη λειτουργικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα ^{106 107}. Περαιτέρω μελέτες του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF) ανέδειξαν τόσο σε κλινικό ¹⁰⁸ όσο και σε πειραματικό επίπεδο ¹⁰⁹, βλάβη των βιοφυσικών

ιδιοτήτων του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά την πνευμονική μεταμόσχευση.

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα κατά τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις έχει προταθεί ότι συνδέονται άμεσα με την παθοφυσιολογία των βλαβών που εμφανίζονται στις μεταμοσχεύσεις. Έτσι η σταθεροποίηση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού συστήματος μπορεί να αναδειχτεί σημαντική για την επίτευξη βέλτιστης πνευμονικής συντήρησης. Έχει αποδειχθεί ότι ο εξωγενώς χορηγούμενος επιφανειοδραστικός παράγοντας μιμείται τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Σκοπός

Ο πρώτος στόχος μας ήταν να δημιουργήσουμε ένα σταθερό και επαναλήψιμο πειραματικό πρωτόκολλο που θα μπορούσε να αναπαράγει την εικόνα του συνδρόμου ισχαιμίας - επαναιμάτωσης συμπεριλαμβανομένων της διαταραχής της ανταλλαγής αερίων, της αύξησης των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων, αλλά και των συστηματικών αποτελεσμάτων του συνδρόμου επαναιματώσεως. Ταυτόχρονα θέσαμε ως αναγκαιότητα την αποφυγή της παθολογίας της ιστικής απόρριψης και με την ελαχιστοποίηση των χειρουργικών χειρισμών.

Ο δεύτερος στόχος της μελέτης μας ήταν να εκτιμήσει, αν και κατά πόσο η πνευμονική διατήρηση βελτιώνεται μετά την προθεραπεία του μοσχεύματος με εξωγενή επιφανειοδραστικό παράγοντα. Για το σκοπό αυτό χορηγήσαμε το σκεύασμα Beractant, που είναι φυσικό εκχύλισμα βόειου επιφανειοδραστικού παράγοντα. Εκτιμήσαμε τη δράση της προθεραπείας του μοσχεύματος με επιφανειοδραστικό παράγοντα ελέγχοντας την πνευμονική αιμοδυναμική, τις αναπνευστικές παραμέτρους, τα επίπεδα του νιτρικού οξειδίου και ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης στον ορό του πλάσματος και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και τέλος τη μικροσκοπική μορφολογία της κυψελίδας.

Υλικό και μέθοδος

Υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν δεκατέσσερις θηλυκοί (14) χοίροι (landscape white pigs) βάρους 25-30kg και μέσου βάρους $27(\pm 3,5)$ kg . Όλα τα ζώα έλαβαν ανθρώπινη φροντίδα σύμφωνα με τις διατάξεις του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής¹¹⁰ και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (86/609). Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Χρησιμοποιήθηκε ως επιφανειοδραστικός παράγοντας ένα στείρο μη πυρετογόνο τροποποιημένο φυσικό εκχύλισμα βόειου πνεύμονα (*Survanta*® *Beractant*, *Abbott*), που περιέχει φωσφολιπίδια, ουδέτερα λίπη, λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα (surfactant-associated proteins) SP-B και SP-C. Το εναιώρημα αυτό σταθεροποιήθηκε με την προσθήκη colfosceril palmitate, παλμιτικό οξύ (palmitic acid), και τριπαλμιτικό οξύ (tripalmiting). Το συγκεκριμένο σκεύασμα δεν περιέχει SP-A¹¹¹.

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες (με τη χρήση γεννήτριας τυχαίων αριθμών, Casio fx-7000G). Μετά τη διασωλήνωση πραγματοποιήθηκε τραχειοστομία και λήφθηκαν βασικές αιμοδυναμικές και αναπνευστικές μετρήσεις σε ύπτια θέση. Το πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε θέση δεξιάς θωρακοτομής. Στην ομάδα ελέγχου (ομάδα Α) (n=8), δε χορηγήθηκε καμία θεραπεία, στην ομάδα μελέτης, ομάδα Β (n=6), χορηγήθηκε ο επιφανειοδραστικός παράγοντας σε δόση 1.5 ml/kg στον αριστερό κύριο βρόγχο μέσω εύκαμπτου βρογχοσκοπίου (*Olympus P10, Tokyo, Japan*). Η χορήγηση έγινε ιδιαίτερος αργά στον αριστερό κύριο βρόγχο, ακριβώς στο σημείο διχασμού του σε αριστερό άνω (*cranial*) και κάτω (*caudal*) λοβαίο βρόγχο, ακολούθως χορηγήθηκαν 10 ml αέρα. Η όλη διαδικασία χορήγησης διαρκούσε 10 min. Μετά τη χορήγηση ακολουθούσε μηχανικός αερισμός εξαρτώμενος κατά τον όγκο (*Volume-controlled*), για διάστημα 30 min, με το ζώο σε θέση δεξιάς θωρακοτομής, με στόχο την πλήρη και εκλεκτική κατανομή του

επιφανειοδραστικού παράγοντα σε όλο τον αριστερό πνεύμονα εκμεταλλευόμενοι την βαρύτητα και τη μηχανική αναπνοή. Η ομάδα ελέγχου υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία για το ίδιο χρονικό διάστημα, αλλά δε χορηγήθηκε επιφανειοδραστικός παράγοντας.

Αναισθησιολογικό Πρωτόκολλο

Εικόνα 15

Τραχειοστομία και εισαγωγή τραχειοσωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 7 mm.

Εικόνα 16

Βρογχοσκόπηση διαμέσου του τραχειοσωλήνα 7 mm και λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.

Η προνάρκωση των πειραματόζωνων έγινε με ενδομυϊκή χορήγηση μιδαζολάμης σε δόση 5mg και 0,5 mg ατροπίνης. Ακολούθησε η τοποθέτηση φλεβικής γραμμής χορήγησης υγρών στην ωτιαία φλέβα. Η εισαγωγή στην αναισθησία έγινε με ενδοφλέβια χορήγηση θειοπεντάλης (250-400 mg). Τα ζώα αρχικά διασωληνώθηκαν με τραχειοσωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 6,5mm. Ακολούθησε η εκτέλεση τραχειοστομίας και η διασωλήνωση διαμέσου αυτής με στόχο την τοποθέτηση βραχύτερου και ευρύτερου τραχειοσωλήνα (7mm) (εικόνα 15), ώστε να μπορεί να επιτευχθεί βρογχοσκόπηση (Olympus P 10, Tokyo, Japan) και λήψη δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF) (εικόνα 16).

Ακολούθησε ο μηχανικός αερισμός με έλεγχο όγκου (volume control) (Servo Ventilator 900 C, Siemens Elema Sweden). Ο αρχικός αναπνεόμενος όγκος αερισμού ρυθμίστηκε σε 10 ml/kg βάρους σώματος, με ρυθμό αναπνοών στις 14 αναπνοές ανά λεπτό και με FiO₂ στο 0.5. Οι ρυθμίσεις του αναπνευστήρα προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να

εξασφαλίζεται P_{CO_2} από 40 έως 45 mm Hg και ο κορεσμός αρτηριακού αίματος σε οξυγόνο να είναι μεγαλύτερος του 90%¹¹². Η διατήρηση της αναισθησίας επιτεύχθηκε με τη συνεχή ενδοφλέβια χορήγηση θειοπεντάλης ($5\text{mg.kgr}^{-1}\text{hr}^{-1}$), και φεντανύλης ($1\mu\text{g.kgr}^{-1}\text{hr}^{-1}$) (Abbott infusion system Lifecare 5000). Ως μυοχαλαρωτικό χορηγήθηκε ενδοφλέβια περιοδικά 4 mg πανκουρόνιο (pancouronium bromide). Αντιβιοτική χημειο-προφύλαξη χορηγήθηκε άπαξ μετά την εισαγωγή στην αναισθησία (cefuroxime IV 50 mg/kg bolus). Κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου έγινε συνεχής καταγραφή της κεντρικής και πυρηνικής θερμοκρασίας του ζώου^{113, 114}.

Χειρουργικό πρωτόκολλο

Το πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ύπτια θέση, ακολούθησε παρασκευή της δεξιάς μηριαίας αρτηρίας και φλέβας, ώστε να τοποθετηθεί μέσω ανοικτής τεχνικής Seldinger αρτηριακός καθετήρας και καθετήρας κεντρικής φλέβας (Swan - Ganz) (εικόνα 17)¹¹⁵.

Εικόνα 17

Τοποθέτηση αρτηριακού καθετήρα και καθετήρα Swan-Ganz στην δεξιά μηριαία αρτηρία και φλέβα.

Τοποθετήθηκε ουροκαθετήρας με τη εκτέλεση κυστεοστομίας. Ακολούθως το πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε δεξιά πλάγια θέση, ώστε να πραγματοποιηθεί οπισθο-πλάγια θωρακοτομή δια μέσου του 5^{ου} μεσοπλεύριου διαστήματος. Η τομή επεκτάθηκε ως το στέρνο και εκτελέστηκε αφαίρεση 2 παρακείμενων πλευρών και των αντίστοιχων μεσοπλεύριων, ώστε να επιτευχθεί ευρεία αποκάλυψη του πνεύμονα και να είναι ευχερής και ασφαλής ο χειρισμός του. Ο πνεύμονας κατασπάσθηκε και παρασκευάστηκε ο τοιχωματικός υπεζωκότας που βρίσκεται πάνω από την άνω πνευμονική αρτηρία. Ακολούθησε απολίνωση της ημιαζύγου και αφαιρέθηκαν οι παρακείμενοι λεμφαδένες της πύλης, οι παρατραχειακοί και του αορτοπνευμονικού παραθύρου. Η πνευμονική αρτηρία και ο βρόγχος παρασκευάστηκαν κατά την πνευμονική πύλη. Ο πνεύμονας ακολούθως ανασπάστηκε και διαιρέθηκε ο κάτω πνευμονικός σύνδεσμος και παρασκευάστηκε η κάτω πνευμονική φλέβα. Με ανάσπαση του πνεύμονα προς τα πίσω διανοίχτηκε το περικάρδιο και αναγνωρίστηκε η εκβολή της αριστερής πνευμονικής φλέβας στον αριστερό κόλπο. Ακολούθησε προσεκτική παρασκευή της συμβολής της άνω και κάτω πνευμονικής φλέβας και παρασκευή της ημιαζύγου ενδοεπικαρδιακά.

Τοποθετήθηκε ταινία γύρω από το βρόγχο που αποψιλώθηκε από όλες τις γύρω βρογχικές αρτηρίες, με στόχο να διακοπεί η βρογχική κυκλοφορία. Κατά τη διάρκεια αυτών των ενεργειών απαιτήθηκε ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μειωθούν οι χειρισμοί στον ευαίσθητο και εύθραυστο αριστερό πνεύμονα που υποβάλλεται σε μηχανικό αερισμό (εικόνα 18). Η τοποθέτηση του κεντρικού φλεβικού καθετήρα στη δεξιά πνευμονική αρτηρία επιβεβαιώθηκε με την ψηλάφηση της αριστερής πνευμονικής αρτηρίας. Σημειωτέο ότι σε κανένα από τα πειραματόζωα δεν τοποθετήθηκε ο κεντρικός φλεβικός καθετήρας αριστερά και έτσι δε χρειάστηκε επανατοποθέτηση. Ακολούθησε ηπαρινισμός του ζώου με ενδοφλέβια χορήγηση δόσης ηπαρίνης 300 IU/kg. Τοποθετήθηκε περίπαση με ράμμα 6-0 Prolene (Ethicon, Hamburg, Germany) στην πνευμονική αρτηρία με τρόπο ώστε να μην διαπερνά το τοίχωμα.

Καθετηριάστηκε η πνευμονική αρτηρία με αρτηριακή κάνουλα 18 G, και αποκλείστηκε κεντρικά με αγγειακό βρόγχο σιλικόνης (tourniquet). Τοποθετήθηκε λαβίδα μερικού αρτηριακού αποκλεισμού στον αριστερό κόλπο αμέσως μετά τη συμβολή του με τις αριστερές πνευμονικές φλέβες, με τρόπο ώστε να αποφευχθεί επηρεασμός της κολπικής συστολής.

Εικόνα 18

Διεγχειρητική φωτογραφία της αριστερής πύλης του πνεύμονα. A = αορτή, PV=πνευμονικές φλέβες, PA=πνευμονική αρτηρία, B= αριστερός κύριος βρόγχος, P = φρενικό νεύρο

Εκτελέστηκε μικρή τομή στην περιοχή της συμβολής των πνευμονικών φλεβών για την απομάκρυνση του υγρού έκπλυσης και συντήρησης του μοσχεύματος (vent). Ο αριστερός πνεύμονας εκπλύθηκε με ψυχρό 4°C διάλυμα Via Span σε δόση 60 ml/kg. Η πίεση της πνευμονικής αρτηρίας διατηρήθηκε στα 15 mm Hg περίπου. Ο μηχανικός αερισμός διατηρήθηκε καθ'όλη την διάρκεια της έκπλυσης (εικόνα 19).

Μετά το τέλος της διαδικασίας έκπλυσης ο κύριος αριστερός βρόγχος αποκλείστηκε με βρογχολαβίδα και διατηρήθηκε σε μέση θέση. Ο πνεύμονας παρέμεινε *in situ* και περιβαλλόμενος με ένα αδιάβροχο και ισοθερμικό σάκο, ενώ περιτυλίχτηκε με κρύες γάζες 4°C. Ο σάκος διαποτίστηκε με συγκρίμματα πάγου και διαβρέχονταν με ψυχρό νερό, έτσι ώστε να διατηρείται ο πνεύμονας σε θερμοκρασία 4-8°C. Η θερμοκρασία μετριοούνταν συνεχώς στη μεσολόβιο και στο

πνευμονικό παρέγχυμα (Lutron TM-905 Dual Channel Thermometer), και όταν ξεπερνούσε τους 8 °C χορηγούνταν επιπλέον παγωμένο νερό και πάγος επί των επιθεμάτων του πνεύμονα. Ζεστό νερό θερμοκρασίας 38.8°C χορηγούνταν συνεχώς στην ανοιχτή υπεζωκοτική κοιλότητα και με ροή ανάλογη με την κεντρική θερμοκρασία του ζώου, έτσι ώστε να διατηρείται ανάμεσα στους 37 και 38.5°C. Παράλληλα αναρροφόταν από τον υπεζωκοτικό χώρο η περίσσια του υγρού (εικόνα 20). Θερμαινόμενη κουβέρτα τοποθετήθηκε στη βάση του χειρουργικού τραπεζίου, ενώ θερμομονωτικές κουβέρτες διατηρούσαν τη θερμοκρασία του ζώου φυσιολογική. Ο συνολικός χρόνος ισχαιμίας ορίστηκε στις 3 ώρες (εικόνα 21).

Η επαναιμάτωση έγινε με τη σύγκλειση του purse-string και διάνοιξη του tourniquet της πνευμονικής αρτηρίας. Ο αριστερός πνεύμονας επανατέθηκε σε μηχανικό αερισμό προσεκτικά με την αφαίρεση της βρογχικής λαβίδας. Το vent των αριστερών πνευμονικών φλεβών διατηρήθηκε ανοικτό ως τη στιγμή που φρέσκο κόκκινο αίμα εξήλθε, ώστε να απομακρυνθεί όλο το διάλυμα συντήρησης από την πνευμονική κυκλοφορία. Το vent συγκλείστηκε με ράμμα 6-0 Prolene και ακολούθως αφαιρέθηκε η λαβίδα αποκλεισμού του κόλπου, ώστε να αποκατασταθεί η κυκλοφορία του αριστερού πνεύμονα^{116 117}.

Εικόνα 19

Διεγχειρητική φωτογραφία της αριστερής πύλης του πνεύμονα κατά τη διάρκεια συντήρησης του μοσχεύματος. Δια μέσου της πνευμονικής αρτηρίας χορηγήθηκε διάλυμα συντήρησης με ελεγχόμενη πίεση και παροχετεύτηκε από τον αριστερό κόλπο. Φαίνεται η λαβίδα αποκλεισμού στον αριστερό κόλπο και η φακαρόλα αποκλεισμού της πνευμονικής αρτηρίας κεντρικά. PV=πνευμονικές φλέβες, PA=πνευμονική αρτηρία, B= αριστερός κύριος βρόγχος, P = φρενικό νεύρο, V= αντιστόμιο (vent), LA=αριστερός κόλπος και c=καθετήρας χορήγησης διαλύματος συντήρησης στο μόσχευμα.

Εικόνα 20

Διάγραμμα της τεχνικής διατήρησης του μοσχεύματος στη θερμοκρασία επιλογής μας κατά τη φάση συντήρησης. Σημειώστε την παροχή κρύου φυσιολογικού ορού εντός του αδιάβροχου και ισοθερμικού σάκου δια μέσου της κάνουλας α. Δια μέσου της κάνουλας b θερμός φυσιολογικός ορός προστίθεται στον υπεζωκοτικό χώρο για τη διατήρηση της θερμοκρασίας της καρδιάς σε φυσιολογικά όρια. Η περίσσεια του ορού από τον υπεζωκοτικό χώρο αναρροφάται. c= καθετήρας αναρρόφησης, PV= πνευμονικές φλέβες, PA= πνευμονική αρτηρία, L=αριστερός πνεύμονας A=αορτή.

Εικόνα 21

Διεγχειρητική φωτογραφία κατά τη διάρκεια συντήρησης του μοσχεύματος. Εικονίζεται η προσθήκη παγωμένου ορού και συγκριμμάτων πάγου επί του μοσχεύματος που είναι τοποθετημένο εντός θερμομονωτικού σάκου.

Εικόνα 22

Βρογχοσκοπική εικόνα στο σημείο διχασμού του αριστερού κύριου βρόγχου σε αριστερό άνω και αριστερό κάτω λοβαίο βρόγχο (βέλη). Ακολουθεί η λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος μετά την ενσφήνωση του βρογχοσκοπίου στο κάτω του άνω και τον κορυφαίο του κάτω λοβαίου βρόγχου.

Εικόνα 23

Καρδιοπνευμονικό παρασκεύασμα (ομάδα Α) μετά το τέλος του πρωτόκολλου (τρεις ώρες επαναιμάτωσης) διακρίνεται ο αριστερός πνεύμονας μετά τη διαδικασία της μεταμόσχευσης. Τα βέλη υποσημαίνουν τις θέσεις λήψης δειγμάτων πνευμονικού ιστού από τον άνω και κάτω λοβό, με χρήση αυτόματων συρραπτικών.

Μεθοδολογία Μετρήσεων

Αιμοδυναμική εκτίμηση

Η αιμοδυναμική εκτίμηση περιέλαβε την καταγραφή του καρδιακού ρυθμού (HR), τη μέτρηση της καρδιακής παροχής (CO) με τη μέθοδο της θερμοδιάλυσης, της συστηματικής αρτηριακής πίεσης (MAP), της κεντρικής φλεβικής πίεσης (CVP), της πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας (MPAP), της πίεσης εξ ενσφηνώσεως (wedge), τη συνεχή μέτρηση κορεσμού οξυγόνου (SVO₂), ανάλυση των αέριων αίματος και καταγραφή της ωριαίας διούρησης^{118 119}.

Επιπλέον υπολογίστηκε η αρτηριο-κυψελιδική διαφορά συγκέντρωσης οξυγόνου (AaDO₂) σύμφωνα με τον τύπο: Δραστική AaDO₂: Fio₂ x (Pbar – P H₂O) – Paco₂ – Pao₂ όπου: Pbar είναι η βαρομετρική πίεση, P H₂O είναι η μερική πίεση των ατμών νερού, Fio₂ είναι το ποσοστό της συγκέντρωσης του οξυγόνου στον εισπνεόμενο αέρα, Pao₂ η μερική πίεση αρτηριακού οξυγόνου και Paco₂ η μερική πίεση του αρτηριακού διοξειδίου του άνθρακα.

Ο δείκτης πνευμονικών αντιστάσεων (PVRI) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον

$$\text{τύπο: } PVRI = (MPAP - LAP) / CI \times 80$$

όπου MPAP είναι η αρτηριακή πνευμονική μέση πίεση, LAP η πίεση αριστερού κόλπου και CI είναι ο καρδιακός δείκτης¹⁰³.

$$CI = \frac{CO}{BSA}$$

όπου CO είναι η καρδιακή παροχή και BSA αντιπροσωπεύει την επιφάνεια σώματος.

Η επιφάνεια σώματος (BSA) υπολογίστηκε σε m² σύμφωνα με τον τύπο:

$$BSA = B^{2/3} \times K \times 10^{-4}$$

όπου B είναι το βάρος σε gr και K=9 όταν πρόκειται για χοίρους¹¹⁸.

Μηχανική του πνεύμονα

Επιπλέον υπολογίστηκε με τη χρήση του αναπνευστήρα Servo Ventilator 900 C η στατική ευενδοτότητα, static compliance (Cstat), που αποτελεί ένα μέτρο της ‘σκληρότητας’ του πνεύμονα. Για την εκτίμηση της Cstat χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{stat} = \frac{V_t}{P_{pp} - PEEP}$$

όπου V_t είναι ο ολικός αναπνεόμενος όγκος (tidal volume) σε ml, P_{pp} = plateau pressure (πίεση κατά το πλατό εισπνοής), σε cm στήλης νερού, $PEEP$ = positive end expiratory pressure (θετική τελοεισπνευστική πίεση), σε cm στήλης νερού.

Όπως είναι φανερό από την επίλυση του παραπάνω μαθηματικού τύπου οι μονάδες μέτρησης της στατικής ευενδοτότητας που προκύπτουν είναι ml/cmH₂O.

Τα σημεία μετρήσεων της αιμοδυναμικής και μηχανικής του πνεύμονα ορίστηκαν κατά την αρχή του πειράματος μετά την τοποθέτηση των γραμμών, μετά τις παρασκευές και τους χειρουργικούς χειρισμούς, 60, 120 και 180 min μετά την ισχαιμία και 60, 120 και 180 min μετά την επαναιμάτωση¹²⁰.

Λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF)

Για την επίτευξη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF) χρησιμοποιήθηκε εύκαμπτο ινοπτικό βρογχοσκόπιο το οποίο ενσφηνώθηκε στον κάτω τμηματικό βρόγχο του άνω λοβού και στον άνω τμηματικό βρόγχο του κάτω λοβού του αριστερού πνεύμονα (εικόνα 22). Μετά τη χορήγηση 20 ml φυσιολογικού ορού το υγρό αναρροφήθηκε με ήπια αρνητική πίεση. Το BALF συγκεντρώθηκε και καταγράφηκε. Τα σημεία εκτίμησης ορίστηκαν στο τέλος της ισχαιμίας και στο τέλος της επαναιμάτωσης¹²¹.

Ιστολογική μελέτη και μορφομετρία

Μετά από τρεις ώρες ισχαιμίας και τρεις ώρες επαναιμάτωσης ελήφθη πνευμονικός ιστός για ιστολογική και μορφομετρική ανάλυση (εικόνα 23). Ο ιστός εμβαπτίστηκε αρχικά σε διάλυμα *Karnovsky* παρασκευασμένο σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M, pH = 7.4, για διάστημα 12 ωρών στους 4°C. Ο ιστός ακολούθως μονιμοποιήθηκε σε 1% υδατικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου (*aquatic osmium tetroxide*) για μία ώρα στους 4°C, και αφυδατώθηκε εμβαπτιζόμενο σε μια σειρά από διαλύματα αιθανόλης, με αρχική συγκέντρωση 50% και τελική 100% (απόλυτη αιθανόλη), τοποθετήθηκε τελικά σε μίγμα εποξικών ρητινών (*Epon-Araldite*) και παρέμεινε για πολυμερισμό στους 60°C για 24 ώρες.

Οι ιστικές τομές πάχους 1μm κόπηκαν με τη χρήση μικροτόμου (*Leica Ultracut R ultratome*) και τη χρησιμοποίηση γυάλινων μαχαιριδίων. Η χρώση τους έγινε με κυανό της τολουιδίνης 1% σε 1% βόρακα. Για τη δειγματοληψία των εικόνων χρησιμοποιήθηκε φωτονικό μικροσκόπιο (*Zeiss Axiolab light microscope*) που είναι εφοδιασμένο με μια υψηλής ευκρίνειας έγχρωμη κάμερα (*Sony CCD Iris, high resolution*). Όλες οι παρατηρήσεις έγιναν σε μεγέθυνση αντικειμενικού φακού 5-40X. Οι περιοχές δειγματοληψίας επιλέχθηκαν τυχαία χρησιμοποιώντας πλέγμα προσοφθάλμιου φακού (*multipurpose ocular test grid*). Για κάθε δείγμα από κάθε ζώο αναλύθηκαν 150-250 τομές κυψελίδων. Η μορφομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό *Image Pro plus 3.1* (*Media Cybernetics*) εγκαταστημένο σε ένα *Pentium III, 800MHz PC*¹²². Οι εικόνες για παρουσίαση παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο *Zeiss Axiovert S100 inverted microscope* και οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μία 35-mm κάμερα με τη χρήση *100 ASA film* (*Kodak Tmax*). Τα αρνητικά σαρώθηκαν σε ένα *Agfa Duoscan T2500* σε ανάλυση 1000 dpi και οι εικόνες αποθηκεύτηκαν ως *Tagged Image File Format (*.tiff)*.

Μέτρηση νιτρωδών ιόντων

Η μέτρηση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) είναι δύσκολη, γιατί το NO ως ελεύθερη ρίζα έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (τάξης δευτερολέπτων) και αντιδρά πολύ γρήγορα με οξυγόνο, ρίζες οξυγόνου, μέταλλα, σουλφυδρυλικές ομάδες κ.ά. Μία από τις πλέον εύχρηστες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους μέτρησης του NO είναι η μέθοδος Griess, με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων σε διάλυμα. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι το NO σε διάλυμα μετατρέπεται χημικά σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα και η αντίδραση αυτή είναι στοιχειομετρική. Στα πειράματά μας, τα νιτρώδη μετρήθηκαν στην αρχή του πειράματος, μετά το τέλος της ισχαιμίας και μετά το τέλος της επαναιμάτωσης. Για τον προσδιορισμό των νιτρωδών, ο ορός του αίματος ή το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 20.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Σε 500μl από το υπερκείμενο προστέθηκε το αντιδραστήριο Griess¹²³ σε αναλογία 1:1. Τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ο προσδιορισμός των νιτρωδών έγινε με φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 540 nm. Οι τιμές των νιτρωδών υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται ως συγκέντρωση νιτρωδών σε μM και είναι η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση της μέσης τιμής (standard error, ± SEM).

Μέτρηση ενεργότητας ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης (EPO)

Χρησιμοποιήσαμε χρωματομετρική ανάλυση που βασίζεται στην οξείδωση της ορθο-φαινυλ-διαμίνης (OPD) από την EPO παρουσία H_2O_2 . Στα πειράματά μας, η ενεργότητα της EPO μετρήθηκε στην αρχή του πειράματος, μετά το τέλος της ισχαιμίας και μετά το τέλος της επαναιμάτωσης. Ο ορός του αίματος ή το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000 g για 10 min στους 4°C. 50 μl από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν εις-τριπλούν σε κυψελίδες μιας μικροπλάκας ELISA 96 θέσεων. Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 150 μl διαλύματος υποστρώματος (0.1 mM OPD, 0.05 M Tris pH 8 και 1 mM H_2O_2). Καθώς αυτή η αντίδραση δεν είναι ειδική για EPO, τα

δείγματα μετρήθηκαν επίσης υπό την παρουσία 50 mM AMT, που είναι εκλεκτικός αναστολέας της EPO. Μετά από 60 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 490 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε διάφορους όγκους από τα δείγματα, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι οι μετρήσεις μας έγιναν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης απορρόφησης.¹²⁴

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (mean, average) $\pm$ τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) ή μέση τιμή $\pm$ η τυπική απόκλιση της δειγματικής μέσης τιμής (standard error, SEM).

Ως μέση τιμή, ορίζεται το άθροισμα των τιμών των επιμέρους παρατηρήσεων, διαιρεμένο με το συνολικό αριθμό των παρατηρήσεων, σύμφωνα με το μαθηματικό τύπο:

$$\mu = \frac{\sum_i^1 x_i}{n_i}$$

Όπου μ = μέση τιμή, $\sum x_i$ = το αλγεβρικό άθροισμα και n_i = ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων.

Η μεταβλητότητα (variation) αποτελεί τη βασική ιδιότητα όλων των βιολογικών μεταβλητών, που συλλέγονται ή παρατηρούνται στην καθημερινή πράξη και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όλες οι τιμές αυτών των μεταβλητών δεν είναι σταθερές ή απόλυτες. Έτσι μπορεί π.χ. δύο σειρές μετρήσεων να εμφανίζουν τον ίδιο μέσο όρο, ενώ η διασπορά των παρατηρήσεων να αποκαλύπτει μεγάλες ανισότητες μεταξύ των κατανομών. Συνεπώς, για την ορθή περιγραφή ενός δείγματος δεν επαρκεί μόνο ο προσδιορισμός του κεντρικού του σημείου, επειδή η τιμή αυτή από μόνη της δεν περιγράφει καθόλου την κατανομή των δεδομένων και συνεπώς τη διασπορά τους γύρω από το κεντρικό σημείο του δείγματος.

Αντίθετα, ο βαθμός διασποράς των παρατηρήσεων μπορεί να περιγραφεί με ακρίβεια μέσω των ακραίων τιμών, μέσω της στατιστικής μεταβλητότητας και της σταθερής απόκλισης των τιμών των παρατηρήσεων αντίστοιχα, όπως

και τέλος, μέσω των εκατοστημορίων και των τεταρτημορίων της κατανομής του συνόλου των παρατηρήσεων.

Οι δύο **ακραίες τιμές** (minimum, maximum) προσδιορίζουν το εύρος των παρατηρήσεων. Οι τιμές όμως αυτές δεν είναι σε θέση να περιγράψουν τη μορφή της κατανομής των παρατηρήσεων.

Η **σταθερή απόκλιση** (standard deviation, SD) εκφράζεται μαθηματικά ως η τετραγωνική ρίζα της μεταβλητότητας και συνεπώς εμφανίζει τις ίδιες μονάδες μέτρησης με τις παρατηρήσεις και τα μέτρα περιγραφής του κεντρικού σημείου, σύμφωνα με το μαθηματικό τύπο:

$$SD = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n_i}}$$

Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της σταθερής απόκλισης, τόσο πιο μικρή είναι η διασπορά των δεδομένων γύρω από τη μέση τιμή.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την ανάλυση μεταβλητότητας μονής κατεύθυνσης (*One way ANOVA*) και ακολούθως με το *post hoc Newman-Keul's test*. Η διαδικασία αυτή αναδεικνύει όχι μόνο τις ομάδες που διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά και το ακριβές επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Τιμές $p < 0.05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Η σύγκριση των δεδομένων όταν πρόκειται για συνεχή μεταβλητή ανάμεσα στις δύο ομάδες έγινε με την εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς με ένα μόνο παράγοντα (*One-Way ANOVA*), και ακολούθως η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε με στατιστικά test, *post hoc Newman-Keul's test*. Η διαδικασία αυτή αναδεικνύει όχι μόνο τις ομάδες που διαφέρουν μεταξύ τους αλλά και το ακριβές επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Για την εκτίμηση των ομάδων με μη παραμετρικό τρόπο χρησιμοποιήθηκε το *Mann-Whitney U test* και όταν η πιθανότητα ήταν $p < 0,05$ θεωρήσαμε τις δύο ομάδες διαφορετικές^{125 126}. Για τη συλλογή, ταξινόμηση και περιγραφή των δεδομένων μας χρησιμοποιήθηκε το *Microsoft Excel 2002* και για τη στατιστική ανάλυση το στατιστικό πακέτο *SPSS for Windows, release 9.0.0* (SPSS Inc, Chicago, IL), εγκαταστημένο σε περιβάλλον *Win XP Pro, SR 1*.

Κεφάλαιο IV

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Περιγραφή Αποτελεσμάτων

Όλα τα πειραματόζωα συμπλήρωσαν το πειραματικό πρωτόκολλο σύμφωνα με τις απαιτήσεις του, ακολούθως θυσιάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες για το χειρισμό πειραματόζωων, οδηγίες Ευρωπαϊκής Ένωσης (86/609), και τις αρχές και οδηγίες που περιγράφονται στο Animal Care and Use Training Manual of UCLA^{127 128 129}.

Αιμοδυναμικές παράμετροι

Κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου η βασική αιμοδυναμική (MAP, CVP, HR, CI) του πειραματόζωου παρέμεινε σε δυναμικά σταθερή κατάσταση (steady state) χωρίς τη χρήση ινοτρόπων φαρμάκων.

Δείκτης πνευμονικών αντιστάσεων

Η βασική τιμή του PVRI υπολογίστηκε στις $205.18 \text{ dyne} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$ με τυπική απόκλιση (SD) ± 66.8 ο δε πληθυσμός των μετρήσεων συμπεριφέρεται ως κανονική κατανομή (πίνακας 3).

Κατά τη διάρκεια των παρατηρήσεων σε ολόκληρη την περίοδο της επαναιμάτωσης εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των τιμών του PVRI στην ομάδα ελέγχου (ομάδα A) σε σχέση με την ομάδα B τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στο σχήμα 1.

Στη ομάδα A, κατά τη διάρκεια της περιόδου επαναιμάτωσης, οι τιμές του δείκτη των πνευμονικών αντιστάσεων αυξήθηκαν σταθερά (1,26 φορά ή 26%) ανάμεσα στην πρώτη και την τρίτη ώρα. Αν συγκρίνουμε τη βασική τιμή των πνευμονικών αντιστάσεων

Σχήμα 1

Οι τιμές του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων μετά την επαναιμάτωση στις δύο ομάδες σε διαστήματα μίας ώρας. Οι error bars αντιπροσωπεύουν διάστημα εμπιστοσύνης 95% της μέσης τιμής από ανεξάρτητα πειράματα. Οι αστερίσκοι εκφράζουν τη στατιστική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Β, ανάμεσα στις 1^η, 2^η και 3^η ώρα επαναιμάτωσης: * $p=0,003$, ** $p=0,0002$, ή ανάμεσα στην 1^η και 3^η ώρα στην ίδια ομάδα: *** $p=0,001$, **** $p=0,20$ (Mann-Whitney U, Wilcoxon W test, Asymp. Sig. (2-tailed))

στην αρχή του πρωτοκόλλου και την τιμή στο τέλος της περιόδου επαναιμάτωσης, θα δούμε ότι η διαφορά φτάνει στο 2,18 (128%) που αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική ($p=0.001$). Στην ομάδα Β εμφανίστηκε μικρή αύξηση του δείκτη κατά 1,21 φορές από τη βασική τιμή, μη στατιστικά σημαντική, ο δε ρυθμός αύξησης ήταν μη στατιστικά σημαντικός, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 4). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα επιτυγχάνει σταθερότητα της αιμοδυναμικής του πνεύμονα· μπορούμε να προβλέψουμε ότι αυτή θα διατηρηθεί έτσι και τις επόμενες ώρες της επαναιμάτωσης.

		Statistic	Std. Error
PVRI	Mean	205,176	14,941
	95% Lower Bound	173,903	
	Interval for Mean	236,449	
	5% Trimmed Upper Bound	201,186	
	Median	186,427	
	Variance	4465,00	
	Std. Deviation	66,820	
	Minimum	106,6	
	Maximum	375,5	
	Range	268,8	
	Interquartile Range	89,795	
	Skewness	,88	
	Kurtosis	,79	

Πίνακας 3.

Στατιστική επεξεργασία της μέσης τιμής του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων, φαίνεται ότι ακολουθεί κανονική κατανομή.

επαναιμάτωση ώρες	Ομάδα	N	Mean PVRI	St. Deviation	Std. Mean
1 ^η ώρα	A	8	352,7333	37,1572	13,1371
	B	6	216,4909	63,1263	25,7712
2 ^η ώρα	A	8	416,9889	17,8456	6,3094
	B	6	232,9109	32,0812	13,0971
3 ^η ώρα	A	8	447,8002	23,0085	8,1347
	B	6	249,5139	50,9289	20,7917

Πίνακας 4

Οι μέσες τιμές του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων μετά την επαναιμάτωση. Η δειγματοληψία έγινε στην 1^η ώρα, 2^η ώρα και 3^η ώρα

Αναπνευστικές παράμετροι – μηχανική πνεύμονα

Η βασική τιμή της στατικής compliance είναι 20,56 ml/cm H₂O και ακολουθεί κανονική κατανομή (πίνακας 5). Μετά την επαναιμάτωση εμφανίζεται στατιστικά σημαντική $p = 0,03$ πτώση τις τιμές Cstat στην ομάδα A σε σχέση με την ομάδα B. Η πτώση της τιμής της Cstat συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια των παρατηρήσεων μετά την επαναιμάτωση στην ομάδα A. Σε αντίθεση στην ομάδα χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα εμφανίζεται μικρή βελτίωση των τιμών της compliance κατά την επαναιμάτωση η οποία διατηρείται σε όλη την ομάδα ελέγχου (πίνακας 6).

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες υπέρ της ομάδας B στη δεύτερη $p=0.007$ και τρίτη ώρα $p=0.002$ μετά την επαναιμάτωση, (σχήμα 2).

			Statistic	Std. Error
COMPLIANCE	Mean		20,5630	,4451
	95% Confidence	Lower Bound	19,6480	
	Interval for Mean	Upper Bound	21,4779	
	5% Trimmed Mean		20,3025	
	Median		20,5000	
	Variance		5,349	
	Std. Deviation		2,3129	
	Minimum		17,50	
	Maximum		30,00	
	Range		12,50	
	Interquartile Range		1,5000	
	Skewness		2,605	,448
	Kurtosis		10,532	,872

Πίνακας 5

Στατιστική μελέτη της βασικής τιμής της στατικής compliance (ml/cm H₂O), οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή.

Ομάδα		1 ^η ώρα	2 ^η ώρα	3 ^η ώρα
A	Mean (Cstat)	18,5125	15,7750	14,8375
	N	8	8	8
	Std. Deviation	2,2962	2,0940	1,7824
B	Mean (Cstat)	17,0833	18,0000	18,9167
	N	6	6	6
	Std. Deviation	2,6724	1,8708	0,7360

Πίνακας 6

Οι μέσες τιμές της Cstat (ml/cm H₂O) και η τυπική απόκλιση στη 1^η, 2^η και 3^η ώρα μετά την επαναιμάτωση.

Σχήμα 2

Η στατική compliance του πνεύμονα κατά την 1^η, 2^η και 3^η ώρα μετά την επαναιμάτωση. Τα Error Bars αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ml/cm H₂O. οι αστερίσκοι δηλώνουν τη στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις ομάδες **A** και **B** στην δεύτερη * p=0.007 και τρίτη ώρα **p=0.002 μετά την επαναιμάτωση. (Mann-Whitney U, Wilcoxon W test, Asymp. Sig. (2-tailed))

Συγκέντρωση NO στο συστηματικό αίμα

Στην ομάδα στην οποία δε χορηγήθηκε surfactant, η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων στην αρχή του πειράματος ήταν $1,33 \mu\text{M}$ ($\pm 0,11$), ενώ μετά από τις 3 ώρες ισχαιμίας μειώθηκε σε $0,88 \mu\text{M}$ ($\pm 0,14$) ($P < 0,05$). Μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης μειώθηκε ακόμη περισσότερο, φτάνοντας στα $0,585 \mu\text{M}$ ($\pm 0,08$) ($P < 0,01$). Φαίνεται δηλαδή ότι κατά τη συνολική διάρκεια του πρωτοκόλλου των 6 ωρών, υπάρχει σταθερή, στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων του NO (Σχήμα 3).

Σχήμα 3

Συγκέντρωση νιτρωδών ιόντων στον ορό του αίματος του πειραματόζωου στην αρχή του πειράματος (βασική τιμή), μετά από 3 ώρες ισχαιμίας και μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης, χωρίς ή με χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση νιτρωδών σε μM (μέση τιμή $\pm$ SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα βασικά επίπεδα των νιτρωδών της ομάδας Α. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (one way ANOVA test).

Στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε surfactant (ομάδα B), η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων στην αρχή του πρωτοκόλλου ήταν 1,51 μM ($\pm 0,21$), ενώ μετά από 3 ώρες ισχαιμίας ήταν 1,71 μM ($\pm 0,46$) και μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης ήταν 1,585 μM ($\pm 0,41$). Δηλαδή, η χορήγηση εξωγενή επιφανειοδραστικού παράγοντα προκάλεσε διατήρηση των τιμών του NO στο συστηματικό αίμα (Σχήμα 3).

Συγκέντρωση NO στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

Σχήμα 4

Συγκέντρωση νιτρωδών ιόντων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα του πειραματόζωου μετά από 3 ώρες ισχαιμίας και μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης, χωρίς ή με χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση νιτρωδών σε μM (μέση τιμή $\pm$ SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα επίπεδα των νιτρωδών της ομάδας A μετά από 3 ώρες ισχαιμίας. * $p < 0,05$ (one way ANOVA test).

Στην ομάδα στην οποία δε χορηγήθηκε surfactant, η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων μετά από 3 ώρες ισχαιμίας ήταν 1,16 μM ($\pm 0,11$) και μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης ήταν 0,75 μM ($\pm 0,06$) ($p < 0.05$). Στην ομάδα στην οποία είχε χορηγηθεί surfactant, η συγκέντρωση των νιτρωδών στο τέλος της ισχαιμίας ήταν 1,33 μM ($\pm 0,16$) και μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης ήταν 0,91 μM ($\pm 0,15$). Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική πτώση του NO στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα στην ομάδα A, σε σχέση με την ομάδα προθεραπείας με surfactant (Σχήμα 4).

Ενεργότητα ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης (EPO, eosinophil peroxidase) στο αίμα

Στην ομάδα στην οποία δε χορηγήθηκε surfactant (ομάδα A), η ενεργότητα της EPO στο αίμα μειώθηκε σημαντικά (65% μείωση) μετά από τις 3 ώρες ισχαιμίας, σε σχέση με την αρχή του πειράματος. Μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης, μειώθηκε ακόμα περισσότερο (80% μείωση). Στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε surfactant (ομάδα B), δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση (Πίνακας 7, 8 και Σχήμα 5).

Ομάδα A	Ενεργότητα EPO %
Βασική	100 $\pm$ 0 (v=7)
3 h ισχαιμία	36,5 $\pm$ 4,5
3 h επαναιμάτωση	18,6 $\pm$ 5,6

Πίνακας 7

Ποσοστό μεταβολής της ενεργότητας της EPO στο αίμα στην ομάδα A. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα (μέση τιμή $\pm$ SEM) σε σχέση με τη βασική, στην αρχή του πειράματος (που θεωρείται 100%).

Ομάδα Β	Ενεργότητα EPO %
Βασική	100 ± 0 (v=6)
3 h ισχαιμία	126 ± 39
3 h επαναιμάτωση	116 ± 52

Πίνακας 8

Παρουσίαση της EPO στο αίμα της Ομάδας Β, με surfactant, ανάμεσα στην αρχή του πειράματος μετά από 3 ισχαιμίας και μετά από 3 επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα σε σχέση με τη βασική (που θεωρείται 100%)

Σχήμα 5

Ενεργότητα EPO στο αίμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με τη βασική, στην αρχή του πειράματος (που θεωρείται 100%). *** P<0.001 (one way ANOVA test).

Ενεργότητα ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης (EPO, eosinophil peroxidase) στο BALF

Στην ομάδα ελέγχου (ομάδα Α), η ενεργότητα της EPO στο BALF αυξήθηκε σημαντικά μετά από 3 ώρες επαναιμάτωσης. Αντίθετα, στην ομάδα στην οποία είχε χορηγηθεί surfactant (ομάδα Β), η ενεργότητα της EPO δε μεταβλήθηκε σημαντικά (Πίνακας 9, 10 και Σχήμα 6).

	Ενεργότητα EPO %
3 h ισχαιμία	100 ± 0 (v=4)
3 h επαναιμάτωση	180 ± 21

Πίνακας 9

EPO στο BALF. Στην Ομάδα Α, (χωρίς surfactant). Μετά από 3 ισχαιμίας και μετά από 3 επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με τις τρεις ώρες ισχαιμίας (που θεωρείται 100%)

	Ενεργότητα EPO %
3 h ισχαιμία	100 ± 0 (v=3)
3 h επαναιμάτωση	73 ± 8

Πίνακας 10

EPO στο BALF. Ομάδα Β, με surfactant. Μετά από 3 ώρες ισχαιμίας και μετά από 3 επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με τις τρεις ώρες ισχαιμίας (που θεωρείται 100%).

Σχήμα 6

Ενεργότητα EPO στο BALF. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα (μέση τιμή $\pm$ SEM) σε σχέση με τις 3 ώρες ισχαιμίας (που θεωρείται 100%). ** $P < 0.01$ (one way ANOVA test).

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν σαφή αύξηση της ενεργότητας της EPO στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, με παράλληλη μείωση της ενεργότητάς της στο περιφερικό αίμα στην ομάδα στην οποία δε χορηγήθηκε surfactant, γεγονός που εκφράζει μετακίνηση των ηωσινοφίλων στην κυψελίδα. Στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε surfactant, η μετακίνηση των ηωσινοφίλων φαίνεται να αναστέλλεται (σχήμα 5 και 6).

Στην ομάδα Α παρατηρήθηκαν εμφανησιακές βλάβες ομοιογενώς διαταγμένες στο πνευμονικό παρέγχυμα. Στην ομάδα Β η μορφολογία και η ακεραιότητα της κυψελίδας διατηρήθηκε καλύτερα σε σχέση με την ομάδα Α. Στο τέλος της επαναιμάτωσης, μικτός πληθυσμός φλεγμονωδών κυττάρων (πολυμορφοπύρηνων, λεμφοκυττάρων και μακροφάγων) συσσωρεύθηκαν στο διάμεσο χώρο. Στην ομάδα Α η διήθηση ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα Β (εικόνα 24).

Στην ομάδα Α η μέση επιφάνεια τυχαίων κυψελιδικών τομών (mean surface area), μετά την επαναιμάτωση τριών ωρών, που μετρήθηκε με υπολογιστική μορφομετρία ήταν $5280,84 (\pm 4991,1) \mu\text{m}^2$, ενώ στην ομάδα Β ήταν $3997,89 (\pm 3284,70) \mu\text{m}^2$ ($p < 0.009$, one way ANOVA test) (εικόνα 24).

Στην ομάδα Α το παχύ μεσοκυψελιδικό διάστημα (εικόνα 22) που μετρήθηκε με υπολογιστική μορφομετρία μετά από 3 ώρες από την επαναιμάτωση ήταν $18,464 \mu\text{m} (\pm 0,623)$ ενώ στην ομάδα Β ήταν μικρότερο $13,935 (\pm 0,282)$, η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική, $p = 0,000$ (σχήμα 7).

Στον πίνακα 11 περιγράφονται οι τιμές του λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος (εικόνα 23)· φαίνεται ότι το πάχος αυξάνεται στην ομάδα που δεν χορηγήθηκε επιφανειοδραστικός παράγοντας. Το πάχος στο τέλος της ισχαιμίας ήταν $4,1948 \pm 1,3434 \mu\text{m}$, ενώ μετά το τέλος της επαναιμάτωσης ήταν $5,7735 \pm 2,5351 \mu\text{m}$. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p = 0.000$) (Πίνακας 12)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ομάδα A	thin interalveolar septum ισχαιμία	4,1948	143	1,3434	,1135
	thin interalveolar septum επαναιμάτωση	5,7735	143	2,5351	,2143
Ομάδα B	thin interalveolar septum ισχαιμία	5,3315	143	1,6559	,2525
	thin interalveolar septum Επαναιμάτωση	5,3604	143	2,0981	,3200

πίνακας 11

Περιγραφική στατιστική. Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του πάχους του λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος (thin interalveolar septum) στις δύο ομάδες.

Paired Samples Test

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Ομάδα A	thin interalveolar septum ischaemia - thin interalveolar septum reperfusion	-1,5787	2,7832	,2352	-2,0438	-1,1136	-6,712	142	0,000
Ομάδα B	thin interalveolar septum ischaemia	-2,89E-02	3,1597	,4818	-1,0013	,9435	-,060	142	,953
	thin interalveolar septum reperfusion								

Πίνακας 12

Στατιστική ανάλυση του πάχους του λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Η αύξηση που παρατηρείται κατά την επαναιμάτωση της ομάδας μη χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι στατιστικά σημαντική, $p < .000$

Στον πίνακα 13 περιγράφονται οι τιμές του πάχους της βασικής μεμβράνης της κυψελιδοτριχοειδικής μεμβράνης (εικόνα 24). Φαίνεται ότι το πάχος αυξάνεται στην ομάδα που δεν χορηγήθηκε επιφανειοδραστικός παράγοντας. Το πάχος στο τέλος της επαναιμάτωσης είναι 7,421E-02 μm στην ομάδα B ενώ 8,385E-02 μm στην ομάδα χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.000$) (Πίνακας 14).

Εικόνα 24

Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τοιχώματος κυψελίδας χοίρου μετά από 3 h ισχαιμίας στην ομάδα Β: * αντιστοιχεί στην βασική μεμβράνη της κυψελίδας, ** αντιστοιχεί στο λεπτό μεσοκυψελιδικό διάστημα, *** πυρήνας πνευμονοκυττάρου τύπου Ι.

X 7000

Βασική Μembrάνη

		95% Confidence Interval for Mean						
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
Ομάδα Α	250	8,385E-02	1,578E-02	2,189E-03	7,946E-02	8,824E-02	,05	,13
Ομάδα Β	250	7,421E-02	1,470E-02	1,359E-03	7,152E-02	7,690E-02	,04	,12

Πίνακας 13

Περιγραφική στατιστική. Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του πάχους της βασικής μεμβράνης στις δυο ομάδες.

ANOVA

Βασική μεμβράνη

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ανάμεσα στις ομάδες	3,345E-03	1	3,345E-03	14,792	,000
Within Groups	3,776E-02	499	2,261E-04		
Total	4,111E-02	499			

Πίνακας 14

Στατιστική μελέτη ανάμεσα στις δύο ομάδες μετά από τρεις ώρες από την επαναιμάτωση. Η ομάδα Β (χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα) φαίνεται ότι διατηρεί λεπτότερη τη βασική μεμβράνη με στατιστικά σημαντικό τρόπο,

$p < .000$

Σχήμα 7

Διαστάσεις του παχέος μεσοκυψελιδικού διαστήματος (thick interalveolar septum) υπολογισμένες με υπολογιστική μορφομετρία μετά από τρεις ώρες από την επαναιμάτωση. Στην ομάδα Α (ελέγχου) είναι $18,464 \pm 0,623 \mu\text{m}$, με εύρος τιμών 4,16 ως 70,02. Στην ομάδα Β (ομάδα surfactant) είναι $13,935 \pm 0,282 \mu\text{m}$ με εύρος τιμών 1,18 ως 44,21. ο αστερίσκος δηλώνει τη στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Β μετά την επαναιμάτωση (* $p=0.000$).

Εικόνα 25

Εικόνα φυσιολογικής κυψελίδας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο:

* πνευμονοκύτταρο τύπου I, ** παχύ μεσοκυψελιδικό διάστημα, *** λεπτό μεσοκυψελιδικό διάστημα, --- η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στην surface area, Al κυψελίδα και Ca τριχοειδές, → ερυθροκύτταρο.

A 1 **x82**

B 1 **x82**

A 2 **x327**

B 2 **x327**

Εικόνα 26

Ιστολογική εικόνα του μεταμοσχευμένου πνεύμονα, A1 και A2: Ομάδα A (ελέγχου). Εμφυσηματική εικόνα σε όλο το πνευμονικό παρέγχυμα. B1 και B2 ομάδα B (χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα). Ο μέσος όγκος της κυψελίδας όπως εκφράζεται από το εμβαδόν τυχαίων τομών κυψελίδας είναι μικρότερος σε σχέση με την ομάδα A. Ο μικτός πληθυσμός κυττάρων φλεγμονής είναι μικρότερος στην ομάδα B σε σχέση με την ομάδα A. Χρώση κυανού της τολουιδίνης (toluidine blue stain). A 1 & B2 μεγέθυνση X 82, A2 & B2 μεγέθυνση X 327.

Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μεταμόσχευσης πνεύμονα

Οι μεταμοσχεύσεις πνεύμονα αποτελούν την τελευταία θεραπευτική λύση για ασθενείς τελικού σταδίου πνευμονικής νόσου. Τα αποτελέσματα της μεθόδου τα τελευταία 10 χρόνια έχουν βελτιωθεί τόσο ώστε να αποτελούν μια αποδεκτή πια θεραπευτική προσέγγιση. Η επιβίωση ενός έτους κυμαίνεται σε διάφορες πρόσφατες σειρές από 77-80% ενώ η πενταετής επιβίωση φτάνει από 60-63%^{130 131 132}.

Οι κύριοι παράγοντες θνητότητας και νοσηρότητας που εμφανίζονταν κατά την περιεγχειρητική περίοδο μετά τη μεταμόσχευση πνεύμονα σχετίζονταν με την επούλωση της βρογχικής αναστόμωσης, την υπεροξεία και οξεία απόρριψη και τις λοιμώξεις¹³¹. Η πλειοψηφία αυτών των προβλημάτων αυτών έχει ως τώρα μειωθεί σημαντικά. Οι αναστομώσεις των αεραγωγών μπορούν να γίνουν με ασφάλεια με τη βελτίωση της χειρουργικής τεχνικής και την αντικατάσταση της κορτιζόνης με άλλα ανοσοκατασταλτικά. Η οξεία απόρριψη μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά με πολλές εναλλακτικές θεραπείες. Οι λοιμώξεις ελέγχονται αποτελεσματικότερα και αντιμετωπίζονται με τη χρήση νεότερων φαρμάκων^{133 131}. Η πρόωγη νοσηρότητα και θνητότητα φαίνεται να συνδέεται πλέον με τα αποτελέσματα της βλάβης ισχαιμίας – επαναιμάτωσης (primary graft failure) (σχήμα 8)¹³². Η ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής και η αλληλοεπίδραση αυτής της διαδικασίας με το πνευμονικό αγγειακό ενδοθήλιο φαίνεται να είναι η κύρια αιτία για τις βλάβες που παρατηρούνται κατά την πνευμονική μεταμόσχευση.

Η ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου μεταμόσχευσης πνεύμονα σε μεγάλα ζώα, μπορεί να δημιουργήσει ένα σταθερό περιβάλλον, όπου αναπαράγεται η διαδικασία ισχαιμίας και επαναιμάτωσης αλλά και τα αποτελέσματά της σε τοπικό και συστηματικό επίπεδο. Το περιβάλλον αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στην ενδελεχή έρευνα του μηχανισμού ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και στην ανάπτυξη χειρισμών που θα μπορούσαν να μειώσουν τα αρνητικά αποτελέσματά του. Η καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του παραπάνω μηχανισμού, που θα μπορούσε να επιτευχθεί

με την ανάπτυξη ενός τέτοιου μοντέλου μεγάλων ζώων, είναι ουσιώδους σημασίας¹⁰¹.

THE REGISTRY OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HEART AND LUNG TRANSPLANTATION: FIFTEENTH ANNUAL REPORT-2002. Ενήλικες λήπτες μοσχευμάτων: αιτίες θανάτου ανά χρονική περίοδο: θνητότητας (0-30 ημέρες)

Σχήμα 8¹³²

Κατά την πνευμονική μεταμόσχευση στο μόσχευμα εξελίσσονται τρεις διαφορετικοί παθογενετικοί μηχανισμοί: η ισχαιμία–επαναιμάτωση, οι μηχανικές κακώσεις λόγω χειρουργικών χειρισμών και μηχανικού αερισμού, καθώς και η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στο μόσχευμα. Ο πνευμονικός ιστός που δέχεται την τριάδα αυτών των παραγόντων μεταβάλλεται με τρόπο ώστε να γίνεται πιο επιρρεπής στον μηχανισμό της απόρριψης. Ο μηχανισμός της κυτταρικής και χημικής ανοσολογικής βλάβης είναι πιο απίθανο να συμβεί σε φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να είναι γενικά πιο ανθεκτικά, από τα επηρεασμένα, μολυσμένα ή ενεργοποιημένα κύτταρα. Οι επιδράσεις που υφίστανται τα κύτταρα του μοσχεύματος προάγουν την ανοσοαπάντηση του ξενιστή στο μόσχευμα^{134 135}. Η επίπτωση της οξείας απόρριψης είναι συγκριτικά υψηλότερη μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα σε σχέση με άλλα συμπαγή όργανα¹³⁶. Φαίνεται ότι περίπου το 5% της πρώιμης θνητότητας σχετίζεται με την απόρριψη του μοσχεύματος¹³⁷. Η απόρριψη του μοσχεύματος μπορεί να αναγνωριστεί ως:

υπεροξεία απόρριψη (*hyperacute rejection*) η οποία μπορεί να εμφανιστεί σε λεπτά ή ώρες μετά την επαναιμάτωση, **επιταχυνόμενη** (*accelerated rejection*) η οποία συμβαίνει σε ώρες ή ημέρες και ως **οξεία** απόρριψη (*acute rejection*) που συμβαίνει σε μέρες ή εβδομάδες. Δεν πρέπει να θεωρηθούν ως τελείως διαφορετικές διαδικασίες, μια και μπορεί να συμβούν οποιαδήποτε στιγμή μετά την επαναιμάτωση και συχνά επικαλύπτονται σημαντικά¹³⁴. Ο ακριβής μηχανισμός του 'πολυπαραγοντικού καταρράκτη' της απόρριψης, το σημείο αφετηρίας του μηχανισμού απόρριψης καθώς και η αλληλουχία των διαδικασιών του δεν έχει πλήρως τεκμηριωθεί. Τα πειραματικά πρότυπα που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία έχουν χρόνο επαναιμάτωσης ικανό να εμφανιστεί ο μηχανισμός της απόρριψης (πίνακας 15). Το πειραματικό μοντέλο που αναπτύξαμε διαρκεί ικανό χρόνο (τρεις ώρες), που είναι σαφώς αναγκαίος για να μελετηθεί η συμπεριφορά του μοσχεύματος μετά την επαναιμάτωση, ώστε να μπορεί εν δυνάμει να ανιχνεύσει τις δύο άμεσες διαδικασίες απόρριψης: την υπεροξεία και την επιταχυνόμενη. Ο σχεδιασμός αυτού του πειραματικού μοντέλου καταργεί εξ ορισμού τη διαδικασία οποιασδήποτε μορφής απόρριψης, αφού χρησιμοποιείται ο ίδιος πνεύμονας στο ίδιο ζώο.

Πολλά πειραματικά μοντέλα έχουν προταθεί για την εκτίμηση του μηχανισμού της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης¹³⁸. Η έλλειψη ενός κατάλληλου πειραματικού μοντέλου ανάλογου στη συνήθη κλινική πρακτική έχει περιορίσει την πρόοδο της μελέτης των πνευμονικών μεταμοσχεύσεων¹³⁹. Ο πίνακας 15 παρουσιάζει περιληπτικά την ποικιλία των μοντέλων που αναπτύχθηκαν κατά τις τελευταίες δεκαετίες περιλαμβανομένων και των μοντέλων αυτομεταμόσχευσης. Το μοντέλο αλλο-μεταμόσχευσης πνεύμονα, από ένα ζώο σε άλλο του ίδιου είδους, (allotransplantation) φαίνεται ότι είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σήμερα από πολλές ομάδες διεθνώς. Σε προηγούμενα πειραματικά πρωτόκολλα το μοντέλο αλλο-μεταμόσχευσης χρησιμοποιήθηκε και από τη δικιά μας ερευνητική ομάδα^{140 141}. Τα μοντέλα αλλο-μεταμόσχευσης, έχουν το μειονέκτημα ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές στην αναπνευστική και αιμοδυναμική λειτουργία του ζώου είναι ουσιαστικά το μεικτό αποτέλεσμα τριών διαφορετικών μηχανισμών βλάβης. Ο πρώτος μηχανισμός είναι οι χειρουργικές βλάβες από την εξαίρεση και επανεμφύτευση του μοσχεύματος και την εκτέλεση αναστομών. Δεύτερος

μηχανισμός είναι αυτές καθαυτές η ισχαιμία και επαναιμάτωση που είναι στην προκειμένη περίπτωση το ζητούμενο προς μελέτη. Τέλος υπάρχει σαφώς η επίπτωση της διαδικασίας της απόρριψης που αφορά κυρίως την υπεροξεία και επιταχυνόμενη μορφή της, αφού ξεκινούν ουσιαστικά από τη στιγμή της επαναιμάτωσης. Ο βιοχημικός μηχανισμός της απόρριψης είναι κοινός κατά ένα μεγάλο μέρος με τη διαδικασία της φλεγμονής που εμπλέκεται στην διαδικασία ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Σαν αποτέλεσμα πολλοί βιοχημικοί δείκτες χρήσιμοι στη μελέτη των βλαβών ισχαιμίας επαναιμάτωσης ταυτόχρονα αποτελούν και δείκτες απόρριψης ВРТ.¹⁴² ВТРВ ¹⁴³ ¹⁴⁴ άρα η ακρίβεια και η αξιοπιστία των μετρήσεων περιορίζεται. Στην προσπάθεια να μετριάστούν ή να εξαφανιστούν αυτοί οι παράγοντες που μειώνουν τη δυνατότητα μελέτης μόνο της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης, σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα επανεμφύτευσης ή αυτομεταμόσχευσης¹³³.

Τα μοντέλα επανεμφύτευσης, (αφαίρεσης και επανεμφύτευσης του πνεύμονα), έχουν το πλεονέκτημα της δυνατότητας διατήρησης του μοσχεύματος σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών συντήρησης, ενώ ο χρόνος ισχαιμίας περιορίζεται σε σχέση με το μοντέλο αλλο-μεταμόσχευσης. Το κύριο μειονέκτημα των πρωτοκόλλων αυτών είναι το γεγονός ότι στο μηχανισμό των αναπνευστικών και αιμοδυναμικών παραμέτρων εμπλέκεται και η χειρουργική επιβάρυνση. Τα μοντέλα *in situ* αυτο-μεταμόσχευσης (*in situ autotransplantation*) μειώνουν και τους χειρουργικούς χειρισμούς στο μόσχευμα. Στο μοντέλο που αναπτύξαμε προκειμένου να μειώσουμε ακόμα περισσότερο τη χειρουργική επιβάρυνση του πνεύμονα συμπεριλάβαμε τη χρήση θωρακοπλαστικής, δεδομένου ότι ο πνεύμονας του χοίρου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος.

Ως τώρα τα μοντέλα αυτο-μεταμόσχευσης περιορίζονται στη χρήση θερμής ισχαιμίας και συντήρησης. Πρόσφατα ανακοινώθηκε από τους Demertzis και συνεργάτες ¹⁴⁵ πειραματικό μοντέλο μεταμόσχευσης πνεύμονα με ψυχρή ισχαιμία. Οι περιορισμοί αυτού του μοντέλου ήταν η υψηλή θερμοκρασία συντήρησης (15 °C) και η μικρή διάρκεια της ισχαιμικής συντήρησης (2 h).

Το προτεινόμενο πειραματικό μοντέλο από την ομάδα μας, συνδυάζει χαρακτηριστικά που το κάνουν ιδιαίτερα ενδιαφέρον, αφού παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης του μηχανισμού ισχαιμίας-επαναιμάτωσης κατά τη

μεταμόσχευση πνεύμονα. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως οι χειρουργικοί χειρισμοί και η πιθανότητα έναρξης της διαδικασίας απόρριψης παρεμβαίνουν σε βιοχημικό και κλινικό επίπεδο, στη δυνατότητα λήψεως ακριβέστερων μετρήσεων μειώνοντας την ακρίβεια και επαναληψιμότητα σε ένα ήδη πολυπαραγοντικό πειραματικό περιβάλλον. Επιπλέον οι βιοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση παραμέτρων του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης είναι κοινοί με αυτούς που χρησιμοποιούνται για το μηχανισμό απόρριψης, γεγονός που κάνει προφανή την αλληλοκάλυψη των δύο παθογενετικών μηχανισμών.

Στο προτεινόμενο μοντέλο εξ ορισμού δεν έχουμε διαδικασία απόρριψης, αφού χρησιμοποιούμε το ίδιο όργανο, ενώ οι χειρουργικοί χειρισμοί είναι οι λιγότεροι δυνατοί, για ένα τέτοιο μοντέλο. Ωστόσο θα πρέπει να τονίσουμε το γεγονός ότι το συγκεκριμένο μοντέλο είναι χειρουργικά δύσκολο αφού είχαμε κατά την περίοδο της καμπύλης εκμάθησης, δύο θανάτους λόγω αναισθησιολογικών και χειρουργικών προβλημάτων (τα πειράματα αυτά εξαιρέθηκαν της μελέτης).

Η μέθοδος ισχαιμικής συντήρησης που χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τις κλινικές μεταμοσχεύσεις πνεύμονα διεθνώς είναι η εμβάπτιση του μοσχεύματος σε ψυχρό διάλυμα με πάγο. Η διαδικασία αυτή συνήθως επιτυγχάνει θερμοκρασία 7°C στην επιφάνεια του πνεύμονα που έρχεται σε επαφή με το υγρό¹⁴⁶. Η βέλτιστη θερμοκρασία συντήρησης φαίνεται να είναι οι 10°C . Πειραματικά η συντήρηση στους 10°C οδήγησε σε καλύτερη λειτουργική ανάκαμψη του μοσχεύματος από τη συντήρηση στους 4°C ή και στους 22°C ¹⁴⁷.

Στο πειραματικό μοντέλο που σχεδιάσαμε πετύχαμε θερμοκρασίες $4-8^{\circ}\text{C}$ στη μεσολόβιο με σταθερό και επαναλήψιμο τρόπο. Στη βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται τόσο χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης σε μοντέλο *in situ* αυτομεταμόσχευσης (πίνακας 15). Κατά τη διάρκεια όλου του πρωτοκόλλου η πυρηνική θερμοκρασία του ζώου (δεξιός κόλπος) διατηρούνταν σε νορμοθερμία στους $37,5^{\circ}\text{C}$. Τα αποτελέσματα που είχαμε ήταν σταθερά και επαναλήψιμα¹²¹.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα των μοντέλων αυτομεταμόσχευσης είναι ότι απαιτούν το μισό αριθμό πειραματόζωων σε σχέση με τα μοντέλα αλλομεταμόσχευσης για τον ίδιο αριθμό αποτελεσμάτων για στατιστική

μελέτη. Το γεγονός αυτό μειώνει σημαντικά το κόστος του πρωτοκόλλου, ενώ παράλληλα είναι περισσότερο συμβατό με την ηθική αντιμετώπισης των ζώων.

Συμπερασματικά, αυτό το πείραμα βασικών επιστημών μπορεί να προσφέρει ένα σταθερό και επαναλήψιμο περιβάλλον για τη μελέτη του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε επίπεδο παθογένειας, αλλά και τη μελέτη θεραπευτικών παρεμβάσεων, απομονώνοντάς το από άλλους μηχανισμούς, που μπορεί να εμπλέκονται κατά τη μεταμόσχευση πνεύμονα.

Συγγραφέας έτος	Είδος ζώου	Είδος μοντέλου μεταμόσχευσης	Χαρακτηριστικά μεταμόσχευσης
Feeley TW, 1985	Σκύλος	Καρδιά- πνεύμονες	5 h διατήρηση, στους 4 °C
Kondo T 1986	Ποντίκι	Πνεύμονας Homograft	Χρόνος ισχαιμίας 95 min, normothermic
Dark JH, 1986	Σκύλος	En bloc δυο πνευμόνων, acute	Αλλομοσχεύματα
Campbell C, 1986	Κουνέλι	Καρδιά- πνεύμονες	Ετεροτοπική, λαιμός κουνελιού
Hachida M, 1988	Σκύλος	Αριστερός πνεύμονας	Αυτομεταμόσχευση, 1-5 h νορμοθερμική συντήρηση,
Jones MT, 1988	Σκύλος	Αριστερός πνεύμονας	Αλλομόσχευμα, 1 h ισχαιμία, inflatable cuff σε κάθε πνευμονική αρτηρία
Nazari S, 1990	Χοίρος	Ενός πνεύμονα	Αλλομεταμόσχευση, επαναστομωση των βροχικών αρτηριών
Klepetko W, 1990	Σκύλος	Ενός πνεύμονα	Allograft, hypothermic συντήρηση 4 h, BALF
Hiraiwa T, 1990	Κουνέλι	Συνδυασμένη καρδιά- πνεύμονα	Ορθοτοπική, αλλομεταμόσχευση
Haverich A, 1991	Χοίρος	Αριστερού πνεύμονα	Allograft, επιβίωση 11 εβδομάδων
Portilla E, 1991	Σκύλος	Autoperfused heart-lung block	Homograft
Kontos GJ, 1992		Πνεύμονα καρδιά organ blocks	Normothermic autoperfusion circuit.
Wisser W, 1993	Κουνέλι	Απομονωμένος πνεύμονας	Κλειστού κυκλώματος perfusion
Swoboda L, 1994	Κουνέλι	Ex-vivo πνευμονική επαναιμάτωση	Ποικίλοι χρόνοι ισχαιμίας και τύποι συντήρησης
Balkhy HH, 1995	Κουνέλι	In vivo θερμής ισχαιμίας επαναιμάτωσης πνεύμονα	Αυτομεταμόσχευση, ισχαιμία 120 min
Everett JE, 1995	Χοίρος	Αριστερός κάτω λοβός	Λοβαία μεταμόσχευση
Hausen B, 1996	Ποντίκι	Δυο πνευμόνων	acute, syngeneic in situ
Demertzis S, 1999	Πρόβατο	Αυτομεταμόσχευση αριστερός πνεύμονας	2 h in situ στους 15 °C

Πίνακας 15

Συγκεντρωτικός πίνακας των ποικίλων πειραματικών μοντέλων που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία τις τελευταίες δεκαετίες.

Η επίδραση της άμεσης χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα στο υποψήφιο μόσχευμα.

Κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας οι γνώσεις μας γύρω από το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα αυξήθηκαν¹⁴⁸. Το υγρό που καλύπτει τις κυψελίδες αποτελείται από μία λεπτή μονοστοιβάδα από πνευμονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα που επικάθεται σε μία υδατική υποκείμενη φάση. Ο επιφανειοδραστικός αυτός παράγοντας αποτελείται από φωσφολιπίδια (κυρίως διπαλμιτυλο φωσφατιδύλο χολίνη (DPPC, dipalmitoyl phosphatidyl choline)) και αποπρωτεΐνες (Apoproteins A, B, C και D). Οι παράγοντες αυτοί συντίθενται και εκκρίνονται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας βρίσκεται σε μια δυναμικά σταθερή κατάσταση (steady state) παραγόμενος συνεχώς, καταστρεφόμενος και επαναπροσροφώμενος από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και τα πνευμονικά μακροφάγα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής αναφέρεται ότι είναι δύο ή δέκα ώρες¹⁴⁹. Στο φυσιολογικά λειτουργούντα πνεύμονα ο ρόλος της στοιβάδας του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι να μειώνει την επιφανειακή τάση στη διαχωριστική επιφάνεια υγρού-αερίου με αποτέλεσμα να αποτρέπει τη σύμπτωση των κυψελίδων κατά την εκπνευστική φάση και να διατηρεί την επιφάνεια ανταλλαγής αερίων, όπως εξηγήσαμε στο γενικό μέρος. Εάν το υγρό που καλύπτει την πνευμονική κυψελίδα αποτελούνταν μόνο από ορό, τότε δύο γεγονότα θα συνέβαιναν. Πρώτον, ο πνεύμονας θα απαιτούσε μεγαλύτερη ενδοβροχική πίεση απ'ό,τι φυσιολογικά για να εκπτυχθεί, αφού η αυξημένη επιφανειακή τάση θα αντιστεκόταν στη διάταση της κυψελίδας. Δεύτερον, οι μικρότερης διαμέτρου κυψελίδες θα είχαν την τάση να αδειάζουν στις μεγαλύτερες οδηγώντας κάποιες πνευμονικές περιοχές στη σύμπτωση (ατελεκτασία) και άλλες περιοχές θα υπερδιατεινόταν (εμφύσημα). Στο μοντέλο μας αναπαραγάγαμε αυτές τις διαταραχές στην ομάδα ελέγχου. Οι μηχανικές επιδράσεις του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα, είναι ωστόσο πιο πολύπλοκες από το να μειώνεται η επιφανειακή τάση, όπως για παράδειγμα θα συνέβαινε με ένα απλό επιφανειοδραστικό παράγοντα όπως είναι το σαπούνι. Ο πνευμονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας έχει τη μοναδική ικανότητα να μειώνει περισσότερο την επιφανειακή τάση στις μικρότερες κυψελίδες απ'ό,τι στις μεγαλύτερες.

Η πλέον ευρέως αποδεκτή και κλινικά εφαρμοζόμενη μέθοδος συντήρησης του πνευμονικού μοσχεύματος, κατά τη διάρκεια της μεταμόσχευσης, είναι η υποθερμική έκπλυση του πνεύμονα δια μέσω της πνευμονικής αρτηρίας (ορθόδρομη έκπλυση) που ακολουθείται από υποθερμική συντήρηση του μοσχεύματος. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή φαίνεται να μην είναι η βέλτιστη. Υποστηρίζεται ότι αυτές οι συνθήκες λήψης και συντήρησης του πνευμονικού μοσχεύματος είναι υπεύθυνες για την πρόωμη ανεπάρκειά του μετά την επαναιμάτωση που οδηγεί στο θάνατο τους μεταμοσχευθέντες ασθενείς^{150 151}.

Η απάντηση του ιστού στη διαδικασία της μεταμόσχευσης (re-implantation response) έχει πολλές ομοιότητες με την οξεία πνευμονική βλάβη που προκαλείται από ιογενείς παράγοντες¹⁵² και οδηγεί σε διαταραχή της λειτουργίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα¹⁵³. Σε πειραματικά μοντέλα πνευμονικής μεταμόσχευσης έχει δείχθει ότι επηρεάζεται η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα ενώ σε *in vitro* μετρήσεις έχει αποδειχθεί μείωση των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων, μετά από διατήρηση ή και επαναιμάτωση του μοσχεύματος¹⁰⁹. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της έκπλυσης του μοσχεύματος με ψυχρό διάλυμα συντήρησης, ο λόγος λεκιθίνης / σφιγγομυελίνης (L/S) και η συγκέντρωση της διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DSPC) μειώνονται, ενώ παράλληλα οι συγκεντρώσεις των ολικών πρωτεϊνών (TP) και της αλβουμίνης αυξάνονται¹⁰⁸. Αυτές οι μελέτες έδειξαν επίσης ότι η επιφανειακή τάση της κυψελίδας αυξάνεται κατά τη διάρκεια της πνευμονικής μεταμόσχευσης. Παρόμοια ευρήματα έχουν καταγραφεί και στην οξεία πνευμονική βλάβη^{154 155}. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν επιπλέον ότι οι ανωμαλίες στη δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα πνεύμονα αρχίζουν από τη στιγμή που το μόσχευμα εκπλένεται με ψυχρό διάλυμα συντήρησης, ενώ επιδεινώνονται κατά τις φάσεις διατήρησης και επαναιμάτωσης. Βασίζόμενοι στα παραπάνω θεωρήσαμε σωστό να χορηγήσουμε επιφανειοδραστικό παράγοντα πριν από την έναρξη της ψυχρής έκπλυσης με στόχο να διατηρήσουμε φυσιολογική την επιφανειοδραστική λειτουργία της κυψελίδας.

Η πρώτη παρατήρηση από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας ήταν ότι ο πνεύμονας στην ομάδα ελέγχου για να εκπτυχθεί χρειάζεται μεγαλύτερη ενδοβρογχική πίεση απ'ό,τι φυσιολογικά. Αυτό αντανακλάται

στις στατιστικά σημαντικές μικρότερες τιμές στατικής ευενδοτότητας (*static compliance*) στην ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, η *static compliance* στην ομάδα που έλαβε επιφανειοδραστικό παράγοντα έμεινε ουσιαστικά σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτό συνάδει αρμονικά με την αρχική μας υπόθεση ότι η πρόωμη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα θα διατηρούσε σε φυσιολογικά επίπεδα την επιφανειακή τάση της κυψελίδας. Εκτιμώντας τις βασικές αρχές της πνευμονικής λειτουργίας, όπως αναλύθηκαν εκτενώς παραπάνω και τα έμμεσα ευρήματα που αποδείξαμε, πιστεύουμε ότι η χρήση εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα διατηρεί την επιφανειακή τάση της κυψελίδας και γενικά, τις μηχανικές ιδιότητες του πνεύμονα, οι οποίες, όπως ανασκοπήθηκε παραπάνω, επηρεάζονται κατά την πνευμονική μεταμόσχευση.

Επιπλέον, όπως περιγράφηκε στο γενικό μέρος, οι ίδιες οι ενδείξεις λήψης μοσχεύματος στην κλινική πράξη, όπως παραδείγματος χάρη η ύπαρξη εγκεφαλικού θανάτου ή εγκεφαλικής βλάβης, αλλά και η παρατεταμένη διασωλήνωση του δότη, είναι παράγοντες που επιδεινώνουν τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του μοσχεύματος, αφού προκαλούν πνευμονικό οίδημα και έξοδο πρωτεϊνών του πλάσματος στην πνευμονική κυψελίδα. Τα δεδομένα αυτά κάνουν την ανάγκη προ-χορήγησης εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα επιτακτικότερη. Η απόδειξη αυτής της αναγκαιότητας θα γίνει στόχος νεότερου μοντέλου από την ομάδα μας, αφού ο στόχος του μοντέλου μας δεν ήταν να αναπαράγει αυτές τις συνθήκες.

Σ' αυτό το πειραματικό μοντέλο ένα επιπλέον εύρημα ήταν το γεγονός ότι στην ομάδα ελέγχου παρατηρήσαμε λιγότερες και μεγαλύτερες κυψελίδες ανά οπτικό πεδίο, που χαρακτηρίζονται ως εμφυσηματόμορφες βλάβες. Το εύρημα αυτό ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια της μορφομετρίας της κυψελίδας μετρώντας τυχαία μεγάλο αριθμό εμβαδών κυψελίδων σε τυχαίες τομές πνεύμονα (*surface area* – εμβαδά επιφανείας) και συγκρίνοντας στατιστικά τις τιμές των δύο ομάδων. Παρατηρήθηκε ότι στην ομάδα χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα διατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μικρότερα μέσα εμβαδά επιφανείας και με μικρότερη διασπορά τιμών. Αν θέλαμε να το εκφράσουμε σε παθοφυσιολογικό επίπεδο, θα λέγαμε ότι στην ομάδα χορήγησης *surfactant* παρατηρήσαμε περισσότερες κανονικού

μεγέθους κυψελίδες (φυσιολογικές), και ελάχιστες γιγάντιες ή συρρικνωμένες.

Τα ευρήματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από τον νόμο του Laplace ο οποίος ορίζει ότι η πίεση (P) σε σφαιρική φυσαλίδα αέρα μέσα σε ένα υγρό όπως είναι η κυψελίδα που περιβάλλεται από αίμα και περιέχει αέρα, ορίζεται από τον τύπο:

$$P = \frac{2T}{R}$$

Όπου, T είναι η επιφανειακή τάση του υγρού και R είναι η ακτίνα της φυσαλίδας. Αν εφαρμόσουμε το νόμο του Laplace στις κυψελίδες, η πίεση θα είναι μεγαλύτερη στις μικρότερες κυψελίδες οδηγώντας βαθμιαία στη μετακίνηση του αέρα από τις μικρότερες στις μεγαλύτερες με αποτέλεσμα οι μικρές κυψελίδες απορροφώνται τελικά από τις μεγαλύτερες ώστε ο πνεύμονας αποκτά μεγαλύτερες και λιγότερες κυψελίδες. Η εικόνα αυτή εκφράζεται ως εμφυσηματική βλάβη. Ο πνεύμονας θα έχει μικρότερη συνολική επιφάνεια ανταλλαγής αερίων με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στο αίμα. Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι να μειώνει την επιφανειακή τάση περισσότερο στις μικρότερες κυψελίδες και να σταθεροποιεί το λόγο $2T/R$ του νόμου του Laplace. Τα προαναφερθέντα ευρήματα αποδεικνύουν ότι και ο εξωγενώς χορηγούμενος surfactant σταθεροποιεί το λόγο $2T/R$.

Επιπρόσθετα με τα προαναφερθέντα αναπνευστικά ευρήματα το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε μετρήσεις αιμοδυναμικών παραμέτρων. Η συνεχής καταγραφή του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων μας οδήγησε στην παρατήρηση ότι η προθεραπεία του μοσχεύματος με surfactant διατηρεί τις τιμές του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων σε σταθερά επίπεδα σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου όπου αυξάνεται στατιστικά σημαντικά. Η σταθερότητα των πνευμονικών αντιστάσεων συνδυάζεται με στατιστικά σημαντική σταθερότητα των τιμών της συστηματικής αρτηριακής πίεσης.

Υποθέσαμε ότι οι τιμές του δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων συνδέονται πιθανά με την παραγωγή αγγειοδραστικών ουσιών όπως είναι το NO. Έτσι επεκτείναμε τον έλεγχό μας στις πιθανές βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια μιας μεταμόσχευσης πνεύμονα στο

βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και στον ορό του αίματος σε σχέση με τα επίπεδα του NO.

Το NO είναι γνωστό ότι μεσολαβεί στην πρόκληση αγγειοδιαστολής που σχετίζεται με τη δράση ακετυλοχολίνης στον άνθρωπο και σε πολλά πειραματικά μοντέλα. Η πνευμονική αγγειοδιαστολή είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας του NO στο μη αδρενεργικό, μη χολινεργικό νευρικό σύστημα (NANC)¹⁵⁶.

Η αναστολή της σύνθεσης του NO οδηγεί στην αυξημένη αγγειοσυσπαστική απάντηση των πνευμονικών αγγείων όλων των μεγεθών σε μια ποικιλία από ζωικά είδη¹⁵⁷. Παραμένει αδιευκρίνιστο κατά πόσο η συνεχής παραγωγή του NO διατηρεί το βασικό αγγειακό τόνο. Το NO φαίνεται ότι απελευθερώνεται άμεσα, μόνο όταν εμφανίζεται ένα αγγειοσυσπαστικό ερέθισμα, σε μια προσπάθεια να ανασταλεί η αύξηση του πνευμονικού αγγειακού τόνου διατηρώντας την ομοιόσταση του πνεύμονα. Η δραστηριότητα του NO φαίνεται να είναι σημαντική στην οξεία και χρόνια πνευμονική αγγειοσύσπαση. Υποστηρίζεται ότι έχει μία καλώς τεκμηριωμένη αγγειοχαλαρωτική επίδραση στα συσπασμένα πνευμονικά αγγεία, αλλά ελάχιστη επίδραση στα μη-συσπασμένα αγγεία¹⁵⁸. Η μείωση της παραγωγής του NO καταλήγει σε άμεση απώλεια της εξαρτώμενης από το NO αγγειοδιαστολής¹⁵⁹.

Από την άλλη πλευρά, είναι άξιο επισήμανσης ότι το NO συμμετέχει σε μια μεγάλη ποικιλία άλλων βιολογικών δράσεων εκτός της αγγειοδιαστολής. Τέτοιες είναι η νευρομεταβίβαση, η πήξη του αίματος και οι μηχανισμοί της άμυνας του ξενιστή¹⁶⁰. Το NO φαίνεται να παίζει μείζονα ρόλο στην ανορχήστρωση της ανοσολογικής απάντησης¹⁶¹, επηρεάζοντας την κυτταρική απάντηση στη φλεγμονή και αναδεικνύοντας αντιφλεγμονώδεις και προφλεγμονώδεις δράσεις¹⁶². Έτσι το NO φαίνεται να δρα ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα ουδετερόφιλα που οδηγεί στην εξαγγείωση των ουδετερόφιλων¹⁶³, ως αποτέλεσμα αυτού έχουμε τη βλάβη του οργάνου από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τις κυτοκίνες και τις πρωτεάσες που ελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα¹⁶⁴. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη ερεθίσματα ενεργοποιούν τη σύνθεση του νιτρικού οξειδίου

(NOS) στα ουδετερόφιλα και μακροφάγα· ενώ τέλος το NO αναστέλλει τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων¹⁶⁵.

Στο πειραματικό μας μοντέλο, η προθεραπεία του μοσχεύματος με επιφανειοδραστικό παράγοντα οδήγησε σε μια αξιόπιστη και σταθερή διατήρηση των τιμών του δείκτη των πνευμονικών αντιστάσεων χωρίς σημαντική μείωση στις τιμές της συστηματικής αρτηριακής πίεσης. Ομοίως, οι τιμές της συγκεντρώσεως του NO στον ορό του αίματος διατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά υπέρ της ομάδας προχορήγησης (ομάδα B). Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μειώνει την ενδογενή παραγωγή του NO και της προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εκτιμώντας ότι ο βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής του NO είναι 3-30 sec¹⁶⁶, είναι ασφαλές να υποθέσουμε, ότι δεν υπάρχει μείωση της παραγωγής του NO στην ομάδα B κατά το διάστημα των 3 ωρών επαναιμάτωσης που εφαρμόσαμε στο πρωτόκολλό μας.

Ο ρόλος των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών στις εξωγενείς χορηγήσεις επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι αμφιλεγόμενος. Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανόμενου του BERACTANT® (SURVANTA ABBOTT) περιέχουν ένα εκχύλισμα λιπιδίων αλλά δεν περιέχουν την υδρόφοβη μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνη γνωστή ως SP-A¹⁶⁷. Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A & SP-D συνδέονται με μια ποικιλία από παθογόνους μικροοργανισμούς και ευοδώνουν τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα. Μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή και την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών και ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα φλεγμονώδη κύτταρα όπως π.χ. είναι τα κυψελιδικά μακροφάγα¹⁶⁸. Ωστόσο, σε πειραματικά μοντέλα ζώων, η SP-A φαίνεται να έχει ανοσολογικές δράσεις, επάγει τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων στον πνεύμονα¹⁶⁹ και παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού εναντίων των παθογόνων¹⁷⁰.

Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του SP-A στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα μειώνεται μετά από βρογχοσκοπική χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα χωρίς SP-A, όπως για παράδειγμα του σκευάσματος Alveofact¹⁷¹, δράση που αποδίδεται στην αραίωση του SP-A από το ποσό του χορηγούμενου επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επιπλέον είναι γνωστό ότι οι εξαγγειωμένες πρωτεΐνες του ορού του πλάσματος

προκαλούν μείωση του ποσού του SP-A⁸⁵, γεγονός που φαίνεται να οφείλεται σε μεταβολή της έκκρισης και επαναπρόσληψης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II κατά την μεταμόσχευση πνεύμονα⁵⁷.

Τα δεδομένα που αναλύσαμε στηρίζουν την υπόθεση ότι η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα χωρίς SP-A στο μόσχευμα, στο πειραματικό μοντέλο που εφαρμόσαμε, προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης της SP-A στην κυψελίδα οδηγώντας πιθανά σε επαγωγή της σύνθεσης του NO¹⁷².

Μετά από την πνευμονική μεταμόσχευση ένα σταθερό εύρημα σε κλινικό^{173 174} και πειραματικό επίπεδο είναι η ανάπτυξη διάμεσου οιδήματος στον πνευμονικό ιστό^{175 176}. Το εύρημα συνήθως εκφράζεται με την αύξηση του λόγου υγρού προς αποξηραμένου ιστού. Ακριβέστεροι δείκτες διάμεσου οιδήματος είναι οι διαστάσεις συγκεκριμένων ανατομικών δομών του ιστού που μπορούν να μετρηθούν με τη χρήση της υπολογιστικής μορφομετρίας. Τέτοιοι μορφομετρικοί δείκτες είναι το παχύ μεσοκυψελιδικό διάστημα, το λεπτό μεσοκυψελιδικό διάστημα και το πάχος της βασικής μεμβράνης¹⁷⁷ στο επίπεδο της τριχοειδο-κυψελιδικής μεμβράνης^{1, 178}. Η ποσοτικοποίηση τέτοιων δεικτών θα μπορούσε, όχι μόνο να εκτιμήσει το βαθμό κατακράτησης νερού από το μόσχευμα, αλλά και να εντοπίσει συγκεκριμένες θέσεις που αυτό συμβαίνει και σε ποιο ποσοστό. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν αύξηση διαστάσεων σε όλους τους μορφομετρικούς δείκτες και σαφή, στατιστικά σημαντική, διατήρηση αυτών των τιμών στην ομάδα χορήγησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η παρατήρηση στην κοινή φωτονική μικροσκοπία έδειξε ότι ο χώρος της επαφής των κυψελίδων που εκφράζεται ως παχύ μεσοκυψελιδικό διάστημα δεν περιλαμβάνει μόνο το υγρό στοιχείο του οιδήματος, αλλά είναι ταυτόχρονα ένας ανατομικός χώρος στον οποίο συγκεντρώνονται τα κύτταρα φλεγμονής (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα) κατά την πνευμονική μεταμόσχευση. Ο βαθμός της συγκέντρωσης αυτών των κυττάρων αποτελεί ένα καλό δείκτη του βαθμού ενεργοποίησης του παθογενετικού μηχανισμού της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης¹⁷⁹. Είναι φανερό ότι οι διαστάσεις του παχέος μεσοκυψελιδικού διαστήματος εκφράζουν και τη συγκέντρωση του μικτού πληθυσμού κυττάρων φλεγμονής που συσσωρεύονται στο διάμεσο ιστό της πνευμονικής κυψελίδας. Οι μετρήσεις μας αποδεικνύουν ότι η συσσώρευση

αυτή μειώνεται στην ομάδα χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα χωρίς SP-A. Μπορούμε να υποθέσουμε λοιπόν με ασφάλεια, λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι η μετανάστευση των ουδετερόφιλων στον πνεύμονα επάγεται από τη παρουσία της SP-A, ότι η έλλειψή της οδηγεί σε αναστολή της συσσώρευσης των κυττάρων της φλεγμονής και ελάττωση του διάμεσου οιδήματος.

Παράλληλα αναδείξαμε σαφή αύξηση της ενεργότητας της ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης (EPO) στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα με παράλληλη μείωση της ενεργότητάς της στο περιφερικό αίμα στην ομάδα A (ομάδα μη χορήγησης surfactant), γεγονός που εκφράζει μετακίνηση ηωσινοφίλων στη κυψελίδα. Στην ομάδα B (χορήγησης surfactant) αυτή η αναστροφή αναστέλλεται γεγονός που εκφράζει αναστολή της μετακίνησης των ηωσινοφίλων¹⁸⁰. Φαίνεται ότι η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα χωρίς SP-A καταστέλλει τη μετακίνηση των ηωσινοφίλων στην κυψελίδα.

Πολύ πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το NO λειτουργεί ως φυσιολογικό υπόστρωμα των υπεροξειδασών στα θηλαστικά. Έχει δείχθει ότι η ηωσινοφιλική υπεροξειδάση λειτουργεί ως καταλυτική δεξαμενή για το NO, επηρεάζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και τη λειτουργία του. Αυξημένα ποσά EPO φαίνεται ότι καταστέλλουν την NO εξαρτώμενη βρογχοδιαστολή, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του¹⁸¹.

Οι παρατηρήσεις μας μπορεί να υποθέσουν το παρακάτω παθοφυσιολογικό μονοπάτι: η παρουσία μειωμένων ποσών SP-A στην κυψελίδα οδηγεί σε μείωση της μετανάστευσης των κυττάρων φλεγμονής στο μόσχευμα, με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της ηωσινοφιλικής υπεροξειδάσης, η οποία οδηγεί σε αύξηση των τιμών του νιτρικού οξειδίου στο επίπεδο του μοσχεύματος με αποτέλεσμα τη διατήρηση της NO εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής και τη διατήρηση φυσιολογικών πνευμονικών αντιστάσεων.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε υποστηρίζουν ότι η προχορήγηση του εξωγενή επιφανειοδραστικού βελτιώνει τις ιδιότητες του πνευμονικού μοσχεύματος με δύο τρόπους:

1. διατηρεί το δείκτη των πνευμονικών αντιστάσεων φυσιολογικό, τουλάχιστον στον άμεσο μετεγχειρητικό χρόνο.

2. και σταθεροποιεί την κυψελίδα διατηρώντας τις αναπνευστικές παραμέτρους.

Το αποτέλεσμα αυτών είναι η μείωση της άμεσης αιμοδυναμικής και αναπνευστικής δυσλειτουργίας.

Ο έλεγχος της βιβλιογραφίας δεν ανέδειξε καμία αναφορά που να συνδέει τη σύνθεση το NO με τις δράσεις του SP-A, κατά την πνευμονική μεταμόσχευση. Οι πιθανοί μηχανισμοί που συζητούνται σε αυτή την εργασία θα μπορούσαν να οδηγήσουν με μείζονες βελτιώσεις στη διατήρηση του πνευμονικού μοσχεύματος. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να διερευνηθεί και να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός και ο πιθανός ρόλος των επιπέδων του SP-A στην σύνθεση του NO και στην EPO ώστε να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα αυτών των δράσεων στην αιμοδυναμική του πνεύμονα κατά τη διάρκεια των πνευμονικών μεταμοσχεύσεων.

Συμπερασματικά, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας και οι δράσεις του SP-A εκτιμήθηκαν και μερικώς ερευνήθηκαν σε αυτή την πειραματική μελέτη. Οι πιθανές ανοσορυθμιστικές δράσεις ανασκοπήθηκαν με σκοπό να διερευνηθούν οι υποκείμενες διαταραχές και βλάβες που συμβαίνουν κατά τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις. Προς το παρόν είναι αδιευκρίνιστο, εάν τα δεδομένα μας θα μπορούσαν να συστήσουν τη χρήση επιφανειοδραστικού παράγοντα χωρίς SP-A ως ανοσοκατασταλτικό χειρισμό στις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις. Περαιτέρω έρευνα αυτού του πολυπαραγοντικού μηχανισμού χρειάζεται να γίνει. Επιπλέον αναδείχθηκε η σχέση της αναγκαιότητας διατήρησης του επιφανειοδραστικού μηχανισμού με άμεσα κλινικά δεδομένα του ασθενούς, όπως είναι η αιμοδυναμική του πνεύμονα αλλά και η αναπνευστική του μηχανική.

Είναι δυνατόν να υποθέσουμε ότι η χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα εξωγενώς στις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις, πριν από τη λήψη του μοσχεύματος, ιδιαίτερα όταν οι κλινικές συνθήκες του επιλεγμένου δότη μοσχεύματος το απαιτούν, θα μπορούσε να είναι ακρογωνιαίος λίθος στη βελτίωση της λειτουργικότητας και αποτελεσματικότητας τέτοιων μοσχευμάτων, τουλάχιστον άμεσα μετεγχειρητικά. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει οριακά μοσχεύματα σε επιτυχημένη μεταμόσχευση στην κλινική πράξη. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά

ενισχύουν την άποψη ότι η χρήση του επιφανειοδραστικού παράγοντα δευτερογενώς, μετά από μια πνευμονική μεταμόσχευση, θα μπορούσε να βοηθήσει ασθενείς με σοβαρές αναπνευστικές δυσλειτουργίες κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

A. Γενική αναισθησία- παρακολούθηση

1. Διασωλήνωση, μηχανικός αερισμός MV 12-15 ml/Kg.
2. Τραχειοστομία και τοποθέτηση 7 mm τραχειοσωλήνα.
3. Αποκάλυψη κοινής μηριαίας αρτηρίας και φλέβας δεξιά.
4. Τοποθέτηση θερμόμετρου ορθού.
5. Τοποθέτηση ΚΦΓ, πνευμονικού αρτηριακού καθετήρα και αρτηριακής γραμμής.
6. Λήψη αίματος για εργαστηριακό έλεγχο.
7. Βρογχοσκόπηση.
8. Αιμοδυναμική Παρακολούθηση, Μετρήσεις: HR, SVR, PVR, MAP, CVP, MPAP, PCWP, SVO₂, CI, θερμοκρασίας.
9. Αναπνευστική Παρακολούθηση, Μετρήσεις: Peak Airway P, Compliance, RVC.
10. Αέρια αίματος.

Οι παραπάνω μετρήσεις έγιναν στις εξής χρονικές στιγμές:

1. Βασική μέτρηση.
2. Μετά τη χορήγηση του surfactant.
3. Μετά τον αποκλεισμό των αγγείων και του βρόγχου.
4. 1^η ώρα, 2^η ώρα, 3^η ώρα κατά τη φάση ισχαιμίας του μοσχεύματος.
5. Αμέσως μετά την επαναιμάτωση, 1^η , 2^η , 3^η ώρα μετά την επαναιμάτωση.

Αμέσως μετά τη διασωλήνωση και τη λήψη βασικών μετρήσεων ακολούθησε βρογχοσκόπηση, έγχυση surfactant και καλή έκπτυξη πνεύμονα για διάστημα 30min. (θέση δεξιάς θωρακοτομής).

Φάρμακα: cefuroxime 750 mg IV, surfactant (1.5ml/kg) δια του βρογχοσκοπίου στον άνω και κάτω λοβαίο βρόγχο.

B. Χειρουργικό πρωτόκολλο

1. Αρ. Θωρακοτομή.
2. Προσεκτική κινητοποίηση πνεύμονα.
3. Παρασκευή πνευμονικής αρτηρίας (ΠΑ), tape.
4. Παρασκευή αριστερού στελεχιαίου βρόγχου, πλήρης απαγγείωση της βρογχικής κυκλοφορίας, tape.
5. Ηπαρινισμός 300 IU/Kg.
6. Διάνοιξη περικαρδίου, παρασκευή συμβολής πνευμονικών φλεβών.
7. Τοποθέτηση purstring στην ΠΑ και καθετήρα 16-18G.
8. Τοποθέτηση side binding clamp στον αρ. κόλπο, χωρίς διαταραχή πιέσεων και μιτροειδικής ροής.
9. Αποκλεισμός ΠΑ.
10. Χορήγηση διαλύματος EuroColins 4 βαθμών, από την πνευμονική 50-60 ml/Kg.
11. Διάνοιξη vent στην κάτω πνευμονική φλέβα
12. Αποκλεισμός βρόγχου σε πλήρη έκπτυξη πνεύμονα.
13. Τοποθέτηση μοσχεύματος σε θερμομονωτικό σάκο με πάγο.
14. Έκπλυση του αριστερού υπεζωκοτικού χώρου με ορό θερμοκρασίας 38,9 °C.
15. Στη φάση της ισχαιμίας του μοσχεύματος αν η θερμοκρασία ορθού του ζώου κατέβει κάτω από τους 37° C, το ζώο θερμαίνεται με κουβέρτα και γίνεται ενδοφλέβια χορήγηση θερμών κρυσταλλοειδών διαλυμάτων.
16. Διάρκεια Ισχαιμίας 3 ώρες.
17. Πριν από την επαναιμάτωση (αυτομεταμόσχευση), εκτελέστηκαν τα εξής:
 - A. Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (Bronchoalveolar lavage, BAL)
 - B. Σφηνοειδής βιοψία πνεύμονα (Wedge Biopsy) με συρραπτικό από τη γλωσσίδα.
18. Συρραφή πνευμονικής αρτηρίας και vent αριστερού κόλπου.
19. Αφαίρεση λαβίδων αποκλεισμού και επαναιμάτωση με σταδιακή έκπτυξη του πνεύμονα.

20. Διάρκεια επαναιμάτωσης πνεύμονα 3 ώρες.
21. Πριν από τη θανάτωση του ζώου εκτελέστηκαν τα εξής:
- A. BAL
 - B. Wedge βιοψία με συρραπτικά από τον οπίσθιο του κάτω.
22. Αφαίρεση πνεύμονα σε πλήρη έκπτυξη με μακρύ κολόβωμα βρόγχου,
23. Θανάτωση, τέλος πειράματος.

Σημείωση: Τα παραπάνω έγιναν και στην ομάδα ελέγχου, με τη μόνη διαφορά ότι δεν χορηγήθηκε εξωγενής surfactant ενδοβρογχικά.

Η μεταμόσχευση πνεύμονα είναι μια αποδεκτή θεραπευτική λύση για τους ασθενείς με πνευμονική νόσο τελικού σταδίου. Η πρώιμη δυσλειτουργία του μοσχεύματος παραμένει μία από της κύριες αιτίες πρώιμης θνητότητας και νοσηρότητας. Το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης είναι ο υπεύθυνος κύριος παθογενετικός μηχανισμός. Η ακριβής αιτιοπαθολογία του συνδρόμου ισχαιμίας – επαναιμάτωσης δεν έχει πλήρως ερευνηθεί. Η πειραματικές μεταμοσχεύσεις ως τώρα δεν μπόρεσαν να απομονώσουν την κλινική εικόνα της βλάβης ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, όπως είναι η υποξία, η σοβαρή βλάβη της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και το γενικευμένο κυψελιδικό οίδημα. Η ερευνητική μας ομάδα όπως και πολλές άλλες διεθνώς, χρησιμοποίησε ως τώρα το μοντέλο μεταμόσχευσης ενός πνεύμονα από το ένα ζώο σε άλλο.

Ο πρώτος στόχος μας ήταν να δημιουργήσουμε ένα σταθερό και επαναλήψιμο πειραματικό πρωτόκολλο που θα μπορούσε να αναπαράγει τις τοπικές και συστηματικές εκδηλώσεις του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης χωρίς όμως τη συμμετοχή της παθολογίας της απόρριψης, διατηρώντας παράλληλα τους λιγότερους χειρουργικούς χειρισμούς στο μόσχευμα. Είναι γνωστό ότι κατά τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις σε πειραματικά μοντέλα εμφανίζονται αλλαγές στη σύνθεση και λειτουργικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα και επιπλέον εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος στην κυψελίδα με αποτέλεσμα την επιπρόσθετη επιβάρυνση της λειτουργίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Οι αλλαγές στον επιφανειοδραστικό παράγοντα κατά τις πνευμονικές μεταμοσχεύσεις έχει προταθεί ότι συμμετέχουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία των βλαβών που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι διαδικασίες που θα μπορούσαν να σταθεροποιήσουν το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα θα οδηγούσαν πιθανότερα σε βελτίωση της λειτουργίας του μοσχεύματος. Έχει αποδειχτεί ότι ο εξωγενώς χορηγούμενος επιφανειοδραστικός παράγοντας μιμείται τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του ενδογενούς.

Ο δεύτερος στόχος της μελέτης μας ήταν να εξετάσουμε αν η εξωγενής χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα θα βελτίωνε τις ιδιότητες

του μοσχεύματος αλλά και ποια επίδραση θα είχε η μη χορήγηση ενός ανοσοδιεγερτικού παράγοντα του επιφανειοδραστικού παράγοντα όπως είναι το SP-A επί του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης.

Χρησιμοποιήσαμε 14 νεαρούς χοίρους μέσου βάρους $27(\pm 3,5)$ Kg εφαρμόζοντας ένα μοντέλο αυτομεταμόσχευσης πνεύμονα *in situ*. Ο πνεύμονας παρασκευάστηκε και εκπλύθηκε μέσω της πνευμονικής αρτηρίας ορθόδρομα χρησιμοποιώντας διάλυμα U Wisconsin. Οι πνευμονικές φλέβες αποκλείστηκαν μετά τη συμβολή τους επί του αριστερού κόλπου και το υγρό συντήρησης παροχετεύτηκε από αντιστόμιο στον αριστερό κόλπο. Το μόσχευμα παρέμεινε σε θερμοκρασία $4-8^{\circ}\text{C}$ για διάστημα 3 ωρών, διατηρώντας την κεντρική θερμοκρασία ανάμεσα 37 και $38,5^{\circ}\text{C}$. Ακολούθησε επαναιμάτωση του μοσχεύματος. Στην ομάδα ελέγχου (B) χορηγήθηκε ελεύθερος SP-A επιφανειοδραστικός παράγοντας $1,5\text{ ml/Kg}$ μέσω βρογχοσκοπίου, πριν τη θωρακοτομή. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν 3 ώρες μετά την επαναιμάτωση.

Μετά από 3 ώρες από την επαναιμάτωση, (ομάδα A vs. B) η PVRI ήταν $447,80\text{ dyne}\cdot\text{sec}^{-1}\text{cm}^{-5}\text{m}^{-2}$ ($\pm 66,8$) vs. $249,51(p<0,001)$ ενώ το NO(* $p<0,05$,** $p<0,001$), η EPO και η πνευμονική ευενδοτότητα (** $p<0,002$) διατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά. Η μέση κυψελιδική επιφάνεια ήταν $5280,84$ ($4991,1$) μm^2 vs. $3997,89$ ($3284,70$) $\mu\text{m}^2(p<0,005)$. Η ιστολογική μελέτη έδειξε μικρότερη διήθηση μικροφάγων και λεμφοκυττάρων στην ομάδα χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα στο τέλος της επαναιμάτωσης.

Συμπεράσματα

Το νέο αυτό μοντέλο ετερόπλευρης μεταμόσχευσης πνεύμονα αποδείχθηκε αξιόπιστο και αναπαρήγαγε όλη την παθολογία του συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης, χωρίς την επίδραση των μηχανισμών απόρριψης. Επιπλέον αποδείχτηκε ότι η προθεραπεία του μοσχεύματος με εξωγενή επιφανειοδραστικό παράγοντα μειώνει τη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης διατηρώντας όχι μόνο την πνευμονική ευενδοτότητα αλλά και το δείκτη πνευμονικών αντιστάσεων. Επιπλέον οι συγκεντρώσεις του NO και η

δραστηριότητα του EPO διατηρήθηκαν καλύτερα, ενώ και η μορφολογία της κυψελίδας φαίνεται να διατηρείται σημαντικά καλύτερα.

**PRETREATMENT OF DONOR
LUNG WITH SURFACTANT:
AN EXPERIMENTAL STUDY
IN A NEWLY DEVELOPED
AUTOTRANSPLANTATION
PIG MODEL**

by

Efstratios N Koletsis

A thesis submitted in partial fulfillment of
the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

University of Patras

April 2003

Approved by _____ Professor John Androulakis
Chairperson of Supervisory Committee

_____ Professor Dimitrios Dougenis

_____ Professor Dionisios Bonikos

_____ Associate Professor Evangelos Marinos

_____ Associate Professor Kostas Spiropoulos

_____ Assistant Professor Maria Melachrinou

_____ Assistant Professor Evagelia Papadimitriou

Program Authorized
to Offer Degree _____

Summary

Objectives:

Lung transplantation is a well accepted treatment for patients with end stage pulmonary disease. Early graft dysfunction remains one of the major causes of early morbidity and mortality, with reperfusion injury (RI) being the most responsible mechanism. The exact pathophysiology of RI in lung transplantation has not been fully evaluated and understood. Experimental transplantation after cold storage has been so far unable to duplicate the complete clinical picture of RI, such as, hypoxia, severe impairment of endothelial permeability, and frank alveolar oedema. We, among others, in our previous experimental work with pigs, had been using a single lung transplantation model. Our first aim has been to create a steady and reproducible experimental protocol that could demonstrate several parameters associated with the mechanisms of reperfusion injury, including impaired gas exchange, elevated pulmonary vascular resistant, local and systemic aspects of the reperfusion syndrome, but without the interference of the pathology concerning acute graft rejection, and with the minimal possible surgical manipulation of the graft.

Animal studies have shown that lung transplantation is followed by changes to both synthesis and activity of surfactant. Surfactant alterations have been suggested to contribute significantly to the pathophysiology of transplantation-associated lung injuries. Therefore, procedures that stabilize the pulmonary surfactant system may prove to be crucial for optimal lung preservation. It has been demonstrated that exogenous surfactant mimics the surface-tension-lowering properties of natural lung surfactant. The second purpose of our study was to evaluate whether differences exist in lung preservation after pre-treatment (prior to graft retrieval) of donor lung with surfactant. We postulated that surfactant would lead to an enhanced preservation of the organ. Therefore, we used Surfactant, Beractant which is a natural bovine lung extract containing phospholipids, neutral lipids, fatty acids, and surfactant-associated proteins SP-B and SP-C to which colfosceril palmitate, palmitic acid, and tripalmiting are added in order to standardise the suspension. It should be noted that it does not contain SP-A. Furthermore, we assessed the effect of surfactant pretreatment to lung haemodynamics, respiratory parameters, serum

and BALF nitric oxide and EPO levels and the microscopic morphology of the alveolar.

Methods:

Fourteen young female white pigs, mean weight 27($\pm$ 3.5) Kg were used in a newly developed autotransplantation model with in-situ cold ischemia. The hilum was dissected free and the pericardium opened. University of Wisconsin solution was used for lung preservation flushed in an antegrade fashion through the left pulmonary artery. Pulmonary veins were clamped proximal to their origin at the left atrium and vent was created just distally to the clamp. The left main bronchus was clamped with the lung left semi-inflated. Interlobar fissure tissue temperature was monitored and maintained at 4-8 °C, while core temperature was kept between 37 and 38.5 °C. After 3 hours of cold ischaemia clamps were removed and the lung was reperfused. In the study group (B, n=6) free-SP-A surfactant 1.5 ml/Kg, was administrated into the left main bronchus via flexible bronchoscopy, prior to thoracotomy. Animals were sacrificed after 3 hours of graft reperfusion.

Results:

At the end of reperfusion, (Control vs. study group) PVRI was 447.80 dyn.sec⁻¹cm⁻⁵m⁻² ($\pm$ 66.8) vs. 249.51(p<.001) and lung compliance was 14.83 ml/cm H₂O (SD 1.78) vs. 18.91 (SD 0.73) (**p<0.002) were adequately preserved. Serum eosinophil peroxidase (EPO) activity persentence change was 18.6 $\pm$ 5.6 vs. 116 $\pm$ 52 p=0.001. In contrast, EPO activity in BALF was 180 $\pm$ 21 vs 73 $\pm$ 8, p=0.01. Finally, NO concentration in BALF was 0.75 μ M = $\pm$ 0. 06 vs. 0.91 $\pm$ 0.15 p< 0,05 and serum NO were adequately preserved (*p<0.05,**p<0.001). The mean alveoli surface area estimated by computerized morphometry were 5280.84 (4991.1) μ m² vs. 3997,89 (3284.70) μ m²(p<0.005). Histology revealed less macrophage and lymphocyte accumulation in the study group at the end of reperfusion.

Conclusions:

This new model of unilateral lung auto transplantation with a cold storage of the graft, proved to be very reliable in reproducing all aspects of

ischemia/reperfusion injury, and we, therefore, propose its use in experimental studies dealing with this yet to be fully clarified clinical entity.

Moreover it has demonstrated that pre-treatment of the donor lung with a surfactant agent reduced the ischemia and reperfusion injury by means of maintaining lung compliance and resulting in less respiratory and haemodynamic disturbances. Also, alveoli surface area, alveoli morphology, EPO and NO concentration were better preserved. These data supports the hypothesis that donor lung pretreatment with surfuctant has a beneficial effect on graft properties.

Further studies are required before discussing potential benefits in clinical practice.

Key-words:

lung transplantation, surfactant, static compliance, nitric oxide, SP-A, experimental reperfusion injury.

INDEX

3

3'5 μονοφωσφορικής αδενοσίνης, 11

A

AaDO₂, 56
accelerated rejection, 83
acute rejection, 83
acute respiratory distress syndrome, 15
allotransplantation, 83
alveolar sacs, 4
alveoli, 3
ARDS, 34
autotransplantation, 84

B

BALF, 30, 36, 45, 48, 57, 59, 72, 87
Belzer, 30
Beractant, 46, 47
beta-adrenergic stimulation, 20
BSA, 56

C

CI, 56, 63, 99
Clara cells, 18
compliance, 13, 39, 57, 66, 90
convertase, 21
Cstat, 57, 66
CVP, 56, 63, 99

D

dipalmitoylphosphatidylcholine, 15
DPPC, 15, 23, 29, 32, 88

E

ELISA, 60
eosinophil peroxidase, 70, 72
EPO, 59, 70, 72, 95, 96, 104, 105
Eurocollins, 29, 30, 31, 32

F

FiO₂, 30, 48

H

heavy subtype, 20
hyperacute rejection, 83

K

Karnovsky, 58

L

LA, 53
Laplace, 6, 13, 91
light subtype, 20

M

Mann-Whitney U test, 61
MAP, 56, 63, 99
MPAP, 56, 99
multipurpose ocular test grid, 58

O

One way ANOVA, 61

P

Pco₂, 49
Peak Airway P, 99
PEEP, 27, 28, 57
Perfadex, 30, 34
phosphatidylcholine, 15
pores of Kohn, 4
Ppp, 57
primary graft failure, 81
purstring, 100
PV, 51, 53
PVRI, 56, 63, 104

R

re-implantation response, 89
RVC, 99

S

saline-air interface, 16
SP-A, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 25, 30, 32, 36, 38, 40, 45, 47, 93, 94, 95, 96, 104
SP-A *-/-* mice, 17
SP-A υποδοχείς, 17
SP-B, 15, 16, 18, 21, 47
SP-C, 15, 16, 18, 47
SP-D, 15, 16, 17, 18, 93
standard deviation,, 61
static compliance, 90
steady state, 63, 88
surface area, 3, 74, 78, 90, 117
surfactant, 15, 25, 47, 70, 72, 90, 91, 95, 99, 100, 101, 117
SVO₂, 56, 99
Swan - Ganz, 49

T

thin interalveolar septum, 75

U

unilamellar vesicles, 20

V

vent, 51, 52, 53, 100

Via Span, 51

Volume-controlled, 47

W

wedge, 56

A

αεροθυλάκια, 4

ανοσοσφαιρινών, 22

ανταλλαγή οξυγόνου, 8

αντιδραστήριο Griess, 59

απόρριψης, 46, 82, 83, 84, 85, 103, 104

ατελεκτασία, 5, 88

B

βαρύς υπότυπος, 19, 33

βασική μεμβράνη, 4, 76, 77

βιοψία, 100, 101

βρογχιόλιο, 3

βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, 30, 46, 59, 69, 70, 73, 92, 93, 95

βρογχοσκόπηση, 48, 99

Γ

γλυκοζυλιωμένα αντιγόνα, 17

γλυκοπρωτεΐνες, 17

Δ

διαχωριστική επιφάνεια, 5, 6, 7, 22, 23, 88

E

εγκεφαλικό θάνατο, 26

ελαστικότητα, 8, 32

ελαφρύς υπότυπος, 20

εξαγγείωση, 14, 27, 92, 103

επαναιμάτωση, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 52, 57, 66, 70, 71, 72, 74, 75, 77, 82, 83, 84, 87, 89, 99, 100, 104

επιφανειακή τάση, 5, 6, 8, 12, 13, 21, 36, 88, 89, 90, 91

H

ηπαρινισμός, 50

Θ

θερμής ισχαιμίας, 29, 32, 35, 84, 87

I

ινωδογόνο, 25

K

κορτιζόνη, 20

κυτοκινών, 22, 93

κυψελιδικά μακροφάγα, 4, 20, 93

κυψελιδικό οίδημα, 26, 45, 103

Λ

λεπτού μεσοκυψελιδικού διαστήματος, 74, 75

λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, 23

M

μακροφάγα, 16, 21, 88, 93, 94

μηχανική πνεύμονα, 66

μηχανικό αερισμό, 27, 35, 39, 50, 52

μονοστοιβάδα, 10, 15, 16, 19, 23, 88

Μορφομετρία πνεύμονα, 74

N

νεογνά, 14

νευρογενές πνευμονικό οίδημα, 26

νευρομεταβίβαση, 92

NO, 68, 69, 91, 92, 93, 94, 95, 96

O

οξεία πνευμονική βλάβη, 23, 89

οξείας απόρριψης, 82

ορθόδρομη έκπλυση, 89

ουδετερόφιλα, 92, 94

Π

παθογόνα, 17, 18

παχύ μεσοκυψελιδικό διάστημα, 74, 78, 94

πεπτικό βλεννογόνο, 18

πνευμονικά τριχοειδή, 3

πνευμονική αρτηρία, 28, 50, 51, 53, 87

πνευμονικής ευενδοτότητας, 13

πνευμονοκύτταρα τύπου II, 4, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 29, 45, 88, 94

πνευμονοκυττάρων τύπου I, 4

πυκνά σωμάτια, 19

Σ

συνδρόμου ισχαιμίας - επαναιμάτωσης, 45, 46

σφιγγομυελίνης, 33, 89

σωληνώδη μυελίνη, 16, 19

T

τραχειοστομία, 47

Υ

υπολογιστική μορφομετρία, 74

Φ

φαγοκυττάρωση, 18, 21, 93

φωσφατιδυλογλυκερόλης, 23

φωσφατιδυλοχολίνης, 11, 89

X
χημειοταξία, 18

Ψ
ψυχρής ισχυμίας, 29, 31, 35, 39

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹ Alan Stevens, James Lowe. Human Histology Second Edition Mosby, Spain, p 159-176,1997
 - ² Donald E. Ingber Scientific American: Feature Article: The Architecture of Life: January 1998.
 - ³ Ida, M.P. and Miksis, M.J. "The dynamics of thin films I: general theory," *SIAM J. Appl. Math.* 1998;58, 2: 456-478
 - ⁴ Ruckenstein, E. and Li, B. "Surface Equation of State for Insoluble Surfactant Monolayers at the Air/Water Interface," *J. Phys. Chem. B* 1998;102: 981-989
 - ⁵ Krueger, M.A. and Gaver, D.P. III "A Theoretical Model of Pulmonary Surfactant Multilayer Collapse under Oscillating Area Conditions," *J. Coll. Int. Sci.* 2000;229, 353-364
 - ⁶ Bergström, M., and Eriksson, J.C. "A Theoretical Analysis of Synergistic Effects in Mixed Surfactant Systems," *Langmuir* 2000;16: 7173-7181
 - ⁷ Gill et Al. 'Alveolar volume surface area relation in air and saline-filled lungs, fixed by vascular perfusion'. *J. of Appl. Physiol.* 1979;47:990-1001
 - ⁸ Diamant, H., Witten, T.A., Ege, C., Copal A, Lee KY. Topography and instability of monolayers near domain boundaries, *Phys. Rev. E* 2001;63, (6 Pt 1) 061602
 - ⁹ Pulmonary surfactants. Special issue in honor of Professor John A. Clements. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):77-361.
 - ¹⁰ Chen, P., and Neumann, A.W. "Derivation of a general kinetic equation for transfer-controlled adsorption at liquid interfaces using Statistical Rate Theory," *Coll. Surf. A* 1998;143: 331-338
 - ¹¹ Diamant, H., Witten, T.A., Gopal, A., and Lee, K.Y.C. "Unstable topography of biphasic surfactant monolayers," *Europhys. Lett.* 2000;52, 2: 171-177 ()
 - ¹² Jiang, Q., Valentine, J.E., and Chiew, Y.C. "Theoretical Models for Dynamic Dilational Surface Properties of Binary Surfactant Mixtures," *J. Coll. Int. Sci.* 1995;174: 268-271

-
- ¹³ Fainerman, V.B., Miller, R., and Wüstneck, R. "Adsorption Isotherm and Surface Tension Equation for a Surfactant with Changing Partial Molar Area. 2. Nonideal Surface Layer," *J. Phys. Chem. B* 1997;101:6479-6483
- ¹⁴ Chander A; Fisher. 'Regulation of lung surfactant secretion'. *Am. J. Physiol.* 1990;258 L:241-253
- ¹⁵ Schurch S, Green FH, Bachofen H Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):180-202.
- ¹⁶ King, R. J. Pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1982;53:1-8
- ¹⁷ Robertson B, Berry D, Curstedt T, et al: leakage of protein in immature rabbit lung: effect of surfactant replacement. *Respir Physiol* 1985;61:265-276
- ¹⁸ Jobe A, Ikegami M, Jacobs H, et al: Permeability of premature lamp lung to protein and effect of surfactant on permeability. *J Appl Physiol* 1983;55:169-176
- ¹⁹ Johansson, J., T. Curstedt, B. Robertson. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994;7:372-91
- ²⁰ Creuwels, L. A. J. M., L. M. G. Van Golde, and H. P. Haagsman. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997;175:1-39
- ²¹ Mason RJ, Voelker DR Regulatory mechanisms of surfactant secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):226-40
- ²² Weaver TE Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):173-9
- ²³ Ikegami M, Jobe AH. Surfactant protein metabolism in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):218-25.
- ²⁴ Hawgood S, Derrick M, Poulain F Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):150-60.
- ²⁵ Johansson J. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):161-72.
- ²⁶ Tino MJ, Wright JR. Interactions of surfactant protein A with epithelial cells and phagocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):241-63.

-
- ²⁷ Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):334-45
- ²⁸ Haagsman, H. P. Surfactant proteins A and D. *Biochem Soc Trans* 1994;22:100-6
- ²⁹ Korfhagen TR, LeVine AM, Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):296-302.
- ³⁰ Haagsman HP. Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):264-77.
- ³¹ Reid KB. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):290-5
- ³² Hartshorn K.L. et Al. 'Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria.' *Am. J. Physiol*. 1998;274 L:958-969
- ³³ Magoon, M. W., J. R. Wright, A. Baritussio, M. C. Williams, J. Goerke, B.J. Benson, R. L. Hamilton, and J. A. Clements. Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 1983;750:18-31.
- ³⁴ Haagsman, H. P., and L. M. G. van Golde. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol* 1991;53:441-64
- ³⁵ Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., M. van Eijk, B. L. van Buel, L. M. G. vanGolde, and H. P. Haagsman. Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. *Biochem J* 1991;274:115-9.
- ³⁶ Rooney, S. A., L. I. Gobran, T. M. Umstead, and D. S. Phelps. Secretion of surfactant protein A from rat type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1993;265:L586-90
- ³⁷ Auten, R. L., R. H. Watkins, D. L. Shapiro, and S. Horowitz. Surfactant apoprotein A (SP-A) is synthesized in airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:491-6
- ³⁸ McCormack FX. Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):109-31
- ³⁹ Suzuki, Y., Y. Fujita, and K. Kogishi. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:75-81.

-
- ⁴⁰ Putman, E., L. A. J. M. Creuwels, L. M. G. Van Golde, and H. P. Haagsman. Surface properties, morphology and protein composition of pulmonary surfactant subtypes. *Biochem J* 1996;320:599-605.
- ⁴¹ Wright, J. R., and L. G. Dobbs. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol* 1991;53:395-414.
- ⁴² Whitsett JA, Glasser SW. Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):303-11.
- ⁴³ Mendelson CR, Gao E, Li J, Young PP, Michael LF, Alcorn JL . Regulation of expression of surfactant protein-A. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):132-49
- ⁴⁴ Floros J, Hoover RR. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):312-22.
- ⁴⁵ Crouch EC. Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochim Biophys Acta*. 1998;Nov 19;1408(2-3):278-89.
- ⁴⁶ Gross, N. J., and R. M. Schultz. Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine pro-tease. *Am J Physiol* 1992;262:L446-53.
- ⁴⁷ Veldhuizen, R. A. W., K. Inchley, S. A. Hearn, J. F. Lewis, and F. Possmayer. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 1993;295:141-7
- ⁴⁸ Ida, M.P. and Miksis, M.J. "The dynamics of thin films II: applications," *SIAM J. Appl. Math.* 1998;58,2: 474-500
- ⁴⁹ Ferri, J.K. and Stebe, K.J. "Which surfactants reduce surface tension faster? A scaling argument for diffusion-controlled adsorption," *Adv. Coll. Int. Sci.* 2000;85: 61-97
- ⁵⁰ Perez-Gil J, Keough KM. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998;Nov 19;1408(2-3):203-17.
- ⁵¹ Müller B. and von Wichert P. (Editors) 'Lung Surfactant: Basic Research in the Pathogenesis of Lung Disorders' *Prog. Resp. Res.* 27:69-73 (1994) Basel Karger
- ⁵² Mason R. Green K. Voelker D. 'Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease'. *Am. J. Physiol.* 1998;275 L:1-11

-
- ⁵³ Lewis, J. F., and A. H. Jobe. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:218-33.
- ⁵⁴ Holm, B. A., G. Enhorning, and R. H. Notter. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids* 1988;49:49-55
- ⁵⁵ Chung, J., S. H. Yu, J. A. Whitsett, P. G. Harding, and F. Possmayer. Effect of surfactant-associated protein-A (SP-A) on the activity of lipid extract surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1989;1002:348-58.
- ⁵⁶ Schürch, S., F. Possmayer, S. Cheng, and A. M. Cockshutt. Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am J Physiol* 1992;263:L210-8.
- ⁵⁷ Cockshutt, A. M., J. Weitz, and F. Possmayer. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry* 1990;29:8424-9.
- ⁵⁸ Strayer, D. S., E. Herting, B. Sun, and B. Robertson. Antibody to surfactant protein A increases sensitivity of pulmonary surfactant to inactivation by fibrinogen in vivo. *Amer J Respir Crit Care Med* 1996;153:1116-22.
- ⁵⁹ Yukitake, K., C. L. Brown, M. A. Schlueter, J. A. Clements, and S. Hawgood. Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vivo. *Pediatr Res* 1995;37:21-5.
- ⁶⁰ Malik, A. B.. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res* 1985;57:1-18.
- ⁶¹ Beckman, D. L. Sympathetic influence on lung compliance and surface forces in head injury. *J Appl Physiol* 1971;30:394-9.
- ⁶² Soifer BE, Gelb AW. The multiple organ donor: identification and management. *Ann Intern Med* 1989;110:814-823
- ⁶³ Muhlberg J, Wagner W, Rohling R, Link J, Neumayer HH. Hemodynamic and metabolic problems in the preparation for organ donation. *Transplant Proc* 1986;18:391-393
- ⁶⁴ Randell T, Orko R, Hockerstedt K. Perioperative fluid management of brain-death multiorgan donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 1990;34:592-595
- ⁶⁵ Wyszogrodski, I., K. Keye-aboagye, j. Tausch, H. W., and M. E. Avery. Surfactant inactivation by hyperventilation: conservation by end-expiratory pressure. *J Appl Physiol* 1975;38:461-6

-
- ⁶⁶ Thet, L. A., L. Clerch, G. D. Massaro, and D. Massaro.. Changes in sedimentation of surfactant in ventilated excised rat lungs. Physical alterations in surfactant associated with the development and reversal of atelectasis. *J Clin Invest* 1979;64:600-8
- ⁶⁷ Shepard, J. W., Jr., D. Hauer, K. Miyai, and K. M. Moser. Lamellar body depletion in dogs undergoing pulmonary artery occlusion. *J Clin Invest* 1980;66:36-42.
- ⁶⁸ Hildebran, J. N., J. Goerke, and J. A. Clements.. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J Appl Physiol* 1981;51:905-10
- ⁶⁹ Massaro, G. D. and D. Massaro.. Morphologic evidence that large inflations of the lung stimulate secretion of surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:235-6.
- ⁷⁰ Ennema, J. J., D. J. Reijngoud, C. R. Wildevuur, and J. Egberts. Effects of artificial ventilation on surfactant phospholipid metabolism in rabbits. *Respir Physiol* 1984;58:15-28
- ⁷¹ Veldhuizen, R. A. W., J. Marcou, L. J. Yao, L. McCaig, Y. Ito, and J. F. Lewis. Alveolar surfactant aggregate conversion in ventilated normal and injured rabbits. *Amer J Physiol-Lung Cell M Ph* 1996;14:L152-8
- ⁷² Novick, R. J., A. A. Gilpin, K. E. Gehman, I. S. Ali, R. A. W. Veldhuizen, J. Duplan, L. Denning, F. Possmayer, D. Bjarneson, and J. F. Lewis. Mitigation of injury in canine lung grafts by exogenous surfactant therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:342-53.
- ⁷³ Dreyfuss D, Saumon G. Role of tidal volume, FRC, and end-expiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. *Am Rev Respr Dis* 1993; 148:1194-203
- ⁷⁴ Kunc, L., M. Kuncova, R. Holusa, and F. Soldan. Physical properties and biochemistry of lung surfactant following vagotomy. *Respiration* 1978;35:192-7.
- ⁷⁵ Berry, D., M. Ikegami, and A. Jobe. Respiratory distress and surfactant inhibition following vagotomy in rabbits. *J Appl Physiol* 1986;61:1741-8
- ⁷⁶ Puskas, J. D., T. Hirai, N. Christie, E. Mayer, A. S. Slutsky, and G. A. Patterson. Reliable thirty-hour lung preservation by donor lung hyperinflation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:1075-83
- ⁷⁷ Cooper, J. D., and C. E. Vreim. 1992. NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Respir Dis* 146:803-7.

-
- ⁷⁸ Novick, R. J., A. H. Menkis, and F. N. McKenzie. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:377-92.
- ⁷⁹ Steen, S., P. O. Kimblad, T. Sjöberg, L. Lindberg, R. Ingemansson, and G. Massa. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg* 1994;57:450-7.
- ⁸⁰ Hausen, B., R. Ramsamooj, C. W. Hewitt, F. Schroder, M. Beuke, C. F. Poets, and H.-J. Schafers. The importance of static lung inflation during organ storage. *Transplantation* 1996;62:1720-5.
- ⁸¹ Egberts, J., and M. A. Sietaram. Postmortem effects on the yield and composition of alveolar surfactant from rat lungs. *Respiration* 1990;57:254-8
- ⁸² Akashi, A., K. Nakahara, W. Kamiike, A. Matsumura, N. Hatanaka, Y. Kawashima, Y. Yoshida, and K. Tagawa. Attenuation of warm is-chemic injury of rat lung by inflation with room air--assessment of cellular components and the surfactant in the bronchoalveolar lavage fluid in relation to changes in cellular adenosine triphosphate. *Transplantation* 1993;55:24-30.
- ⁸³ Shepard, J. W., Jr., G. F. Dolan, and S. Y. Yu. Factors regulating lamellar body volume density of type II pneumocytes in excised dog lungs. *J Appl Physiol* 1982;53:555-62
- ⁸⁴ Erasmus, M. E., A. H. Petersen, S. Bambang Oetomo, and J. Prop. The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in rat lung transplants. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:791-802.
- ⁸⁵ Veldhuizen, R. A. W., J. Lee, D. Sandler, W. Hull, J. A. Whitsett, J. Lewis, F. Possmayer, and R. J. Novick. Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:208-15.
- ⁸⁶ Klepetko, W., A. Lohninger, W. Wisser, M. R. Mueller, G. Khunl-Brady, A. Windisch, F. Eckersberger, and E. Wolner. Pulmonary surfactant in bronchoalveolar lavage after canine lung transplantation: effect of L-carnitine application. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:1048-58.
- ⁸⁷ Andrade, R. S., E. E. Solien, O. D. Wangenstein, M. Y. Tsai, V. R. Kshetry, and R. M. Bolman III. Surfactant dysfunction in lung preservation. *Transplantation* 1995;60:536-41.

-
- ⁸⁸ Hausen, B., P. Muller, M. Bahra, R. Ramsamooj, and C. W. Hewitt. Donor pretreatment with intravenous prostacyclin versus inhaled nitric oxide in experimental lung transplantation. *Transplantation* 1996;62:1714-9
- ⁸⁹ Semik, M., R. Schnabel, T. Bruske, V. Lange, H. Wottge, K. Morgenroth, and H. Toomes. Ultrastructural studies of acute rejection following single lung transplantation in the rat. Histological and immunological findings. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1994;42:290-7.
- ⁹⁰ Novick, R. J., J. MacDonald, R. A. Veldhuizen, F. Wan, J. Duplan, L. Denning, F. Possmayer, A. A. Gilpin, L. J. Yao, D. Bjarneson, and J. F. Lewis. Evaluation of surfactant treatment strategies after prolonged graft storage in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:98-104
- ⁹¹ Erasmus, M. E., A. H. Petersen, G. J. H. Hofstede, H. P. Haagsman, S. Bambang Oetomo, and J. Prop. Surfactant treatment before reperfusion improves the immediate function of lung transplants in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:665-70
- ⁹² Erasmus, M. E., A. H. Petersen, G. J. H. Hofstede, H. P. Haagsman, S. Bambang Oetomo, and J. Prop. Effects of early surfactant treatment persisting for one week after lung transplantation in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;153:665-70
- ⁹³ Novick, R. J., R. A. W. Veldhuizen, F. Possmayer, J. Lee, A. Hamvas, F. S. Cole, D. E. deMello, M. Moxley, J. A. Whitsett, H. R. Colten, and L. M. Nogee. Exogenous surfactant therapy in thirty-eight hour lung graft preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:259-68.
- ⁹⁴ Ueda, T., M. Ikegami, and A. Jobe. Surfactant subtypes. In vitro conversion, in vivo function, and effects of serum proteins. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1254-9
- ⁹⁵ Meyers B, Patterson A. Lung transplantation: Current status and future prospects. *World J. Surg.* 1999;23:1156-1162
- ⁹⁶ Palazzo R, Hamvas A, Shuman T, Kaiser L, Cooper J, Schuster DP. Injury in nonischemic lung after unilateral pulmonary ischemia with reperfusion. *J Appl Physiol* 1992;72:612-20
- ⁹⁷ Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Laboratories. The University of Virginia Health Sciences Centre. Lung Transplantation – Reperfusion Injury <http://www.ctsnet.org/doc/4992>, Oct-28-2000
- ⁹⁸ King CR, Binns O, Rodriguez F, Kanithanon C, Daniel TM, Spotnitz WD, Tribble CG, Kron IL. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann. Thorac Surg* 2000; 69:1681-5

-
- ⁹⁹ Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:302-14
- ¹⁰⁰ Novick RJ, Menkis AH, McKenzie FN. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11:377-392
- ¹⁰¹ Cooper JD, Patterson GA. Lung transplantation. In: Sabiston DC, Spencer FC editors. *Surgery of the Chest*. Philadelphia: Saunders, 1995:2117-2134
- ¹⁰² Lewis JFR, Novick J, Veldhuizen RAW. *Surfactant in Lung Injury and Lung Transplantation*. New York: Chapman & Hall, 1997.
- ¹⁰³ Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg*, 1996; 62:302–314.
- ¹⁰⁴ Klepetko W, Lohninger A, Wissen W, et al. Pulmonary surfactant in bronchoalveolar lavage after canine lung transplantation: effect of L-carnitine application. *J Thorac. Cardiovasc Surg*, 1990; 99:1048-58.
- ¹⁰⁵ Andrade R, Solien E, Wangenstein OD, et al: Surfactant Dysfunction in Lung Preservation. *Transplantation*, 1995; 60:536-41.
- ¹⁰⁶ Cockshutt A, Weitz J, Possmayer F. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverse inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry*, 1990; 29:8424-29.
- ¹⁰⁷ Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J Biol Chem*, 1988;263:3388-94.
- ¹⁰⁸ Hohlfeld JM, Tiryaki E, Hamm H, Hoymann HG, Krug N, Haverich A, Fabel H. Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998;158:706–712.
- ¹⁰⁹ Erasmus ME, Petersen AH, Oetomo SB, Prop J. The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in rat lung transplants. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:791–802.
- ¹¹⁰ Principles of Laboratory Animal Care, the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Institute of Laboratory Animal Resources (published by the National Institutes of Health: publication 85-23, revised 1985)

-
- ¹¹¹ Merritt TA, Hallman M. Surfactant replacement. A new era with many challenges for neonatal medicine. *Am J Dis Child* 1988;142:1333-1339.
- ¹¹² Archer, R.K.: Hematological techniques for use on animals. Oxford: Blackwell (1965) Green, C.J. *Animal Anesthesia*. 1979.
- ¹¹³ Koletsis E, Chatzimichalis A, Kokkinis K, Papadimitriou E, Melachrinou M, Marinos E, I Bellenis, D Dougenis. Pretreatment of donor lung with surfactant in an autotransplantation pig model: Effect on PVRI, NO, Alveoli and Graft elasticity. 16th Annual Meeting of the EACTS, 2002
- ¹¹⁴ Swindell MM, *Anesthetic and perioperative techniques in swine*. Wilmington, MA: Charles River Laboratories, CRL Tech Bull (winter), 1991
- ¹¹⁵ Filos K, Dougenis D, Tzorakoelefterakis E, et al. The prognostic value of continuous SvO₂ monitoring by fiberoptic oxymetry in single lung transplantation. A pilot study. *Intens Care Med* 18 (suppl):117, 1992.
- ¹¹⁶ *The Anatomy of the Domestic Animals* by Sisson JD and Grossman GR, Elsevier Science Health Science div p 1291-96, 1975
- ¹¹⁷ Sack WO, *Essentials of pig anatomy*. Veterinary Textbooks, Ithaca, New York, p 21-24, 1982
- ¹¹⁸ Hawk CT, Leary SL. *Formulary For Laboratory Animals*, American College of Laboratory Animal Medicine, Iowa State Pr (Sd) p78, 1995
- ¹¹⁹ Report of the ATS workshop on lung transplantation: Lung transplantation. *Am Rev Resp Dis* 1993;147:772-6
- ¹²⁰ RESPIRATORY CARE Standard Abbreviations and Symbols. *Resp Care* , 1997;42:637-42
- ¹²¹ E. Koletsis, A. Chatzimichalis, K. Kokinis, V. Fotopoulos, D. Dougenis, I. Bellenis. In Situ Autotransplantation Model in Pigs. In: Sir M Yacoub, N Marczin editors. *DISEASE MARKERS IN EXHALED BREATH. Basic Mechanisms And Clinical Applications*, NATO Science Series I Life and Behavioural Sciences IOS Press, Amsterdam Vol. 346 p 300-3, 2002.
- ¹²² Kouloukoussa M, Panagopoulou E, Marinos E. The in vitro effect of the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on Sertoli Cell Morphology. *Cancer Detect Prev* 1999; 23:280-289.

-
- ¹²³ Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, et al. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 2000;129: 207-213, 39-78.
- ¹²⁴ Giannopoulou E, Katsoris P, Polytarchou C. & Papadimitriou E. Nitration of cytoskeletal proteins in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002;400: 188-198.
- ¹²⁵ Carvounis CP. Handbook of biostatistics. A review and text. New York: Parthenon Publishing, 2000.
- ¹²⁶ Αλεξ Λαζαριδης, MN Λαζαριού. Εφαρμοσμένη Ιατρική Στατιστική, Αθήνα, 1999
- ¹²⁷ Smith AW, Houpt HA, Kitchell RL, et al. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am. Vet Med Assoc* 1986; 188:252-268.
- ¹²⁸ Breazile JE, Kitchell RL. Euthanasia for laboratory animals. *Fed Proc* 1969;28:1577-1579. *Vet Med Assoc* 1986; 188:252-268.
- ¹²⁹ Grier RL, Clovin TL. Euthanasia guide (for animal shelters). Ames, Iowa: Moss Creek Publications, 1990.
- ¹³⁰ Harringer W, Wiebe K, Struber M, Franke U, Niedermeyer J, Fabel H, Haverich A. Lung transplantation. 10-year experience. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;16:546-554
- ¹³¹ Harringer W, Haverich A. Heart and heart-lung transplantation: standards and improvements. *World J Surg* 2002;26:218-25
- ¹³² Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:805-15
- ¹³³ J D Cooper. Historical perspective of lung transplantation, In: G A Patterson and L Couraud editors. *Lung Transplantation Vol 3* Current topics in General Thoracic Surgery An international series. Netherlands: Elsevier 1995:5-14
- ¹³⁴ Hutchinson IV. Effector mechanisms in transplant rejection – an overview. In: Rose LM, Yacoub M, editors. *Great Britain: Edmunds Arnold, Immunology of heart and lung transplantation.* 1993:3-21
- ¹³⁵ Cyril Serrick, Adel Giaid, Alex Reis, and Hani Shennib Prolonged Ischemia Is Associated With More Pronounced Rejection in the Lung Allograft. *Ann. Thorac. Surg.* 1997; 63: 202-208.

-
- ¹³⁶ Van den Berg JW, Koeter GH, van der Bij W. New immunosuppressive drugs and lung transplantation: last or least? *Thorax* 1999;54:550-3
- ¹³⁷ Hosenpud JD, Bennet LE, Keck BM, Novick RJ. The registry of the international society for heart and lung transplantation: eighteenth official report-2001. *H Heart lung transplant* 2001;20:805-15
- ¹³⁸ Novick RJ, Innovative techniques to enhance lung preservation *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:2-5
- ¹³⁹ Stewart KC, Patterson GA. Current trends in lung transplantation *Am J Transplant* 2001;1:204-10
- ¹⁴⁰ Dougenis D, Tzorakoelefterakis E., Filos KS. Experimental single lung transplantation in pigs. *Intern J Artif Organ* 1992;15:533 sup
- ¹⁴¹ Dougenis D, Tzorakoelefterakis E, Filos K, Goudas L, Melachrinou M, Moschos S, Kyriakopoulou T, Pouloupoulou M, Koletsis E, Androulakis J. Single lung transplantation: An experimental study in pigs. *Acta Chirurgica Hellenica* 1993;65:50-6
- ¹⁴² Mora B, Boasquevisque C, Geoffrey Uy, McCarthy T, Welch M, Boglione M, Patterson A, Exhaled nitric oxide correlates with experimental lung transplant rejection *Ann Thorac Surg* 2000;69:210-215
- ¹⁴³ Tsuyoshi Hasegawa, Aldo T. Iacono, and Samuel A. Yousem The anatomic distribution of acute cellular rejection in the allograft lung *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 1529-1531
- ¹⁴⁴ Takeshi Shiraishi, Takatoshi Mizuta, Steven R. DeMeester, Jon H. Ritter, Paul E. Swanson, Mark R. Wick, Joel D. Cooper, and G. Alexander Patterson. Effect of Ischemic Injury on Subsequent Rat Lung Allograft Rejection *Ann. Thorac. Surg.* 1995; 60: 947-951.
- ¹⁴⁵ Demertzis S, Langer F, Graeter T, Dwenger A, Georg T, Schafers HJ. Amelioration of lung reperfusion injury by L- and E- selectin blockade *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;16:174-180.
- ¹⁴⁶ Haverich A. Preservation for clinical lung transplantation. In: G A Patterson and L Couraud editors. *Lung Transplantation Vol 3 Current topics in General Thoracic Surgery An international series.* Netherlands: Elsevier 1995: p147-155
- ¹⁴⁷ Date H, Lima O, Matsumura A, et al. In canine model, lung preservation at 10 °C is superior to that at 4 °C. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:773-780

-
- ¹⁴⁸ Spragg R, Lewis J. Pathology of the surfactant system of the mature lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:280-282.
- ¹⁴⁹ Notter RH: Lung surfactants: Basic science and clinical applications. In: *Lung Biology in Health and Disease*. Vol 149,p:7-344, 2000
- ¹⁵⁰ Report of the ATS workshop on lung transplantation: Lung transplantation. *Am Rev Resp Dis* 1993;147:772-6.
- ¹⁵¹ Novick RJ, Menkis AH, McKenzie FN. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:377-92.
- ¹⁵² Cooper JV, Vreim CE. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Resp Dis* 1992;146:803-7.
- ¹⁵³ Burkhardt R, Van Golde LMG. Lipids and lipid metabolism in the lung. *Lung Biol Health Dis* 1989;41:591-599.
- ¹⁵⁴ Hallman M, Maasilta P, Sipila I, et al. Composition and faction of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome. *Eur Resp. J* 1989; 2 (suppl 3):104s.
- ¹⁵⁵ Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck S. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982; 70:673-83.
- ¹⁵⁶ Li CG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of the guinea pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide *Br J Pharmacol* 1991;102:91-94.
- ¹⁵⁷ Dinh-Xuan AT. Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. *Eur Respir J* 1992; 51:757-762.
- ¹⁵⁸ Barnes PJ. Nitric oxide and airways *Eur Respir J* 1993; 6:163-165.
- ¹⁵⁹ Tsao PS, Lefer AM. Time course and mechanism of endothelial dysfunction is isolated ischemic and hypoxic perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1990;259:H1660-66.
- ¹⁶⁰ Thuchiya M, Tokai H, Takehara Y et al. Interrelation between oxygen tension and nitric oxide in the respiratory system. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1257–1261.
- ¹⁶¹ Dugas B, Debre P, Moncada S. Nitric oxide, a vital poison inside the immune and inflammatory network. *Res Immunol* 1995; 146:664-670.

-
- ¹⁶² Hancock JT. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *Br J Biomed. Sci* 1997; 54:38-46.
- ¹⁶³ Kubes P, Szuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-5.
- ¹⁶⁴ Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:71-90.
- ¹⁶⁵ Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 1995; 27:359-367.
- ¹⁶⁶ Schroeder RA, Kuo PC. Nitric Oxide: Physiology and Pharmacology *Anesth Analg* 1995;81:1052-1059.
- ¹⁶⁷ Merritt TA, Hallman M. Surfactant replacement. A new era with many challenges for neonatal medicine. *Am J Dis Child* 1988;142:1333-1339.
- ¹⁶⁸ Sano H, Sohma H, Muta T et al. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD 14. *J Immunol* 1999;163:387-395.
- ¹⁶⁹ Kramer B, Jobe A. Surfactant protein A recruits neutrophils into the lungs of ventilated preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:158-165.
- ¹⁷⁰ Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA et al. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:389-397.
- ¹⁷¹ Walmrath D, Günther A, Ardeschir H et al. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:57-62.
- ¹⁷² Koletsis EN, Chatzimichalis A, Fotopoulos V, Kokkinis K, Papadimitriou E, Tiniakos D, Marinos E, Bellenis I and Dougenis D. Donor lung pretreatment with Surfactant in experimental transplantation preserves graft hemodynamics and alveolar morphology. *Exp Biol Med* 2003; 228:540-545.
- ¹⁷³ Anderson DC, Glazer HS, Semenkovich JW, Pilgram TK, Trulock EP, Cooper JD, and Patterson GA. Lung transplant edema: chest radiography after lung transplantation—the first 10 days. *Radiology* 1995; 195:275-281.

-
- ¹⁷⁴ Haydock DA, Trulock EP, Kaiser LR, Knight SR, Pasque MK, and Cooper JD. Management of dysfunction in the transplanted lung: experience with 7 clinical cases. Washington University Lung Transplant Group. *Ann Thorac Surg* 1992; 53:635–641.
- ¹⁷⁵ Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, and Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:980–988.
- ¹⁷⁶ Van Griensven M, Stalp M, and Seekamp A. Ischemia-reperfusion directly increase pulmonary endothelial permeability *in vitro*. *Shock* 1999; 11:259–263.
- ¹⁷⁷ Ochs M, Fehrenbach H, Richter J. Ultrastructure of canine type II pneumocytes during hypothermic ischemia of the lung: a study by means of conventional and energy filtering transmission electron microscopy and stereology. *Anat Rec* 2001;263:118-26
- ¹⁷⁸ Fehrenbach H, Schepelmann D, Albes JM, Bando T, Fischer F, Fehrenbach A, Stolte N, Wahlers T, Richter J. Pulmonary ischemia/reperfusion injury: a quantitative study of structure and function in isolated heart-lungs of the rat. *Anat Rec* 1999;255:84-9
- ¹⁷⁹ Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, and Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997;150:1773–1784
- ¹⁸⁰ van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 2000;1(2):67-72
- ¹⁸¹ Abu-Soud HM, Khassawneh MY, Sohn JT, Murray P, Haxhiu MA, Hazen SL. Peroxidases inhibit nitric oxide (NO) dependent bronchodilation: development of a model describing NO-peroxidase interactions. *Biochemistry* 2001; 40:11866-75.