

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

SCUOLA DI DOTTORATO IN  
SANITÀ E PRODUZIONI ANIMALI: SCIENZA, TECNOLOGIA E  
BIOTECNOLOGIE

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE, IGIENE E SANITÀ  
PUBBLICA VETERINARIA  
SEZIONE DI BIOCHIMICA E FISIOLOGIA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E  
ZOOTECNICHE  
CICLO XXII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**VENTILAZIONE MECCANICA E VOLUTRAUMA: STUDIO *IN VIVO* IN  
UN MODELLO SUINO**

VET/02

Dott.ssa Camilla Valeria PASTORE

TUTOR: Chiar.ma Prof.ssa Mariangela ALBERTINI

COORDINATORE: Chiar.mo Prof. Fulvio GANDOLFI

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

## INDICE

I. ABSTRACT	4
II. INTRODUZIONE	7
1. CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA	9
1.1. METALLOPROTEINASI DI MATRICE	13
1.2. ENDOTELINA-1	17
2. VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO	19
2.1. CENNI DI STORIA	19
2.2. DANNO POLMONARE INDOTTO DALLA VENTILAZIONE MECCANICA (VILI)	20
2.2.1 STUDI SPERIMENTALI SU POLMONI SANI	21
2.2.2 STUDI SPERIMENTALI SU POLMONI DANNEGGIATI	22
2.3. MECCANISMO D'AZIONE DEL VOLUTRAUMA	23
2.3.1. FORMAZIONE DELL'EDEMA POLMONARE	23
2.3.2. INATTIVAZIONE DEL TENSIOATTIVO	27
2.3.3. CAPILLARY STRESS FAILURE	29
2.3.4. IL CIRCOLO VIZIOSO	30
2.3.5. MECCANOTRASDUZIONE	30
2.4. BIOTRAUMA	34
2.4.1. RUOLO DELLE CELLULE INFIAMMATORIE	34
2.4.2. RUOLO DEI MEDIATORI INFIAMMATORI	36
2.4.3. RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI	36
2.4.4. RUOLO DELL'ENDOTELINA	38
2.4.5. DAL BIOTRAUMA ALLA SINDROME DA INSUFFICIENZA MULTIORGANO	39
2.5. STRATEGIE VENTILATORIE	39
2.5.1. UTILIZZO DI BASSI VOLUMI POLMONARI	39
2.5.2. IPERCAPNIA PERMISSIVA	42

2.5.3.	NUOVE FORME DI RIMOZIONE EXTRACORPOREA DI CO <sub>2</sub>	43
3.	DANNO POLMONARE INDOTTO DA IPOSSIA O STRESS IPOSSICO	46
3.1.	VASOCOSTRIZIONE POLMONARE IPOSSICA (HPV)	46
3.2.	DISFUNZIONE ENDOTELIALE	49
3.3.	RUOLO DEI LEUCOCITI	50
3.4.	RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI	51
4.	DANNO POLMONARE INDOTTO DA SHOCK SETTICO O STRESS SETTICO	53
4.1.	INTRODUZIONE	53
4.2.	DEFINIZIONI	54
4.3.	LA SEPSI	56
4.5.	SVILUPPO DELLA SEPSI	56
4.6.	MICROCIRCOLAZIONE E DISFUNZIONE ENDOTELIALE	60
4.7.	RUOLO DEI NEUTROFILI	60
4.8.	AZIONE DEL LIPOPOLISACCARIDE (LPS)	61
4.9.	RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI	62
III.	PARTE SPERIMENTALE	64
1.	MATERIALI E METODI	65
1.1.	VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO	65
1.1.1.	ANIMALI	65
1.1.2.	PROTOCOLLO SPERIMENTALE	65
1.1.3.	PROCEDURA SPERIMENTALE	65
1.1.4.	LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL)	68
1.1.5.	ZIMOGRFIA SDS-PAGE	68
1.1.6.	ANALISI ISTOLOGICHE	70

1.1.7.	ANALISI STATISTICHE	70
1.2.	STRESS MECCANICO <i>vs</i> STRESS IPOSSICO <i>vs</i> STRESS SETTICO	71
1.2.1.	ANIMALI	71
1.2.2.	PROTOCOLLO SPERIMENTALE	71
1.2.3.	PROCEDURA SPERIMENTALE	72
1.2.4.	ZIMOGRAFIA SDS-PAGE	73
1.2.5.	ANALISI ISTOLOGICHE	73
1.2.6.	ANALISI STATISTICHE	73
2.	RISULTATI	74
2.1.	VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO	74
2.1.1.	EMOGASANALISI	74
2.1.2.	PARAMETRI POLMONARI	77
2.1.3.	PARAMETRI CIRCOLATORI	80
2.1.4.	ENDOTELINA-1	83
2.1.5.	METALLOPROTEINASI (MMP-2, MMP-9)	85
2.1.6.	ANALISI ISTOLOGICHE	92
2.2.	STRESS MECCANICO <i>vs</i> STRESS IPOSSICO <i>vs</i> STRESS SETTICO	94
2.2.1	PARAMETRI FISIOLGI	94
2.2.2.	METALLOPROTEINASI	97
2.2.3.	ANALISI ISTOLOGICHE	100
3.	DISCUSSIONE	102
3.1.	VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO	102
3.2.	STRESS MECCANICO <i>vs</i> STRESS IPOSSICO <i>vs</i> STRESS SETTICO	110
4.	CONCLUSIONI	113
IV.	BIBLIOGRAFIA	114

## I. ABSTRACT

Mechanical ventilation is an essential support for patients with acute lung pathologies, such as acute respiratory distress syndrome and acute lung injury, and it is generally applied in surgical practice. Specialists are however aware that, despite of its “life saving” role, this practice presents several negative side effects. Recently one of the most serious negative effects of mechanical ventilation, called Ventilatory Induced Lung Injury (VILI), has been detected and better analysed. This syndrome, initially associated with barotrauma, has been recently defined as *volutrauma*, meaning a damage of lung parenchyma caused by mechanical stress deriving from overdistension induced by high tidal volumes ( $V_T$ ).

The aim of the present study was to evaluate the onset of ventilatory induced lung injury in a clinically relevant, validated and well-studied model, which closely mimics the human physiology and the ventilator setting currently used in the clinical arena. The study was performed using 18 pigs were involved, divided into three groups (n=6): two groups were mechanically ventilated ( $V_T$  20 ml/kg and 8 ml/kg), and one group was spontaneously breathing (SB). The duration of the experiments was 240 minutes. Hemogasanalysis and all main respiratory and circulatory parameters were detected every 30 minutes. Metalloproteinases 2 and 9 expression and activation and ET-1 levels were observed in the bronchoalveolar lavage fluid. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and autoptic samples of lung, kidney and liver for histological and zymographic analysis were obtained. The results showed serious alterations of lung mechanics and structure induced by high  $V_T$ , although the protective strategies as low  $V_T$  were not immune from negative side effects. Respiratory function worsening was observed in spontaneously breathing subjects, too. Therefore, our study demonstrates that, both animals undergoing mechanical ventilation with high volumes and non-assisted breathing animals develop a massive lung edema, as revealed by extravascular lung water values. As expected, the alveolar over-distension induced ultrastructural cellular abnormalities only in animals subjected to high  $V_T$  and not in those where lung distension was limited, as in our  $V_T8$  group, or absent, as in SB group.

Our data show irrefutably that the severe edema formation noticed in spontaneously breathing animals was clearly related to the increase in

pulmonary arterial pressure, which induced the extravasation of fluid into lung parenchyma.

Moreover, we have evaluated the changes in lung mechanics and metalloproteinases production and activation in three different types of lung damages evoked by mechanical, hypoxic and septic stress. Under that, 24 pigs were studied, randomly divided into four groups (n=6): control group (pigs spontaneously breathing), mechanical stress group (pigs ventilated with high  $V_T$ ), hypoxic group (pigs inhaled with an hypoxic gas mixture), septic group (pigs i.v. infused with E.coli LPS). All the animals were studied for 240 minutes. Hemogasanalysis and main respiratory and circulatory parameters were detected every 20 minutes. At the end of the experiment, subjects were sacrificed and autoptic samples of lung for histological and zymographic analysis were obtained. The changes in physiological parameters were in line with morphological lung alterations. Zymographic analysis showed a strong activation of MMP-2 but no activation of MMP-9 in control, mechanical and hypoxic stress groups. The septic stress group has reflected a specular situation with activation of MMP-9 and low levels of MMP-2, which was present only in the inactivated form. The present study has underlined an acute modulation of MMPs in lung tissues and MMPs different behaviour facing different stimulations.

In conclusion, it is clear that mechanical ventilation strategies profoundly affects lung parenchyma integrity and functionality, and the choice of a ventilation strategy that avoids these damages, ensuring at the same time an appropriate exchange of gases, is strongly encouraged.

## II. INTRODUZIONE



Il polmone è l'organo cardine per la respirazione nei vertebrati. La sua principale funzione è di trasportare ossigeno dall'atmosfera al sangue e di espellere anidride carbonica dal sangue all'atmosfera. Questo scambio di gas avviene grazie ad un mosaico di cellule specializzate che formano delle piccole sacche d'aria chiamate alveoli. I termini medici che si riferiscono al polmone molto spesso iniziano con il prefisso *pneumo-*, dal greco *πνεύμα*, spirito, aria, da cui deriva *πνεύμων*, polmone. La respirazione è quindi essenziale per la sopravvivenza di un organismo e, di conseguenza, è indispensabile che l'integrità e la funzionalità dell'apparato respiratorio venga preservata. In molte situazioni patologiche, ma non solo, i polmoni necessitano di un supporto esterno per poter compiere un corretto scambio gassoso. Questo ausilio è rappresentato dalla ventilazione meccanica o assistita, strumento salvavita in talune condizioni patologiche ed importante supporto nella pratica chirurgica. Tuttavia, la ventilazione meccanica non è completamente scevra da effetti negativi sul polmone e sul resto dell'organismo. L'obiettivo centrale del lavoro svolto durante il dottorato di ricerca è stata la valutazione dei meccanismi coinvolti nel danno della barriera alveolo-capillare da stress meccanico, causato da livelli diversi di ventilazione, e l'analisi della relazione esistente tra questi e la produzione di fattori endoteliali, quali l'endotelina, e di metalloproteinasi di matrice, quali la MMP-2 e la MMP-9. Inoltre, è stato effettuato un confronto tra differenti tipologie di stress applicate al polmone ed i danni riscontrati, attraverso la valutazione di parametri fisiologici e della presenza ed attivazione delle metalloproteinasi di matrice. Sono stati quindi valutati modelli sperimentali di stress meccanico indotto da ventilazione assistita, di stress ipossico, causa anche di ipertensione polmonare, e di stress settico.

# 1. CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA

Il sistema respiratorio è costituito da vie aeree superiori ed inferiori. Le vie aeree superiori, a loro volta costituite da coane, cavità nasali, rinofaringe e laringe, oltre ad essere vie di conduzione, hanno la funzione di riscaldare, umidificare e filtrare grossolanamente l'aria prima dell'arrivo alle vie inferiori. Queste ultime, organizzate in albero tracheobronchiale e sacchi alveolari formati da alveoli, sono divise in vie aeree di conduzione, le prime 16 generazioni prodotte dalla segmentazione dell'albero bronchiale, e zona respiratoria propriamente detta, le successive 7 generazioni, che rappresentano il luogo dove avvengono gli scambi gassosi tra aria e sangue circolante (Albertini e Vanelli, 1991).

L'elemento cardine di questo processo è rappresentato dall'unità alveolo-capillare. Tale struttura, anche chiamata barriera gas-ematica (BGB, *Blood-Gas Barrier*), è formata da cellule epiteliali alveolari di tipo I e di tipo II, da cellule endoteliali e dalla matrice extracellulare (ECM, *Extracellular Matrix*). L'ECM rappresenta l'impalcatura tridimensionale della parete alveolare, composta da uno strato di cellule epiteliali ed endoteliali, dalla loro membrana basale e da un sottile strato di spazio interstiziale situato tra l'endotelio capillare e l'epitelio alveolare (West e Mathieu-Costello, 1999). Nel segmento in cui le membrane basali epiteliali ed endoteliali non sono fuse, l'interstizio è composto da cellule, dalla fase fluida dell'ECM e da componenti fibrosi macromolecolari. Tale maglia fibrosa è costituita principalmente da collagene di tipo I e III, che offre resistenza alla trazione; elastina, che permette il ritorno elastico; glicosaminoglicani (GAG), che rappresentano i maggiori componenti del comparto interstiziale non fibrillare (Negrini *et al.*, 2003). Nel polmone, l'ECM svolge un ruolo molto importante in quanto provvede a fornire estensibilità meccanica, forza compressiva ed elasticità; contribuisce inoltre a mantenere normali le dinamiche dei fluidi interstiziali (Miserocchi *et al.*, 1993); controlla il comportamento cellulare tramite legami con chemochine, fattori di crescita, citochine e tramite l'interazione con recettori di superficie cellulare; ripara e rimodella i tessuti (Pelosi *et al.*, 2007).

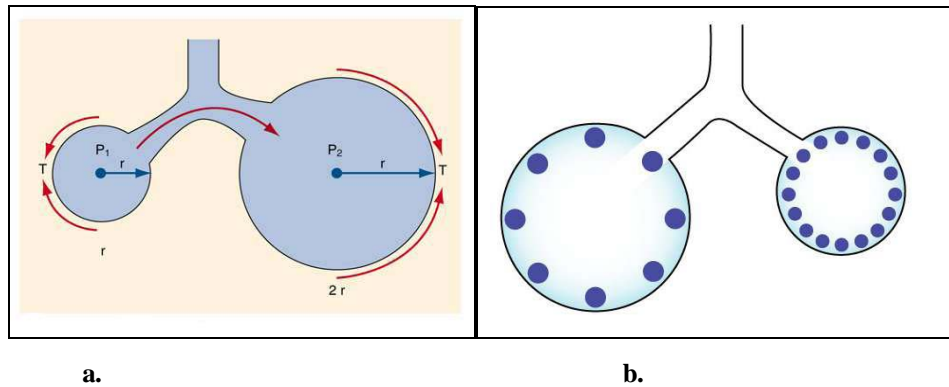
La barriera gas-ematica è molto estesa, nell'uomo occupa un'area di 50-100 m<sup>2</sup>, ma allo stesso tempo è estremamente sottile, il suo spessore, infatti, è di soli 0,2-0,3 μm (West, 2000). Questo spessore ridotto è necessario per permettere un

adeguato scambio gassoso tra alveoli e capillari polmonari, la cui superficie è ulteriormente aumentata dalla presenza delle caveole intracellulari.

Il parenchima polmonare è costituito da centinaia di milioni di alveoli, strutture globose con un diametro che varia da 75 a 300  $\mu\text{m}$ ; assumendo che si comportino come strutture sferiche, l'espansione di ogni alveolo, causato dalla pressione dell'aria presente nelle vie aeree, sarebbe bloccata dalla tensione superficiale secondo la legge di Young-Laplace:

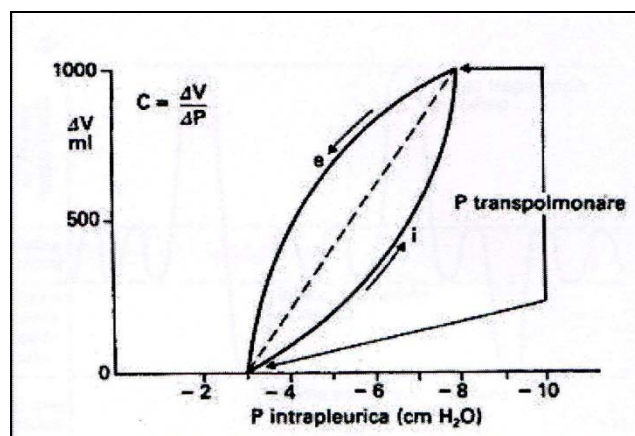
$$P=2T/r$$

dove T rappresenta la tensione superficiale, ossia la forza coesiva delle molecole che si instaura in un film di superficie dei liquidi, r è il raggio della struttura sferica e P la pressione transmurale, ovvero la differenza tra la pressione interna ed esterna della struttura. La pressione, quindi, è inversamente proporzionale al raggio. Gli alveoli polmonari sono di diametro differente, per cui la pressione degli alveoli più piccoli, essendo maggiore di quella negli alveoli più grandi, dovrebbe provocare un movimento di aria dall'alveolo più piccolo a quello più grande, con conseguente collasso del più piccolo (Fig. 1.1). Nel polmone questa situazione determinerebbe la presenza di aree atelettasiche, ossia collassate, ed aree enfisematose, ossia eccessivamente espanse, condizione assolutamente sfavorevole per gli scambi gassosi. Nel sistema respiratorio ciò è impedito dalla presenza del tensioattivo polmonare. Questa sostanza, prodotta all'interno dei corpi lamellari delle cellule epiteliali alveolari di tipo II, tappezza la parete dell'alveolo, riducendo la tensione superficiale. Ciò è possibile grazie alla sua struttura chimica, una miscela di fosfolipidi, tra cui il più importante è la fosfatidilcolina satura, e di proteine specifiche chiamate 'proteine associate al tensioattivo'. I fosfolipidi, costituiti da una testa idrofila ed una coda idrofoba, sono in grado di orientarsi sulla superficie con la porzione idrosolubile verso la cellula e la porzione idrofoba verso il gas. Più il raggio dell'alveolo è ampio più le molecole di tensioattivo saranno distanziate e quindi la loro azione sarà minore; al contrario, negli alveoli con diametro ridotto i fosfolipidi saranno ravvicinati e la loro azione sarà maggiore. Le proteine sembra che abbiano un ruolo nella diffusione del tensioattivo sulla superficie dell'alveolo.



**Fig.1.1. a)** Legge di Young-Laplace:  $P=2T/r$ . Secondo questa legge l'aria contenuta nell'alveolo  $P_1$  dovrebbe spostarsi nell'alveolo  $P_2$  a causa della maggior pressione trasmurale generata. **b)** Grazie al tensioattivo, le cui molecole sono più ravvicinate nell'alveolo piccolo, la tensione superficiale diminuisce consentendo all'alveolo di rimanere disteso.

Il tensioattivo polmonare, quindi, stabilizza gli alveoli durante l'espiazione, evitando che la riduzione del raggio determini il loro collasso e permettendo al polmone di trattenere aria durante l'espiazione, nonostante la repentina diminuzione di pressione. La rappresentazione grafica dell'interazione tra pressione polmonare e volume polmonare (curva V/P) mostra come, a parità di volume, le pressioni richieste in inspirazione ed espiazione siano diverse (Auten *et al.*, 2001). Tale fenomeno è conosciuto con il nome di isteresi e consente una diminuzione del lavoro dei muscoli respiratori ad ogni inspirazione (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2.** Isteresi polmonare. La pendenza della curva, determinata dal rapporto V/P rappresenta la *compliance* polmonare.

L'isteresi fissa la Capacità Funzionale Residua (FCR), ossia il volume d'aria che rimane all'interno dei polmoni al termine di ogni atto respiratorio normale.

La FCR è la somma del Volume di Riserva Espiratoria (ERV), ossia il volume d'aria che può essere ulteriormente allontanato dai polmoni dopo una normale espirazione, e del Volume Residuo (VR), ossia il volume di aria che rimane intrappolato nei polmoni anche dopo un'espirazione forzata.

Il Volume Corrente o Tidalico ( $V_T$ ) rappresenta la quantità di aria che viene inspirata ed espirata durante un normale atto respiratorio; durante un'inspirazione forzata la quantità d'aria che può essere ulteriormente inspirata, oltre al  $V_T$ , viene definita Volume di Riserva Inspiratoria (IRV). La somma di tutti questi volumi è definita Capacità Polmonare Totale (TLC), mentre la quantità di aria che attraversa il polmone durante un'inspirazione ed un'espirazione forzata, ovvero la somma di IRV, ERV e  $V_T$ , è definita Capacità Vitale (VC) (Fig. 1.3). La diminuzione della FRC può essere un problema legato all'utilizzo di bassi volumi tidalici per contrastare l'insorgenza di un volutrauma durante la ventilazione meccanica.

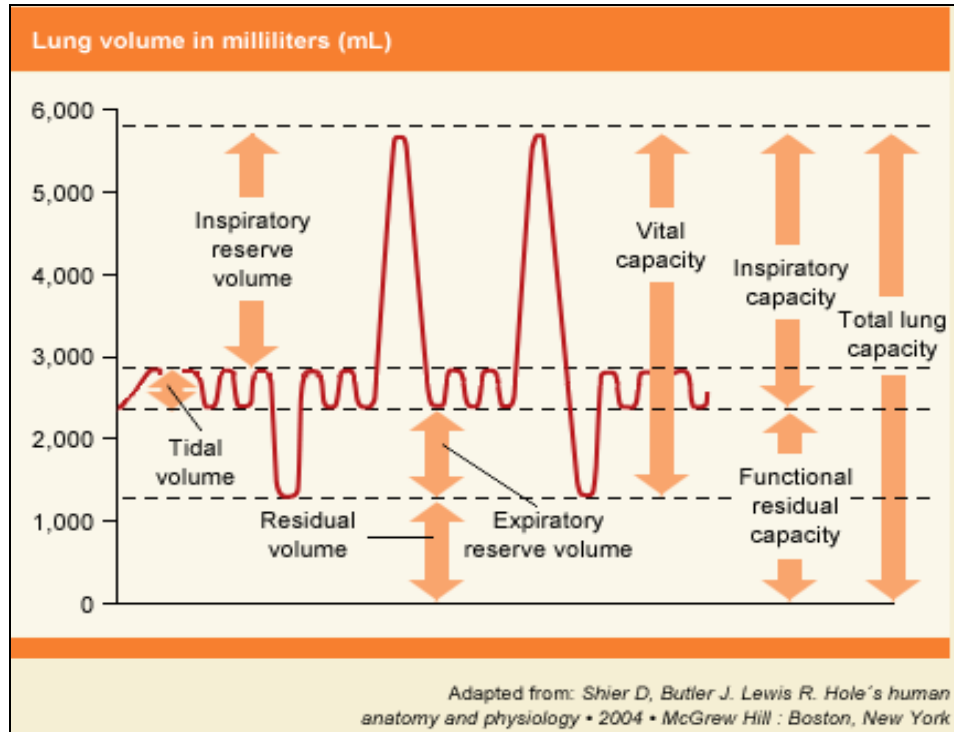


Fig. 1.3. Volumi respiratori.

La grandezza dei volumi respiratori è influenzata dalla distensibilità polmonare o *compliance* ( $C_L$ ), la quale dipende dalla presenza di fibre elastiche nel parenchima polmonare e dalla presenza del tensioattivo a livello alveolare. La *compliance* totale del sistema broncopolmonare ( $C_{rs}$ ) è determinata dalla *compliance* della parete toracica e da quella polmonare; la prima, data dalla forza di raccolta della cassa toracica una volta superati i 2/3 della capacità vitale, non viene influenzata dalle patologie a carico del polmone; al contrario, la seconda può essere seriamente compromessa in caso di patologie polmonari, nel corso delle quali può presentare valori aumentati o diminuiti, come in caso di volutrauma. Quantitativamente, la *compliance* polmonare è il rapporto tra la variazione di volume polmonare durante un normale respiro e la variazione della pressione transpolmonare, determinata a sua volta dalla differenza tra pressione intrapleurica e pressione alveolare.

### 1.1. METALLOPROTEINASI DI MATRICE

Le metalloproteinasi di matrice (MMP) sono endopeptidasi facenti parte di una famiglia di enzimi correlati tra loro, presenti normalmente negli individui sani, e considerate fondamentali nella regolazione del *turnover* delle macromolecole che compongono la matrice extracellulare (ECM), quali il collagene ed i proteoglicani (Parsons *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 2004). L'adeguato rimodellamento della matrice è indispensabile per l'interazione delle singole cellule con l'ambiente circostante, per la fisiologia ed il normale sviluppo degli organismi multicellulari. Infatti, le MMP rivestono importanti ruoli nella degradazione della ECM nell'ambito di svariati eventi biologici, come l'angiogenesi, la morfogenesi, la cicatrizzazione delle ferite cutanee, il rimodellamento tissutale, la gravidanza, l'infiammazione, il parto, l'edema, l'invasione tumorale (Sternlicht e Werb, 2001) (Fig.1.1.1). Tutte le MMP sono potenzialmente in grado di degradare il fibrinogeno, influenzando così i normali meccanismi della coagulazione, nonché diverse proteine pericellulari, circolanti e di superficie, oltre che tutte le molecole strutturali della matrice extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001). Le MMP non possono essere considerate solo come dei semplici enzimi, alcune infatti sono potenzialmente in grado di avviare numerose funzioni cellulari attraverso

l'alterazione delle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula; attraverso la liberazione, l'attivazione o l'inattivazione del *signaling* delle molecole (mediatori chimici autocrini e paracrini); attraverso la potenziale attivazione o inattivazione dei recettori di superficie cellulare (Bode *et al.*, 1993). La degradazione della matrice da parte delle MMP favorisce la migrazione cellulare attraverso varie vie: aprendo una strada verso la matrice, esponendo siti criptici su proteine "clivate" che promuovono l'attacco della cellula, promuovendo il distacco della cellula in modo che possa muoversi, rilasciando proteine di segnale extracellulare che stimolano la migrazione cellulare (Mizuno *et al.*, 2005). Le metalloproteinasi conosciute sono 25 nei vertebrati e 22 omologhe umane, classificate secondo una nomenclatura numerico sequenziale (Sternlicht e Werb, 2001). L'attività catalitica delle MMP risiede nello ione zinco ( $Zn^{2+}$ ) contenuto al loro interno, mentre una porzione N terminale ne determina la secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico ed il suo trasporto al di fuori delle cellule (Andrew *et al.*, 2002). Queste endopeptidasi vengono secrete come zimogeno, ovvero in forma inattiva, da svariati tipi cellulari, quali cellule epiteliali, cellule endoteliali, macrofagi, leucociti, e devono essere attivate, per poter svolgere la loro attività proteolitica, attraverso la scissione del legame  $Zn^{2+}$ -Cys (*cystein switch*) (Sternlicht e Werb, 2001; Kobayashi *et al.*, 1999). L'organismo esprime più di una metalloproteinasi, ciascuna con il proprio profilo d'espressione, di localizzazione, d'attivazione, di inibizione e di *clearance*, con il proprio *range* di substrati. La molteplicità delle funzioni, distinte ma talvolta sovrapponibili, salvaguarda qualsiasi perdita di controllo della loro regolazione (Sternlicht e Werb, 2001). Dal momento che le specificità di substrato tendono a sovrapporsi, la funzione biologica delle singole MMP è ampiamente dettata dai loro profili, o *pattern*, differenziali di espressione. La maggior parte delle MMP è strettamente regolata a livello trascrizionale, fatta eccezione per la MMP-2 che è controllata ed espressa essenzialmente attraverso un unico meccanismo di attivazione enzimatico ed alcuni gradi di stabilizzazione post-trascrizionali dell'mRNA (Kusano *et al.*, 1998). L'espressione genica è regolata da numerosi fattori, che possono determinare una *up-regulation* o una *down-regulation*, quali proteine della ECM, stress cellulari, nonché citochine e fattori di crescita, tra cui interleuchine (IL), interferone, EGF (*Epithelial Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), TNF- $\beta$  (*Tumor necrosis*

*Factor-β*) e l'EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) (Baker *et al.*, 2002; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Le MMP sono inoltre regolate da inibitori endogeni, come l' $\alpha$ -macroglobulina, e da inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP), prodotti per lo più dalle stesse cellule che producono le MMP a cui sono destinati, ed attivati dai medesimi stimoli, allo scopo di limitare eccessivi danni secondari alla loro azione proteolitica (Nagase e Woessner, 1999). Le metalloproteinasi 2 e 9, chiamate anche gelatinasi A e B, sono caratterizzate dall'inserzione di tre ripetizioni di *cystein-rich* testa-coda all'interno del dominio catalitico, simili alle ripetizioni di fibronectina di tipo II (Mizuno *et al.*, 2005) (Fig. 1.1.2). Sono in grado di degradare il collagene di tipo IV presente nelle membrana basale e per tale motivo vengono considerate enzimi chiave nella migrazione e nell'invasione di molti tipi cellulari, quali neutrofili, macrofagi, cellule T e alcune cellule invasive cellulari (Mizuno *et al.*, 2005; Kusano *et al.*, 1998). La MMP-2 può essere considerata una proteasi di segnale, in grado di agire velocemente in risposta a fini cambiamenti in corso di stress ossidativo, in modo particolare in risposta all'anione perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>). È in grado di degradare gelatina, fibronectina e laminina, ma ha una minore affinità per il collagene di tipo IV e V rispetto alla MMP-9 (Sternlicht e Werb, 2001; Albert *et al.*, 2004). La localizzazione intracellulare della MMP-2 suggerisce molti ruoli fisiologici addizionali ancora da indagare (Sternlicht e Werb, 2001; Albert *et al.*, 2004). L'espressione della MMP-9 è primariamente indotta in condizioni di attivazione immunitaria, in genere da parte di macrofagi e leucociti attivati, cellule endoteliali umane e cardiomiociti embrionali (Sternlicht e Werb, 2001; Albert *et al.*, 2004). È immagazzinata in specifici granuli dei neutrofili circolanti e necessita dell'attivazione di queste cellule da parte di mediatori infiammatori per essere rilasciata (Andrew *et al.*, 2002). È in grado di degradare la gelatina, il collagene di tipo III, IV e V e l'elastina (Nagase e Woessner, 1999; Sternlicht e Werb, 2001; Baker *et al.*, 2004).



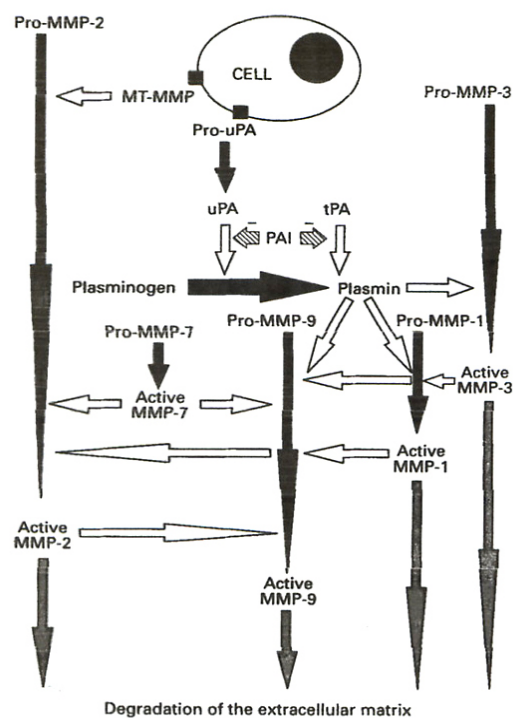


Fig.1.1.1. Degradazione della matrice extracellulare (Br. J. Surg. 1997; 84, 160-166).

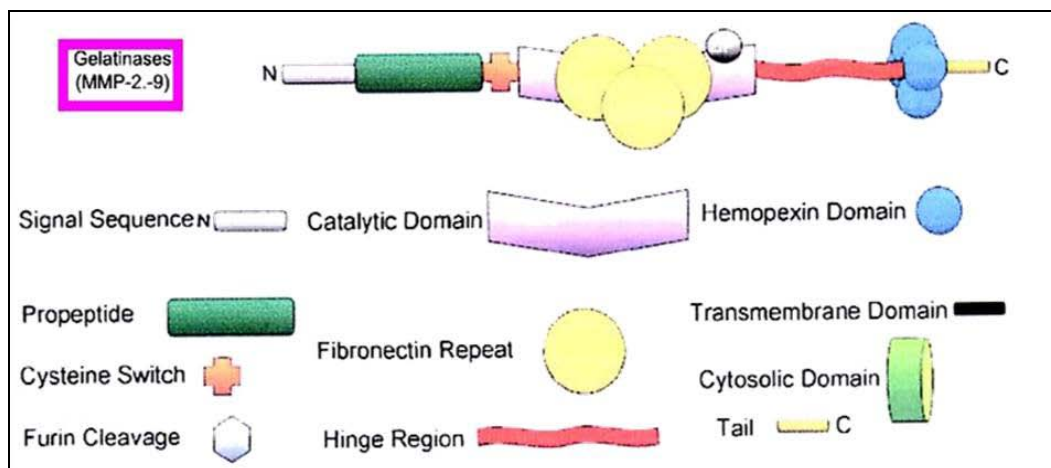


Fig. 1.1.2. Struttura delle metalloproteinasi di matrice MMP-2 e MMP-9 (British Journal of Pharmacology, 2007 152, 189-205).

## 1.2. ENDOTELINA-1

L'endotelina-1 è uno dei più potenti vasocostrittori endogeni conosciuti, secreta prevalentemente dalle cellule endoteliali, attraverso un *pathway* costitutivo. La sua azione contribuisce al mantenimento del tono vascolare, regola la proliferazione cellulare e controbilancia l'azione vasodilatatoria dell'ossido nitrico (NO) (Marasciulo *et al.*, 2006). Oltre alle cellule endoteliali, contribuiscono alla genesi dell'ET-1 cellule delle muscolatura vascolare liscia (VSMC), cardiomiociti, leucociti, macrofagi ed altre cellule. L'ET-1 non è solamente un potente vasocostrittore, ma ad elevate concentrazioni, patologiche o farmacologiche, ha attività proinfiammatoria e promuove la proliferazione delle VSMC. Le più recenti proprietà attribuite all'endotelina-1, infatti, sono strettamente legate all'ipertensione arteriosa polmonare e probabilmente ad altre patologie vascolari quali l'aterosclerosi e l'occlusione venosa a seguito di trapianto d'organo. L'endotelina-1 presenta proprietà angiogenetiche, che potrebbero essere potenzialmente coinvolte nella neovascolarizzazione osservata nelle arterie coronarie umane aterosclerotiche (Thorin e Webb, 2010).

Da un punto di vista puramente fisiologico, l'ET-1 contribuisce al mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare agendo sulla regolazione del tono vascolare basale (Thorin e Webb, 2010). La produzione dell'endotelina-1 è finemente regolata a livello genico: numerosi fattori possono determinare una *up-regulation* a carico dell'ET-1 mRNA, TNF- $\alpha$ , interleuchine, *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulina, angiotensina II, epinefrina, radicali liberi e fattori fisici come lo *shear stress*, oppure una *down-regulation*, come NO, PGI<sub>2</sub>, ipossia, GMPc. In questo modo, in condizioni fisiologiche, gli effetti dell'ET-1 sono accuratamente regolati attraverso uno stimolo o un'inibizione del suo stesso rilascio da parte dell'endotelio (Marasciulo *et al.*, 2006; Brunner *et al.*, 2006). L'endotelina-1 è sintetizzata sotto forma di pre-pro-ET-1, quindi scissa in pro-ET-1 ed infine in ET-1 da enzimi *ET-converting* (ECE-1 e ECE-2). Gli effetti biologici dell'endotelina-1 sono mediati attraverso l'attivazione di due differenti categorie di recettori, ET<sub>A</sub> ed ET<sub>B</sub>.

La disfunzione endoteliale è uno dei più precoci indicatori di anormalità vascolari, un'alterata funzione endoteliale può infatti risultare in una sensibile riduzione

della biodisponibilità di NO così come in un incremento della sintesi, rilascio o attività di ET-1. Un disequilibrio nella produzione di agenti vasodilatatori e vasocostrittori può contribuire all'insorgenza di disordini emodinamici. Dal momento che nella patogenesi di importanti patologie cardiovascolari un'alterata regolazione del sistema endoteliale ricopre un ruolo molto importante, i recettori ET<sub>A</sub> ed ET<sub>B</sub> sono diventati interessanti *target* terapeutici per i disordini associati ad elevati livelli di ET-1 (Marasciulo *et al.*, 2006).

È inoltre stato dimostrato come l'ET-1 moduli l'espressione della matrice extracellulare e delle metalloproteinasi di matrice. Questa proprietà conferisce all'ET-1 un ruolo nel rimodellamento vascolare, il quale, tuttavia, dovrebbe essere considerato come una risposta adattativa, normalmente associato a disfunzioni endoteliali e patologie vascolari (Abraham e Dashwood, 2008).

## 2. VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO

La ventilazione meccanica è utilizzata da tempo come supporto in pazienti con patologie acute, quali ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) e ALI (*Acute Lung Injury*). I clinici, tuttavia, sono consci del fatto che, nonostante il suo ruolo di 'salvavita', presenti numerosi potenziali effetti negativi e complicazioni. Recentemente è emerso come uno dei più gravi effetti negativi della ventilazione assistita sia la cosiddetta VILI (*Ventilator-Induced Lung Injury*). Per anni tale sindrome è stata sinonimo di barotrauma, ovvero fuoriuscita di aria a seguito della distruzione della parete alveolare a causa di elevati valori pressori. Ultimamente, la VILI è stata associata al termine *volutrauma*, ovvero un danno causato da uno stress meccanico da sovradistensione indotto da inadeguati volumi tidalici.

### 2.1. CENNI DI STORIA

Per decenni, la ventilazione meccanica è stata utilizzata in terapia intensiva ad elevati volumi tidalici ( $V_T$ ) al fine di assicurare livelli adeguati di pressione parziale di ossigeno ( $PaO_2$ ) ed anidride carbonica ( $PaCO_2$ ) a pazienti affetti da importanti disturbi respiratori, quali la sindrome da distress respiratorio acuta o ARDS, o in pazienti neonati prematuri con insufficienza respiratoria.

Nonostante il ruolo fondamentale della ventilazione meccanica, già da tempo i clinici si sono resi conto che questo importante supporto non è scevro da complicazioni, tali da aggravare la sintomatologia del paziente (Pingleton, 1988). Inizialmente si pensava che l'insorgenza della VILI fosse legata allo sviluppo di un *barotrauma*, ovvero un trauma indotto da elevati livelli di pressione inspiratoria massima (PIP) utilizzati durante la ventilazione meccanica, caratterizzato da rottura delle pareti alveolari e conseguente insorgenza di un pneumotorace iperteso (Macklin e Macklin, 1994). Conseguentemente l'attenzione venne focalizzata sul controllo di tale parametro, mentre nei confronti dei volumi respiratori veniva mantenuto l'approccio tradizionale, che prevedeva l'uso di  $V_T$  pari a 10-15 ml/kg, superiori rispetto ai valori fisiologici di un soggetto a riposo (7-8 ml/kg) (Brower *et al.*, 2000).

Studi sperimentali hanno permesso successivamente di evidenziare come la principale causa di danno polmonare secondario fosse l'utilizzo di elevati volumi e non la pressione (Dreyfuss *et al.*, 1988). Di conseguenza si ritenne più opportuno parlare di *volutrauma* anziché *barotrauma* (Dreyfuss e Saumon, 1992). Ulteriori ricerche focalizzarono l'attenzione sulla possibilità che il primitivo danno meccanico indotto dalla ventilazione potesse scatenare una risposta infiammatoria con attivazione di cellule infiammatorie (Tsuno *et al.*, 1991) e liberazione di citochine (Tremblay *et al.*, 1997). Tale processo venne denominato *biotrauma* (Tremblay e Slutsky, 1998).

## 2.2. DANNO INDOTTO DALLA VENTILAZIONE MECCANICA (VILI)

È ormai appurato che la ventilazione meccanica ad elevati volumi danneggi il polmone e, in modo particolare, che la permeabilità dell'epitelio alveolare e dell'endotelio dei capillari aumenti parallelamente al volume polmonare. Di conseguenza, si può ritenere che le modificazioni del volume corrente possano influenzare la filtrazione a livello capillare e quindi essere responsabili di edema polmonare. L'eccessiva distensione del polmone a seguito di un'iperventilazione determina inoltre l'insorgenza di enfisema, interstiziale ed alveolare. Le lesioni citologiche che accompagnano tale stress meccanico sono reversibili, ma sono anche caratterizzate dalla perdita dell'integrità funzionale della barriera alveolo-capillare e di conseguenza facilitano l'instaurarsi, oltre all'edema, di emorragia e reclutamento delle cellule infiammatorie. Infatti, lo stress meccanico sulle cellule è responsabile di lesioni traumatiche della membrana citoplasmatica, specialmente a danno delle cellule epiteliali alveolari; questo può favorire l'instaurarsi di processi infiammatori ed il potenziamento dell'espressione e della secrezione delle citochine. Inoltre il *volutrauma*, alterando le caratteristiche del tensioattivo, determina la riduzione della *compliance* polmonare.

### 2.2.1. STUDI SPERIMENTALI SU POLMONI SANI

I primi studi relativi alle lesioni polmonari indotte dalla ventilazione meccanica risalgono ai primi anni sessanta. Greenfield *et al.*, nel 1964, dimostrarono la presenza di aree atelettasiche ed edematose in polmoni di cani ventilati per due ore ad alte pressioni inspiratorie; analisi microscopiche mostrarono un incremento della tensione superficiale suggerendo un'alterazione delle proprietà del tensioattivo. Successivamente, nel 1968, Sladen *et al.* evidenziarono come pazienti sottoposti a ventilazione meccanica presentassero parametri polmonari alterati, tra cui la riduzione della *compliance*. L'associazione tra volutrauma ed elevate pressioni inspiratorie fu verificata per la prima volta da Webb e Tierney (1974), i quali dimostrarono, in uno studio svolto su ratti, che l'aumento della pressione (da 14 a 30 cmH<sub>2</sub>O) determinava l'insorgenza di edema polmonare di entità variabile. Tali risultati furono ulteriormente confermati da Dreyfuss *et al.* nel 1985, i quali per primi suggerirono un'analogia tra le lesioni polmonari di ratti ventilati meccanicamente e pazienti sofferenti di ARDS, dimostrando il filo di unione tra VILI ed elevati volumi tidalici. Dreyfuss *et al.*, nel 1988, validarono, inoltre, l'ipotesi che fosse l'elevato volume tidalico a determinare l'insorgenza della VILI, attraverso un esperimento effettuato su un gruppo di ratti, posti in ventilazione meccanica a diversi V<sub>T</sub> ma con PIP costante. La medesima ipotesi venne ulteriormente convalidata, nel 1989, da Hernandez *et al.* grazie ad uno studio effettuato su due gruppi di conigli, un gruppo con torace compresso e l'altro con torace normale, in cui venivano applicate pressioni differenti e, nel 1990, da Carlton *et al.* con uno studio basato sull'applicazione di diversi V<sub>T</sub> ad agnelli in ventilazione assistita.

Da un punto di vista microscopico, i polmoni affetti da VILI presentano aree atelettasiche, iperemia ed edema, con conseguente aumento del peso dell'organo (Tsuno *et al.*, 1990). La presenza di edema interstiziale ed alveolare è un reperto estremamente comune in polmoni meccanicamente ventilati e la sua estensione e gravità sono direttamente proporzionali alla durata della ventilazione (Dreyfuss *et al.*, 1985). L'edema al microscopio ottico appare sottoforma di manicotti fortemente eosinofili peribronchiali e perivascolari, suggerendo la presenza di un'elevata quantità di proteine, tipiche di un essudato più che di un trasudato. Studi condotti su suini e conigli ventilati meccanicamente (Tsuno *et al.*, 1991;

Dreyfuss et al. 1985) evidenziarono, a livello istologico, la presenza di danni alveolari gravi e diffusi, presenza di membrane ialine, emorragie alveolari, infiltrazione neutrofila, collasso alveolare; tipiche alterazioni che si riscontrano in pazienti affetti da ARDS, a sottolineare ulteriormente la stretta relazione tra questa sindrome e la VILI.

### 2.2.2. STUDI SPERIMENTALI SU POLMONI DANNEGGIATI

La ventilazione meccanica è uno strumento di estrema importanza, utilizzata non solo in corso di interventi chirurgici, ma anche come supporto terapeutico in pazienti affetti da patologie polmonari. Di conseguenza, molti studi si sono focalizzati sugli effetti della ventilazione meccanica su polmoni danneggiati.

Da un punto di vista sperimentale, i polmoni possono essere sottoposti a svariati tipi di insulto. Bowton *et al.* (1989) valutarono polmoni di coniglio lesionati tramite perfusione di acido oleico e quindi sottoposti a ventilazione ad elevati  $V_T$  (18 ml/kg), concludendo che i polmoni presentavano un marcato aumento di peso ed evidenziando, quindi, la presenza di un importante edema. Corbridge *et al.* (1990) confrontarono l'effetto di differenti volumi tidalici su polmoni di cani trattati con acido cloridrico. La presenza di edema polmonare risultava minore nei soggetti ventilati con bassi  $V_T$ , confermando l'ipotesi che alti volumi tidalici incrementino l'insorgenza di edema in polmoni lesionati.

Studi successivi hanno dimostrato che il danno polmonare preesistente ed il volutrauma possono agire in maniera sinergica, ampliando gli effetti negativi sul polmone. Una ricerca svolta su tre gruppi di conigli (uno a cui è stato somministrato acido oleico, uno sottoposto a ventilazione meccanica ad alti volumi ed uno sottoposto sia a volutrauma che a somministrazione di acido oleico) dimostrò come gli effetti su polmoni ventilati e danneggiati fossero significativamente peggiori rispetto a quelli ottenuti in polmoni o solo ventilati o solo danneggiati (Hernandez *et al.*, 1990).

Dreyfuss *et al.*, nel 1995, convalidarono ulteriormente tale ipotesi in uno studio svolto su ratti in cui l'agente insultante era rappresentato da  $\alpha$ -naftil-tiourea (ANTU), un potente rodenticida. In questo studio si osservò un'alterazione della permeabilità vascolare sia nei polmoni trattati con ANTU sia nei polmoni ventilati meccanicamente. I polmoni sottoposti ad entrambi gli insulti presentavano danni

estremamente maggiori rispetto a quelli sottoposti ad un solo trattamento. La gravità dell'edema risultava inversamente proporzionale alla *compliance* del sistema respiratorio misurata prima della ventilazione, in quanto il versamento alveolare riduce il numero di alveoli che ricevono l'aria inspirata, esponendoli ad una sovradistensione maggiore di quella che subirebbero se lo stesso  $V_T$  fosse utilizzato su polmoni sani.

Sia l'atelettasia che l'edema determinano disomogeneità all'interno del parenchima polmonare, promuovendo una sovradistensione in alcune aree e collasso in altre. In questo modo, le zone sane subiscono il volutrauma, peggiorando le condizioni dell'intero polmone. Per dimostrare questa ipotesi, Dreyfuss *et al.* (1999) instillarono nella trachea di alcuni ratti della soluzione salina, mimando un versamento alveolare. Gli animali vennero quindi ventilati con volumi crescenti. Venne osservato come ad alti volumi tidalici aumentava la quantità di trasudato.

È evidente, quindi, come polmoni patologici risentano maggiormente del volutrauma indotto dalla ventilazione meccanica, in modo direttamente proporzionale alla gravità delle lesioni preesistenti.

## 2.3. MECCANISMO D'AZIONE DEL VOLUTRAUMA

La sovradistensione polmonare è la principale causa del volutrauma durante la ventilazione assistita. Il danno provocato è quindi puramente meccanico e determina alterazioni della permeabilità a carico della membrana alveolo-capillare, con formazione di edema, enfisema, inattivazione del tensioattivo, presenza di aree atelettasiche, attivazione del sistema infiammatorio.

### 2.3.1. FORMAZIONE DELL'EDEMA POLMONARE

Un dato di estrema importanza, una volta avvalorata la presenza di edema in corso di ventilazione meccanica, è la determinazione del tipo di edema instauratosi. Questo rappresenta un elemento determinante per comprendere e prevedere se le alterazioni indotte dalla VILI, su polmoni sani o patologici, risulteranno in un semplice aumento del trasudato, se determineranno l'insorgenza di nuove lesioni



oppure peggioreranno quelle già esistenti (Dreyfuss e Saumon, 1998); determinare il tipo di edema è quindi essenziale per la successiva impostazione di una corretta ed efficace terapia in pazienti ricoverati nelle Unità di Terapia Intensiva.

- *Edema di tipo idrostatico*

Inizialmente, l'instaurarsi di edema in corso di ventilazione meccanica fu spiegato con l'incremento della pressione idrostatica dei vasi a livello polmonare (Webb e Tienney, 1974). L'aumento di trasudato può verificarsi a livello dei vasi extra-alveolari e dei vasi alveolari.

Nel primo caso la filtrazione è provocata dall'interdipendenza polmonare, proprietà del parenchima caratterizzata dal fatto che la parete esterna di ogni alveolo è la parete esterna degli alveoli adiacenti (Mead *et al.*, 1970). Quando i polmoni si espandono, una forza diretta verso l'esterno stira gli spazi interstiziali, diminuendone la pressione idrostatica. Assumendo che la pressione idrostatica all'interno dei vasi extra-alveolari rimanga costante, la differenza tra le due pressioni risulta in uno spostamento di trasudato dai vasi verso l'interstizio. La pressione trasmurale aumenta proporzionalmente all'espansione polmonare, data la stretta interdipendenza tra vasi extra-alveolari e rete connettivale dell'interstizio polmonare. Quando gli alveoli sono dilatati, la pressione alveolare agisce su un'area maggiore a livello della superficie polmonare rispetto che a livello della parete vasale; quindi, la forza totale che agisce verso l'esterno, calcolata come prodotto tra pressione ed area, è maggiore di quella che agisce verso l'interno (Howell *et al.*, 1961).

Nel secondo caso, l'aumento della pressione trasmurale potrebbe essere causata da un'inattivazione del tensioattivo, condizione, dimostrata in numerosi studi, che determinerebbe un incremento della tensione superficiale alveolare ed una diminuzione della pressione negativa del tessuto circostante i vasi a livello alveolare. Questo incrementerebbe la pressione trasmurale capillare, favorendo la filtrazione di trasudato dai vasi agli alveoli (Dreyfuss e Saumon, 1998).

In letteratura, i dati che supportano l'ipotesi che l'edema sviluppatosi durante la VILI sia di tipo idrostatico sono stati acquisiti soprattutto in esperimenti svolti su animali sottoposti a toracotomia o in esperimenti effettuati su polmoni isolati. Nel 1971, Iliff ventilò polmoni isolati di cane utilizzando una pressione alveolare

abbastanza elevata da chiudere sia i vasi venosi che quelli arteriosi. Valutò quindi l'edema derivato dalla filtrazione dei vasi extra-alveolari tramite la misurazione del peso dell'organo e l'esame microscopico di campioni di parenchima. I risultati confermarono la presenza di trasudato e l'aumento del diametro dei vasi dovuto all'interdipendenza dei vasi polmonari. Successivi studi si concentrarono su animali toracotomizzati, come quelli eseguiti da Parker *et al.* che, nel 1990, valutarono due gruppi di cani a cui venne somministrata rispettivamente una bassa ed un'alta PIP. Il secondo gruppo presentava un aumento della pressione arteriosa polmonare, un incremento del flusso linfatico, un aumento della pressione microvascolare media. Tuttavia, i ricercatori stessi ipotizzarono che questi incrementi pressori non si sarebbero verificati in animali intatti, in quanto in questi l'elevata pressione intratoracica avrebbe ridotto la gittata cardiaca e quindi la pressione arteriosa polmonare media.

Si può quindi concludere che l'edema sviluppatosi in corso di VILI non sia di tipo idrostatico, nonostante questo meccanismo possa comunque contribuire alla sua formazione, ma è più probabile che sia legato all'alterata permeabilità della barriera alveolo-capillare (Dreyfuss e Saumon, 1998).

- *Edema da alterata permeabilità*

È stato ampiamente dimostrato che l'edema sviluppatosi in seguito all'utilizzo di inappropriati volumi tidalici durante la ventilazione meccanica è legato ad un aumento della permeabilità della barriera alveolo-capillare. Le alterazioni non coinvolgono solamente l'endotelio dei capillari alveolari, ma sono riscontrabili anche a livello epiteliale. Tali risultati sono stati evidenziati in studi su polmoni isolati, su animali toracotomizzati ed in animali intatti.

- Incremento della permeabilità endoteliale

L'incremento della permeabilità della barriera alveolo-capillare ai piccoli soluti è un evento fisiologico che si sviluppa quando aumenta il volume polmonare. Parker *et al.* (1984) riscontrarono un aumento del coefficiente di filtrazione capillare ed una diminuzione della pressione capillare isogravimetrica (la massima pressione idrostatica capillare per la quale il polmone non incrementa il suo peso) in polmoni isolati di cane, perfusi con sangue e ventilati con livelli di pressioni massime tra i 45 ed i 65 cmH<sub>2</sub>O, corrispondenti a volumi molto superiori alla

capacità polmonare totale. In questo esperimento, solo una volta superati i 30 cmH<sub>2</sub>O si verificava un immediato aumento del coefficiente di filtrazione capillare, suggerendo l'esistenza di un valore soglia, raggiunto il quale l'endotelio capillare diventa permeabile sia ai piccoli che ai grossi soluti. In realtà, successivi studi dimostrarono che non esiste un vero valore soglia in quanto già a 9,3 cmH<sub>2</sub>O di PIP il coefficiente di filtrazione di polmoni isolati di ratto incrementava (Olmor *et al.*, 1993). I differenti risultati possono essere spiegati dalle diverse specie utilizzate, è infatti noto che polmoni di animali di piccola taglia, come i ratti, sono più sensibili al volutrauma rispetto ai polmoni di animali di grossa taglia, come i cani o gli agnelli (Dreyfuss e Saumon, 1998). Un buon metodo sperimentale per valutare la presenza di edema da aumentata permeabilità è la marcatura dell'albumina con Iodio 125, somministrato per via endovenosa. Dreyfuss *et al.* (1985) rilevarono un aumento di questo composto dopo 20 minuti di ventilazione assistita con PIP pari a 45 cmH<sub>2</sub>O in ratti intatti. Inoltre, evidenziarono un aumento del contenuto polmonare di acqua extravascolare e del peso del polmone una volta dissanguato. Tali dati confermarono l'insorgenza di edema da aumentata permeabilità capillare secondaria a lesioni sviluppatesi a livello endoteliale. Parker *et al.* (1990) focalizzarono la loro attenzione sulla *clearance* delle proteine e sul rapporto tra proteine plasmatiche e linfatiche. In animali ventilati con valori di PIP elevata i parametri erano incrementati significativamente dopo due ore di ventilazione.

Le indagini istologiche, effettuate sia al microscopio elettronico che ottico, confermarono la natura dell'edema sviluppatosi in corso di volutrauma. Webb e Tierney (1974) rilevarono un'intensa eosinofilia del versamento polmonare dei campioni analizzati, proponendo una sua natura di tipo proteico. Inoltre, la presenza di discontinuità nelle cellule alveolari e di "blebs" dovuti al distacco delle cellule endoteliali della membrana basale, non lasciarono dubbi sull'origine dell'edema legato alla ventilazione meccanica (Dreyfuss *et al.*, 1985).

– Incremento della permeabilità dell'epitelio alveolare

Oltre alla permeabilità endoteliale, in corso di ventilazione meccanica, anche la permeabilità epiteliale viene compromessa. Cooper *et al.* (1987) valutarono l'effetto dose-dipendente che l'utilizzo della pressione positiva espiratoria (PEEP) e l'incremento del volume polmonare generavano sulla *clearance* polmonare dell'acido di-etilen-triamino-pentacetico marcato con Tecnezio 39 m (99mTc-

DTPA) aerosolizzato. Questi autori ventilarono un gruppo di pecore con livelli crescenti di PEEP, riscontrando un aumento progressivo della *clearance* di questo composto per valori di PEEP superiori a 5 cmH<sub>2</sub>O. Gli stessi risultati sono stati ottenuti in un esperimento analogo svolto su soggetti umani da Marks *et al.* nel 1985. Per quanto riguarda i grossi soluti, come le proteine, è stato riscontrato un aumento della permeabilità a queste molecole in numerosi studi. Nel 1976, Egan *et al.* evidenziarono che la permeabilità dell'epitelio alveolare aumentava se un lobo polmonare veniva sottoposto ad un'espansione statica, dopo essere stato isolato e perfuso con una soluzione salina contenente soluti ad alto peso molecolare (albumina, urea, mannitolo, inulina e saccarosio). I risultati mostrarono come, ad un aumento di PIP e ad un incremento di gas somministrato, il raggio dei pori epiteliali aumentasse in modo direttamente proporzionale e che, arrivati ad un volume di ventilazione simile alla capacità polmonare totale (TLC), corrispondesse un netto movimento di liquido all'interno degli alveoli. In un successivo esperimento del 1980, lo stesso *team* di ricerca confermò i precedenti risultati ed evidenziò come ad una riduzione del volume di gas non corrispondesse una riduzione del raggio del poro, suggerendo un'irreversibilità del processo. Risultati analoghi furono ottenuti su polmoni isolati di rana toro utilizzando molecole marcate radioattivamente. Il raggio dei pori aumentava in maniera statisticamente significativa soltanto nel momento in cui venivano raggiunti valori pari alla TLC (Kim e Crandall, 1982). Quindi, mentre l'incremento della permeabilità per i piccoli soluti è sempre presente durante l'espansione polmonare, la filtrazione dei grossi soluti aumenta solo per incrementi del volume oltre i valori della TLC, durante l'insufflazione statica (Dreyfuss e Saumon, 1998).

A seguito dei numerosi studi, la comunità scientifica ha concordato che la presenza di edema in corso di volutrauma sia causata da un aumento della permeabilità della barriera alveolo-capillare.

### 2.3.2. INATTIVAZIONE DEL TENSIOATTIVO

Mentre le gravi alterazioni a carico della permeabilità della barriera alveolo-capillare in corso di edema indotto dalla ventilazione meccanica sono ormai inconfutabili, i meccanismi ad essa sottesi rimangono ancora poco chiari. In

particolare, come precedentemente sottolineato, l'entità del danno polmonare può variare a seconda della durata e del grado di sovradistensione. Certamente, dato estremamente rilevante è l'alterazione delle proprietà del surfattante (Dreyfuss e Saumon, 1998).

La maggiore suscettibilità alla VILI è stata ampiamente dimostrata in polmoni privati artificialmente del tensioattivo, sia attraverso la somministrazione di sostanze inibenti, come il diottil-solfo-succinato (Coker *et al.*, 1992), sia sottoponendo gli animali ad anestesia prolungata (Ward e Nicholas, 1992). Al contrario, la somministrazione di tensioattivo a conigli nati prematuri, e quindi deficitarii di surfattante, prima che questi fossero sottoposti a ventilazione assistita, ha ridotto la presenza di lesioni epiteliali alveolari confrontati ad un gruppo di controllo ventilato meccanicamente (Nilsson *et al.*, 1980).

L'inattivazione del tensioattivo incrementa la tensione superficiale degli alveoli più piccoli, provocandone il collasso e creando aree disomogenee nel parenchima polmonare, con conseguente ventilazione non uniforme e sovradistensione di determinate zone. In queste zone, la tensione superficiale incrementa la trazione radiale sui capillari polmonari alterando la permeabilità degli stessi (Albert *et al.*, 1979). Inoltre, a causa dell'interdipendenza polmonare, la coesistenza di alveoli collassati con alveoli distesi provoca una innaturale ed aumentata trazione sulla parete degli alveoli espansi, con conseguente danno all'epitelio alveolare (Mead *et al.*, 1970).

La ventilazione meccanica riduce le proprietà del tensioattivo attraverso due meccanismi. Innanzitutto, in animali ventilati è stato osservato un aumento del rilascio di surfattante dalle cellule alveolari di tipo II (Faridy *et al.*, 1966; Massaro e Massaro, 1983). L'aumento della quantità di surfattante provoca un suo spostamento dagli alveoli alle piccole vie aeree nel momento in cui l'alveolo riduce le proprie dimensioni durante l'espiazione, diventando più piccolo dell'area occupata dal tensioattivo stesso (Wyszogrodski *et al.*, 1975; Faridy, 1976). All'inspirazione successiva, le molecole di tensioattivo perse nelle vie aeree non potranno essere sostituite in quanto le cellule epiteliali di tipo II hanno esaurito il loro contenuto e non sono in grado rigenerarlo in tempo così ridotto. Ne consegue una diminuzione di surfattante ed un incremento della tensione superficiale (Verbrugge *et al.*, 2007).

Un secondo meccanismo è dato dalla trasformazione delle molecole a grandi aggregati (LA) del tensioattivo in piccoli aggregati (SA). Gli LA sono elementi funzionalmente attivi del surfattante, in quanto contengono strutture lipoproteiche, come la mielina tubulare, e corpi lamellari. Al contrario gli SA non hanno alcuna proprietà tensioattiva, contenendo piccole vescicole a contenuto lipidico (Yamada *et al.*, 1990). Sono stati effettuati nel corso degli anni numerosi studi che hanno confermato la capacità della ventilazione meccanica di trasformare LA in SA (Savov *et al.*, 1999; Verbrugge *et al.*, 1998; Veldhuizen *et al.*, 1996), in particolare riducendo considerevolmente la quantità di dipalmitoilfosfatidilcolina (DPCC) presente nel tensioattivo, il fosfolipide più importante, dal punto di vista funzionale, del surfattante stesso (Veldhuizen *et al.*, 2001).

### 2.3.3. CAPILLARY STRESS FAILURE

Le alterazioni dell'epitelio alveolare e dell'endotelio capillare a livello di barriera gas-ematica (*blood gas barrier*, BGB) a seguito di un notevole incremento della pressione trasmurale ( $P_{tm}$ ), condizione conosciuta anche come *capillary stress failure*, potrebbero contribuire alla formazione di edema in corso di VILI.

La BGB è costituita da epitelio alveolare, endotelio capillare e dalla fusione delle due membrane basali. A carico di essa agiscono forze quali la tensione circonferenziale capillare, direttamente proporzionale al raggio ed alla  $P_{tm}$  capillare ed inversamente proporzionale allo spessore della parete vasale; la tensione longitudinale del capillare, causata dalla distensione polmonare; e la tensione superficiale alveolare, legata alla presenza del tensioattivo polmonare (West *et al.*, 1991).

Costello *et al.* (1992), dopo aver sottoposto polmoni di coniglio isolati e perfusi a  $P_{tm}$  capillare crescente, da 12,5 a 75,5 cmH<sub>2</sub>O, analizzarono campioni istologici al microscopio elettronico ed evidenziarono numerose rotture epiteliali, quasi totalmente intracellulari. Al contrario, le giunzioni intercellulari risultarono integre, sottolineando la loro elevata resistenza, che tuttavia potrebbe compromettere l'elasticità delle cellule vicine. Studi successivi evidenziarono il legame tra lesioni a carico della BGB e differenti volumi tidalici, infatti, ad un aumento di  $V_T$  corrispondeva un aumento del numero di lesioni per mm di endotelio (Fu *et al.*, 1992).

Come durante la VILI, anche in corso di *capillary stress failure* il danno è reversibile se non c'è stata lisi cellulare (Dreyfuss *et al.*, 1992). Durante la VILI è stata accertata la presenza di *blebs* endoteliali, ovvero una delle alterazioni più frequenti presenti in corso di edema da sovradistensione, non riscontrata in corso di *capillary stress failure* (Tsukimoto *et al.*, 1991; Costello *et al.*, 1992). A livello microscopico, il rigonfiamento, la lisi delle cellule epiteliali e la formazione di membrane ialine non sono mai stati rilevati in esperimenti con elevati valori di  $P_{tm}$ . Ulteriore discrepanza tra i due fenomeni è il fatto che, in corso di VILI, la durata della ventilazione meccanica influisce negativamente sul danno polmonare, mentre la perfusione prolungata ad elevati livelli di  $P_{tm}$  non aumenta la gravità delle lesioni a carico della BGB (Dreyfuss *et al.*, 1985).

Nonostante alcune sostanziali differenze, appare chiaro come VILI e *capillary stress failure* siano due manifestazioni correlate dell'insufficienza polmonare dovuta alla ventilazione meccanica (Dreyfuss e Saumon, 1998).

#### 2.3.4. IL CIRCOLO VIZIOSO

Appare quindi evidente che il trauma indotto dalla ventilazione meccanica sia conseguente all'insorgenza di un edema polmonare, attraverso l'inattivazione del tensioattivo ed allo *stress failure* a livello capillare, con versamento alveolare (Dreyfuss e Saumon, 1998). Inoltre, una volta instauratosi l'edema, la situazione tende ad aggravarsi, in quanto il numero di alveoli distendibili si riduce ulteriormente, causando una sovradistensione regionale delle zone polmonari rimaste sane. Questo fenomeno tende a creare un circolo vizioso, in cui aree sane diventano aree lesionate. Inoltre, le lesioni presenti a livello di barriera alveolo-capillare scatenano una risposta infiammatoria, destinata a provocare un *biotrauma* a livello locale e, successivamente, sistemico.

#### 2.3.5. MECCANOTRASDUZIONE

Negli ultimi anni, l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata su come le cellule avvertano lo stimolo meccanico dovuto alla VILI ed in che modo questo venga convertito in segnali biochimici all'interno della cellula. Tale fenomeno viene denominato *meccanotrasduzione* (Dos Santos e Slutsky, 2000). Forze meccaniche

importanti per la struttura e la funzionalità polmonare sono la gravità, il movimento, le forze osmotiche, l'interazione tra le cellule e/o la matrice cellulare. Apparentemente esistono tre meccanismi di trasduzione dello stimolo meccanico: l'esistenza di canali ionici sensibili allo stiramento, la diffusione attraverso lacerazioni della membrana plasmatica e la trasformazione conformazionale di strutture citoscheletriche (Fig. 2.3.5.1).

L'esistenza di canali ionici del  $\text{Ca}^{2+}$  e del  $\text{K}^+$  attivati dallo stiramento è riconosciuta da anni (Sachs, 1986), ma l'approfondimento del loro ruolo in rapporto alla VILI è successivo. Sembra che questi canali, attivati da un cambiamento conformazionale, siano fondamentali nello sviluppo e nella fisiologia polmonare (Liu *et al.*, 1999). Parker *et al.*, nel 1998 e nel 2000, testarono l'effetto di vari composti, quali inibitori dei canali cationici indotti dallo stiramento, inibitori della calmodulina ed inibitori della protein-chinasi C, sulle alterazioni della permeabilità della BGB conseguenti alla ventilazione meccanica. Tali composti, che prevengono l'influsso o l'utilizzo di  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrarono la capacità di diminuire la perdita di fluidi dai capillari durante il volutrauma. Studi svolti da Waters *et al.* nel 1999 suggerirono un coinvolgimento anche della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nello sviluppo dell'edema legato alla ventilazione meccanica.

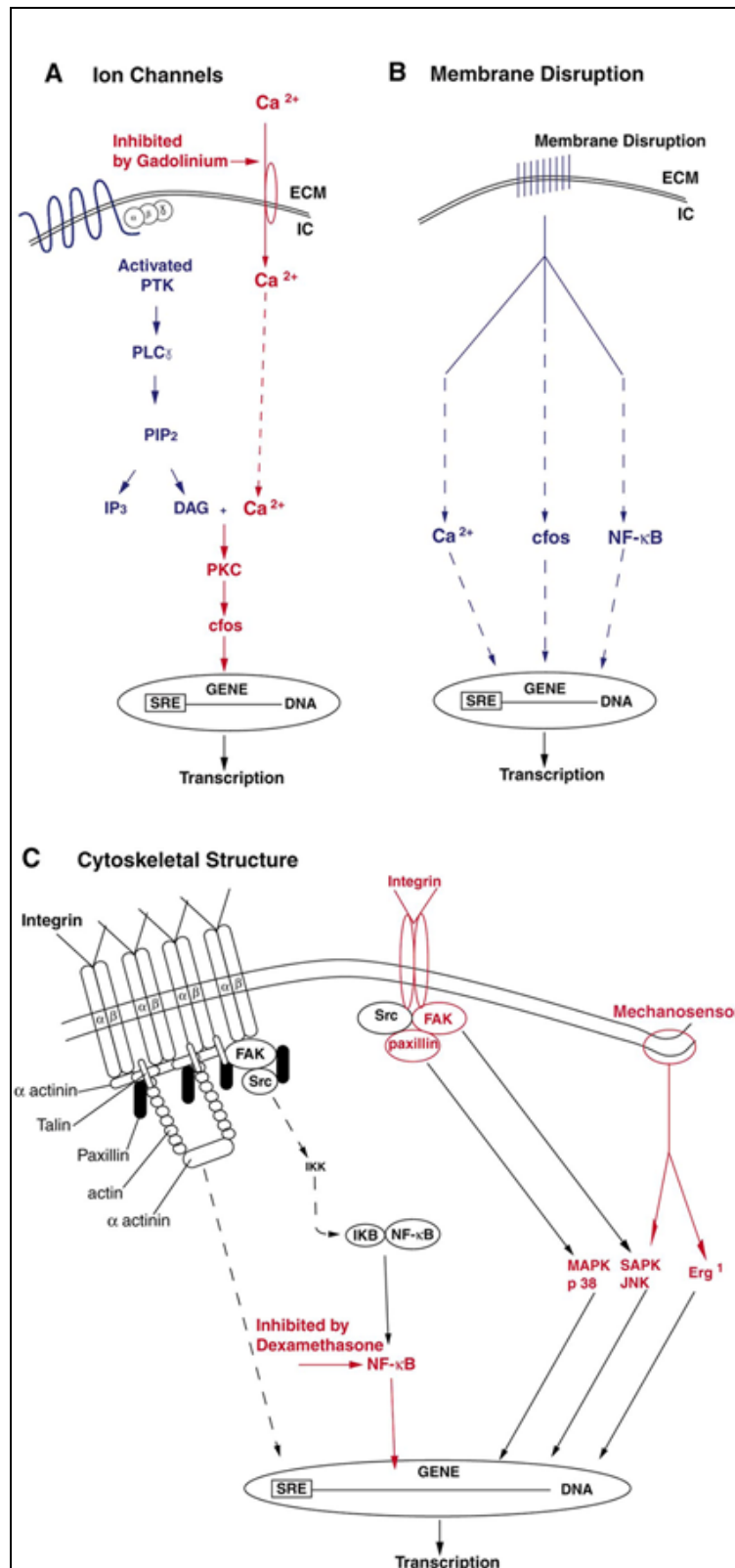
La distruzione della membrana plasmatica risulta essere una situazione determinante nella trasduzione dello stimolo meccanico. Hinman *et al.* (1997) dimostrarono come fosse proprio dai margini della lacerazione della membrana plasmatica delle cellule alveolari di II tipo che iniziava l'incremento di influsso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , provenienti sia dall'esterno della cellula che dai depositi intracellulari di questo ione. L'aumento della concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  nelle zone lesionate determina un aumento della concentrazione di questo ione anche nelle cellule limitrofe, scatenando la cascata di reazioni biochimiche che conduce alla VILI.

In ultimo, è plausibile che l'organizzazione strutturale e le connessioni del citoscheletro siano le responsabili della meccano-trasduzione durante il volutrauma. Sembra che questo fenomeno avvenga a livello di particolari complessi di adesione focale, localizzati sulla membrana plasmatica (Dos Santos e Slutsky, 2000). Gli stimoli meccanici determinerebbero l'attivazione di meccano-cettori e/o di integrine, molecole a stretto contatto con le chinasi adesive focali (FAK), le quali attiverrebbero a loro volta, a seguito di vie metaboliche non ancora chiarite, fattori di trascrizione come le Egr-1 (*Early growth response*



*factor-1*) e le MAPK (*mitogen-activating protein kinases*). In questo modo viene espresso il fattore nucleare kB (NF-kB), fondamentale nella genesi e nella propagazione della risposta delle citochine alla VILI, in quanto risponde alle forze di stiramento nella sua regione promotrice (Dos Santos e Slutsky, 2000). L'NF-kB regola la sintesi di numerose citochine attraverso la fosforilazione di una molecola inibitrice, IκB. La fosforilazione dell'IκB, dovuta all'aumento di Ca<sup>2+</sup> che incrementa l'attività della protein-chinasi, smaschera la regione nucleare che favorisce il trasporto all'interno del nucleo dell'NF-kB promuovendo la sintesi delle citochine e l'inizio della cascata infiammatoria (Dos Santos e Slutsky, 2000).

In questo modo il *volutrauma* si sviluppa in *biotrauma*.



**Fig. 2.3.5.1.** Ipotesi possibili per la meccanotrasduzione: a) attivazione di canali ionici del Ca<sup>2+</sup> e del K<sup>+</sup>, b) presenza di rotture della membrana plasmatica, c) trasformazione conformazionale di strutture citoscheletriche.

## 2.4. BIOTRAUMA

Il termine *biotrauma* si riferisce al danno causato dall'instaurarsi della cascata infiammatoria durante la VILI. Nonostante le lesioni primarie siano dovute prettamente ad un danno di tipo meccanico, questo, in seguito, nell'organismo si traduce, attraverso la meccanotrasduzione, in un insulto di tipo biologico determinato dall'attivazione di cellule infiammatorie e dal rilascio di citochine a livello locale e sistemico.

### 2.4.1. RUOLO DELLE CELLULE INFIAMMATORIE

Nei grossi animali, come il maiale, il cane o anche l'uomo, al contrario degli animali da laboratorio, la VILI si sviluppa in tempi decisamente più lunghi. Infatti, nei ratti la ventilazione meccanica provoca un aumento della permeabilità della barriera alveolo-capillare già dopo 2-5 minuti di trattamento (Dreyfuss *et al.*, 1985, 1992), mentre l'insorgenza delle medesime lesioni nei grossi animali richiede alcune ore di ventilazione assistita. La breve durata degli esperimenti svolti su piccoli animali da laboratorio non consente il massiccio reclutamento delle cellule infiammatorie, reperto caratteristico del volutrauma nei grossi animali (Dreyfuss e Saumon, 1998). Già nel 1972, Woo e Hedley-White riscontrarono la presenza di leucociti a livello capillare ed un aumento dei macrofagi all'interno degli alveoli di polmoni ventilati meccanicamente.

Il ruolo dei macrofagi alveolari nello sviluppo della VILI è molto importante, infatti producono chemochine e citochine, ossido d'azoto e specie reattive dell'ossigeno, e forniscono un richiamo chemotattico per i neutrofili. La loro attivazione durante la ventilazione assistita è stata dimostrata da numerosi studi *in vitro* ed *in vivo*. Pugin *et al.*, nel 1998 elaborarono un modello *in vitro* nel quale cellule polmonari, epiteliali, endoteliali ed infiammatorie potessero essere stirate ciclicamente, mimando la ventilazione meccanica. Dal supernatante delle varie colture evidenziarono come i macrofagi, a seguito di uno stress da stiramento, producessero elevate quantità di citochine, quali TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6. Tali risultati furono confermati da numerosi studi *in vivo* (Withehead *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2006), che permisero di evidenziare la presenza di *marker* di attivazione

macrofagica e leucocitaria dopo trattamenti con la ventilazione assistita, quali gli antigeni di membrana CD14 e ICAM-1 (Moryiyama *et al.*, 2004; Imanaka *et al.*, 2001).

Frank *et al.*, nel 2006, dimostrarono che lo stiramento delle cellule epiteliali durante il volutrauma, attraverso la secrezione di mediatori solubili, contribuisce alla produzione da parte dei macrofagi di nitriti, i prodotti dell'interazione tra il monossido d'azoto e le specie reattive dell'ossigeno. È noto che i macrofagi secernono ossido d'azoto (NO) per modulare la risposta delle cellule epiteliali di II tipo allo stiramento (Hirano *et al.*, 1998). L'NO ha proprietà antiapoptotiche e proapoptotiche, a seconda della concentrazione che raggiunge negli alveoli, tanto che l'utilizzo di composti donatori di azoto come l'S-nitroso-N-acetil-D, L-penicillamina (SNAP), protegge le cellule alveolari di II tipo dall'apoptosi indotta dallo stiramento, finché la sua concentrazione non raggiunge livelli pari a 0.5 mM, tuttavia, una volta superato questo valore soglia, determina un incremento della morte cellulare (Edwards *et al.*, 2000). Nonostante i macrofagi rivestano un ruolo molto importante, non sono le uniche cellule coinvolte nello sviluppo del volutrauma, dato che la loro deplezione farmacologica non previene il danno polmonare (Frank *et al.*, 2006). Tra le cellule presenti, la ventilazione meccanica determina un incremento del numero di neutrofili a livello polmonare (Marcos *et al.*, 1993; Loick *et al.*, 1993). Probabilmente, l'aumento del tempo di permanenza dei polimorfonucleati nel circolo polmonare in corso di ventilazione assistita è dovuto alla loro adesione alla membrana basale denudata a causa della deformazione meccanica (Dreyfuss e Saumon, 1998). Molti studi hanno dimostrato che la ventilazione meccanica ad elevati volumi tidali, oppure la privazione di tensioattivo, determinano un incremento di granulociti neutrofili nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) degli animali utilizzati, e che queste cellule producono maggiori quantità di specie reattive dell'ossigeno, favorendo la morte cellulare (Sugiura *et al.*, 1994; Matsouka *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 1994). Studi successivi hanno però dimostrato che l'attivazione macrofagica è precedente a quella neutrofilica; infatti i macrofagi, secernendo chemochine, attraggono i neutrofili, favorendo il reclutamento di questi dal sangue circolante (Belperio *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006).

#### 2.4.2. RUOLO DEI MEDIATORI INFIAMMATORI

Le cellule infiammatorie hanno un ruolo molto importante nell'evoluzione della VILI, secernendo svariati tipi di citochine. I ricercatori, nel corso degli anni, hanno focalizzato l'attenzione sui mediatori coinvolti nella genesi del biotrauma.

Per quanto concerne l'implicazione del trombossano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e delle prostacicline nella modulazione delle resistenze vascolari durante l'edema indotto dalla ventilazione meccanica i dati sono discordanti (Bowton e Kong, 1989; Imai *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1990; Verbrugge *et al.*, 1999).

Il  $TNF-\alpha$  sembra non essere coinvolto nella genesi del biotrauma, infatti, studi in vivo svolti su animali sottoposti a ventilazione meccanica, pur generando un grave edema polmonare, non mostravano un incremento di questo mediatore (Ricard *et al.*, 2001; Verbrugge *et al.*, 1999). Tuttavia, alcuni studi hanno evidenziato la presenza di  $TNF-\alpha$  mRNA in cellule presenti nel BAL di animali privati di tensioattivo (Takata *et al.*, 1997). Tali risultati sono tuttavia contrastanti (Imanaka *et al.*, 2001).

Di maggior rilievo il ruolo della proteina infiammatoria dei macrofagi (MIP-2), la corrispondente murina all'interleuchina 8 umana, mediatore ad attività chemotattica per i neutrofili, costantemente prodotta in tutti i modelli sperimentali di VILI proposti da diversi gruppi di ricerca, la quale aumenta in associazione a IL-1, IL-6 e di  $TNF-\alpha$  (Tremblay *et al.*, 1997; D'angelo *et al.*, 2001).

Anche l'IL-1 ha un ruolo importante nello sviluppo del biotrauma, infatti non solo aumenta, come precedentemente visto, ma è stato evidenziato come l'utilizzo di un antagonista ricombinate del recettore per l'IL-1 riduca la gravità del danno polmonare in conigli ventilati con elevati valori di PIP e privati di tensioattivo (Narimanbekov e Rozycki, 1995).

In conclusione, nonostante alcuni studi discordanti, sembra che la ventilazione meccanica possa stimolare la produzione di MIP-2, o del suo equivalente umano IL-8, di IL-6, IL-1 e  $TNF-\alpha$ .

#### 2.4.3. RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI

Negli ultimi anni gli studiosi che si occupano di VILI hanno indagato il ruolo di queste endopeptidasi, chiamate anche matrixine, nello sviluppo dell'edema e

dell'enfisema associato al volutrauma. Esistono diversi tipi di metalloproteinasi (MMP), ma le più studiate nell'ambito del danno polmonare da ventilazione meccanica sono la MMP-2 e MMP-9. Già D'Ortho *et al.* valutarono nel 1994 l'attività delle MMP e dell'elastasi in un modello di danno polmonare acuto (ALI) indotto dalla somministrazione intratracheale di lipopolisaccaridi (LPS), rilevando un incremento dell'attività della MMP-9 nel BAL degli animali utilizzati e scoprendo che questa endopeptidasi era secreta sia dai macrofagi alveolari che dai polimorfonucleati neutrofili. Gushima *et al.*, nel 2001, dimostrarono, in un modello sperimentale in cui era stata indotta ipossia, che l'attività della MMP-9 era correlata in modo statisticamente significativo al rapporto tra la tensione d'ossigeno arteriosa e l'ossigeno inspirato ed al rapporto tra il peso umido ed il peso asciutto del polmone (indice di edema polmonare), al numero di neutrofili nel BAL ed ai rilievi patologici di danno alveolare diffuso. La possibilità che queste molecole siano coinvolte nell'evoluzione della VILI è stata suggerita dalla scoperta di elevate concentrazioni polmonari di MMP-2 e del suo mRNA in ratti ventilati con PIP di 35 cmH<sub>2</sub>O (Pardo *et al.*, 1996). Foda *et al.*, nel 2001, dimostrarono che l'utilizzo di elevati volumi tidalici in corso di ventilazione assistita determinava lesioni polmonari accompagnate da una *up-regulation* dell'mRNA messaggero per le gelatinasi A e B, con un incremento della concentrazione di queste due MMP nel BAL dei ratti presi in esame. Inoltre, nello stesso studio, è stato dimostrato come l'utilizzo di un inibitore delle MMP, in questo caso il Prinomastad, riducesse in modo statisticamente significativo il rapporto tra peso umido e secco del polmone e la concentrazione proteica nel BAL dei soggetti ventilati con alti V<sub>T</sub>. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Kim *et al.*, nel 2006, in uno studio in cui furono utilizzati bassi (7 ml/kg) ed elevati (30 ml/kg) volumi tidalici ed un inibitore delle MMP. Tali risultati hanno sottolineato come l'inibizione della MMP-9 determinasse una riduzione della migrazione neutrofila a livello polmonare, riducendo il danno polmonare e rendendolo paragonabile a quello sviluppatosi in animali ventilati con ridotti volumi polmonari. Uno studio recente ha ribadito come l'inibizione della MMP-9 tramite doxiciclina riducesse il danno polmonare indotto dall'utilizzo di elevati volumi tidalici in un modello sperimentale murino, risultando quindi in una possibile applicazione terapeutica in corso di VILI (Doroszko *et al.*, 2010).

#### 2.4.4. RUOLO DELL'ENDOTELINA-1

L'endotelina-1, o ET-1, noto vasocostrittore i cui recettori si concentrano maggiormente a livello polmonare (Clement *et al.*, 1998), viene prodotta dall'endotelio e rilasciata in circolo in seguito a vari tipi di stress polmonari, ad esempio in corso di COPD (malattia polmonare cronica ostruttiva) del cavallo (Benamou *et al.*, 1999). Fisiologicamente viene liberata durante l'esercizio fisico intenso, come dimostrato da studi effettuati su cavalli sottoposti a sessioni di lavoro su *treadmill* (McKeever *et al.*, 2002). Numerosi modelli sperimentali hanno permesso di evidenziare l'aumento di concentrazione plasmatica di ET-1 in corso di ALI e lo stretto legame tra la gravità della patologia e l'aumento della concentrazione di questa molecola: infatti, in studi condotti da Kuklin *et al.* (2005) e Geiger *et al.* (2008), la somministrazione di inibitori dell'endotelina-1 determinava un miglioramento delle condizioni dei pazienti in modelli sperimentali di ALI. Donaubauer *et al.* (2006) confermarono tale ipotesi anche in maiali privati di tensioattivo a cui venne somministrato un inibitore dell'ET-1. Questa condizione è molto simile a quella che si sviluppa in corso di VILI: infatti, la diminuzione delle proprietà del surfattante è un elemento chiave nella genesi del volutrauma. Nakano *et al.*, nel 2007, quantificarono la concentrazione di ET-1 su campioni bioptici polmonari di pazienti con ARDS, precisamente sul fluido ricoprente l'epitelio (ELF). In tali campioni le concentrazioni di ET-1 risultarono significativamente maggiori rispetto a pazienti non affetti da ARDS. La concentrazione proteica dell'ELF, in qualità di *marker* della permeabilità della barriera alveolo-capillare, è strettamente correlata alla quantità dell'ELF stessa, suggerendo che l'ET-1 agisca sulla corretta ossigenazione non solo attraverso la sua attività vasocostrittoria, ma anche attraverso un incremento della permeabilità della barriera alveolo-capillare. Recentemente, Lai *et al.*, nel 2010, hanno dimostrato un incremento della concentrazione di ET-1 nel siero e nel tessuto polmonare in un modello canino di VILI. In particolar modo i soggetti ventilati con elevati volumi tidalici (20 ml/kg) mostravano dei livelli di ET-1 significativamente maggiori rispetto ai soggetti ventilati con volumi tidalici minori (6 e 10 ml/kg), confermando ulteriormente lo stretto legame tra VILI ed ET-1.

#### 2.4.5. DAL BIOTRAUMA ALLA SINDROME DA INSUFFICIENZA MULTIORGANO

La ventilazione meccanica promuove l'aumento della concentrazione di citochine a livello polmonare ed il loro rilascio in circolo. Tale processo è definito come perdita della compartimentalizzazione, ovvero la risposta infiammatoria sviluppatasi in una sede dell'organismo non resta più confinata, come nel caso della VILI, all'interno dello spazio alveolare, ma si estende al resto dell'organismo (Verbrugge *et al.*, 2007). Numerosi studi hanno dimostrato il legame tra ventilazione meccanica ad elevati volumi, e quindi volutrauma, e sindrome da insufficienza multiorgano (MOFS). I primi studi che evidenziarono questo fenomeno furono effettuati nel 1998 da von Bethmann *et al.*, i quali evidenziarono un rilascio di TNF- $\alpha$  e IL-6 nel perfusato ottenuto da polmoni isolati e ventilati meccanicamente con elevati volumi tidalici e pressione negativa intermittente. Haitzma *et al.*, nel 2000, evidenziarono, in polmoni di ratti ventilati con elevati valori di PIP e danneggiati tramite l'instillazione intratracheale di LPS, la liberazione di TNF- $\alpha$  in un primo tempo a livello delle aree polmonari non lesionate, successivamente nel torrente circolatorio. Ranieri *et al.*, nel 1999 ventilarono due gruppi di pazienti affetti da ARDS con ventilazione ad elevati e bassi volumi tidalici ed evidenziarono come molte citochine, tra cui TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, presentassero concentrazioni plasmatiche ridotte nei pazienti ventilati con bassi  $V_T$ . La perdita di compartimentalizzazione che avviene per le citochine può essere causata anche da batteri e tossine batteriche, come dimostrato nel 1977 da Tilson *et al.*, in esperimenti che prevedevano l'inoculo di *Pseudomonas Aeruginosa*, e Verbrugge *et al.*, nel 1998, con *Klebsiella Pneumoniae*.

### 2.4. STRATEGIE VENTILATORIE PROTETTIVE

#### 2.5.1. UTILIZZO DI BASSI VOLUMI POLMONARI

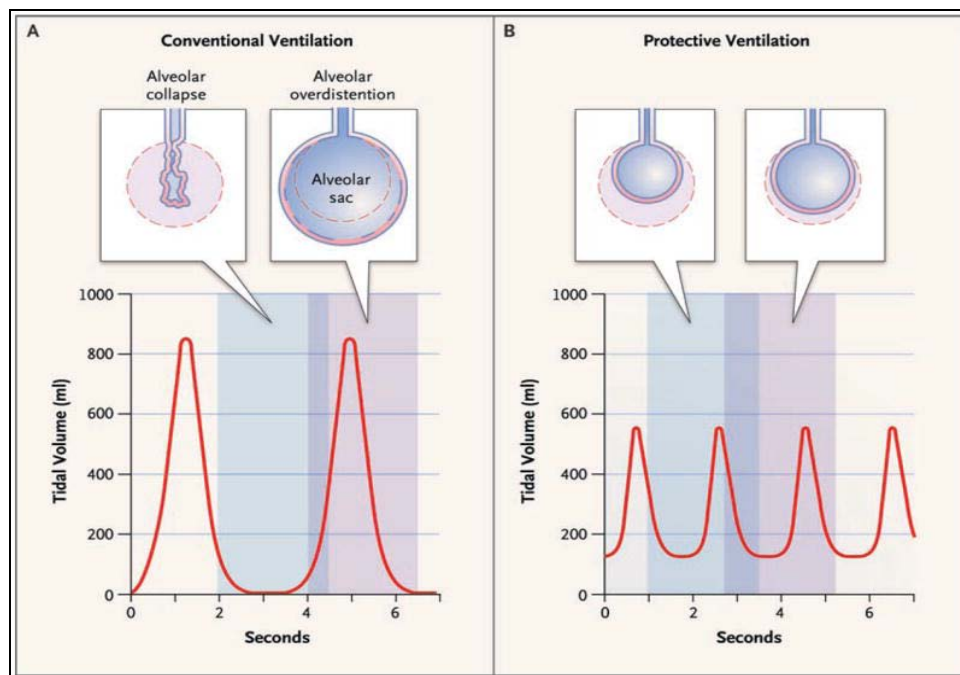
Una delle prime strategie messe in atto dai clinici, con evidente riduzione della mortalità dei pazienti e dei modelli sperimentali animali, è stata la diminuzione del volume tidalico applicato meccanicamente. I primi studi risalgono agli anni



'90 (Hickling *et al.*, 1990), quando la ventilazione a bassi volumi respiratori ridusse dal 39,6% al 16% la mortalità dei pazienti ricoverati in terapia intensiva in corso di ARDS (valutati secondo il sistema APACHE II – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*). Risultati analoghi, ovvero mortalità del 38% nel gruppo di pazienti ventilati con bassi  $V_T$  contro il 71% di mortalità nel gruppo ventilato con parametri convenzionali, furono confermati nel 1998 da Amato *et al.* In questo studio, inoltre, venne evidenziato come il barotrauma fosse presente solo nel 7% dei soggetti ventilati con bassi  $V_T$  contro il 42% dell'altro gruppo. Sebbene molti studiosi abbiano criticato questo lavoro per l'elevata mortalità del gruppo ventilato con valori convenzionali, è importante tenere presente che i pazienti presi in esame erano estremamente gravi. Negli anni successivi uno studio effettuato su 861 malati di ARDS e ALI, a cui furono somministrati  $V_T$  pari a 6 ml/kg (PIP <30 cmH<sub>2</sub>O) e 12 ml/kg (PIP 50cmH<sub>2</sub>O), ribadì, con risultati sorprendenti, l'effetto positivo dell'utilizzo di bassi volumi tidalici in pazienti sottoposti a ventilazione assistita (ARDS Network, 2000). Inoltre, in altri studi venne dimostrata una correlazione positiva tra alti livelli di  $V_T$  e concentrazione di citochine nel sangue e nel lavaggio bronco alveolare (BAL), quali IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Ranieri *et al.*, 1999; 2000).

Tuttavia, la ventilazione a bassi volumi tidalici dovrebbe essere attuata nel contesto di una più ampia strategia di gestione di un paziente con danno polmonare acuto o ARDS. Anche la FiO<sub>2</sub> (frazione inspirata di ossigeno) ottimale richiede un'attenta considerazione nel contesto di una ventilazione a bassi  $V_T$ , infatti, una delle caratteristiche dei pazienti affetti da ARDS è la grave ipossiemia: gli sforzi per migliorare l'ossigenazione e per raggiungere un *target* di saturazione arteriosa di ossiemoglobina di circa il 90% può inizialmente richiedere valori elevati di FiO<sub>2</sub>. Tuttavia, l'uso prolungato di alti livelli di FiO<sub>2</sub> può teoricamente aumentare il rischio di tossicità da ossigeno, con conseguenti lesioni polmonari. Un approccio potrebbe essere quello di utilizzare una PEEP adeguata per aumentare l'ossigenazione, ovviamente sempre accompagnata da un accurato monitoraggio (ARDS Network, 2000). Inoltre, un certo grado di ipercapnia è prevedibile con ventilazione a bassi  $V_T$ , tuttavia, dati sperimentali hanno suggerito che un aumento della PaCO<sub>2</sub> entro determinati *range* non solo è sicuro ma potenzialmente benefico, si parla infatti di ipercapnia permissiva (Malhotra *et al.*, 2007). L'*American College of Chest Physicians* sottolineò nel 1993 l'importanza

dell'uso di bassi  $V_T$  in pazienti con ARDS (Slutsky, 1993). Orientamenti successivi furono sviluppati dalla stessa *American College of Chest Physicians*, dall'*American Thoracic Society* e dalla *Critical Care Medicine Society*, le quali hanno indicato delle linee guida, pubblicate con il nome di *Surviving Sepsis Campaign*, nel 2004 (Dellinger *et al.*, 2004) (Fig. 2.5.1.1.). Il processo attraverso il quale le direttive vennero elaborate è stato ampiamente criticato, tuttavia le raccomandazioni in materia di ventilazione meccanica vennero accettate dalla comunità scientifica (Malhorta *et al.*, 2007). *Surviving Sepsis Campaign* approva le linee guida di ventilazione a bassi volumi (6 ml per kg di peso corporeo), con l'obiettivo di mantenere la pressione inspiratoria ad un *plateau* finale inferiore a 30 cm/H<sub>2</sub>O. L'ipercapnia è considerata accettabile in assenza di aumento della pressione intracranica. L'uso della PEEP è consigliato per prevenire il collasso alveolare e per mantenere un'adeguata ossigenazione (Dellinger *et al.*, 2004).



**Fig. 2.5.1.1.** Differenti effetti sugli alveoli determinati dalla ventilazione convenzionale (A) e da quella protettiva (B).

### 2.5.2. IPERCAPNIA PERMISSIVA

Come precedentemente accennato, l'ipercapnia, ovvero elevati livelli di pressione parziale arteriosa di CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>), è la diretta conseguenza dell'utilizzo di ridotti volumi respiratori in corso di ventilazione meccanica. In questo contesto, lo scopo principale della terapia di supporto è minimizzare il danno polmonare indotto dallo stress meccanico, come ad esempio la VILI. Il termine 'ipercapnia permissiva' è stato coniato nel 1990 da Hickling *et al.* in uno studio retrospettivo in cui venne evidenziata la riduzione della mortalità in pazienti in corso di ARDS in cui la pressione massima inspiratoria era mantenuta a 30 cmH<sub>2</sub>O rispetto a pazienti ventilati con parametri convenzionali. Infatti, la mortalità era del 16% nei pazienti appartenenti al primo gruppo rispetto alla mortalità del 40% del secondo gruppo. Nel primo gruppo i valori di PaCO<sub>2</sub> mostravano valori medi pari a 62 mmHg, con picchi che raggiungevano 129 mmHg, il tutto senza arrecare alcun danno al paziente preso in esame. Mentre la riduzione dei volumi tidalici è associata ad un incremento della sopravvivenza dei pazienti, l'ipercapnia può avere ruoli differenti (Peltekova *et al.*, 2010). Innanzitutto, anche l'ipercapnia permissiva risultante da una riduzione dei V<sub>T</sub> può contribuire ad aumentare la sopravvivenza dei pazienti (Laffey e Kavanagh, 2000). In secondo luogo, è stato ipotizzato che il deliberato incremento della CO<sub>2</sub>, ovvero l'ipercapnia terapeutica, agisca direttamente proteggendo dal danno d'organo, come dimostrato da diversi studi (Shibata *et al.*, 1998; Halbertsma *et al.*, 2008). In particolare, dati sperimentali dimostrarono come l'acidosi respiratoria, dovuta all'ipercapnia, determini una riduzione della permeabilità della barriera alveolo-capillare (Broccard *et al.*, 2001); riduca l'edema polmonare, la perdita di proteine e migliori l'ossigenazione del sangue (Laffey *et al.*, 2000); riduca l'infiltrazione neutrofilica, il danno tissutale dovuto ai radicali liberi e la genesi di ossido d'azoto (Laffey *et al.*, 2004).

Considerando che i pazienti affetti da ARDS nella maggior parte dei casi non decedono per insufficienza respiratoria, ma per insufficienza multiorgano, gli studi si sono ben presto rivolti all'analisi di altri organi oltre al polmone. A carico del sistema cardiaco, dopo un'iniziale riduzione della contrattilità del miocardio causata dall'acidosi respiratoria, la liberazione delle catecolamine determina un aumento della frequenza cardiaca, del volume telesistolico e telediastolico

(Kavanagh e Laffey, 2006). A livello encefalico, alcuni studi dimostrarono l'effetto protettivo dell'ipercapnia sulle cellule cerebrali dal danno da ri-perfusione dopo ischemia (Vannucci *et al.*, 1997; Barth *et al.*, 1998), tuttavia tali effetti benefici risultarono successivamente inversamente proporzionali alla percentuale della CO<sub>2</sub> nell'aria inspirata (Vannucci *et al.*, 2001), ovvero l'ipercapnia risulta terapeutica soltanto entro determinati valori. Inoltre, tale strategia non può essere applicata in pazienti con ipertensione intracranica in quanto ne determinerebbe un ulteriore incremento (Tasker e Peters, 1998). Numerosi studi si sono concentrati sull'effetto dell'ipercapnia permissiva sulla liberazione di citochine, dimostrando una riduzione nella produzione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Coakley *et al.*, 2002). Come precedentemente menzionato, l'ipercapnia determina un decremento della migrazione neutrofilica dal torrente circolatorio al tessuto polmonare, riducendo all'interno dei neutrofili l'espressione di selectine e di altre molecole di adesione intercellulare (Serrano *et al.*, 1996). Tuttavia, oltre agli effetti positivi dell'ipercapnia esistono effetti negativi potenzialmente gravi, tra i cui l'ipertensione polmonare o intracranica (Feihl e Perret, 1994); l'ipercapnia permissiva, infatti, dovrebbe essere usata con cautela in pazienti con malattie cardiache e, come già detto, è relativamente controindicata nei soggetti con elevata pressione intracranica (Peltekova *et al.*, 2010).

### 2.5.3. NUOVE FORME DI RIMOZIONE EXTRACORPOREA DI CO<sub>2</sub>

La ventilazione meccanica, come più volte ribadito, è uno strumento indispensabile e salvavita in numerose situazioni. L'insufficienza respiratoria acuta, ad esempio, è una condizione frequente che può essere scatenata da numerose patologie ad insorgenza acuta sia di origine polmonare che extra-polmonare. I pazienti colpiti da insufficienza respiratoria severa si presentano comunemente con una ridotta distensibilità del sistema respiratorio causata da edema tissutale e presenza di aree atelettasiche. Tali pazienti, il cui quadro clinico è caratterizzato da ridotta ossigenazione del sangue e livelli elevati di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), richiedono l'utilizzo dell'intubazione endotracheale e della ventilazione meccanica. Quest'ultima, a causa della ridotta distensibilità del sistema respiratorio, produce elevate pressioni polmonari. Tali pressioni causano,

a loro volta, un danno al tessuto polmonare che si va a sovrapporre al danno polmonare preesistente (Dreyfuss *et al.*, 1985; Hernandez *et al.*, 1989; Tsuno *et al.*, 1990; Carlton *et al.*, 1990). L'utilizzo di una ventilazione meccanica "gentile", utilizzando ridotte pressioni, può ridurre l'insulto meccanico sul polmone, ma inevitabilmente si accompagna ad elevati livelli ematici di CO<sub>2</sub>. Come precedentemente affermato, livelli contenuti di ipercapnia possono apportare benefici al paziente, tuttavia livelli estremamente elevati possono risultare dannosi. Di conseguenza, la rimozione extracorporea di CO<sub>2</sub> risulta una strategia terapeutica salvavita che consente di effettuare la ventilazione "gentile", mantenendo la CO<sub>2</sub> entro limiti accettabili, anche nei pazienti più compromessi. Poiché il polmone artificiale può rimuovere solo la CO<sub>2</sub> fisicamente disciolta nel sangue, che ammonta a meno del 10% del totale (l'80% è presente come ione bicarbonato), per rimuovere l'intera CO<sub>2</sub> prodotta da un uomo adulto risulta necessario un elevato (circa 2 litri/min) flusso di sangue extracorporeo, tale da rendere questa procedura di competenza di pochi centri ad elevata specializzazione, grazie all'ECMO (*ExtraCorporal Membrane Oxygenation*) (Chan *et al.*, 2008; Lequier *et al.*, 2008; Peek *et al.* 2009). Tecnicamente l'ECMO è formata da un sistema costituito da una pompa che ha lo scopo di immettere nel circolo sistemico il sangue che viene ossigenato da un apposito ossigenatore, integrante del sistema stesso. Semplificando, il sangue venoso del paziente raggiunge l'ossigenatore tramite una cannula posizionata nel distretto venoso (vena femorale o atrio destro); l'ossigenatore ossigena il sangue che, tramite la pompa, viene restituito al paziente mediante una cannula posizionata nel distretto arterioso (arteria femorale o aorta ascendente). L'ECMO è, quindi, un intervento non terapeutico, ma di supporto, che mantiene il cuore e/o i polmoni a riposo permettendo così il loro recupero funzionale (Skinnet *et al.*, 2006). Di conseguenza, negli anni, svariati studi si sono focalizzati sull'individuazione di strategie mirate ad incrementare e ottimizzare la rimozione di CO<sub>2</sub> da bassi flussi extracorporei di sangue, tale da rendere la rimozione extracorporea di CO<sub>2</sub> una strategia sicura, mini-invasiva e altamente efficace. Diversi studi hanno teorizzato una strategia che prevede di incrementare l'estrazione extracorporea di CO<sub>2</sub>, sfruttando la sua più grande riserva ematica: il bicarbonato.



Attraverso l'acidificazione del sangue, l'equilibrio bicarbonato-CO<sub>2</sub> viene forzato in direzione della CO<sub>2</sub>, incrementando la pressione parziale di anidride carbonica ed ottenendo, al passaggio del sangue nel polmone artificiale, un incremento della capacità di rimozione della CO<sub>2</sub>. Tale metodica è stata ad oggi resa possibile mediante l'utilizzo di acidi organici metabolizzabili, nello specifico di acido lattico, la cui infusione, titolata sulla capacità di *clearance* del corpo, ha permesso di raggiungere l'equilibrio tra quantità infusa e metabolizzata (Zanella *et al.*, 2009). Nel corso degli anni numerosi studi hanno dimostrato tale ipotesi. Snider *et al.*, nel 1987, infusero con 2-8 mEq/min di acido lattico (0,25 e 0,5N) una pecora sveglia collegata ad un by-pass artero-venoso (flusso ematico di 500 ml/min e flusso gassoso di 4 l/min) ed evidenziarono un incremento del 120-170% della velocità di trasferimento della CO<sub>2</sub> da una base di 60 ml/min. Tuttavia durante l'infusione di 8 mEq/min di acido lattico 0,5N venne rilevata un'imponente emolisi, la quale venne ridotta notevolmente, ma con i medesimi risultati di aumento della velocità di trasferimento, utilizzando 5 Eq/min di acido lattico. Infatti, Zanella *et al.*, in uno studio sperimentale nel suino effettuato nel 2009, raggiunsero la massima rimozione di CO<sub>2</sub> con l'infusione di 5 Eq/min di acido lattico, ed il raggiungimento di un pH pari a 7.51±0.14. L'aggiunta di un acido non solo consente di incrementare la rimozione di CO<sub>2</sub>, ma tampona anche l'alcalosi respiratoria.

È inoltre ipotizzabile l'uso di altri acidi organici come l'acido citrico ed acetico, oppure di acidi minerali forti (es. acido cloridrico) che, non essendo metabolizzabili, dovrebbero essere rimossi artificialmente dal sangue.

La tecnica di rimozione extracorporea di CO<sub>2</sub>, così semplificata e meno invasiva, potrebbe essere usata in anticipo rispetto alle terapie convenzionali, allo scopo di evitare l'intubazione, la ventilazione meccanica e le complicazioni ad esse associate.

## 3.DANNO POLMONARE INDOTTO DA IPOSSIA O STRESS IPOSSICO

### 3.1. VASOCOSTRIZIONE POLMONARE IPOSSICA (HPV)

La circolazione polmonare è una circolazione ad alto flusso ed a bassa resistenza, che, normalmente, può ospitare elevati aumenti della gittata cardiaca, come avviene per esempio durante l'esercizio fisico, mantenendo ai minimi livelli l'incremento della pressione arteriosa. Questa condizione è resa possibile grazie alla distensione vasale, al reclutamento di vasi ed al basso tono della sottile parete muscolare che riveste le arteriole polmonari (Rounds e Hill, 1984).

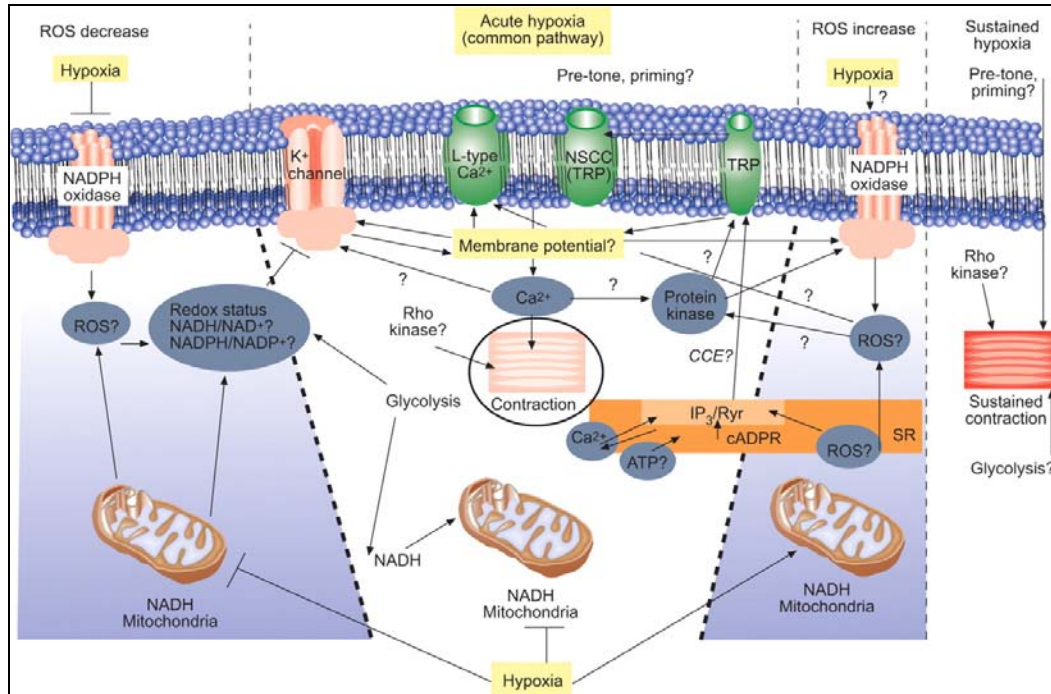
Anomalie strutturali e /o funzionali del letto vascolare polmonare sono associate ad una condizione nota come ipertensione polmonare (IP), caratterizzata da un aumento della pressione arteriosa polmonare media (MPAP) e/o delle resistenze vascolari polmonari (RVP) (Hall e Haworth, 1992). L'ipertensione polmonare si può verificare come disordine primario delle arterie polmonari o può essere secondaria ad una varietà di patologie cardiache e respiratorie. L'IP secondaria è molto comune e la sua incidenza riflette la frequenza delle patologie che la determinano, mentre quella primaria, detta anche idiopatica, è rara (Rounds e Hill, 1984).

L'ipossia è una delle principali cause di ipertensione polmonare. In condizioni ipossiche le arterie del circolo sistemico e polmonare mostrano due comportamenti in netto contrasto tra loro: le arterie sistemiche si dilatano per soddisfare le esigenze metaboliche dei tessuti periferici, mentre le arterie polmonari rispondono all'ipossia mediante elevata vasocostrizione. La vasocostrizione polmonare ipossica (IPV) è un meccanismo omeostatico altamente conservativo, il cui scopo fisiologico è quello di contribuire al mantenimento di un corretto rapporto ventilazione/perfusione polmonare, deviando il flusso di sangue verso le aree più ricche di ossigeno. Questo principio, conosciuto anche con il nome di meccanismo di von Euler-Liljestrand, permette di ottimizzare lo scambio gassoso a livello dell'interfaccia sangue-aria. Tuttavia, quando l'ipossia alveolare è ampiamente diffusa, come in patologie quali l'enfisema e la fibrosi cistica, la vasocostrizione polmonare ipossica porta ad

ipertensione polmonare e a una generalizzata vasocostrizione della vascolarizzazione polmonare, che determina l'induzione di un processo di rimodellamento vascolare con conseguente ipertrofia cardiaca destra e *cor pulmonale* (Sommer *et al.*, 2008).

La vasocostrizione polmonare ipossica viene guidata dalla risposta intrinseca all'ipossia di due diversi tipi cellulari, le cellule muscolari lisce delle arterie polmonari e le cellule endoteliali. In condizioni ipossiche, in tali cellule viene inibita la fosforilazione ossidativa mitocondriale e ciò in parte ne media l'attivazione. Nel caso delle arterie polmonari, la vasocostrizione viene indotta dall'aumento della concentrazione di calcio all'interno della cellula muscolare liscia e dal rilascio da parte dell'endotelio arterioso di mediatori che, aumentando la sensibilità dell'apparato contrattile al calcio, determinano un'ulteriore contrazione della muscolatura liscia vasale (Mark, 2007) (Fig. 2.1.1.).





**Fig. 2.1.1.** Pathway coinvolti nella vasocostrizione polmonare ipossica. L'ipossia acuta risulta in un incremento del calcio intracellulare nelle cellule muscolari lisce delle arterie polmonari, determinandone la contrazione. Questo incremento deriva da un influsso di calcio extracellulare attraverso i canali del calcio del plasmalemma e dal rilascio di calcio intracellulare immagazzinato. Gli effetti ipossici possono essere mediati o modulati da una riduzione (lato sinistro) o un aumento (lato destro) delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NSCC: nonspecific cation channels; TRP: transient receptor potential; NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; CCE: capacitative calcium entry; ATP: adenosine triphosphate; IP<sub>3</sub>: inositol triphosphate; cADPR: cyclic ADP-ribose; SR: sarcoplasmic reticulum. (Sommer *et al.*, 2008).

### 3.2. DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Quando la funzione compensatoria della risposta cellulare viene meno, diventando al contrario un elemento dannoso per l'ospite, non si può parlare di attivazione endoteliale bensì di disfunzione. La disfunzione endoteliale è l'evento fisiopatologico chiave alla base dell'ipertensione polmonare (Van Beers *et al.*, 2003; Szmitko *et al.*, 2003). Tale condizione in corso di ipertensione polmonare è caratterizzata dall'aumento dei livelli circolanti di endotelina-1 (ET-1), un peptide di derivazione endoteliale con attività vasocostrittrice ed importanti proprietà mitogene. Una sua produzione locale può contribuire ai disordini vascolari associati a questa patologia, quali l'aumento del tono vasale o l'abnorme proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete delle arterie polmonari (Giaid *et al.*, 1993).

Un altro importante indice di disfunzione endoteliale è rappresentato dall'alterazione del *pathway* dell'ossido di azoto (NO), con conseguente riduzione del rilascio o della disponibilità di NO e, quindi, una riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente (Celermajer *et al.*, 1993). L'NO endogeno è prodotto da un'ampia varietà di cellule del tratto respiratorio, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Ricciardolo *et al.*, 2004), dove regola importanti funzioni quali:

- Il tono delle vie respiratorie: i sistemi colinergici ed adrenergici controllano il tono broncomotore insieme al sistema NANC (non adrenergico non colinergico), il quale media la contrazione, ossia l'effetto eccitatorio, o il rilassamento, ossia l'effetto inibitorio, della muscolatura liscia dell'albero respiratorio (Bredt *et al.*, 1990; Stretton *et al.*, 1991). Recenti evidenze hanno dimostrato che l'ossido di azoto è un neurotrasmettitore del sistema NANC, ad effetto inibitorio (Barnes e Belvisi, 1993); in particolare viene rilasciato dalla terminazione nervosa periferica ad opera dell'enzima nNOS, attivato dall'entrata di calcio che si verifica in seguito alla depolarizzazione (Bredt e Snyder, 1990).
- La secrezione di muco e di elettroliti: l'NO endogeno stimola la secrezione delle ghiandole sottomucose (Nagaki *et al.*, 1995), interviene nel meccanismo che determina la secrezione di mucina (Adler *et al.*, 1995),

partecipa alla regolazione della motilità ciliare (Jain *et al.*, 1995) e regola il movimento ionico transepiteliale attraverso la modulazione dei canali ionici (Duszyk e Radomski, 2000). Conseguentemente, eventuali alterazioni della sua formazione ed azione possono giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi delle patologie respiratorie.

- La circolazione polmonare e bronchiale: il rilascio di NO, da parte delle cellule endoteliali del distretto polmonare, sembra in grado di regolare il tono vascolare basale e di contrastare la vasocostrizione ipossica (Persson *et al.*, 1990) e diminuisce in condizioni di ipossia cronica; l'isoforma eNOS è presente nell'endotelio dei vasi polmonari, ma la sua espressione viene limitata in pazienti con ipertensione polmonare primaria, suggerendo che la vasocostrizione polmonare e l'aumento dello spessore della muscolatura liscia dei vasi polmonari, caratteristiche di questa patologia, siano associate ad una insufficiente espressione di eNOS (Giaid e Saleh, 1995).

### 3.3. RUOLO DEI LEUCOCITI

L'esposizione prolungata, giorni o settimane, a basse concentrazioni di ossigeno, siano esse persistenti o intermittenti, determina, come già evidenziato, lo sviluppo di un'ipertensione polmonare cronica e di un rimodellamento vascolare polmonare, spesso caratterizzato da un ispessimento della tonaca media ed avventizia dei vasi dovuto a iperplasia ed ipertrofia cellulare, e ad un incremento delle proteine della matrice extracellulare. La presenza di un'infiltrazione leucocitaria in tessuti ischemici o ipossici è ben documentata. Molti studi hanno evidenziato l'incremento dell'espressione di mediatori infiammatori e del numero di macrofagi e neutrofili in polmoni di ratti e topi esposti ad ipossia acuta. In modo particolare è stata osservata una marcata induzione di citochine proinfiammatorie e chemochine: interleuchina-1 $\beta$ , interleuchina-6, *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein* (MIP-2) (Minamino *et al.*, 2001). Nel modello analizzato da Minamino non sembra coinvolto il TNF- $\alpha$ , citochina che caratterizza i modelli sperimentali in cui è presente un'inflammatione polmonare LPS-indotta, a sottolineare la possibilità

che l'ipossia induca un *network* di citochine e chemochine differenti dagli altri substrati infiammatori (Minamino *et al.*, 2001; Zampetaki *et al.*, 2003). Tuttavia ulteriori studi hanno evidenziato la presenza e l'incremento di questa citochina in modelli sperimentali di ipossia acuta (Weinberger *et al.*, 2000; Schoene *et al.*, 1988). Madjdpour *et al.* (2003) riportarono risultati analoghi ed evidenziarono un incremento nel numero di neutrofili e macrofagi a livello polmonare in associazione ad un aumento della fuoriuscita extravasale di albumina, indicando lo sviluppo di un lieve danno vascolare in risposta ad un insulto ipossico acuto.

Il reclutamento dei leucociti negli spazi polmonari o nella parete vasale può avere un significativo impatto sulla struttura e sulla funzionalità dei vasi sanguigni. Macrofagi attivati e/o neutrofili possono rilasciare fattori, quali le specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed enzimi proteolitici, in grado di determinare vasocostrizione ed aumento della permeabilità vascolare (Stenmark *et al.*, 2005). Inoltre, monociti e fibrociti polmonari circolanti possono contribuire alla modificazione delle cellule muscolari lisce ed allo stato proliferativo dei fibroblasti, nonché al fenotipo osservato in risposta all'esposizione ipossica cronica attraverso il rilascio di numerosi fattori di crescita (*vascular endothelial growth factor* – VEGF; *transforming growth factor*  $\beta$ 1 - TGF $\beta$ 1; *stromal cell derived factor* – SDF), in modo analogo alla proliferazione e differenziazione cellulare osservata nello sviluppo di forme tumorali (Stenmark *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2004).

### 3.4. RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI

Il rimodellamento della parete dei vasi polmonari periferici è un importante meccanismo patogenetico nello sviluppo di tutte le forme di ipertensione polmonare (IP). La maggior parte degli studi a riguardo è stata eseguita su animali e uomini esposti ad ipertensione indotta da ipossia (Herget *et al.*, 1978; Reid, 1986). La temporanea ipossia determina una ricostruzione strutturale reversibile delle arterie polmonari caratterizzata da 'muscolarizzazione' delle arterie prealveolari, ipertrofia ed iperplasia delle cellule muscolari lisce delle arterie periferiche, incremento del *turnover* del collagene nelle pareti arteriose, incremento della deposizione di proteine connettivali tissutali e loro

modificazione qualitativa (Frisdal *et al.*, 2001; Novotna e Herget, 2002). In studi ultrastrutturali su campioni di tessuto polmonare prelevati da pazienti colpiti da ipertensione polmonare, la lamina elastica interna, che normalmente separa la tonaca intima dalla media, mostrava un'evidente frammentazione con elastinolisi attiva (Rabinovitch *et al.*, 1986). Studi analoghi hanno evidenziato un incremento della sintesi di elastina associata a modificazioni della stessa con anomale proporzioni di accumulo, suggerendo un aumento del *turnover* (Todorovitch-Hunter *et al.*, 1988). È stata inoltre osservata l'alterazione della matrice extracellulare come risultato di un'attiva degradazione proteolitica del tessuto connettivale ad opera di enzimi specializzati, le metalloproteinasi (Tozzi *et al.*, 1998). Secondo l'*equipe* guidata da Frisdal (2001), le metalloproteinasi sono coinvolte nella progressione della IP: in primo luogo, attraverso l'azione di degradazione dei componenti della membrana basale, specialmente del collagene tipo IV, le MMP diventano promotori della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce e possono essere parte attiva del *turnover* del collagene tipo IV; secondariamente, le gelatinasi hanno proprietà elastinolitiche e, quindi, possono contribuire alla frammentazione delle fibre elastiche. Il rimodellamento della parete vasale in risposta ad uno stimolo dannoso coinvolge l'espressione delle MMP e, in particolar modo, le MMP-2 e 9 sono coinvolte nell'attivazione delle cellule muscolari lisce vasali e nella formazione della neointima, che caratterizza il rimodellamento vasale dopo un insulto (Bendeck *et al.*, 1994). Il rimodellamento ipossico delle arterie periferiche polmonari, come ipotizzato da Novotna *et al.* (2002), potrebbe essere considerato anche come un processo riparativo a seguito di un insulto da parte di radicali liberi alle pareti vasali nella fase precoce dell'esposizione ad un ambiente ipossico. Una fase importante di questo processo è l'incremento del *turnover* delle proteine di matrice, infatti, sebbene sia la degradazione che la neosintesi proteica siano incrementate, prevale la formazione di nuove fibre collagene. Il risultato è la fibrosi e la riduzione della *compliance* della parete dei vasi polmonari e, di conseguenza, l'insorgenza di ipertensione polmonare.

## 4.DANNO POLMONARE INDOTTO DA SHOCK SETTICO O STRESS SETTICO

### 4.1. INTRODUZIONE

La sepsi, la sepsi severa e lo shock settico rappresentano, in crescendo, gravi stadi di una risposta infiammatoria sistemica ad una grave infezione. I pazienti colpiti presentano un'elevata morbilità e mortalità, e permangono per tempi molto prolungati in terapia intensiva. La percentuale di mortalità pari al 40-60% non è variata negli ultimi 20 anni nonostante le ricerche avanzate ed i recenti progressi terapeutici. Uno studio del 2007 svolto in Germania su 454 unità di terapia intensiva, ha evidenziato una percentuale di casi di sepsi pari al 25% (Engel *et al.*, 2007). La frequenza di mortalità dei pazienti colpiti da sepsi severa (incluso lo shock settico) raggiunge negli ospedali e nelle unità di terapia intensiva rispettivamente il 48 ed il 55%. Le statistiche della *World Health Organization* hanno mostrato come, tra i più pericolosi killer di bambini (polmonite, sepsi neonatale, malaria e morbillo), l'80% delle morti in età infantile siano da attribuirsi alla sepsi (Skippen *et al.*, 2008). I pazienti colpiti da sepsi presentano un elevato rischio di sviluppare un'insufficienza respiratoria acuta, inoltre molti pazienti colpiti da sepsi severa e shock settico necessitano di intubazione endotracheale e ventilazione meccanica. Circa il 50% dei pazienti con sepsi severa svilupperà ALI/ARDS.

Per questi motivi, nel 2003, esperti di terapia intensiva e malattie infettive rappresentanti 11 organizzazioni internazionali hanno sviluppato delle linee guida per la corretta gestione dei pazienti colpiti da sepsi severa e shock settico con lo scopo di migliorare la prognosi di questa letale condizione patologica. Tale progetto ha preso il nome di *Surviving Sepsis Campaigns* (Dellinger *et al.*, 2004).

## 4.2. DEFINIZIONI

- Infezione

Una sospetta o provata (con colture positive, colorazioni tissutali, *polymerase chain reaction test*) infezione causata da patogeni o una sindrome clinica associata ad elevata probabilità di infezione. I segni di infezione includono risultati positivi a esami clinici, diagnostica per immagini, test di laboratorio.

- SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*)

Confermata dalla presenza di almeno due dei quattro seguenti criteri, uno dei quali deve essere temperatura anormale o alterata conta leucocitaria:

1. temperatura corporea  $>38.5$  °C o  $<36$ °C;
2. tachicardia, definita come frequenza cardiaca media  $\geq 2$  volte i valori normali per età in assenza di stimoli esterni, farmaci cronici, o stimoli dolorifici;
3. frequenza respiratoria media  $\geq 2$  volte oltre i valori normali per età o in ventilazione meccanica per un processo acuto non correlato ad una patologia neuromuscolare;
4. conta leucocitaria elevata o depressa rispetto alla media per l'età del soggetto, non compresa leucopenia secondaria indotta da chemioterapia.

- Sepsì:

1. Sepsì: SIRS in presenza o come risultato di sospetta o provata infezione;
2. Sepsì severa: sepsì più almeno una delle seguenti condizioni: disfunzione cardiovascolare, ARDS, due o più altre disfunzioni d'organo;
3. Shock settico: sepsì e disfunzione cardiovascolare, caratterizzato da un'ipotensione refrattaria alla fluido terapia (Fig. 4.2.1).

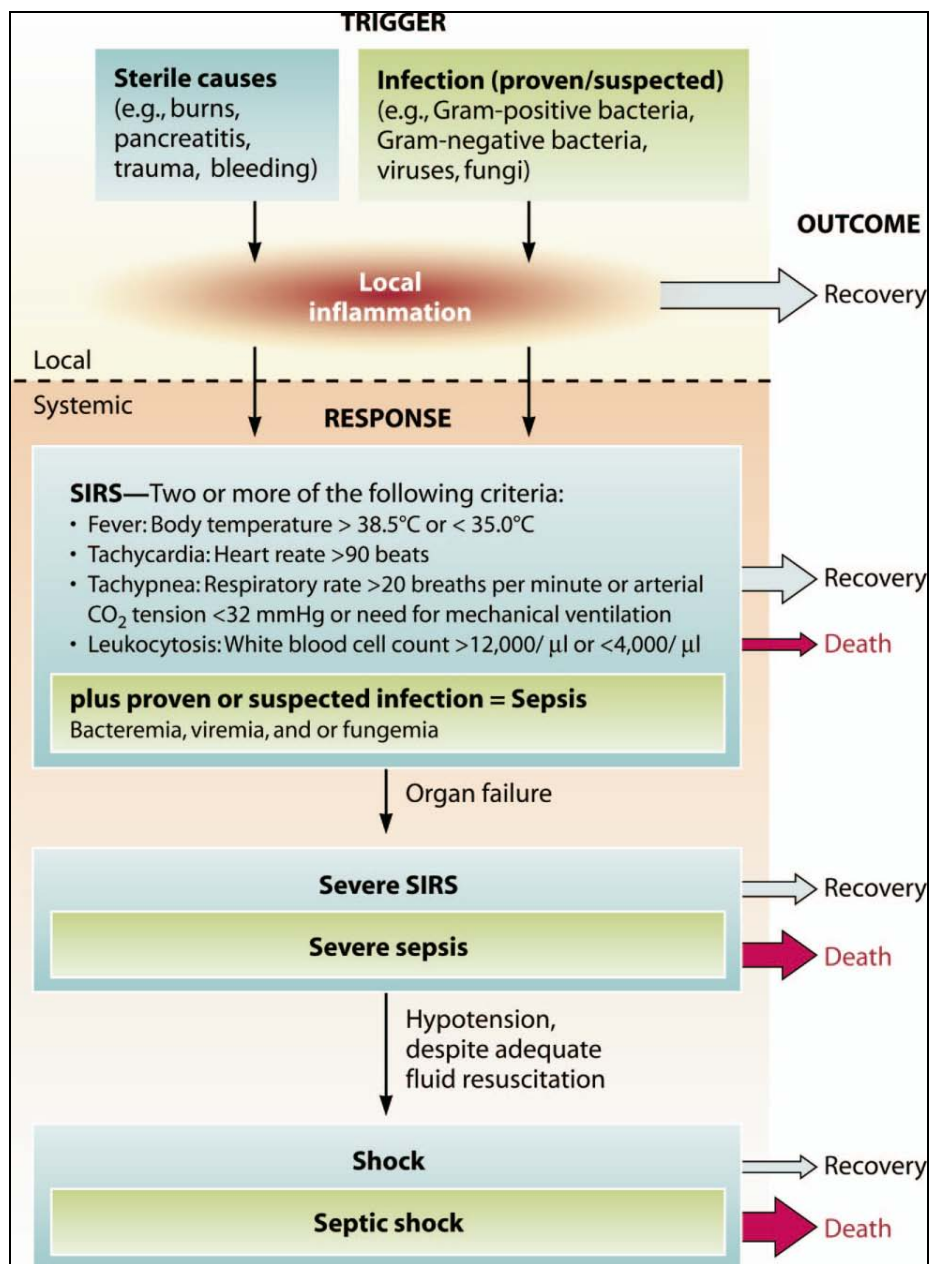


FIG. 4.2.1. Definizioni generali.



### 4.3. LA SEPSI

La sepsi e lo shock settico rappresentano la condizione finale comune di molte patologie che portano alla disabilità ed alla morte. Il termine sepsi si riferisce ad un ampio spettro di disordini fisiopatologici e clinici, che derivano da una iniziale infezione e batteriemia fino alla sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), sepsi generalizzata, sepsi severa, shock settico e shock settico refrattario (Levy *et al.*, 2003). Inoltre, la definizione di sepsi è ulteriormente qualificata dalla risposta alla terapia e dall'incremento della gravità, inclusa la refrattarietà ai fluidi, resistenza alla dopamina, resistenza all'adrenalina, resistenza e refrattarietà agli steroidi (Carcillo e Fields, 2007). La base fisiopatologica dello shock settico è determinata dall'incapacità del sistema cardiovascolare di fornire risorse energetiche (ATP) ai tessuti che le necessitano. Questa carenza di ATP può essere determinata da una carenza nel trasporto di ossigeno o glucosio. La classificazione dello shock, infatti, in ipossico, anemico, ischemico e glucopenico riflette l'insufficiente produzione e disponibilità di ATP stesso.

### 4.4. SVILUPPO DELLA SEPSI

La sepsi si sviluppa quando l'iniziale, appropriata risposta dell'ospite ad un'infezione si amplifica perdendo ogni tipo di regolazione. Clinicamente, la fase iniziale è spesso insidiosa: è possibile osservare febbre, confusione mentale, ipotensione transitoria, oliguria o inspiegabile citopenia. Se non trattato, il paziente può sviluppare insufficienza respiratoria o renale, alterazioni della coagulazione ed ipotensione grave e refrattaria. I siti più comuni di infezione sono i polmoni, la cavità addominale, il tratto urinario. Nel 60% dei casi, la sepsi è determinata da batteri Gram-negativi, e quindi dalle loro endotossine, primo tra tutti il lipopolisaccaride (LPS), mentre nel restante 40% da Gram-positivi (Cohen, 2002).

A seguito dell'iniziale interazione tra ospite e patogeno, che nel caso dell'LPS avviene a livello del complesso recettoriale (TLR4)-MD2-CD14, presente in svariati tipi cellulari tra cui macrofagi e cellule dendritiche (Miller *et al.*, 2005), vi

è una diffusa attivazione della risposta immunitaria innata, finalizzata a coordinare la risposta difensiva coinvolgendo componenti umorali e cellulari. Le cellule mononucleate giocano un ruolo chiave, rilasciando le classiche citochine proinfiammatorie IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , insieme ad altre citochine come IL-12, IL-15, IL-18 ed altre molecole. TNF- $\alpha$  e IL-1, le tipiche citochine che mediano molti degli aspetti immunopatologici dello shock indotto da LPS (Dinarello, 1997), sono rilasciate durante i primi 30-90 minuti di esposizione ad LPS ed a loro volta attivano un secondo livello di cascata infiammatoria che include altre citochine, mediatori lipidici e specie reattive dell'ossigeno; inoltre determinano una *up-regulation* delle molecole di adesione cellulare.

Oltre a ciò, le citochine hanno un ruolo determinante nell'induzione degli effetti procoagulanti tipici della sepsi. Disordini nella coagulazione sono molto comuni in questa patologia, infatti il 30-50% di pazienti colpiti da gravi forme di sepsi mostrano coagulazione intravasale disseminata (Levi e ten Cate, 1999). Il *pathway* coagulativo viene attivato da LPS o altri componenti patogeni, i quali inducono l'espressione di fattori tissutali nei mononucleati e nelle cellule endoteliali. I fattori tissutali a loro volta attivano una serie di cascate proteolitiche che portano alla conversione della protrombina in trombina e quindi del fibrinogeno in fibrina. Simultaneamente, i normali meccanismi di fibrinolisi aumentano a causa degli elevati livelli plasmatici di PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*). Questo processo porta alla deposizione di coaguli di fibrina nei piccoli vasi sanguigni, inadeguata perfusione tissutale e insufficienza d'organo. Le citochine proinfiammatorie come IL-1 e IL-6 stimolano la coagulazione, mentre IL-10 regola la coagulazione attraverso l'inibizione dell'espressione del fattore tissutale dei monociti (Cohen, 2002). Inoltre è presente una *down-regulation* di due proteine anticoagulanti: antitrombina e proteina C.

Questa grave situazione viene ulteriormente aggravata dallo sviluppo di apoptosi dei linfociti. Un'imponente apoptosi linfocitaria, infatti, è stata osservata in diversi modelli animali ed è presente in pazienti colpiti da sepsi (Hotchkiss R. S. *et al.*, 1999).

La causa finale di morte in pazienti con sepsi è l'insufficienza multiorgano. Il paziente inizialmente sviluppa insufficienza in un singolo organo, ma successivamente questa si espande a livello sistemico. La patogenesi della disfunzione d'organo è multifattoriale e non completamente spiegata.

L'ipoperfusione tissutale e l'ipossia sono fattori dominanti. Il meccanismo coinvolge deposizione diffusa di fibrina che causa occlusione microvascolare, formazione di essudato tissutale che compromette l'adeguata ossigenazione, disordini nell'omeostasi vascolare con conseguente sintesi di sostanze vasoattive come PAF, istamina e prostanoidi. Infiltrati cellulari, particolarmente neutrofilo, danneggiano i tessuti attraverso il rilascio di enzimi lisosomiali e radicali liberi derivati dal superossido. Il TNF- $\alpha$  ed altre citochine incrementano l'espressione delle iNOS (NO sintasi inducibile), aumentando la produzione di NO con conseguente instabilità vascolare e contribuendo direttamente alla depressione miocardica tipica della sepsi (Landry e Oliver, 2001). L'ipossia tissutale riflette il debito d'ossigeno che si sviluppa durante la sepsi (Cohen, 2002).

Il risultato finale della sepsi, quindi, è un'alterata regolazione della cascata infiammatoria che porta ad un danno endoteliale, coagulazione diffusa, attività fibrinolitica anomala, disturbi nella microcircolazione, depressione miocardica, disfunzione d'organo ed incremento della suscettibilità alle infezioni nosocomiali (Fig. 4.4.1).

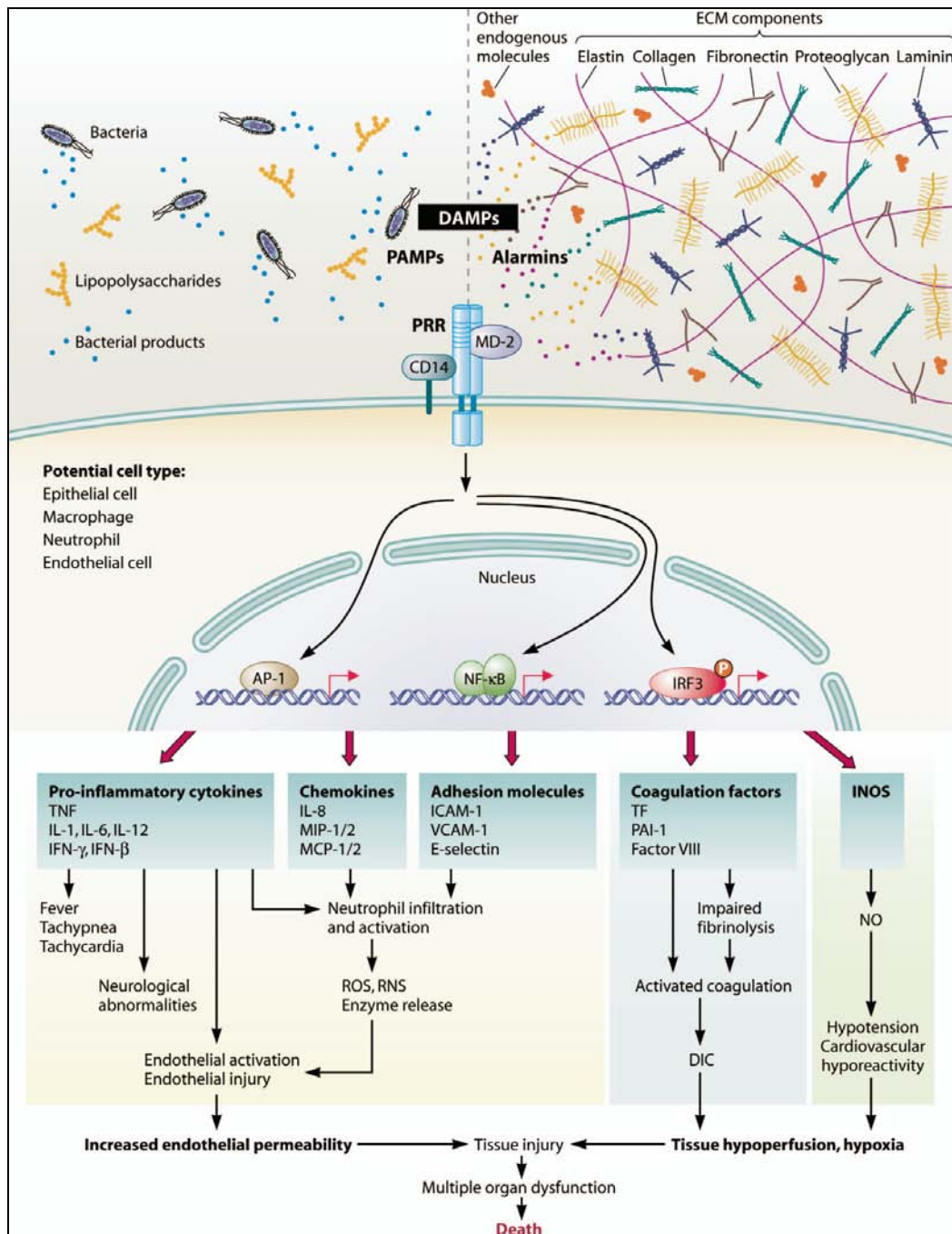


FIG. 4.4.1. I maggiori *pathway* e mediatori infiammatori della sepsi e le relative condizioni.

#### 4.5. MICROCIRCOLAZIONE E DISFUNZIONE MITOCONDRIALE

La fase iniziale della sepsi è caratterizzata da vasodilatazione e deplezione del volume intravascolare, per incremento della permeabilità capillare e per perdite esterne, con conseguente riduzione della portata e della gittata cardiaca. Questa situazione è aggravata da una depressione miocardica e, potenzialmente, determina disequilibrio tra domanda e apporto di ossigeno in vari organi (Dyson *et al.*, 2007). La somministrazione di fluidi durante la sepsi precoce incrementa l'apporto di ossigeno agli organi e migliora le conseguenze cliniche. Tuttavia, lo sforzo di incrementare l'apporto di ossigeno attraverso i fluidi e la somministrazione di dobutamina durante la sepsi con danno d'organo non sempre mostra benefici e può risultare potenzialmente pericolosa (Rudiger *et al.*, 2008). Alterazioni della microcircolazione, documentate in pazienti con shock settico (De Backer *et al.*, 2002), possono portare ad un'ulteriore riduzione nell'apporto di ossigeno ai tessuti. All'interno delle cellule, i mitocondri richiedono ossigeno per la produzione di ATP, per i processi di fosforilazione ossidativa. I mitocondri vengono danneggiati dall'insulto infiammatorio, che fa seguito all'infezione, sia da un punto di vista strutturale che funzionale (Brealey *et al.*, 2002). La disfunzione mitocondriale indotta dalla sepsi sembra che abbia come sia determinata dalla diretta inibizione del complesso di enzimi respiratori, con conseguente incremento di ossido nitrico e dei suoi metaboliti, i perossinitriti, e danno derivante dall'azione delle specie reattive dell'ossigeno. Questo danno è ulteriormente aggravato dall'inibizione dei meccanismi di difesa intra-mitocondriali (riduzione del glutatione e superossido dismutasi) (Rudiger *et al.*, 2008).

#### 4.6. RUOLO DEI NEUTROFILI

L'elevata natura proapoptotica dei neutrofili è finalizzata a mantenere l'equilibrio tra effetti antimicrobici ed il potenziale danno associato alla loro azione nella difesa dell'organismo in corso di sepsi o in altri processi patologici come traumi o ischemia (Brown *et al.*, 2006). Il danno tissutale nella sepsi severa può portare ad

una serie di meccanismi inclusa l'attivazione prematura dei neutrofili durante la migrazione, il rilascio extracellulare di molecole citotossiche e di tossine durante l'azione microbica, il danneggiamento di cellule dell'organismo ospite. Quindi, al fine di massimizzare la difesa dell'organismo e minimizzare il danno tissutale, la risposta neutrofilica è finemente regolata. L'interazione tra leucociti ed endotelio, che può contribuire al danno indotto dall'infiammazione, coinvolge molecole d'adesione, selectine ed integrine (Cinel e Opal, 2009). I neutrofili contribuiscono alla coagulazione del sangue in infiammazioni localizzate e nella sepsi generalizzata (Brown *et al.*, 2006). Durante l'infiammazione sistemica, i meccanismi dell'omeostasi sono compromessi a livello di microcircolazione, in particolare è possibile osservare attivazione endoteliale, deposizione di fibrina, occlusione microvascolare e presenza di essudato cellulare che impedisce un'adeguata ossigenazione. I neutrofili partecipano a queste modificazioni attraverso il loro aumentato trasporto nelle pareti dei vasi sanguigni e attraverso la formazione di aggregati piastrine-leucociti (Astiz *et al.*, 1995). Inoltre, I neutrofili contribuiscono alla sintesi ed alla secrezione di metalloproteinasi (MMP-9 e MMP-8) a seguito di uno stimolo di tipo infiammatorio (Vanlaere e Libert, 2009). Il danno tissutale mediato dai neutrofili indotto dalla sepsi è stato dimostrato in vari organi inclusi polmoni, diaframma, rene, intestino e fegato (Cinel e Opal, 2009).

#### 4.7. AZIONE DEL LIPOPOLISACCARIDE (LPS)

In alcuni casi, i patogeni infettano direttamente le cellule (Folk e Box, 2000), ma, più comunemente, strutture della parete batterica attivano specifici recettori sulla superficie delle cellule, come nel caso del lipopolisaccaride (LPS), un componente dell'*envelope* esterno della parete dei batteri Gram-negativi (Roberts, 1996). Durante l'infezione, l'LPS viene rilasciato in circolo con conseguente stimolo del complesso recettoriale (TLR4)-MD2-CD14 sulle cellule circolanti (Miller *et al.*, 2005). Le cellule in cui i recettori TLR4 costitutivi non sono presenti, come le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce vascolari, rispondono all'LPS interagendo con il CD14 solubile (Cohen, 2002). Il legame tra LPS e CD14 attiva i recettori, aumentando la trascrizione dei geni deputati alla risposta infiammatoria

ed immunitaria, e determinando la traslocazione dell'NF-kB al nucleo, con conseguente attivazione dei promoter dei geni per le citochine (Miller *et al.*, 2005). La stimolazione del *pathway* dell'NF-kB porta ad un'aumentata trascrizione di numerose citochine proinfiammatorie, quali TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , prostaglandine ed NO. Tramite un'azione autocrina e paracrina queste ed altre citochine amplificano la risposta dell'ospite verso i patogeni. La produzione incontrollata di citochine media molti degli eventi immunopatologici indotti nello shock dall'infezione, stimolando un ampio spettro di risposte secondarie che includono, come precedentemente detto, alterazione della coagulazione, reattività vascolare, adesione cellulare e contrattilità del miocardio.

Studi *in vitro* che prevedevano l'aggiunta di LPS e/o citochine a cellule endoteliali evidenziarono una riduzione della sintesi di trombomodulina (TM), un anticoagulante endogeno, ed un aumento dell'espressione del PAI-1, inibitore della fibrinolisi (Bevilacqua *et al.*, 1985). In un modello murino di endotossemia, la somministrazione di LPS determinò una riduzione della TM nel polmone e nel cervello, ma non nel rene, suggerendo una variabilità nell'espressione di TM durante la sepsi nei vari distretti dell'organismo (Weiler *et al.*, 2001). Uno studio condotto da Yanada *et al.*, nel 2002, dimostrò come la somministrazione di LPS in topi *wild-type* aumentasse i livelli di fibrina in rene, fegato e miocardio.

#### 4.8. RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI

Inizialmente considerate unicamente come importanti elementi nel rimodellamento della matrice extracellulare, alle metalloproteinasi di matrice (MMP) sono stati recentemente attribuiti un elevato numero di substrati, target non di matrice, quali recettori di superficie cellulare, citochine, chemochine, molecole di adesione cellula-cellula, fattori di coagulazione ed altre proteinasi (Stamenkovic *et al.*, 2003). La caratterizzazione di questi nuovi substrati ha dimostrato l'importanza di queste endopeptidasi in numerosi processi fisiologici e patologici, tra cui l'infiammazione e di conseguenza la sepsi (Vanlaere e Libert, 2009). Molte condizioni patologiche sono caratterizzate da un'aumentata espressione di MMP, suggerendo come la loro fine regolazione genica sia un punto critico nel mantenimento dell'omeostasi. La scoperta dei meccanismi di

regolazione genica delle matrixine potrebbe identificare un interessante nuovo *target* terapeutico.

Numerosi studi hanno dimostrato come l'espressione delle MMP sia indotta da *Clamidia* e da batteri Gram-negativi, quali *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ed *Escherichia* (Vanlaere e Libert, 2009). LPS induce la trascrizione di vari geni di MMP e molti gruppi di studio hanno analizzato tale espressione. L'incremento dell'espressione delle MMP dopo la somministrazione di LPS suggerisce come queste proteasi possano influenzare la patogenesi dell'endotossemia. In modo particolare, Albert *et al.*, nel 2003, osservarono come MMP-9 venisse rilasciata dopo somministrazione di LPS a volontari sani. In seguito, un incremento dei livelli di pro-MMP-9 e pro-MMP-2, così come della forma attiva della MMP-9, fu rilevato nel plasma di due pazienti con sepsi da Gram-negativi. I livelli di MMP erano relazionati alla gravità della sepsi stessa (Pugin *et al.*, 1999). In studi clinici con pazienti in shock settico, Nakamura *et al.*, nel 1998, dimostrarono come i livelli di MMP-9 nei pazienti non sopravvissuti fossero significativamente maggiori rispetto a quelli dei sopravvissuti e dei pazienti sani, dato ulteriormente confermato da Yassen *et al.* nel 2001. Analizzando l'espressione di alcune metalloproteinasi e dei loro inibitori (TIMP) nel fegato, rene, milza e cervello di ratti in differenti momenti dopo l'iniezione di LPS, il gruppo di ricerca guidato da Pagenstecher dimostrò una *up-regulation* organo-specifica e tempo-specifica di molti geni per le MMP e del gene per la TIMP-1 (Pagenstecher *et al.*, 2000). Questa espressione LPS-indotta è dose dipendente: una dose letale di LPS determina la sintesi di più MMP per un tempo maggiore rispetto ad una dose non letale.

Le MMP possono essere indotte direttamente da LPS o dai batteri, ed indotte o represses da svariati segnali, inclusi citochine, fattori di crescita, ormoni, interazione cellule-ECM, molti dei quali generati durante la risposta all'LPS o durante un'infezione, come la IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$  (Kim *et al.*, 2005). Di conseguenza, è evidente che MMP e citochine sono legate da un *feedback* positivo, tuttavia queste endopeptidasi possono distruggere le citochine attraverso un processo di proteolisi, creando un rapporto a *feedback* negativo. Inoltre, le metalloproteinasi sono inibite dai glucocorticoidi, utilizzati come terapia precoce in caso di sepsi (Vanlaere e Libert, 2009).



### III. PARTE SPERIMENTALE

# 1. MATERIALI E METODI

## 1.1 VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO

### 1.1.1. ANIMALI

Lo studio è stato svolto utilizzando 18 suini di razza Large White, di entrambi i sessi, il cui peso medio era di  $21,58 \pm 2,87$  kg. I soggetti sono stati alimentati con dieta standard e libero accesso all'acqua fino a 12 ore prima dell'esperimento, quindi messi a digiuno. La cura ed il trattamento degli animali sono stati condotti in accordo con le linee guida internazionali nel rispetto delle leggi e delle norme nazionali (Decreto legislativo n. 116 Gazzetta Ufficiale, suppl. 40, 18 Febbraio 1992; Circolare n.8, Gazzetta Ufficiale, 14 Luglio 1994).

### 1.1.2. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi di  $n=6$  soggetti ciascuno. I suini appartenenti al primo gruppo sono stati posti in anestesia e ventilati meccanicamente con un volume tidale pari a 8 ml/kg (gruppo  $V_T8$ ) per 240 minuti; i soggetti del secondo gruppo sono stati posti in anestesia e ventilati con volumi tidalici pari a 20 ml/kg (gruppo  $V_T20$ ) per 240 minuti; gli animali appartenenti al terzo gruppo, utilizzati per testare la risposta alla procedura sperimentale e valutati per lo stesso periodo di tempo, sono stati sottoposti ad anestesia e mantenuti in respirazione spontanea (gruppo SB), ovvero in assenza di ventilazione assistita.

Nei risultati viene indicato come tempo 0 l'inizio dell'esperimento, che avviene dopo 30 minuti di respirazione meccanica e non, in modo da stabilizzare il soggetto.

### 1.1.3. PROCEDURA SPERIMENTALE

Gli animali sono stati sedati con medetomidina alla dose di 0,03 ml/kg i.m. (Pfizer Italia s.r.l.) e tiletamina-zolazepam alla dose di 4 mg/kg i.m. (Virbac S.A., Francia). L'anestesia è stata indotta mediante somministrazione di un bolo di

tiopentale sodico per via endovenosa (15 mg/kg, Farmitalia, Carlo Erba) e mantenuta in stato profondo attraverso infusione continua di una soluzione di tiopentale sodico alla dose di 9 ml/kg/h. I suini sono stati quindi tracheostomizzati, intubati e divisi in maniera *random* nei tre gruppi. I soggetti ventilati meccanicamente sono stati paralizzati mediante la somministrazione di pancuronio bromuro alla dose di 0,2 mg/kg i.v. (Organon Teknika B.V. Boxtel, Olanda). Dosi supplementari di agente paralizzante sono state somministrate secondo necessità.

Il primo ( $V_T8$ ) ed il secondo gruppo ( $V_T20$ ) sono stati ventilati utilizzando un ventilatore meccanico (900 Servo ventilator, Siemens-Elema, Svezia). Il ventilatore è stato settato, subito dopo l'intubazione degli animali, ad un valore fisso di volume tidale pari a 8 ml/kg per il gruppo  $V_T8$  e 20 ml/kg per il gruppo  $V_T20$ . Il rapporto tra il tempo totale di un ciclo respiratorio ed il tempo di inspirazione era di  $0,33 \pm 0,001$ . È stata utilizzata una pressione positiva di fine espirazione (PEEP) di 4 cmH<sub>2</sub>O al fine di evitare l'atelettasia degli alveoli. Il flusso respiratorio è stato rilevato mediante un pneumotacografo Fleisch n.2 (Fleisch, Losanna, Svizzera) collegato alla cannula tracheale, ed il volume tidale è stato ottenuto mediante integrazione elettronica sul tracciato del flusso; la pressione tracheale è stata rilevata tramite un trasduttore di pressione differenziale (Statham PM 15, 10846), connesso ad un ingresso laterale della cannula tracheale. Particolare attenzione è stata posta per evitare perdite di aria nel circuito tracheale e respiratorio. La *compliance* ( $C_{rs}$ ) e la resistenza totale del sistema respiratorio ( $R_{rs}$ ) sono state calcolate mediante il metodo delle occlusioni a fine inspirazione mantenendo flusso e volume costanti (Bates *et al.*, 1987). Ogni singola occlusione è stata mantenuta fino a raggiungere un *plateau* nella  $P_{tr}$  (5-6s), al termine della quale veniva ripristinata la ventilazione di base. L'occlusione delle vie respiratorie a fine inspirazione era seguita da una rapida caduta iniziale di  $P_{tr}$  ( $P_{max} - P_1$ ) e da una graduale diminuzione della pressione fino ad un valore di *plateau* ( $P_2$ ). La  $C_{rs}$  è stata determinata mediante il rapporto tra volume tidale valutato durante l'occlusione e  $P_2$ , mentre la  $R_{rs}$  mediante il rapporto tra ( $P_1 - P_2$ ) ed il flusso respiratorio precedente all'occlusione.

In tutti gli animali sono stati inseriti cateteri di polietilene nell'arteria femorale destra, per il monitoraggio della pressione arteriosa sistemica, e nella vena femorale destra per la somministrazione di farmaci e fluidi (soluzione salina

standard), indispensabili per l'adeguata compensazione della perdita stessa di fluidi corporei e per il mantenimento di un profilo emodinamico stabile degli animali.

In ogni soggetto è stato inserito nella vena giugulare destra un catetere Swan-Ganz pediatrico del diametro di 5F, che è stato fatto procedere attraverso il cuore destro fino ad arrivare a livello di arteria polmonare. Attraverso questo catetere è stata rilevata la gittata cardiaca (CO), la pressione arteriosa polmonare e la pressione di cuneo (wedge), che rappresenta con buona approssimazione la pressione esistente a livello di atrio sinistro. Le pressioni arteriose polmonare e sistemica sono state registrate connettendo i cateteri ai rispettivi trasduttori di pressione (4-422 Bell e Howell), mentre le resistenze vascolari sistemiche sono state calcolate tramite formule standard. La gittata cardiaca è stata valutata tramite la tecnica della termodiluizione (Cardiac Output Computer 701). Tutti i segnali sono stati calibrati in modo indipendente e registrati simultaneamente su un registratore a penna a sei canali (Nec San-ei Instruments Polygraph mod.8K40, Ltd).

I volumi di sangue intratoracico (ITBV), di acqua polmonare extravascolare (EVLW), di sangue polmonare (PBV) e l'indice cardiaco (CI) sono stati determinati mediante dispositivo PiCCO (PiCCO, 22G-5F; Pulsion Medical System, Monaco, Germania), attraverso l'inserimento di due cateteri, uno nell'arteria femorale sinistra e uno nella vena giugulare sinistra.

I parametri emodinamici e respiratori sono stati registrati subito prima dell'inizio dell'esperimento ed ogni 30 minuti fino al suo termine. Durante la procedura sperimentale, ogni 30 minuti, sono stati prelevati campioni di sangue arterioso e venoso. I campioni di sangue arterioso, raccolti in provette contenenti eparina (Parke-Davis, Milano, Italia) sono stati immediatamente utilizzati per le analisi emogasanalitiche, che hanno permesso la valutazione di PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, pH ed ematocrito (IL 1640, Instrumentation Laboratory System); i campioni di sangue venoso, raccolti in provette contenenti EDTA (Venoject, Terumo Corporation, Leuven, Belgio), venivano immediatamente centrifugati, conservati in azoto liquido e quindi stoccati a -80°C per le successive analisi. I livelli ematici di endotelina-1 sono stati valutati mediante ELISA test specifici (Amersham Biosciences, U.K.).

Al termine della fase sperimentale, i suini sono stati sacrificati tramite *overdose* di tiopentale sodico. Immediatamente dopo l'eutanasia, sono stati prelevati campioni autoptici di tessuto polmonare, renale ed epatico, conservati in azoto liquido e stoccati a -80°C per ulteriori analisi.

#### 1.1.4. LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL)

Per ogni soggetto è stato eseguito un lavaggio broncoalveolare (BAL) all'inizio dell'esperimento, subito dopo le procedure chirurgiche, ed uno al suo termine, prima dell'eutanasia. Il BAL è stato effettuato mediante la somministrazione di 30 ml di soluzione fisiologica preriscaldata a temperatura corporea (37°C) attraverso un catetere di polietilene inserito nella cannula tracheale e fatto procedere fino al raggiungimento di un bronco segmentale. La ri-aspirazione della soluzione è stata ripetuta tre volte. Il fluido ottenuto è stato quindi centrifugato (1200 g per 10 min. a 4°C) e conservato a -20°C prima dello svolgimento delle analisi. Sul liquido di lavaggio broncoalveolare sono stati valutati i livelli di ET-1, di MMP-2 e MMP-9 tramite ELISA test (Amersham Biosciences, U.K.). Per determinare l'attività totale delle suddette metalloproteinasi (forma pro-attiva e forma attiva) i campioni sono stati addizionati con acetato p-aminofenil mercurio (APMA) e sottoposti ad ELISA test come precedentemente riportato.

#### 1.1.5. ZIMOGRAFIA SDS-PAGE

Al termine dell'esperimento sono stati prelevati e conservati campioni di tessuto polmonare, epatico e renale per la determinazione dell'attività delle metalloproteinasi (MMP-2 e MMP-9) tramite zimografia. La tecnica zimografica è una variante della classica metodica di analisi elettroforetica che permette di evidenziare su gel l'attività enzimatica delle MMP, grazie alla presenza di un opportuno substrato. Per l'allestimento del saggio zimografico i campioni di tessuto sono stati omogenati in un buffer di lisi privo di agenti riducenti composto da Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,02% Tween 20, EDTA 10 mM, a pH 7.6 per l'estrazione delle proteine, successivamente dosate sul surnatante ottenuto attraverso metodo di Bradford e lettura con spettrofotometro. Una quantità costante di estratto (5 µg) per ogni campione è stata caricata su gel

senza subire denaturazione al calore: ciò permette di mantenere intatta l'attività enzimatica che può essere evidenziata a seguito di un processo di rinaturazione. Il gel utilizzato per la zimografia (zimogramma) è composto da un *running gel* all'8% di acrilammide e da uno *stacking gel* al 4%. Il *running gel* viene ottenuto miscelando 1,3 ml di acrilammide 30%, 1,25 ml di Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, 250 µl di gelatina 10%, 2,15 ml di acqua milliQ, 50 µl di SDS 10%. Lo *stacking gel* viene invece ottenuto miscelando 1,55 ml di acqua milliQ, 625 µl di Tris-HCl 0,5 M pH 6.8, 333 µl di acrilammide 30%. Entrambi i gel vengono fatti polimerizzare aggiungendo 50 µl di ammoniopersolfato (APS) 10% e 10 µl di TEMED. La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone Tris-Glicina-SDS a pH 8.3, a 150 V per 1 ora in un apparato minigel (Mini PROTEAN System Tetra Cell, Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA).

Dopo la corsa elettroforetica è stato effettuato un lavaggio di 2 ore in 2.5% Triton X-100 in acqua a temperatura ambiente per rimuovere l'SDS e permettere la rinaturazione dell'enzima.

Il gel è stato quindi incubato *overnight* a 37°C in tampone di digestione Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, che assicura le condizioni ottimali per il manifestarsi dell'attività enzimatica delle gelatinasi.

Dopo la digestione il gel è stato colorato con una soluzione di Comassie Blue G250 in 45% metanolo, 10% acido acetico per circa 2 ore e decolorato in soluzione 20% etanolo, 10% acido acetico.

Il gel si colora uniformemente per la presenza di substrato ad eccezione delle bande in cui si localizza l'attività metalloproteasica, che risultano chiare.

Al fine di distinguere le diverse attività proteasiche presenti nei tessuti, con i campioni da analizzare vengono anche caricati campioni di MMP-2 e di MMP-9 purificate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.). Per la determinazione dell'attività totale delle metalloproteinasi i campioni sono stati trattati con acetato p-aminofenil mercurio (APMA).

Il gel decolorato in maniera opportuna è stato quindi acquisito in formato digitale tramite un densitometro per immagini (modello GS700, Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA) e le bande gelatinolitiche sono state quantificate mediante ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e Adobe Photoshop (Adobe Software, Seattle, WA). La densità è stata espressa come unità arbitrarie (A.U.).

#### 1.1.6. ANALISI ISTOLOGICHE

Al termine della fase sperimentale sono stati raccolti campioni autoptici di tessuto polmonare per lo svolgimento delle indagini istologiche. I campioni sono stati fissati in formalina al 10% (KALTEK, Padova, Italia) e le sezioni sono state successivamente colorate con ematossilina-eosina. La valutazione oggettiva delle lesioni riscontrate è stata effettuata mediante l'utilizzo di una scala quantitativa che ha permesso di attribuire un punteggio alle seguenti lesioni considerate: enfisema alveolare acuto, enfisema interstiziale, edema polmonare, atelettasia polmonare, risposta infiammatoria. I punteggi attribuiti erano i seguenti: 0 - assenza di lesioni; 1 - lesioni lievi e focali; 2 - lesioni lievi e diffuse; 3 - lesioni moderate; 4 - lesioni gravi. È stata inoltre osservata la presenza di broncospasmo e valutata secondo il seguente punteggio: 0 – assenza di lesioni; F – focale; D – diffuso.

#### 1.1.7. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati presentati come valori medi  $\pm$  deviazione standard (SD). Per l'analisi statistica, svolta sul confronto tra gruppi per tutti i parametri, è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute seguita da comparazioni multiple effettuate tramite Tukey *b* test (SPSS Version15.0, Inc., Chicago, IL, USA). Sono stati considerati significativi i valori con  $p < 0.05$ .

## 1.2. STRESS MECCANICO vs STRESS IPOSSICO vs STRESS SETTICO

### 1.2.1. ANIMALI

Lo studio è stato svolto utilizzando 24 suini di razza Large White, di entrambi i sessi, il cui peso medio era di  $24,13 \pm 1,92$  kg. I soggetti sono stati alimentati con dieta standard e libero accesso all'acqua fino a 12 ore prima dell'esperimento, quindi messi a digiuno. La cura ed il trattamento degli animali sono stati condotti in accordo con le linee guida nel rispetto delle leggi e delle norme nazionali (Decreto legislativo n. 116 Gazzetta Ufficiale, suppl. 40, 18 Febbraio 1992; Circolare n.8, Gazzetta Ufficiale, 14 Luglio 1994).

### 1.2.2. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Gli animali sono stati divisi in quattro gruppi di  $n=6$  soggetti ciascuno. I suini appartenenti al primo gruppo (gruppo C) sono stati anestetizzati e posti in ventilazione spontanea per 240 minuti; i soggetti del secondo gruppo (gruppo SM) sono stati posti in anestesia e sottoposti a stress meccanico, ovvero ventilati con volumi tidalici pari a 20 ml/kg per 240 minuti; gli animali appartenenti al terzo gruppo (gruppo SI) sono stati sottoposti a stress ipossico, ovvero è stata indotta un'ipertensione polmonare ipossica attraverso l'inalazione di una miscela di gas, con concentrazioni decrescenti di  $O_2$ , mantenuta ciascuna per una durata di 20 minuti, iniziando dapprima con:

- una miscela di controllo con  $FiO_2$  di 0.21 (20 minuti), seguita da
- una miscela ipossica con  $FiO_2$  di 0.15 (20 minuti),
- una miscela ipossica con  $FiO_2$  di 0.13 (20 minuti), per tornare quindi ad
- una miscela normossica con  $FiO_2$  di 0.21, per i restanti 180 minuti.

Infine, gli animali appartenenti al quarto gruppo sono stati sottoposti a stress settico (gruppo SS), indotto attraverso l'infusione endovenosa di LPS (Lipopolisaccaride di E.coli sierotipo 055:B5, Sigma Chemical, USA) alla dose di  $40 \mu\text{g/kg/h}$  per 120 minuti, seguito da un periodo di osservazione di 120 minuti.



### 1.2.3. PROCEDURA SPERIMENTALE

I soggetti sono stati sedati, anestetizzati e tracheostomizzati come precedentemente descritto. Negli animali posti in ventilazione assistita (gruppi SM, SI, SS) è stata utilizzata una pressione positiva di fine espirazione (PEEP) di 4 cmH<sub>2</sub>O al fine di evitare l'atelettasia degli alveoli. Il flusso respiratorio è stato rilevato mediante un pneumotacografo Fleisch n.2 (Fleisch, Losanna, Svizzera) collegato alla cannula tracheale, ed il volume tidale è stato ottenuto mediante integrazione elettronica sul tracciato del flusso. La pressione tracheale ( $P_{tr}$ ) è stata rilevata tramite un trasduttore di pressione differenziale (Statham PM 15, 10846), connesso ad un ingresso laterale della cannula tracheale. La *compliance* ( $C_{rs}$ ) e la resistenza totale del sistema respiratorio ( $R_{rs}$ ), sono state valutate mediante il metodo delle occlusioni. Nei gruppi SI e SS i parametri respiratori erano rappresentati da un volume tidale ( $V_T$ ) di  $200 \pm 8,07$  ml, un flusso inspiratorio di  $0,25 \pm 0,01$  l/s ed una frequenza respiratoria di  $24 \pm 1,3$  respiri al minuto. Nel gruppo SM gli animali sono stati ventilati con un volume tidale pari a 20 ml/kg, mentre il gruppo SB ha mantenuto un  $V_T$  medio pari a  $7,73 \pm 2,08$  ml/kg. Sono stati rilevati, come precedentemente descritto, i seguenti parametri: pressione arteriosa sistemica media (MAP), pressione arteriosa polmonare media (MPAP), gittata cardiaca (CO), pressione di cuneo (wedge), i volumi di sangue intratoracico (ITBV) e di acqua polmonare extravascolare (EVLW), volume di sangue polmonare (PBV) e indice cardiaco (CI). I parametri emodinamici e respiratori sono stati registrati subito prima dell'inizio dell'esperimento ed ogni 20 minuti fino al suo termine. Durante l'esperimento, ogni 20 minuti, sono stati prelevati campioni di sangue arterioso, utilizzati per le analisi emogasanalitiche ( $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ , pH ed ematocrito).

Al termine della fase sperimentale, i suini sono stati sacrificati tramite *overdose* di tiopentale sodico. Immediatamente dopo l'eutanasia, sono stati prelevati campioni autoptici di tessuto polmonare, conservati in azoto liquido e stoccati a  $-80^\circ\text{C}$  per le analisi istologiche e zimografiche.

#### 1.2.4. ZIMOGRRAFIA SDS-PAGE

L'indagine zimografica è stata svolta su campioni autoptici di polmone come descritto precedentemente.

#### 1.2.5. ANALISI ISTOLOGICHE

L'indagine istologica è stata svolta su campioni autoptici di polmone come descritto precedentemente.

#### 1.2.6. ANALISI STATISTICHE

I dati sono stati presentati come valori medi  $\pm$  deviazione standard (SD). Per l'analisi statistica, svolta sul confronto tra gruppi per tutti i parametri, è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute seguita da comparazioni multiple effettuate tramite Tukey *b* test (SPSS Version15.0, Inc., Chicago, IL, USA). Sono stati considerati significativi i valori con  $p < 0.05$ .

## 2. RISULTATI

### 2.1 VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO

#### 2.1.1. EMOGASANALISI

La figura 2.1.1.1. mostra le variazioni di PaCO<sub>2</sub> nei tre gruppi sperimentali. Il gruppo V<sub>T</sub>8 mostrava un'evidente ipercapnia durante tutta la fase sperimentale, significativamente superiore rispetto agli altri due gruppi, con valori medi vicini a 80 mmHg; nel gruppo V<sub>T</sub>20 era presente ipocapnia, con valori medi che oscillavano tra 24,6 e 28,4 mmHg; mentre i soggetti in ventilazione spontanea presentavano valori di PaCO<sub>2</sub> entro i *range* fisiologici.

La figura 2.1.1.2. mostra i valori di pH ematico, parametro che presenta un andamento parallelo alla PaCO<sub>2</sub>. Il gruppo SB al termine dell'esperimento presentava valori entro i *range* fisiologici; il gruppo V<sub>T</sub>8 mostrava una riduzione del pH ; mentre il gruppo V<sub>T</sub>20 mostrava valori superiori rispetto agli altri due gruppi. I valori nel gruppo V<sub>T</sub>8 erano significativamente inferiori rispetto agli altri due gruppi.

Nella figura 2.1.1.3. sono rappresentati i valori di PaO<sub>2</sub>. Il gruppo V<sub>T</sub>20, come atteso, evidenziava livelli di ossigenazione significativamente superiori rispetto agli altri due gruppi a 30 minuti e da 90 a 240 minuti, dove venivano raggiunti valori pari a 120 mmHg. Il gruppo SB ha da subito evidenziato una marcata ipossia, mentre il gruppo V<sub>T</sub>8 presentava livelli di PaO<sub>2</sub> superiori al gruppo SB ma lievemente inferiori ai valori fisiologici.

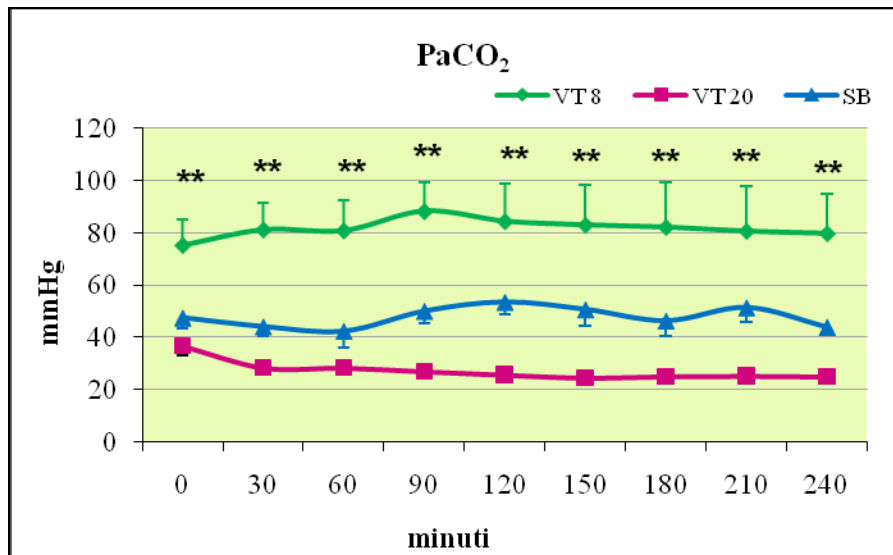


FIG. 2.1.1.1. Variazione della PaCO<sub>2</sub> nel corso dell'esperimento nei tre gruppi sperimentali. I dati sono espressi come medie ± SD. \*\*  $p < 0.001$  vs gruppi V<sub>T</sub>20 e SB.

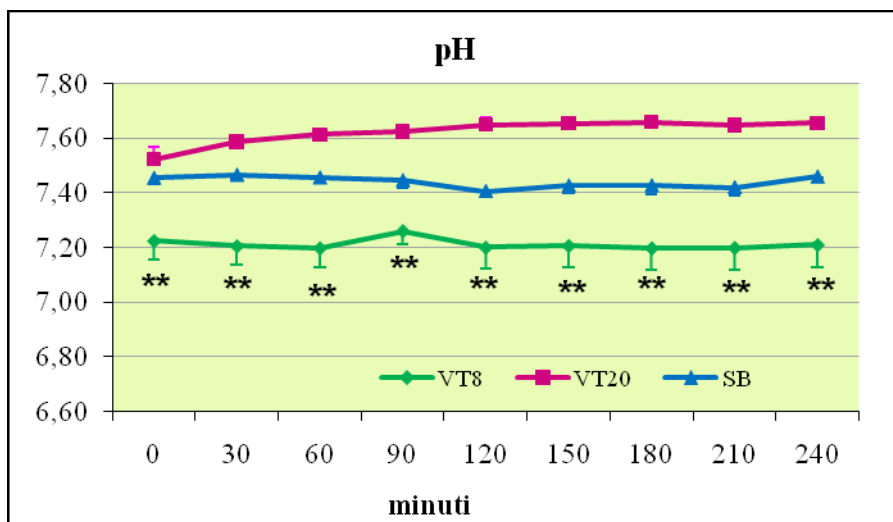


FIG. 2.1.1.2. Variazione del pH nei tre gruppi durante il tempo sperimentale. I dati sono espressi come medie ± SD. \*\*  $p < 0.001$  vs gruppi V<sub>T</sub>20 e SB.

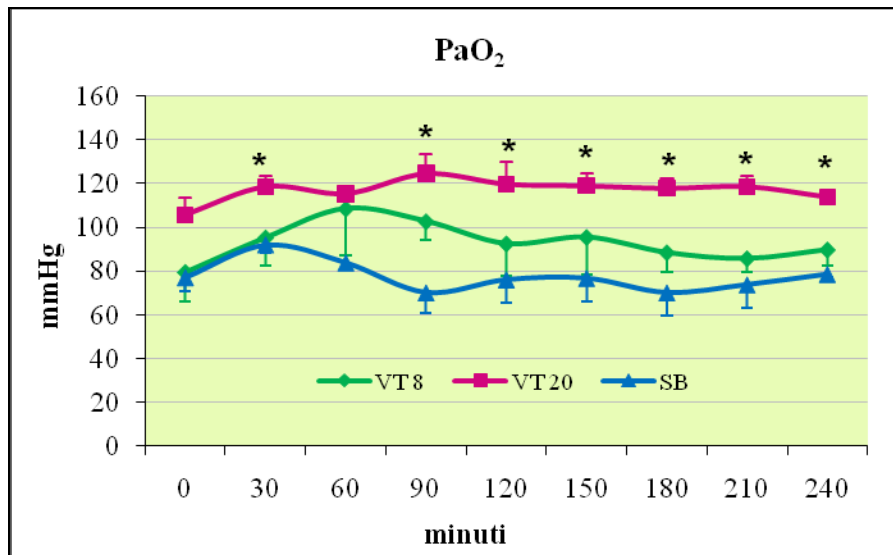


FIG. 2.1.1.3. variazione della PaO<sub>2</sub> in corso di esperimento nei tre gruppi di suini. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs gruppi VT8 e SB.

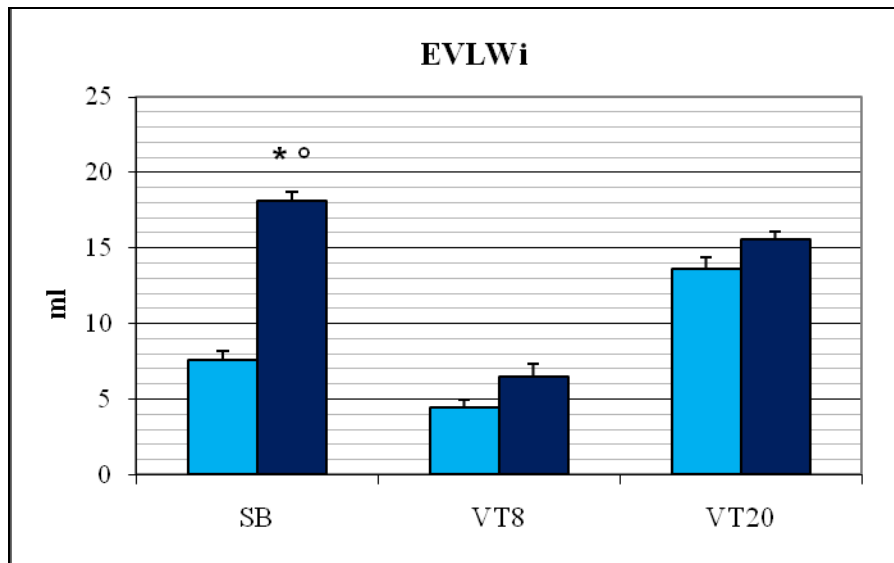
### 2.1.2. PARAMETRI POLMONARI

Nella figura 2.1.2.1. sono descritte in (a) le modificazioni evidenziate nei livelli di acqua polmonare extravascolare indicizzati (EVLWi) e in (b) le variazioni nel rapporto acqua polmonare extravascolare/volume di sangue polmonare (EVLW/PBV), valutate a tempo 0 e al termine della fase sperimentale. Nel gruppo in ventilazione spontanea, EVLWi, che rappresenta un indice preciso, ma non specifico della presenza di fluido interstiziale nei polmoni, era significativamente incrementato dopo 240 minuti rispetto al tempo 0', evidenziando la formazione di edema. Questo parametro era significativamente maggiore a 240 minuti nel gruppo SB rispetto ai gruppi  $V_{T8}$  e  $V_{T20}$ , riflettendo il trend della pressione arteriosa polmonare (fig.2.1.3.2.). Il rapporto EVLW/PBV è un accurato indice della permeabilità del distretto capillare polmonare. A 240 minuti questo parametro risultava significativamente maggiore nel gruppo  $V_{T20}$  rispetto agli altri due gruppi, in cui rimaneva pressoché invariato.

La figura 2.1.2.2. mostra le variazioni della *compliance* del sistema respiratorio (Crs) nei tre gruppi sperimentali. Confrontando i tempi 0' e 240', i valori non erano significativamente differenti in nessun gruppo sperimentale. L'analisi tra gruppi ha evidenziato come a tempo 0' la compliance fosse significativamente maggiore nel gruppo  $V_{T20}$  rispetto agli altri due gruppi, e a 240' fosse significativamente minore nel gruppo SB rispetto ai gruppi  $V_{T8}$  e  $V_{T20}$ .

Il volume tidale nei soggetti in respirazione spontanea mostrava dei valori pari a  $6,3 \pm 1,8$  ml/kg a tempo 0' e  $7,2 \pm 1,7$  ml/kg al termine dell'esperimento. La differenza tra tempo 0' e 240' risultava statisticamente significativa (fig. 2.1.2.3.).

a.



b.

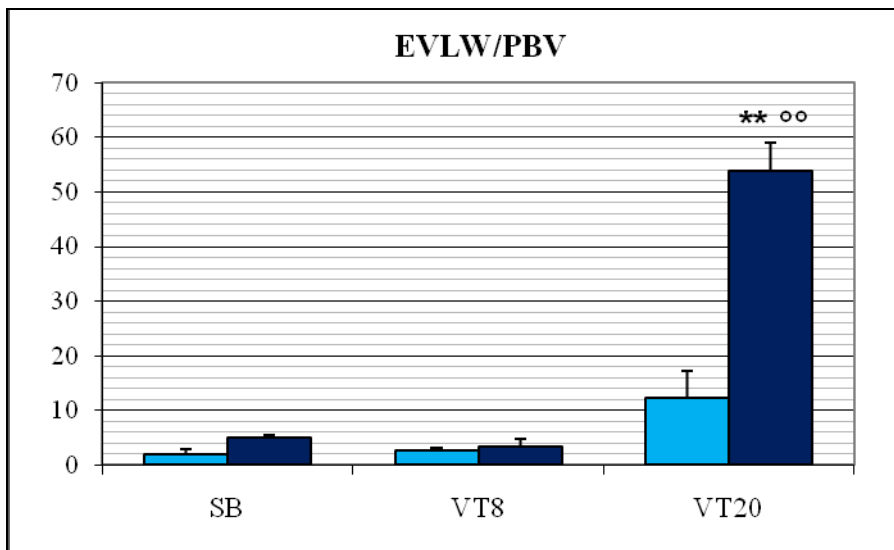


FIG. 2.1.2.1. a) Variazione di EVLWi nei tre gruppi sperimentali; b) variazione del rapporto EVLW/PBV nel corso dell'esperimento in tutti gli animali. Colonne azzurre: tempo 0 minuti; colonne blu: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. a) \*  $p < 0.05$  vs tempo 0' nel gruppo SB; °  $p < 0.05$  vs tempo 240' nei gruppi SB e VT8. b) \*\*  $p < 0.001$  vs tempo 0' nel gruppo VT20; °°  $p < 0.001$  vs tempo 240 min nei gruppi SB e VT8.

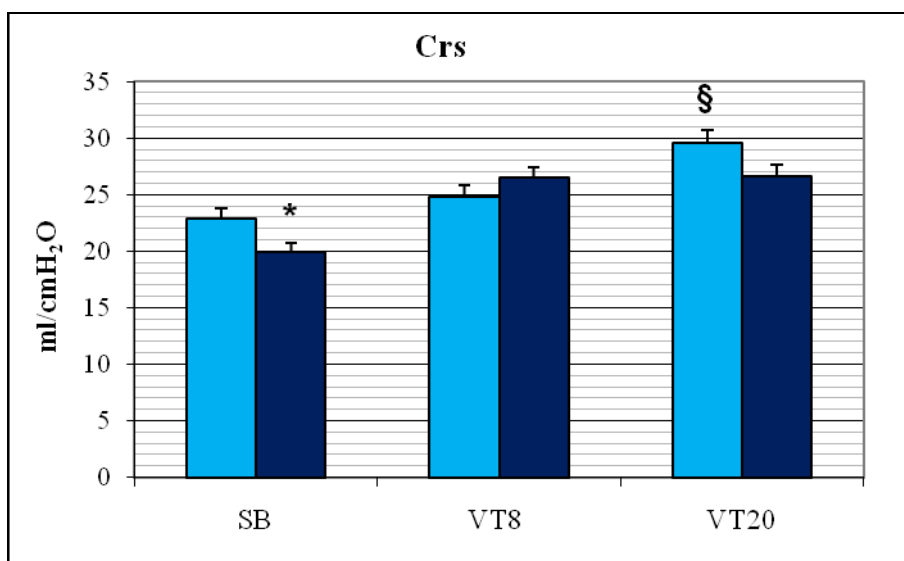


FIG. 2.1.2.2. Variazioni della Crs nei tre gruppi. Colonne azzurre: tempo 0 minuti; colonne blu: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs V<sub>T20</sub> e SB a 240'; §  $p < 0.05$  vs V<sub>T8</sub> e V<sub>T20</sub> a 0'.

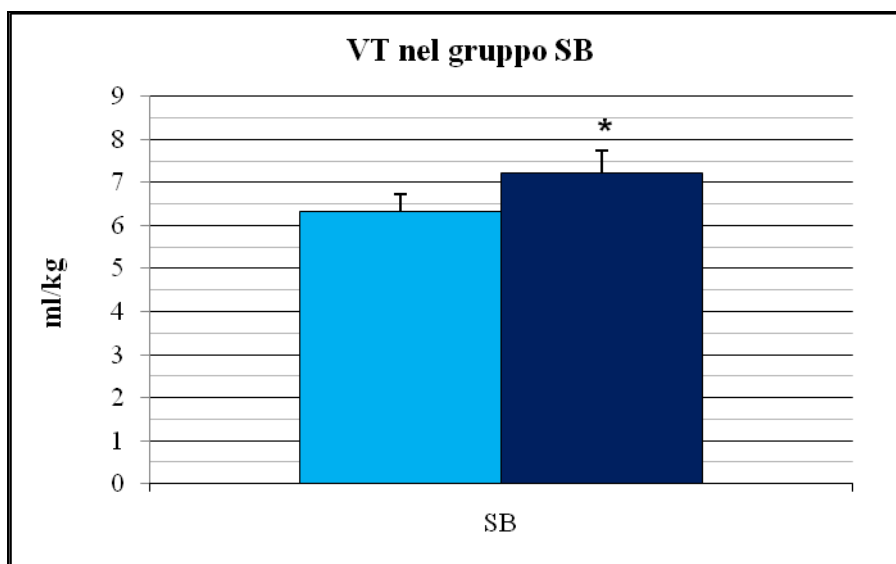


FIG. 2.1.2.3. Valori del volume tidale (V<sub>T</sub>) registrati nei soggetti mantenuti in ventilazione spontanea. Colonna azzurra: tempo 0 minuti; colonna blu: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs tempo 0 minuti.



### 2.1.3. PARAMETRI CIRCOLATORI

Nelle figure 2.1.3.1 e 2.1.3.2. sono riportate le variazioni della pressione arteriosa media (MAP) e della pressione arteriosa polmonare media (MPAP). La MAP si è mantenuta entro i *range* fisiologici per tutta la durata dell'esperimento in tutti gli animali, anche se il gruppo  $V_T8$  mostrava un calo progressivo non significativo dovuto probabilmente ad una vasodilatazione periferica. La MPAP presentava nel gruppo SB un incremento significativo tra 120 e 180 minuti rispetto al tempo 0' e rispetto ai gruppi  $V_T8$  e  $V_T20$ .

I dati relativi alla gittata cardiaca (CO) sono mostrati nella figura 2.1.3.3. Il gruppo SB ha evidenziato valori significativamente maggiori rispetto agli altri due gruppi sia a tempo 0' che a 240'.

La figura 2.1.3.4. mostra le modificazioni dell'indice cardiaco (CI). Tutti i gruppi sperimentali evidenziavano un peggioramento dell'efficienza cardiaca a 240 minuti, anche se i due gruppi ventilati meccanicamente mostravano, già a tempo 0', una minore funzionalità cardiaca. Il peggioramento era maggiormente evidente nel gruppo  $V_T8$ , in cui la riduzione raggiungeva valori significativi.

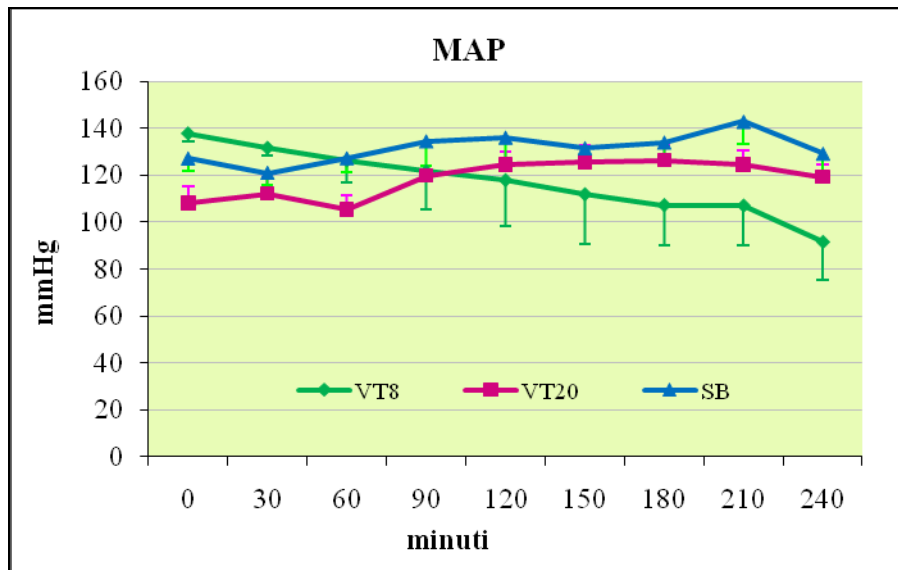


FIG. 2.1.3.1. Variazioni della pressione arteriosa media (MAP) nei tre gruppi sperimentali. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD.

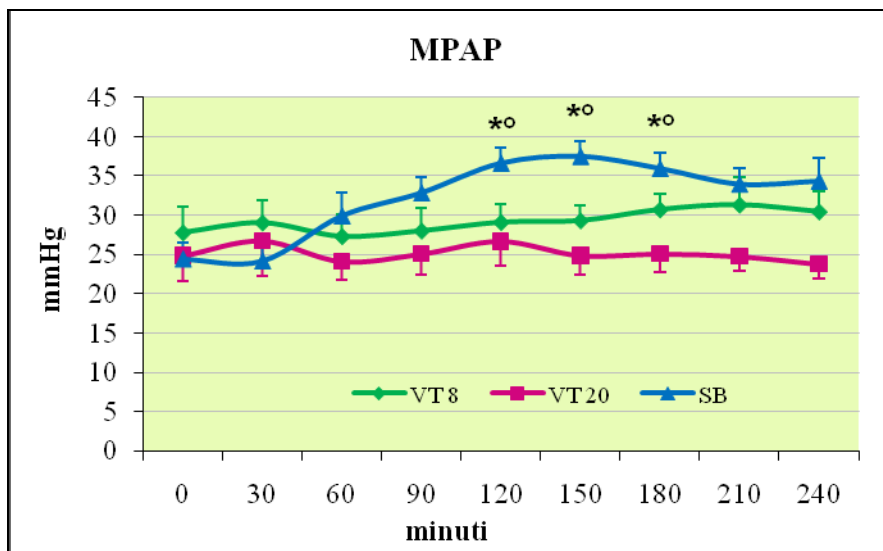


FIG. 2.1.3.2. Variazioni della pressione arteriosa polmonare media (MPAP) in tutti i gruppi. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs 0 minuti; °  $p < 0.05$  vs gruppi  $V_{T8}$  e  $V_{T20}$ .

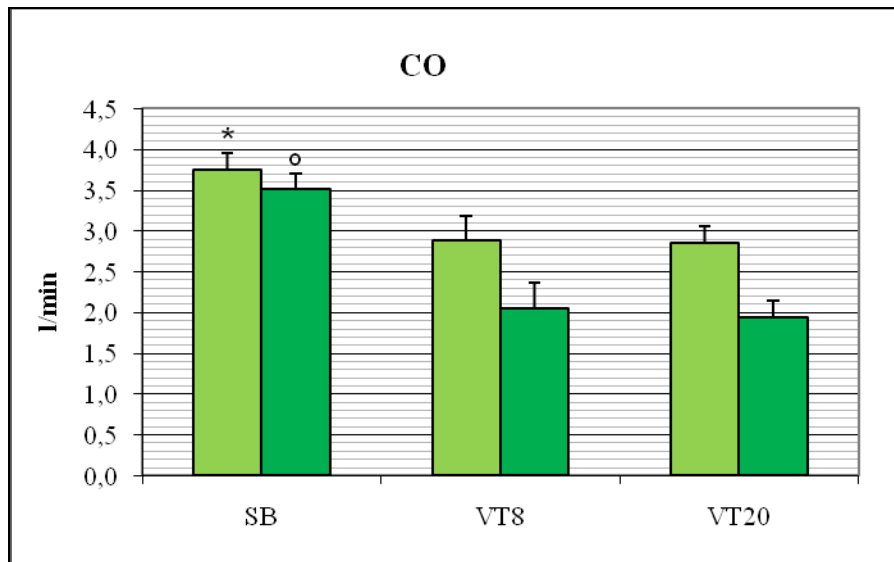


FIG. 2.1.3.3. Variazioni della gittata cardiaca (CO) nei tre gruppi sperimentali. Colonne verde chiaro: tempo 0 minuti; colonne verde scuro: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs gruppi VT8 e VT20 a 0'; °  $p < 0.05$  vs gruppi VT8 e VT20 a 240'.

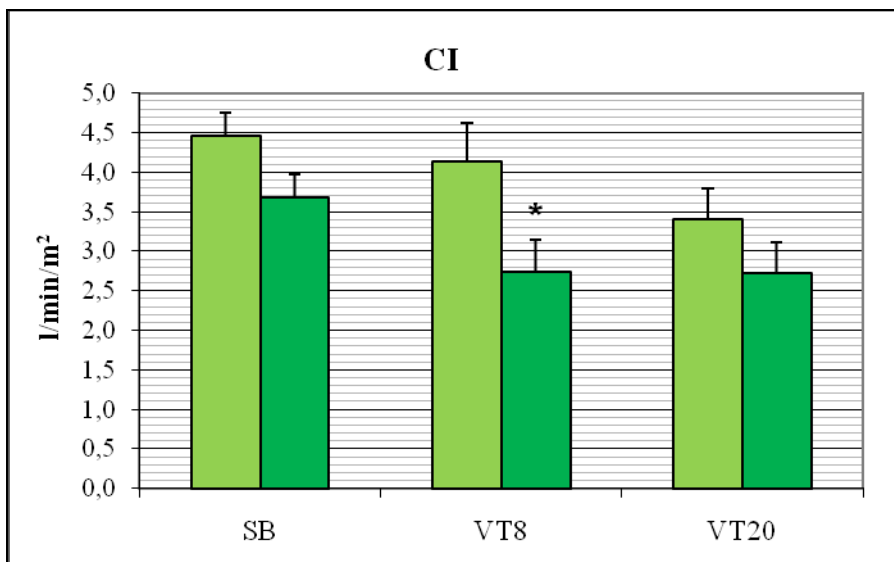


FIG. 2.1.3.4. variazioni dell'indice cardiaco (CI) nei tre gruppi di animali. Colonne verde chiaro: tempo 0 minuti; colonne verde scuro: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD.

\*  $p < 0.05$  vs tempo 0 minuti nel gruppo VT8.

#### 2.1.4. ENDOTELINA-1 (ET-1)

L'endotelina-1 è stata quantificata a livello plasmatico e nel lavaggio broncoalveolare (BAL). I livelli plasmatici di ET-1 (fig. 2.1.4.1.), analizzati tramite ELISA test, all'inizio ed alla fine dell'esperimento, mostravano un incremento in tutti i gruppi a 240 minuti, significativo nei soggetti appartenenti al gruppo  $V_{T20}$  rispetto agli altri due gruppi.

A livello di BAL, l'endotelina-1 era assente nei gruppi SB e  $V_{T8}$ , mentre era presente già a tempo 0' nel gruppo  $V_{T20}$ . In questo gruppo, l'ET-1 aumentava in maniera statisticamente significativa al termine dell'esperimento rispetto a tempo 0' (fig. 2.1.4.2.).

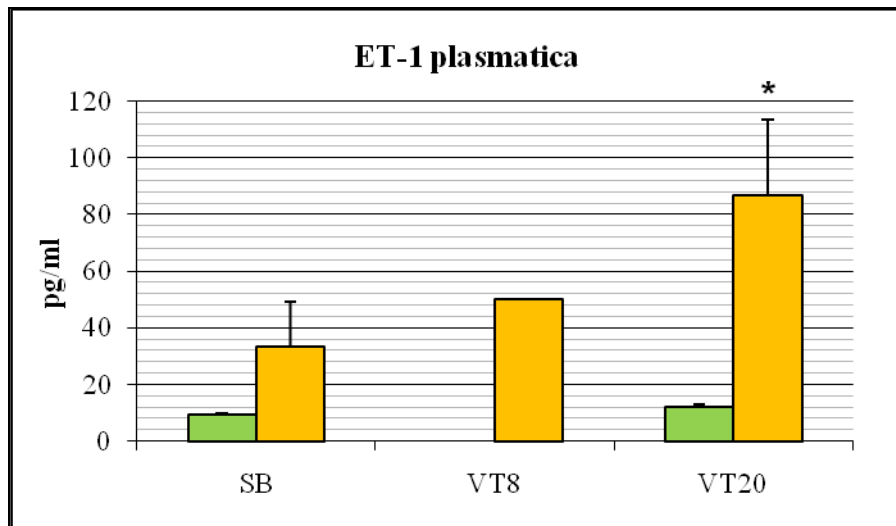


FIG. 2.1.4.1. quantificazione di ET-1 plasmatica nei gruppi sperimentali. Colonne verdi: tempo 0 minuti; colonne gialle: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs gruppi  $V_{T8}$  e SB a 240'.

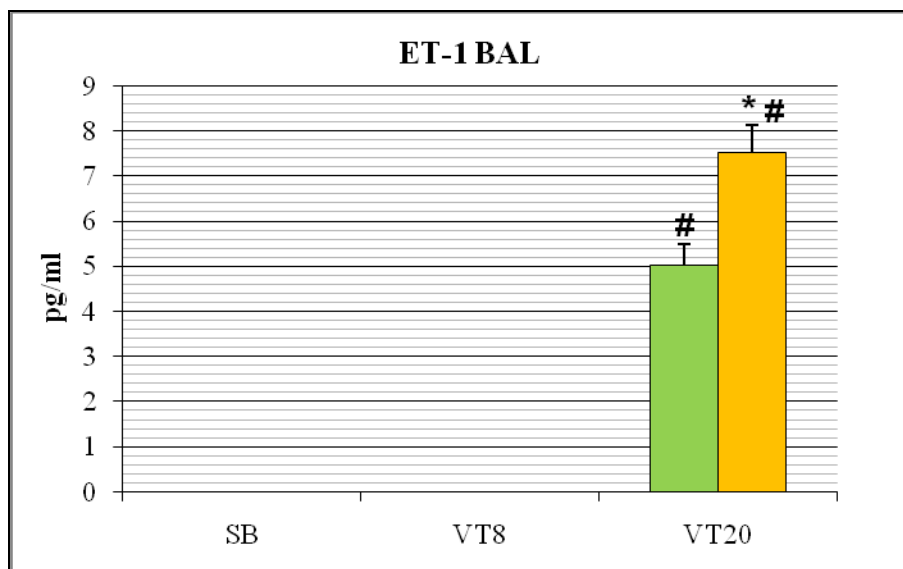


FIG. 2.1.4.2. quantificazione di ET-1 nel BAL. Colonne verdi: tempo 0 minuti; colonne gialle: tempo 240 minuti. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs tempo 0 minuti; #  $p < 0.05$  vs SB e  $V_{T8}$ .

### 2.1.5. METALLOPROTEINASI (MMP-2 E MMP-9)

Le metalloproteinasi di matrice MMP-2 e MMP-9, nonché le loro forme inattive o zimogeni (proMMP-2 e proMMP-9) sono state ricercate a livello tissutale, in campioni autoptici di polmone, rene e fegato, tramite zimografia, e nel BAL tramite ELISA test.

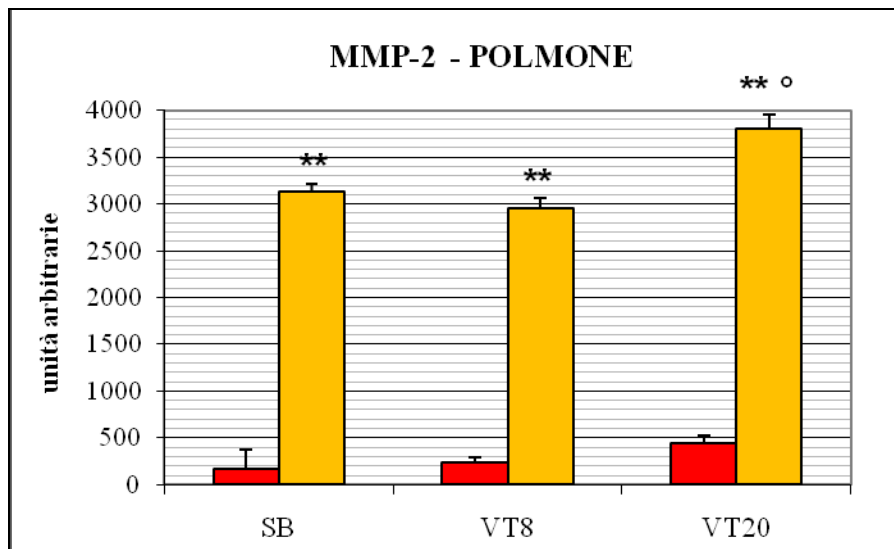
Nel polmone (fig. 2.1.5.1. a) entrambe le forme di MMP-2 erano presenti in tutti gli animali e, in tutti i gruppi sperimentali, i livelli di MMP-2 attivata erano significativamente maggiori rispetto alla forma inattiva. Inoltre, analizzando le differenze tra gruppi, è stato evidenziato come nel gruppo V<sub>T</sub>20 la forma attiva della MMP-2 fosse significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi. A livello renale (b), la forma inattiva della MMP-2 era significativamente maggiore nel gruppo SB rispetto agli altri due gruppi. L'attivazione della MMP-2 seguiva un andamento speculare: infatti, la forma attiva era principalmente espressa nel gruppo V<sub>T</sub>20, in cui raggiungeva livelli significativamente maggiori rispetto agli altri due gruppi ed alla forma inattiva. Nei campioni di fegato (c), la proMMP-2 era sintetizzata in tutti gli animali, ma era significativamente inferiore nel gruppo V<sub>T</sub>20 rispetto agli altri due gruppi. Analogamente, la forma attiva della MMP-2 era significativamente inferiore nel gruppo V<sub>T</sub>20 rispetto ai gruppi V<sub>T</sub>8 e SB. In tutti i gruppi lo zimogeno raggiungeva valori significativamente maggiori rispetto alla forma attiva.

La valutazione tissutale ha permesso di evidenziare la totale assenza della forma attiva della MMP-9 in tutti i gruppi ed in tutti i tessuti (fig. 2.1.5.2. a, b, c). Lo zimogeno della MMP-9, o proMMP-9, è stato osservato a livello polmonare (a) in tutti gli animali, tuttavia nel gruppo V<sub>T</sub>20 la sua espressione era significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi. A livello renale (b) ed epatico (c), la forma inattiva della MMP-9 era sintetizzata in tutti i soggetti senza differenze significative.

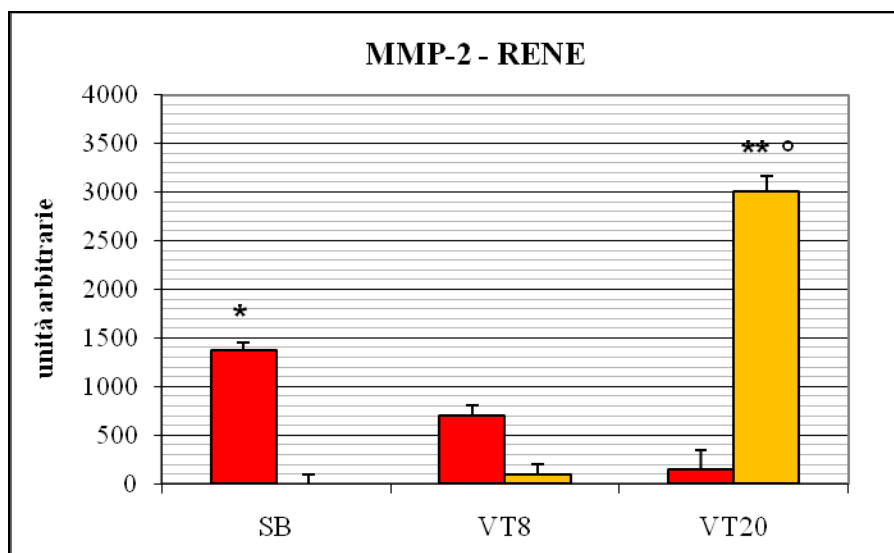
I dati delle MMP nel BAL, valutati tramite ELISA test, sono mostrati nella figura 2.1.5.3 (a. MMP-2; b. MMP-9). Al tempo 0', la MMP-2 era rilevabile in tutti i gruppi in entrambe le forme senza variazioni significative. Al termine dell'esperimento, la MMP-2 era sintetizzata ed attivata in tutti i soggetti, tuttavia nel gruppo V<sub>T</sub>8 la forma attiva presentava valori significativamente maggiori rispetto ai gruppi SB e V<sub>T</sub>20. Nei gruppi SB e V<sub>T</sub>20 la proMMP-2 era

significativamente maggiore a tempo 240' rispetto al tempo 0' (a). A tempo 0', la MMP-9 era rilevabile in tutti i gruppi ed in entrambe le forme senza differenze significative, mentre a 240' la forma attiva della MMP-9 raggiungeva valori significativamente maggiori nel gruppo V<sub>T</sub>8 rispetto ai gruppi SB e V<sub>T</sub>20 (b).

a.



b.





c.

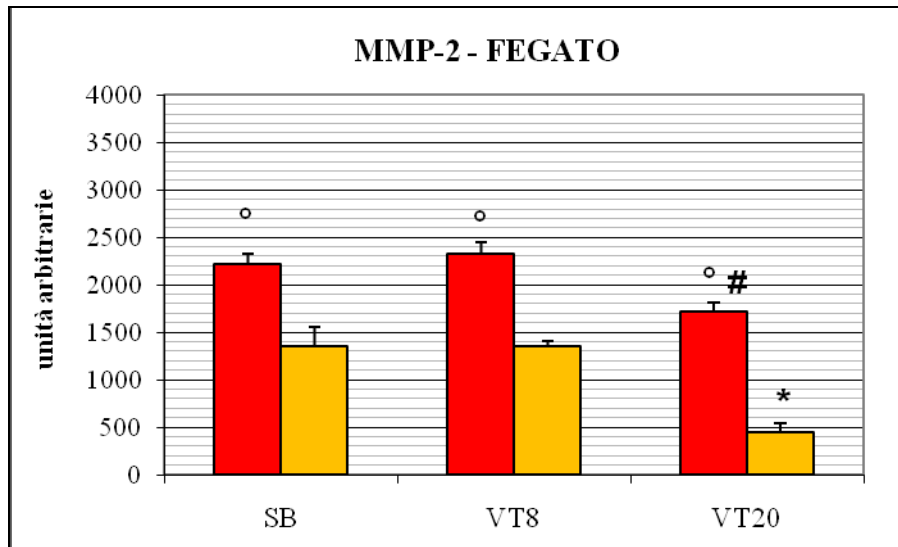


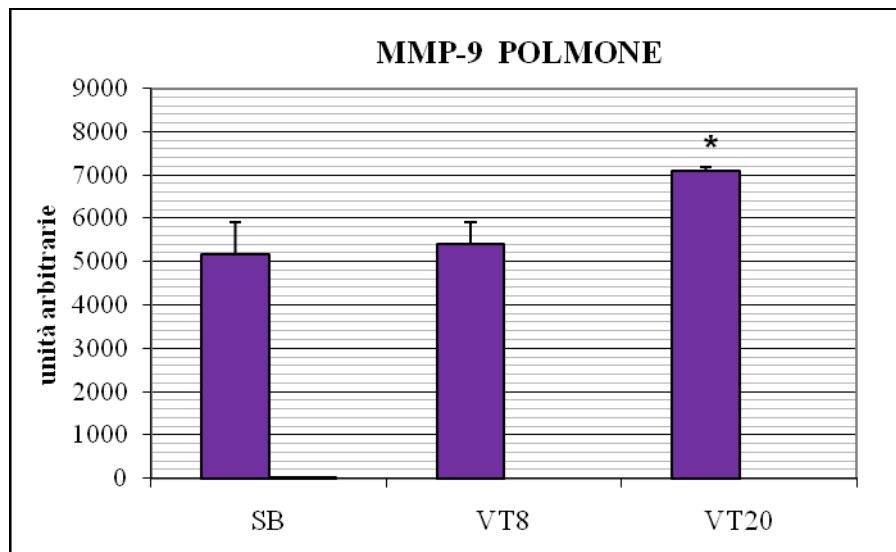
FIG. 2.1.5.1. valutazione zimografica della presenza ed attivazione della MMP-2 a livello di tessuto polmonare (a), renale (b) ed epatico (c). Colonne rosse: tempo 0'; colonne gialle: tempo 240'. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD.

a) \*\*  $p < 0.001$  vs proMMP-2; °  $p < 0.05$  vs MMP-2 attiva nei gruppi SB e VT8.

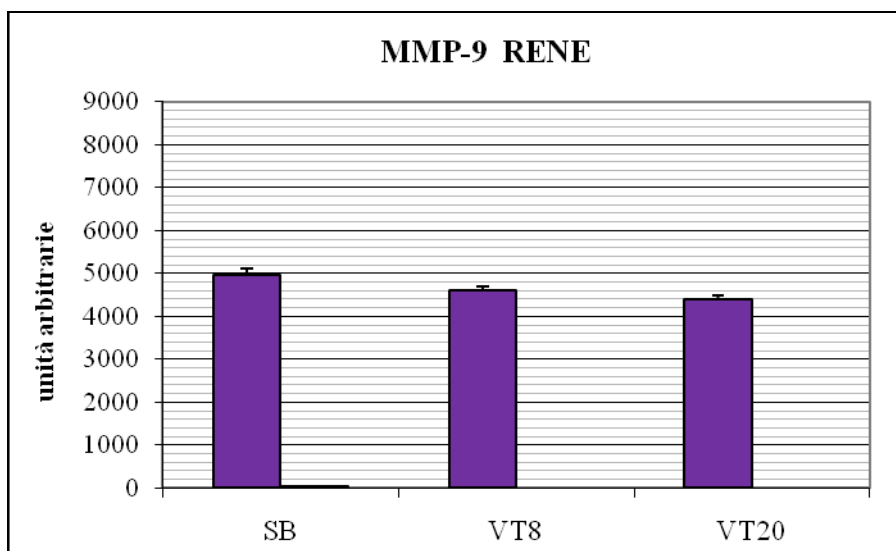
b) \*  $p < 0.05$  vs proMMP-2 nei gruppi VT8 e VT20; \*\*  $p < 0.001$  vs MMP-2 attiva nei gruppi SB e VT8; °  $p < 0.05$  vs proMMP-2.

c) °  $p < 0.05$  vs proMMP-2 nei gruppi SB e VT8; \*  $p < 0.05$  vs MMP-2 attiva nei gruppi SB e VT8; #  $p < 0.05$  vs MMP-2 attiva.

a.



b.



c.

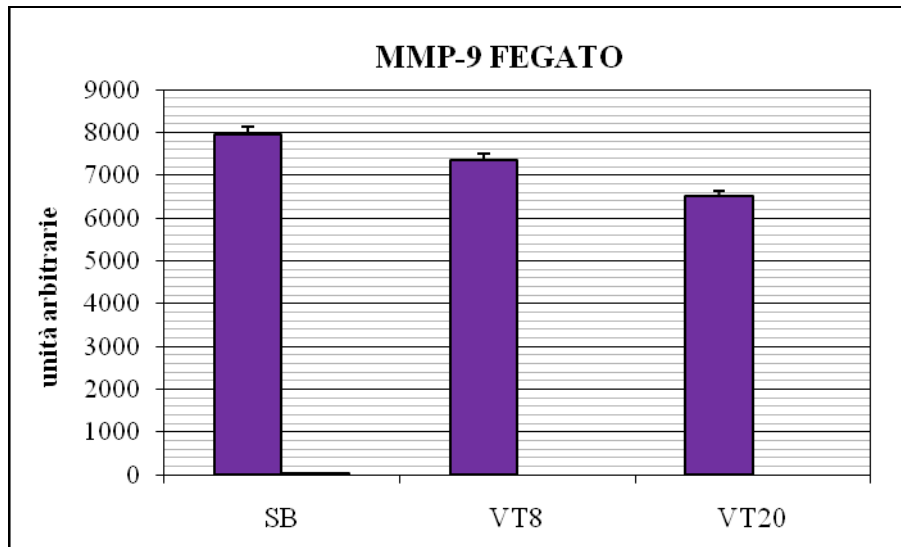
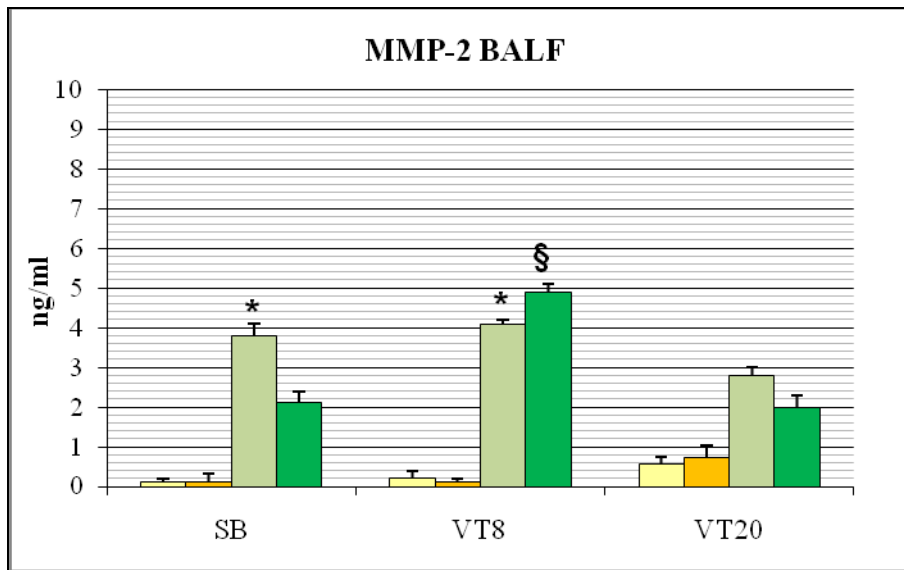


FIG. 2.1.5.2. valutazione zimografica della presenza ed attivazione della MMP-9 a livello di tessuto polmonare (a), renale (b) ed epatico (c). Colonne viola: proMMP-9; MMP-9 attiva: non rilevabile. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD.

a) \*  $p < 0.05$  vs proMMP-9 nei gruppi SB e  $V_{T8}$ .

a.



b.

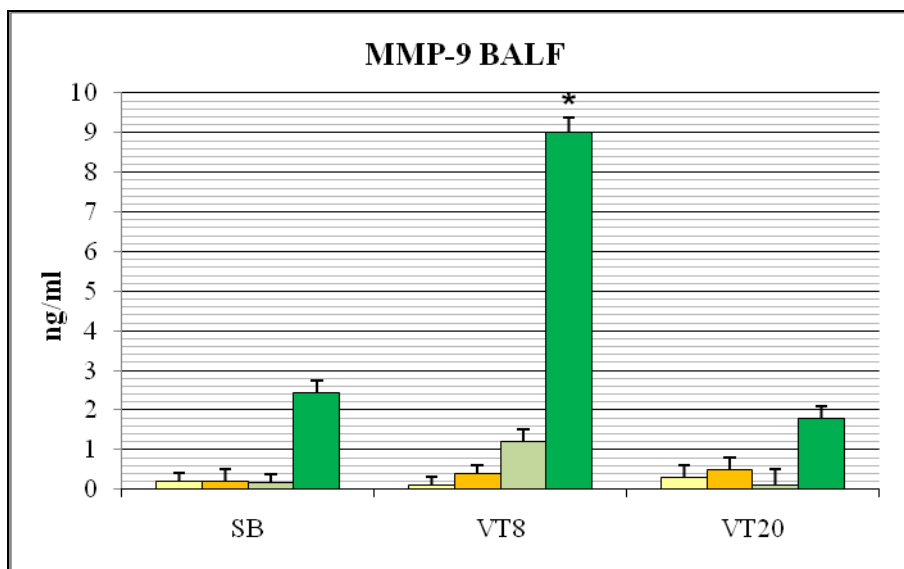


FIG. 2.1.5.3. Valutazione della presenza ed attivazione delle MMP-2 (a) e MMP-9 (b) a livello del liquido di lavaggio bronco alveolare, valutato tramite ELISA test. Colonne giallo chiaro: proMMP a tempo 0'; colonne giallo scuro: MMP attivate a tempo 0'; colonne verde chiaro: proMMP a tempo 240'; colonne verde scuro: MMP attivate a tempo 240'. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD.

a) \*  $p < 0.05$  vs proMMP-2 a tempo 0' nei gruppi SB e  $V_{T20}$ ; §  $p < 0.05$  vs MMP-2 attiva a tempo 240' nei gruppi SB e  $V_{T20}$ . b) \*  $p < 0.05$  vs MMP-9 attiva al tempo 240' nei gruppi SB e  $V_{T20}$ .

## 2.1.6. ANALISI ISTOLOGICHE

I risultati dell'analisi istologica sono brevemente riassunti nella seguente tabella:

GRUPPO	EAA	EI	Atl	Brsp	Infiamm.
SB	1	1	1	0	1
V <sub>T</sub> 8	1	1	1	F	2
V <sub>T</sub> 20	4	1	2	D	3

**Abbreviazioni:** **EAA:** enfisema alveolare acuto; **EI:** enfisema interstiziale; **Atl:** atelettasia polmonare; **Brsp:** broncospasmo; **Infiamm:** infiammazione.

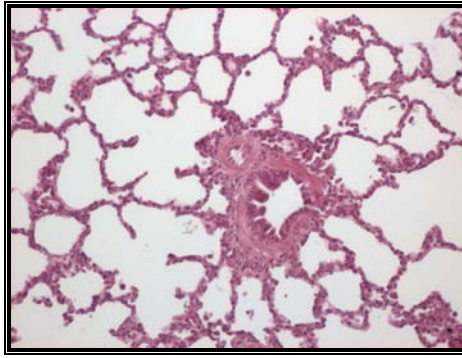
**Score:** **0:** nessuna lesione; **1:** lesioni lievi e focali; **2:** lesioni lievi, ma diffuse; **3:** lesioni moderate; **4:** lesioni gravi; **F:** focali; **D:** diffuse.

Nei campioni del gruppo SB sono state riscontrate modeste alterazioni relative ad un enfisema alveolare acuto, enfisema interstiziale, atelettasia ed infiammazione (fig. 2.1.6.1.a).

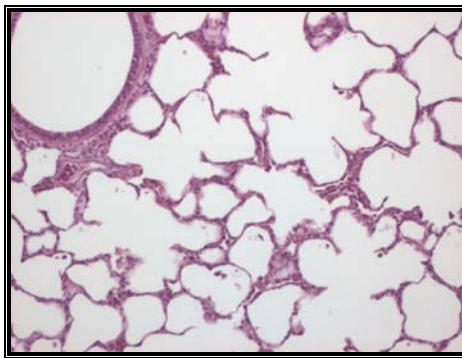
In gran parte delle sezioni del gruppo V<sub>T</sub>8 (b), le lesioni di enfisema alveolare acuto presenti erano di lieve entità, da focali ad estese. Era presente inoltre, sempre in grado lieve, enfisema interstiziale a carico di alcuni setti interlobulari di tutte le sezioni esaminate. Sono state riscontrate aree focali di lieve atelettasia, in relazione a reperti focali di broncocostrizione. In tutti i lobi si riscontrava infine flogosi da lieve a moderata, sotto forma di marginazione granulocitaria ed iniziali reperti di diapedesi granulocitaria cui si associavano, nei casi di maggiore intensità, presenza nel lume di diversi alveoli di macrofagi alveolari desquamati e modesta quantità di fibrina.

Nei soggetti appartenenti al gruppo V<sub>T</sub>20 (c) era presente un enfisema alveolare acuto diffuso, con estese rotture dei setti alveolari, ed un moderato enfisema interstiziale. Il broncospasmo era evidente in numerose sezioni di bronchi e bronchioli, inoltre sono stati riscontrati atelettasia e lesioni infiammatorie, con diatesi emorragica e diapedesi neutrofilica.

a.



b.



c.

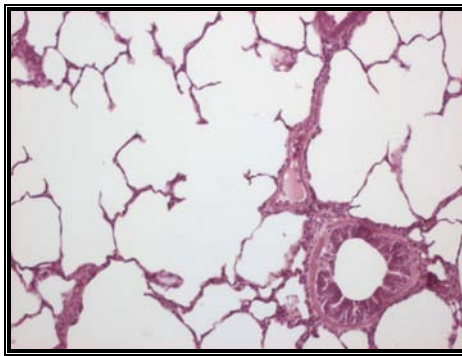


FIG. 2.1.6.1. Immagini istologiche di campioni di tessuto polmonare prelevati dai gruppi SB (a), VT8 (b) e VT20 (c). a) evidente versamento eosinofilo a livello alveolare; b) architettura polmonare pressoché inalterata; c) distruzione dei setti alveolari, tipica di enfisema alveolare acuto, lieve edema peribronchiale.

## 2.2 STRESS MECCANICO vs STRESS IPOSSICO vs STRESS SETTICO

### 2.2.1. PARAMETRI FISIOLÓGICI

La gittata cardiaca ha mantenuto valori costanti, entro i limiti fisiologici, in tutti i gruppi (dati non riportati).

La fig. 2.2.1.1. mostra l'andamento della pressione arteriosa polmonare media (MPAP) durante le fasi sperimentali. Nel gruppo di controllo (C), in respirazione spontanea, la MPAP è rimasta costante, entro valori fisiologici, e significativamente inferiore rispetto ai gruppi SS, da 20' a 180', e SI, da 20' a 120'. Nel gruppo SS la MPAP ha mostrato un picco a 20' significativamente superiore rispetto ai gruppi C, SI ed SM ed uno a 120' significativamente superiore rispetto ai gruppi C, SI e SM. Tra 120' e 180' è risultata significativamente superiore rispetto al gruppo SM. Nel gruppo SM la MPAP si è mantenuta costante per tutto il periodo sperimentale.

In figura 2.2.1.2. sono riportati i valori della pressione arteriosa media (MAP). Nel gruppo C la MAP manteneva livelli costanti, fisiologici e, in alcuni momenti, significativamente superiori rispetto agli altri gruppi: da 80' a 200' era significativamente superiore rispetto al gruppo SS e da 140' a 240' rispetto al gruppo SI. Negli animali del gruppo SS, da 80' a 200', la MAP ha mostrato una notevole riduzione, statisticamente significativa, rispetto ai gruppi SI, SM e C.

I valori di acqua polmonare extravascolare (EVLWi), mostrati in fig. 2.2.1.3., risultavano significativamente maggiori nel gruppo SS rispetto a SM a 80', 100', 220' e 240'; rispetto a SI da 60' a 240'; e rispetto al gruppo C da 60' a 180'. Il gruppo SM mostrava valori statisticamente superiori rispetto al gruppo C da 40' a 180'.

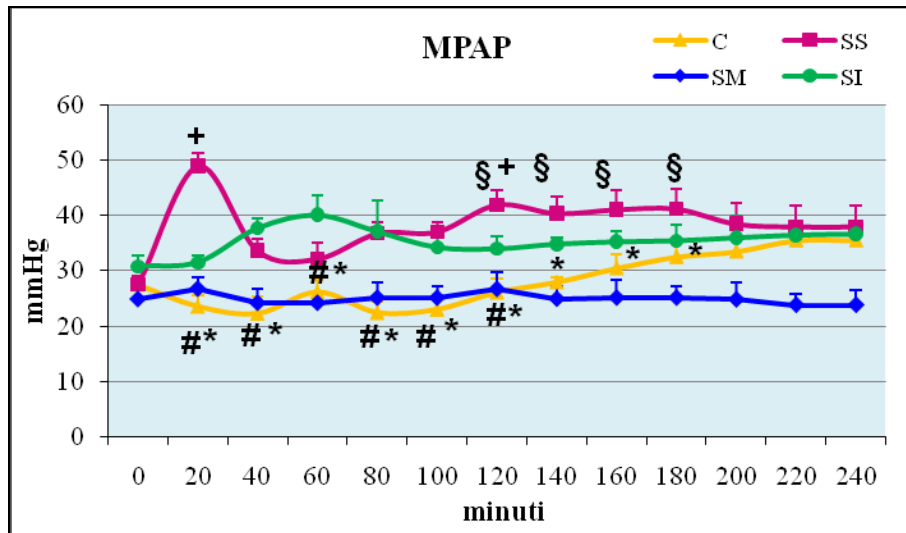


FIG. 2.2.1.1. Variazioni della pressione arteriosa polmonare media (MPAP) nei gruppi sperimentali. C: controllo; SM: stress meccanico; SI: stress ipossico; SS: stress settico. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  C vs SS; #  $p < 0.05$  C vs SI; §  $p < 0.05$  SS vs SM; +  $p < 0.05$  SS vs C, SI, SM.

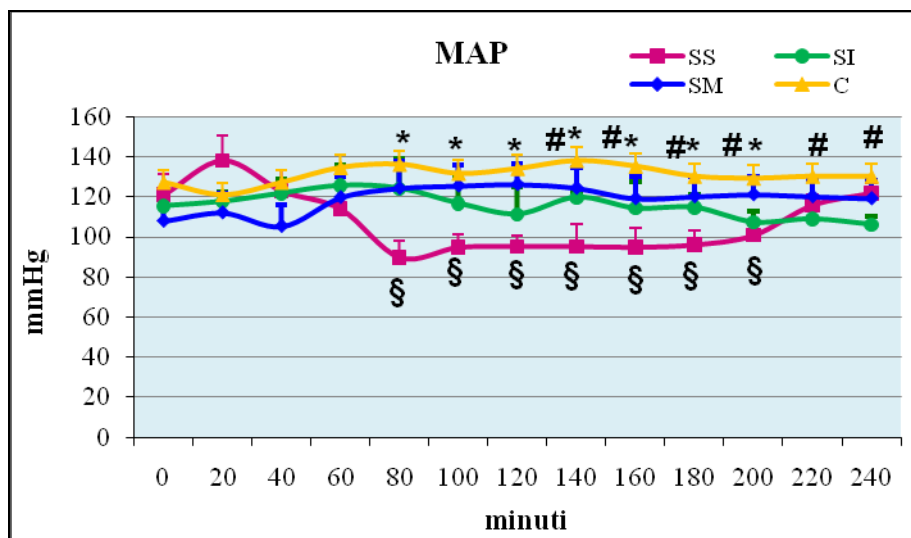


FIG. 2.2.1.2. Variazioni della pressione arteriosa sistemica media (MAP) nei gruppi sperimentali. C: controllo; SM: stress meccanico; SI: stress ipossico; SS: stress settico. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  C vs SS; #  $p < 0.05$  C vs SI; §  $p < 0.05$  SS vs C, SI, SM.



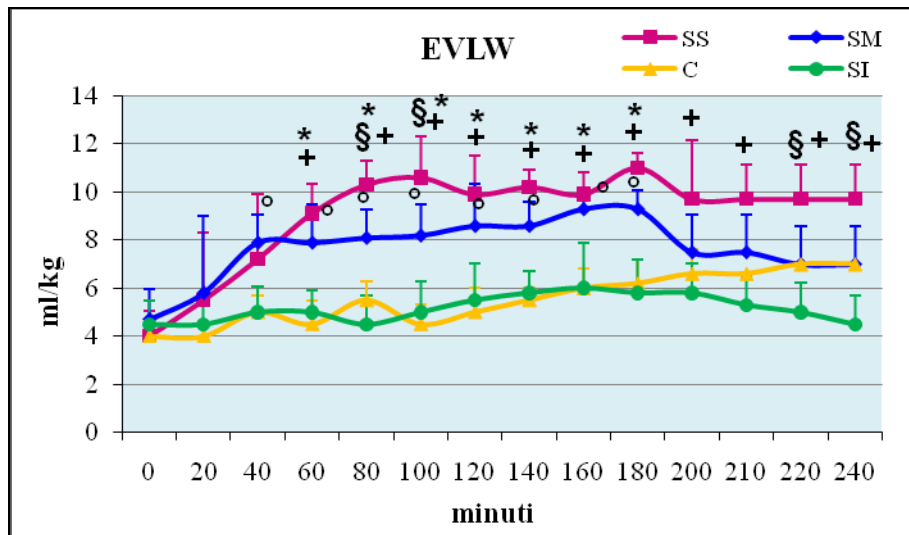


FIG. 2.2.1.3. Variazioni dell'acqua polmonare extravascolare (EVLWi) nei gruppi sperimentali. C: controllo; SM: stress meccanico; SI: stress ipossico; SS: stress settico. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  SS vs C; §  $p < 0.05$  SS vs SM; +  $p < 0.05$  SS vs SI; °  $p < 0.05$  SM vs C.

## 2.2.2. METALLOPROTEINASI (MMP-2 E MMP-9)

In figura 2.2.2.1. è mostrata, a titolo esemplificativo, la scansione del gel zimografico con le bande gelatinolitiche relative alle MMP-2 e MMP-9 del gruppo SS.

Le figure 2.2.2.2. e 2.2.2.3. mostrano i risultati ottenuti tramite indagine zimografica su campioni tissutali di polmone. La MMP-2 era presente in forma attiva nei gruppi C, SM, SI, mentre nel gruppo SS risultava presente unicamente sotto forma di zimogeno. Nei gruppi SM e SI è stata evidenziata un'induzione della proMMP-2 significativamente maggiore rispetto ai gruppi C e SS. La forma attiva era statisticamente inferiore nel gruppo C rispetto ai gruppi SM e SI, mentre nel gruppo SS era statisticamente inferiore rispetto agli altri gruppi (2.2.2.2.). Al contrario, la forma inattiva della MMP-9 era presente in tutti i gruppi, mentre la sua forma attiva era assente nei gruppi C, SM ed SI. Nel gruppo SS la MMP-9 era presente sia come zimogeno che in forma attiva: lo zimogeno presentava livelli statisticamente inferiori rispetto agli altri tre gruppi, mentre la forma attiva era statisticamente superiore rispetto agli altri gruppi. Nel gruppo C la proMMP-9 risultava statisticamente inferiore rispetto ai gruppi SM e SI (fig. 2.2.2.2.).

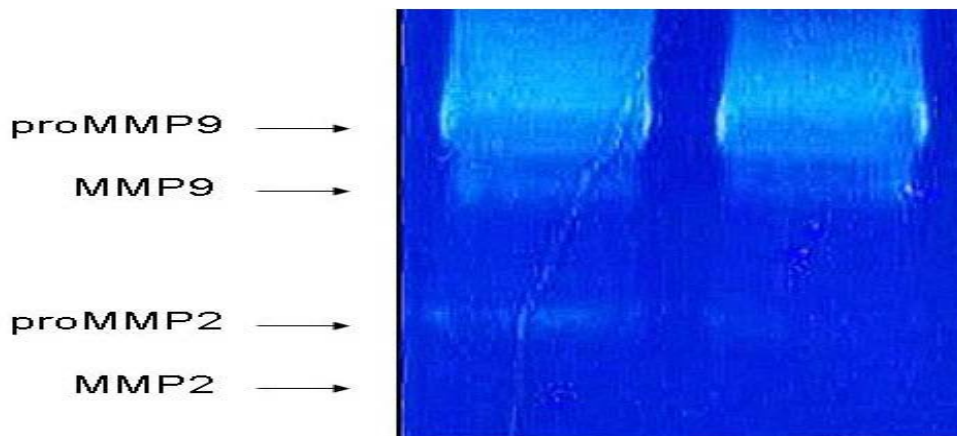


FIG. 2.2.2.1. Gel zimografico relativo all'attività delle metalloproteinasi 2 e 9 in campioni di tessuto polmonare del gruppo SS.

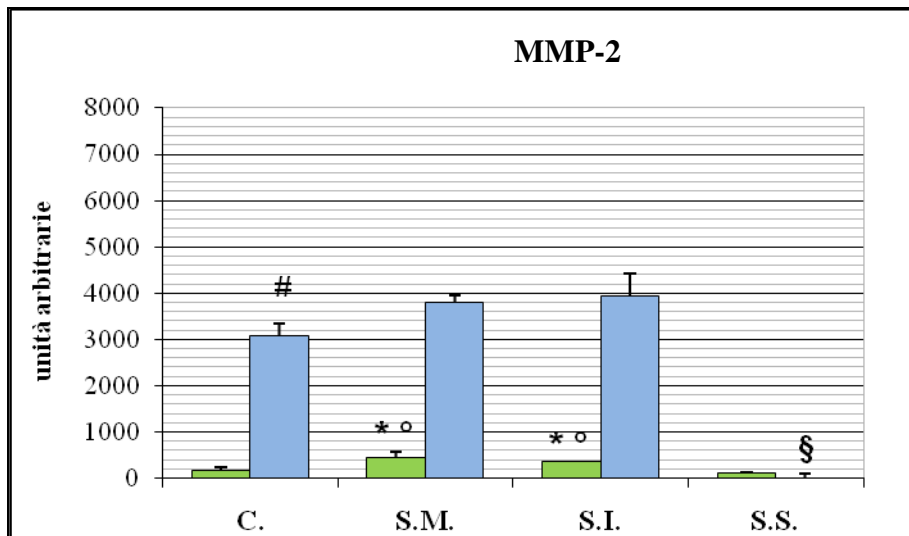


FIG. 2.2.2.2. Valutazione zimografica della presenza ed attivazione della MMP-2 nei gruppi sperimentali. C: controllo; SM: stress meccanico; SI: stress ipossico; SS: stress settico. Colonne verdi: proMMP-2; colonne azzurre: MMP-2 attiva. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs C; °  $p < 0.05$  vs SS; §  $p < 0.05$  vs gli altri gruppi; #  $p < 0.05$  vs SM e SI.

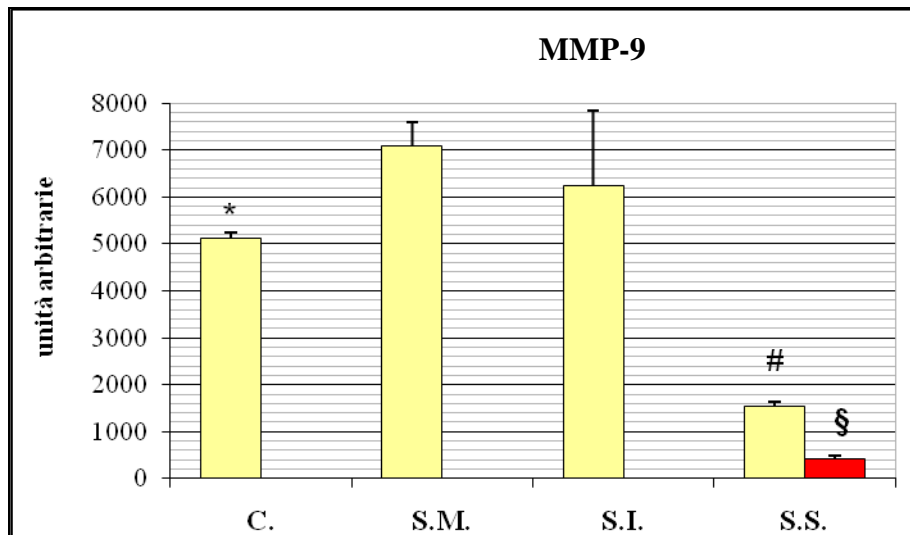


FIG. 2.2.2.3. Valutazione zimografica della presenza ed attivazione della MMP-9 nei gruppi sperimentali. C: controllo; SM: stress meccanico; SI: stress ipossico; SS: stress settico. Colonne gialle: proMMP-9; colonne rosse: MMP-9 attiva. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs SM e SI; #  $p < 0.05$  vs gli altri gruppi; §  $p < 0.05$  vs gli altri gruppi.

### 2.2.3. ANALISI ISTOLOGICHE

I risultati delle indagini istologiche sono brevemente riassunti nella seguente tabella:

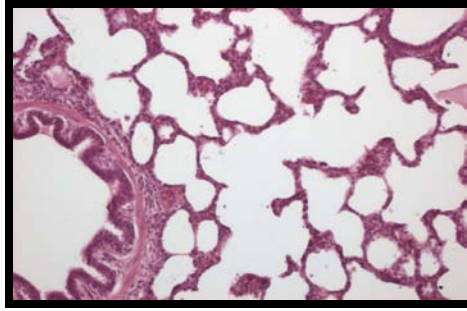
GRUPPO	EAA	EI	Atl	Brsp	Infiamm.	EP
C	0	0	0	0	1	0
SM	4	3	3	D	3	0
SI	3	3	0	0	2	3
SS	0	0	0	0	4	4

**Abbreviazioni:** **EAA:** enfisema alveolare acuto; **EI:** enfisema interstiziale; **Atl:** atelettasia polmonare; **Brsp:** broncospasmo; **Infiamm:** infiammazione; **EP:** edema polmonare

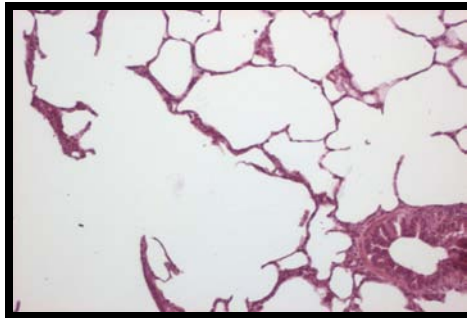
**Score:** **0:** nessuna lesione; **1:** lesioni lievi e focali; **2:** lesioni lievi, ma diffuse; **3:** lesioni moderate; **4:** lesioni gravi; **F:** focali; **D:** diffuse.

Nei campioni appartenenti al gruppo C (fig. 2.2.3.1.a) sono state osservate modeste alterazioni relative ad infiammazione. Nel gruppo SM (fig. 2.2.3.1.b) era presente un enfisema alveolare acuto diffuso, con estese rotture dei setti alveolari, ed un moderato enfisema interstiziale. Il broncospasmo era evidente in numerose sezioni di bronchi e bronchioli, inoltre sono state riscontrate atelettasia e lesioni infiammatorie, con diatesi emorragica e diapedesi neutrofilica. Nel gruppo SI (fig. 2.2.3.1.c) sono stati osservati enfisema alveolare ed interstiziale moderati ed una moderata infiammazione. Nel gruppo SS (fig. 2.2.3.1.d) sono stati evidenziati infiltrazione linfocitaria e neutrofilica con conseguente ispessimento dei setti interlobulari; da lieve a grave infiltrazione neutrofila negli spazi alveolari con setti alveolari ispessiti per la massiva infiltrazione di cellule infiammatorie; da lieve a moderata emarginazione neutrofilica nella maggior parte dei vasi ematici e vasi linfatici sub pleurici ectasici; spazi subpleurici dilatati; grave edema.

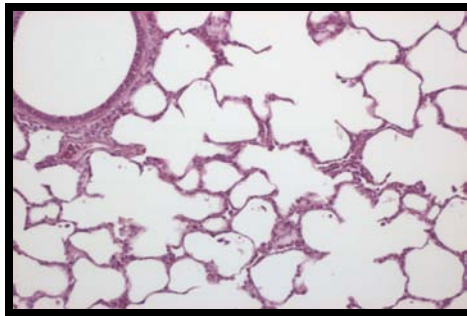
a.



b.



c.



d.

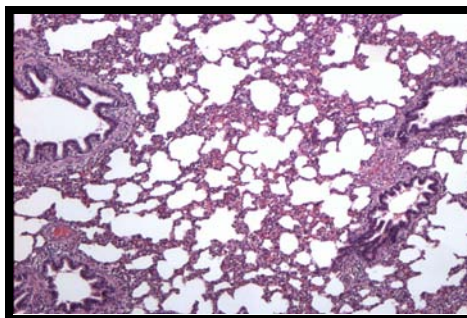


FIG. 2.2.3.1. Immagini istologiche di campioni di tessuto polmonare prelevati dai gruppi C (a), SM (b) SI (c) e SS (d). a) flogosi polmonare; b) imponente enfisema alveolare acuto, rotture dei setti alveolari, diffuso broncospasmo, aree di moderata infiammazione; c) moderato enfisema interstiziale ed alveolare; d) grave infiltrazione di cellule alveolari ed ispessimento dei setti.

### 3. DISCUSSIONE

#### 3.1. VOLUTRAUMA O STRESS MECCANICO

La ventilazione meccanica costituisce uno strumento indispensabile nelle unità di terapia intensiva e nel corso della maggior parte delle procedure chirurgiche, risultando essenziale per pazienti colpiti da ALI e ARDS. Nonostante i progressi in campo medico e biologico, i meccanismi molecolari sottesi alla VILI non sono ancora stati del tutto chiariti e la mortalità dei pazienti colpiti da ALI/ARDS rimane tuttora elevata. Inoltre, gli studi più recenti relativi alla VILI si sviluppano principalmente su modelli murini, che non permettono un'accurata misurazione e valutazione di parametri quali le modificazioni della meccanica respiratoria e della pressione arteriosa polmonare, la dinamica degli scambi gassosi e l'alterazione della permeabilità della barriera alveolo-capillare (Farre *et al.*, 2005; Wurfel, 2007; Wolthuis *et al.*, 2009). Gli studi svolti sul modello murino *in vivo*, inoltre, spesso vengono sviluppati in un ridotto tempo sperimentale e previo insulto polmonare. Negli ultimi decenni, come già sottolineato precedentemente, è risultato evidente come la ventilazione meccanica, nonostante l'importante ruolo salvavita, possa essere altamente dannosa per l'organismo, sia in pazienti sani che in condizioni patologiche (Dreyfuss *et al.*, 1985; Hernandez *et al.*, 1990). La possibilità che la ventilazione meccanica applicata con elevati volumi tidalici possa causare lesioni primarie a carico del polmone è stata ampiamente dimostrata sia in studi sperimentali effettuati su modelli animali (Dreyfuss e Saumon, 1998) sia in *trial* clinici (Amato *et al.*, 1998; Villard *et al.*, 2006).

Molteplici studi clinici hanno evidenziato una riduzione della mortalità, in pazienti colpiti da ARDS, a seguito dell'utilizzo di strategie ventilatorie di tipo protettivo, in grado di limitare lo sviluppo della VILI attraverso l'applicazione di ridotti volumi tidalici, tali da non arrecare lesioni da sovradistensione a livello polmonare. Tuttavia, anche questo tipo di ventilazione non sembra essere completamente scevro da effetti dannosi sul polmone e sul resto dell'organismo (ARDS Network, 2000; Dellinger *et al.*, 2004; Malhorta *et al.*, 2007).

Applicazioni ripetute di pressione transalveolare superiore alla capacità d'infrazione determinano stress tissutali che portano allo sviluppo di un danno indotto dalla ventilazione assistita, con lesioni molto simili da un punto di vista

istologico a quelle determinate da ALI/ARDS (Dreyfuss *et al.* nel 1985). Tali alterazioni istologiche sono da ricondursi al danno a carico dell'epitelio alveolare, della membrana basale e dell'endotelio dei vasi a livello di microcircolazione, e sono caratterizzate da edema polmonare derivante da un aumento della permeabilità alveolo-capillare (Nakos *et al.*, 2006).

Il presente studio ha dimostrato come, sia negli animali sottoposti a ventilazione meccanica con elevati volumi tidalici sia nei suini mantenuti in respirazione spontanea, fosse evidente la presenza di un imponente edema polmonare, come indicato dall'aumento dei livelli di acqua polmonare extravascolare (EVLW). È di vitale importanza, per i medici appartenenti ai reparti di terapia intensiva, comprendere il meccanismo responsabile dell'incremento dei valori di EVLW, in modo da individuare la causa dell'insorgenza di edema polmonare e quindi poterlo trattare in maniera corretta, rapida ed efficace. L'edema polmonare, come precedentemente detto, può essere determinato da uno spostamento dei fluidi a livello interstiziale ed alveolare a causa di un incremento della pressione idrostatica nel letto vascolare polmonare, si parla in questo caso di edema idrostatico, oppure può essere secondario ad un incremento della permeabilità della membrana alveolo-capillare, determinato da un danno a carico della stessa, come nel caso di ALI/ARDS. In questo caso si parla di edema da aumentata permeabilità. Discriminare tra queste due forme risulta indispensabile per poter predisporre un approccio terapeutico mirato (Hickling e Joyce, 1995).

Svariati studi, finalizzati alla determinazione dell'origine dell'insorgenza dell'edema polmonare in corso di ventilazione meccanica, hanno evidenziato uno stretto legame tra edema indotto da VILI e aumento della permeabilità della barriera alveolo-capillare, secondaria a lesioni sia livello endoteliale (Dreyfuss *et al.*, 1985; Dreyfuss e Saumon, 1998; Parker *et al.*, 1990) sia a carico dell'epitelio alveolare (Dreyfuss *et al.*, 1985; Dreyfuss *et al.*, 1988).

L'identificazione dell'eziologia dell'edema può essere valutata attraverso due parametri, EVLW e il rapporto EVLW/PBV. EVLW è l'unico parametro valutabile sul paziente *in vivo* grazie al quale è possibile determinare l'integrità della barriera alveolo-capillare, mentre il rapporto tra EVLW e il volume di sangue polmonare (EVLW/PBV) è un indice rigoroso della permeabilità del distretto capillare polmonare.



I nostri risultati hanno mostrato come negli animali ventilati con elevati volumi tidalici il rapporto EVLW/PBV raggiungesse livelli patologici, mentre nel gruppo posto in ventilazione spontanea tali valori restassero pressoché invariati. Come atteso, la sovradistensione alveolare ha determinato alterazioni cellulari ultrastrutturali ed un aumento della permeabilità solo negli animali ventilati con alti  $V_T$  e non nei soggetti in cui la distensione polmonare era contenuta, come nel gruppo ventilato con bassi  $V_T$  e nel gruppo in respirazione spontanea. Al contrario, gli animali appartenenti al gruppo SB presentavano dei valori molto elevati di EVLW al termine della pratica sperimentale. Questi dati mostrano in maniera inconfutabile che la formazione di un grave edema negli animali che respiravano senza supporto esterno era chiaramente correlata all'incremento della pressione arteriosa polmonare, con conseguente fuoriuscita di liquido nel parenchima. Questo dato, almeno in parte, può essere correlato alla difficoltà respiratoria incontrata dai soggetti determinata dalla posizione supina in cui erano mantenuti durante la fase chirurgica e sperimentale, ed all'azione inibitoria sulla funzionalità respiratoria indotta dal farmaco utilizzato per l'induzione ed il mantenimento dell'anestesia, il tiopentale sodico.

I valori di *compliance* del sistema respiratorio (Crs) tipicamente diminuiscono in relazione alla fuoriuscita di fluidi nel parenchima polmonare. Nei nostri risultati, inaspettatamente, nessun soggetto ha evidenziato modificazioni statisticamente significative durante la fase sperimentale. I valori di Crs erano significativamente differenti solo se messi a confronto tra i gruppi a 0 minuti o a 240 minuti. I suini ventilati con elevati  $V_T$ , all'inizio dell'esperimento, mostravano un incremento significativo dei valori di Crs rispetto agli altri gruppi a tempo 0', probabilmente dovuto all'azione di compressione esercitata dal ventilatore meccanico sulla parete alveolare, che ha provocato l'insorgenza di enfisema, come evidenziato anche dall'analisi istologica eseguita al termine della fase sperimentale. Nella fase precoce dell'esperimento la ventilazione con elevati  $V_T$  ha mostrato benefici solo in termini di ossigenazione, dal momento che la  $PaO_2$  era significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi e la  $PaCO_2$  era significativamente inferiore rispetto al gruppo ventilato con bassi  $V_T$  e simile al gruppo mantenuto in respirazione spontanea. Al termine della fase sperimentale, i suini in ventilazione spontanea mostravano valori di Crs significativamente inferiori rispetto agli altri due gruppi al tempo 240', come riflesso della fuoriuscita di liquido nel

parenchima polmonare indotta dall'aumento della pressione arteriosa polmonare. Questi dati confermano i risultati relativi ad EVLW. Infatti, negli animali del gruppo ventilato con elevati  $V_T$  questo parametro, nonostante l'incremento della permeabilità del distretto capillare polmonare al termine dell'esperimento, non mostrava variazioni significative rispetto alla fase iniziale. Questa valutazione rimane tuttavia senza una plausibile spiegazione, in modo particolare considerando le analisi istologiche che hanno evidenziato in questo gruppo un grave danno polmonare caratterizzato da un severo e diffuso enfisema interstiziale ed alveolare, presenza di un processo infiammatorio, broncocostrizione ed atelettasia.

Come atteso, nonostante il danno alveolo-capillare, i livelli di ossigenazione erano significativamente elevati nel gruppo ventilato con alti  $V_T$ . Nei soggetti che ventilavano spontaneamente l'ossigenazione era condizionata dai ridotti volumi tidalici e dall'incremento della pressione arteriosa polmonare, e di conseguenza risultava inferiore ai *range* fisiologici. È noto che l'organismo è maggiormente sensibile all'incremento di  $PaCO_2$  rispetto ad un incremento di  $PaO_2$ , infatti, nel gruppo SB questa condizione era controbilanciata da un incremento riflesso nella ventilazione polmonare (dati non riportati) e, di conseguenza, i valori di  $PaCO_2$  erano mantenuti entro i *range* fisiologici. Al contrario, gli animali ventilati con ridotti  $V_T$ , dal momento che respiravano in ventilazione meccanica, non hanno potuto attivamente modificare la frequenza respiratoria. Infatti, la strategia respiratoria di tipo protettivo, ovvero ventilazione a  $V_T$  8 ml/kg, ha determinato una moderata e non significativa riduzione dei valori della concentrazione di  $PaO_2$ , mentre i livelli di  $PaCO_2$  raggiungevano un severo e significativo stato di ipercapnia. Tuttavia, l'ipercapnia, secondo alcuni autori, può avere un effetto protettivo, si parla, infatti, di 'ipercapnia permissiva' (Hickling *et al.*, 1990). A supporto di tale ipotesi, lo stato infiammatorio sviluppato nei suini appartenenti al gruppo  $V_T$ 8 era moderato, come confermato dalle analisi istologiche, probabilmente grazie ad un'attenuazione dell'attivazione del fattore nucleare kappaB (NF-kB), elemento chiave nell'espressione di vari geni implicati nello sviluppo della risposta infiammatoria (Amato *et al.*, 1998). A livello cellulare l'ipercapnia, attraverso una riduzione del pH ematico, determina una diminuzione della richiesta di ossigeno, con un conseguente decremento del consumo mitocondriale ed una generale riduzione di tutte le attività cellulari. Questa

condizione di acidosi, quindi, se temporanea, potrebbe proteggere i tessuti dalla produzione di ulteriori acidi organici, radicali liberi, nitriti e fattori promotori della flogosi (Broccard *et al.*, 2001; Hasset e Laffey, 2007).

Gli effetti protettivi dell'ipercapnia permissiva, tuttavia, rimangono ad oggi ancora sperimentali, anche se studi di laboratorio suggeriscono un potenziale ruolo per eventuali applicazioni in ambito terapeutico (Kavanagh e Laffey, 2006; Chonghaile *et al.*, 2005).

Hickling e Joyce (1995) hanno dimostrato che l'ipercapnia aumenta l'apporto di ossigeno alle cellule, ma riduce direttamente la contrattilità del miocardio e della muscolatura liscia vascolare. I nostri risultati hanno evidenziato che tutti gli animali presentavano un peggioramento dell'efficienza cardiaca, ed in particolare gli elevati livelli di PaCO<sub>2</sub> raggiunti dagli animali ventilati con bassi V<sub>T</sub> hanno portato ad un significativo deterioramento della funzionalità cardiaca, confermando le conclusioni di Hickling e Joyce.

La stabilità della pressione arteriosa sistemica e della frequenza cardiaca, rilevata in tutti i soggetti senza differenze significative tra gruppi, era favorita dalla somministrazione di fluidi (soluzione fisiologica).

In svariati modelli sperimentali di ALI e di danno da riperfusione è stato rilevato un aumento plasmatico di ET-1 ed è stato dimostrato che l'inibizione della funzione di questa molecola, tramite l'utilizzo di farmaci bloccanti i suoi recettori, come il Tezosentan, determina la riduzione della gravità delle lesioni riconducibili all'ALI stessa (Geiger *et al.*, 2008; Donaubaue *et al.*, 2006). La somministrazione di questi farmaci migliorava gli scambi gassosi anche in animali privati di tensioattivo, dimostrando che l'ET-1 è corresponsabile nello sviluppo della VILI. Nel nostro studio la concentrazione plasmatica di questa molecola aumentava in modo significativo nei soggetti ventilati meccanicamente con elevati volumi tidalici. Tali risultati sono stati ulteriormente confermati dai dati relativi al BAL, in cui la presenza di ET-1 è stata evidenziata solo nei soggetti ventilati con V<sub>T</sub> pari a 20 ml/kg.

Dal momento che il danno polmonare indotto dalla ventilazione meccanica è il risultato di una complessa interazione tra varie forze meccaniche che agiscono sulle strutture polmonari, inclusa la matrice extracellulare (ECM), abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sul ruolo delle gelatinasi (Pelosi e Rocco, 2008).

Nei campioni polmonari autoptici esaminati, la proMMP-2 e la sua forma attiva erano espresse in tutti i soggetti, in maniera significativa negli animali ventilati con alti  $V_T$ , e, tra le due, la forma attiva si mostrava predominante rispetto allo zimogeno. Dal momento che la MMP-2 è una gelatinasi costitutiva e come tale espressa, appare chiaro come lo stimolo derivante dallo stiramento causato da elevati volumi tidalici sia sufficiente ad indurre la sua attivazione, come già riportato in letteratura (Haseneen *et al.*, 2003; Greenlee *et al.*, 2007).

Tutti i campioni di tessuto polmonare presentavano elevati livelli di espressione della proMMP-9, ma questi erano significativamente maggiori nel gruppo di animali ventilati con elevati volumi tidalici. Al contrario, nessun campione analizzato ha evidenziato la presenza della forma attiva di questa gelatinasi, sottolineando come, probabilmente, questo tipo di stimolo non fosse adeguato o applicato per un tempo non sufficiente alla sua attivazione. Risultati opposti sono stati evidenziati all'analisi del BAL tramite ELISA test. In questo caso la forma attiva della MMP-9 era presente ed era inaspettatamente maggiore nel gruppo ventilato con ridotti  $V_T$  rispetto agli altri due gruppi. Una delle possibili spiegazioni per la non attivazione della MMP-9 nei nostri campioni polmonari potrebbe essere legata al meccanismo di sintesi, rilascio ed attivazione di questa metalloproteinasi. La fonte più importante di MMP-9 è rappresentata dai neutrofili e dai macrofagi, reclutati dal circolo sanguigno. In queste cellule, la MMP-9 è conservata in forma latente in granuli, l'attivazione cellulare ne determina il suo rilascio nello spazio extracellulare ed una modificazione conformazionale ed un *auto-cleavage* conferisce a questa endopeptidasi capacità catalitiche (Owen *et al.*, 2003). Ad oggi, l'attivatore fisiologico *in vivo* rimane poco chiaro, ma studi *in vitro* hanno evidenziato come altre proteinasi e specie reattive dell'ossigeno possano indurre l'attivazione della MMP-9 (Chow *et al.*, 2007). Il meccanismo che determina l'*over-expression* di questa endopeptidasi nel BAL nel gruppo  $V_T8$  rimane senza spiegazione.

Risultati analoghi sono stati evidenziati dall'analisi della MMP-2 nel BAL: il gruppo  $V_T8$ , al termine della fase sperimentale, presentava una massiva *up-regulation* della MMP-2, significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi. Diversamente dalla proMMP-9, lo zimogeno della MMP-2 era espresso in tutti gli animali alla fine dell'esperimento e raggiungeva livelli significativamente maggiori rispetto al tempo 0' nei gruppi SB e  $V_T8$ . Tali

risultati possono essere messi in relazione al fatto, come già detto, che la MMP-2 è una gelatinasi costitutiva e, di conseguenza, ogni tipo di stimolo è in grado di determinare la sua espressione. Tuttavia, ancora una volta, l'incremento dell'espressione della forma attiva della MMP-2 e della MMP-9 nel gruppo  $V_T8$  rimane da chiarire.

Al fine di caratterizzare la risposta infiammatoria legata alla ventilazione meccanica, abbiamo analizzato l'espressione e l'attività delle metalloproteinasi nel fegato e nel rene, dal momento che è stato osservato un coinvolgimento di questi organi nei pazienti colpiti da insufficienza multi organo (MOFS) (ARDS Network, 2000). Nel rene lo stress meccanico indotto da elevati volumi respiratori induce la quasi completa attivazione della MMP-2, mentre, negli altri due gruppi, tale stimolo ha evocato l'espressione dello zimogeno, ma non è stato sufficiente a determinarne l'attivazione, fatta eccezione per una ridotta quantità di forma attivata nei suini ventilati con ridotti volumi tidalici. È ormai noto il fatto che la ventilazione meccanica può determinare un danno renale acuto attraverso tre possibili meccanismi: attraverso l'alterazione delle pressioni parziali dei gas nel sangue arterioso; attraverso gli effetti sul flusso ematico sistemico e renale; attraverso la genesi di una reazione infiammatoria polmonare, chiamata biotrauma, che, a causa della perdita di compartimentalizzazione, induce un rilascio di mediatori della flogosi nel circolo ematico, tra cui l'endotelina-1 (Kuiper *et al.*, 2005).

Come nei campioni polmonari ed epatici, la MMP-9 era espressa solamente in forma di zimogeno, sottolineando il fatto che, ancora una volta, lo stimolo non era adatto o forse della durata non sufficiente per la sua attivazione. A livello epatico, la MMP-2 era espressa in tutti i soggetti come zimogeno e come forma attiva, anche se, inaspettatamente, negli animali ventilati con elevati  $V_T$  l'espressione e l'attivazione era significativamente inferiore rispetto agli altri due gruppi.

I risultati del presente studio sono stati validati dai riscontri ottenuti mediante le analisi istologiche eseguite su campioni di tessuto polmonare. Il reperto patologico di maggiore importanza nei soggetti iperventilati era rappresentato da un severo enfisema alveolare acuto, diffuso e di elevata gravità. In questi soggetti, inoltre, era presente una flogosi polmonare di lieve entità, dato in linea con la letteratura scientifica. Al contrario, le lesioni riscontrate nei soggetti ventilati con

volumi ridotti e nei suini che respiravano spontaneamente erano, seppur presenti, di lieve entità.

### 3.2. STRESS MECCANICO *vs* STRESS IPOSSICO *vs* STRESS SETTICO

La funzione principale delle metalloproteinasi è il rimodellamento della matrice extracellulare nell'ambito di eventi fisiologici e patologici; la loro sintesi, secrezione ed attivazione sono deputate a svariate cellule ed avvengono a seguito di molteplici stimoli. Il presente studio ha permesso di evidenziare una modulazione acuta delle MMP a livello di tessuto polmonare, nonché il loro differente comportamento in risposta alla diversa natura dello stimolo.

In particolar modo, le gelatinasi A e B hanno mostrato una variabilità in relazione alla natura settica o non dello stress applicato a livello polmonare, evidenziando situazioni pressoché speculari.

Nei campioni autoptici di tessuto sottoposto a stress meccanico ed ipossico, infatti, è stato possibile rilevare l'attivazione della MMP-2 e la sintesi, ma non l'attivazione, della MMP-9. Al contrario, nei campioni di polmone sottoposti a stress di tipo settico è stata osservata sia la sintesi che l'attivazione della MMP-9, mentre la MMP-2 era presente solo in piccole quantità in forma inattiva. L'attivazione della MMP-2 nei gruppi sottoposti a stress di tipo non settico è indicativa del ruolo di 'marker precoce' di questo enzima, come già riportato in letteratura ma ancora da chiarire (Gushima *et al.*, 2001; Fink, 2002). Il *team* di ricerca guidato da Gushima, nel 2001, ha evidenziato la precoce espressione della MMP-2 sia nel tessuto polmonare che nel BAL di suini sottoposti a danno polmonare acuto da iperossia. La funzione di questo precoce innalzamento dei livelli di MMP-2, tuttavia, non è stata chiarita. La MMP-2 può essere prodotta da macrofagi alveolari e da cellule epiteliali alveolari in risposta ad un insulto che danneggia direttamente le cellule strutturali (Lalu *et al.*, 2002; Whatling *et al.*, 2004), come ad esempio uno stress di origine meccanica legato allo stiramento tissutale, dovuto all'applicazione di elevati volumi tidalici, o all'ipertensione ed alla vasocostrizione polmonare da ipossia. Tale condizione, nel nostro studio, è stata ulteriormente confermata dall'analisi istologica, che ha permesso di evidenziare, nei gruppi SM e SI, gravi lesioni strutturali quali enfisema, rottura dei setti interalveolari ed atelettasia. Dai risultati ottenuti, abbiamo ipotizzato che la precoce attivazione della MMP-2 sia di natura protettiva. La gelatinasi A,

infatti, è tradizionalmente nota per essere in grado di attivare la cascata di enzimi proteolitici, agendo come effettore del processo infiammatorio. In realtà, recentemente, è stato suggerito che tale endopeptidasi possa avere un'azione di blocco della risposta infiammatoria stessa, focalizzando la propria attività proteolitica su molecole quali le citochine e le chemochine, in modo da inibire la chemiotassi e, di conseguenza, determinare un minor richiamo di cellule infiammatorie ed una minor *clearance* degli infiltrati infiammatori eventualmente presenti (Van Lint e Libert, 2007). In accordo con questa ipotesi, anche nei nostri animali la componente infiammatoria nei tessuti polmonari dei gruppi SM e SI è risultata da lieve a moderata. La MMP-2, nel gruppo controllo ha mantenuto un comportamento simile agli altri due gruppi, seppur a livelli significativamente inferiori, in assenza di analoghe alterazioni morfologiche. Questo risultato potrebbe essere correlato ad alterazioni strutturali provocate dalla probabile difficoltà respiratoria nei suini posti in ventilazione spontanea e mantenuti in posizione supina per la tutta la fase sperimentale.

Altre motivazioni potrebbero essere di natura metodologica. In primo luogo, i tessuti polmonari analizzati non sono stati preventivamente perfusi con soluzione salina e di conseguenza, al momento dell'analisi, presentavano elevate quantità di cellule del circolo ematico quali macrofagi, neutrofili e monociti. La MMP-2 di origine ematica potrebbe aver eliminato la differenza nell'espressione parenchimale della gelatinasi tra campioni di controllo e campioni sottoposti a danno polmonare acuto non settico.

Inoltre, i tessuti analizzati contenevano svariate cellule tra cui cellule epiteliali alveolari, cellule epiteliali bronchiali, fibroblasti e cellule interstiziali, tutti elementi potenzialmente in grado di esprimere la metalloproteinasi-2. I risultati zimografici riflettono l'attività totale della MMP-2, contribuendo a ridurre tale differenza.

Infine, la MMP-2 è normalmente prodotta a livello polmonare da cellule epiteliali ed endoteliali, attraverso un *pathway* costitutivo.

Per quanto concerne la MMP-9 nei gruppi C, SM e SI, è stata sintetizzata, ma non attivata. Questo andamento potrebbe essere determinato sia dalla ridotta durata dello stimolo che dalla sua natura, e potrebbe essere indicativo della presenza di un'alterazione delle proprietà biomeccaniche dell'organo, in assenza di una componente infiammatoria, soprattutto su base neutrofilica. La MMP-9, infatti, è



tipicamente espressa, come già sottolineato, dalle cellule infiammatorie attivate ed è un *marker* specifico della degradazione tissutale in corso di edema polmonare. Non sorprende, dunque, che solo i soggetti sottoposti a stress settico, in cui sono stati osservati grave edema polmonare e grave infiltrazione linfocitaria e neutrofilica dei setti interlobulari, la gelatinasi B sia stata sintetizzata ed attivata, rimpiazzando completamente la gelatinasi A.

Il modello sperimentale utilizzato nel presente studio è senza dubbio innovativo dal momento che gli studi sperimentali finora svolti si sono focalizzati su studi istopatologici in modelli murini (Ferry *et al.*, 1997; Pardo *et al.*, 1996) e, soprattutto, per il fatto che è stata approfondita l'espressione delle MMP nelle fasi più precoci del danno polmonare, affiancando lo studio di queste proteasi a specifici parametri fisiologici. Inoltre, il suino è senz'ombra di dubbio l'animale che maggiormente si avvicina alla fisiopatologia dell'uomo ed è quindi un modello facilmente sovrapponibile a quello umano (Todo e Herman, 1986; Gehrke e Pabst, 1990).

I parametri fisiologici funzionali analizzati in tutti i soggetti sono risultati in linea con le alterazioni morfologiche polmonari.

In particolar modo, i gruppi sottoposti a stress settico e a stress ipossico hanno evidenziato una tipica ipertensione polmonare entro i primi 60 minuti di sperimentazione, nel primo caso da ricondursi alla somministrazione di LPS, nel secondo caso all'inalazione della miscela ipossica. Solo nel gruppo SS, tuttavia, la pressione arteriosa polmonare si è mantenuta significativamente elevata per tutta la durata dell'esperimento. Tale aumento si è riflesso nella presenza di acqua polmonare extravascolare, in termini di aumento dei valori di EVLW.

## 4. CONCLUSIONI

In conclusione, dagli studi eseguiti, appare evidente come la ventilazione meccanica possa modificare profondamente l'integrità e la funzionalità del parenchima polmonare. La scelta di una tipologia di ventilazione che eviti tali danni, assicurando allo stesso tempo un appropriato scambio gassoso, rappresenta quindi il *target* a cui si deve giungere per garantire un'adeguata sopravvivenza agli individui che debbano comunque essere sottoposti a questo tipo di assistenza respiratoria. Grazie all'utilizzo di un modello sperimentale suino che mima la fisiologia umana, abbiamo osservato il *trend* dei principali parametri valutati nelle unità di terapia intensiva. Sebbene l'utilizzo di ridotti volumi tidalici possa ridurre l'insorgenza di un danno polmonare, i nostri risultati hanno evidenziato come la ventilazione meccanica presenti comunque alcune controindicazioni e siano quindi necessari ulteriori studi per chiarire il meccanismo che determina lo sviluppo della VILI, ad oggi ancora non totalmente chiarito. Inoltre, Il presente studio ha dimostrato la precoce espressione delle MMP-2 e 9 a livello polmonare, il differente comportamento in relazione al tipo di stimolo applicato e la corrispondenza tra espressione/attivazione delle gelatinasi ed alterazioni istopatologiche dell'organo. Questi enzimi possono esplicare effetti sia positivi, o protettivi, che negativi nella patogenesi e nella progressione delle patologie polmonari, ma le funzioni di queste proteasi sono molto complesse e rimangono ad oggi ancora da approfondire.

## IV. BIBLIOGRAFIA

- Abraham D. a Dashwood M., 2008. Endothelin – role in vascular disease. *Rheumatology*. 47 (Suppl.5):v23-v24.
- Adler K.B., Fisher B.M., Li H., Choe N.H., Wright D.T., 1995. Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13(5):526-530.
- Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S., Braquet P., Chabrier P.E., 1991. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J. Clin. Invest.* 87(1):155-162.
- Albert R.K., Lakshminarayan A.S., Hildebrandt J., Kirk W., Butler J., 1979. Increased surface tension favors pulmonary edema formation in anesthetized dogs' lungs. *J. Clin. Invest.* 63:1015-1018.
- Albert J., Radomski A., Soop A., Sollevi A., Frostell C., Radomski M. W., 2003. Differential release of matrix metalloproteinase-9 and nitric oxide following infusion of endotoxin to human volunteers. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 47:407–410.
- Albertini M., Vanelli G., 1991. Che fatica respirare! *Scienza veterinaria*. Maggio-Giugno/Luglio-Agosto: 11-14.
- Amato M.B., Barbas C.S., Madeiros M.D., Magaldi R.B., Schettino G.P., Lorenzi-Filho G., Kairalla R.A., Deheinzelin D., Munoz C., Oliveira R., Takagaki Y., Carvalho C.S., 1998. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 338:347-354.
- Astiz ME, DeGent GE, Lin RY, 1995. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*; 23:265–271
- Auten R.L., Vozzelli M., Clark R.H., 2001. Volutrauma. What is it, and how do we avoid it? *Clin. Perinatol.* 28(3): 505-515.
- Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G., 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell. Sci.* 115:3719-3727.
- Barnes P.J., Belvisi M.G., 1993. Nitric oxide and lung disease. *Thorax.* 48(10):1034-43.

- Barth A., Bauer R., Gedrange T., Walter B., Klinger W., Zweiner U., 1998. Influence of hypoxia and hypoxia/hypercapnia upon brain and blood peroxidative and glutathione status in normal weight and growth-restricted newborn piglets. *Exp. Toxicol. Pathol.* 50:402-410.
- Bates J.H., Hunter I.W., Sly P.D., Okubo S., Filiatrault S., Milic-Emili J., 1987. Effect of valve closure time on the determination of respiratory resistance by flow interruption. *Med. Biol. Eng. Comput.* 25(2):136-140.
- Belperio J.A., Keane M.P., Burdick M.D., Londhe V., Xue Y.Y., Li K., Phillips R.J., Strieter R.M., 2002. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J. Clin. Invest.* 110:1703-1716.
- Benamou A.E., Art T., Marlin D.J., Roberts C.A., Lekeux P., 1999. Effect of exercise on concentrations of immunoreactive endothelin in bronchoalveolar lavage fluid of normal horses and horses with chronic obstructive pulmonary diseases. *Equine Vet. J.* 30:92-95.
- Bendeck M.P., Zempo N., Clowes A.W., Galardy R.E., Reidy M.A., 1994. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-2 expression after arterial injury in the rat. *Circ. Res.* 75:539-545.
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Fiers W., Cotran R.S., Gimbrone M.A. Jr, 1985. Recombination tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83:4533-4537.
- Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A., 1993. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit. Rev. Oral Biol. And Med.* 4(2):197-250.
- Bode W., Gomis-Rüth F.X., Stöckler W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be group into a common family, the metzincins. *Fed Eur Bioche.* 331,1,2:134-140.

- Bowton D.L., Kong D.L., 1989. High tidal volume ventilation procedures increased lung water in oleic acid-injury rabbit lungs. *Crit. Care Med.* 17(9):908-911.
- Brealey D., Brand M., Hargreaves I., Heales S., Land J., Smolenski R., 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 360:212-223
- Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H., 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347(6295):768-770.
- Bredt D.S., Snyder S.H., 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(2):682-685.
- Broccard A.F., Hotchkiss J.R., Vannay C., Markert M., Sauty A., Feihl F., Schaller M.D., 2001. Protective effects of hypercapnic acidosis on ventilator-induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:802-806.
- Brower R.G., Matthay M.A., Morris A., Schoenfeld D., Thompson B.T., 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342(18): 1301-1308.
- Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 368: 157–169
- Brunner F., Bras-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira A.F., 2006. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 111:508-531.
- Carcillo J.A., Fields A.I., 2007. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Crit. Care Med.* 30 : 1365-1378.
- Carlton D.P., Cummings J.J., Scheerer R.G., Puolain F.R., Bland R.D., 1990. Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. *J. Appl. Physiol.* 69:577-583.
- Celermajer D.S., Sorensen K.E., Georgakopoulos D., Bull C., Thomas O., Robinson J., Deanfield J.E., 1993. Cigarette smoking is associated with

dose-related and potentially reversible impairment endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 88(5 Pt 1):2149-2155.

- Chan T., Thiagarajan R.R., Frank D., Bratton S.L., 2008. Survival after extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in infants and children with heart disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136:984–992.
- Cinel I., Opal S.M., 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. *Crit. Care Med.* 37(1):291-304.
- Clement M.G., Marzani M., Dimori M., Albertini M., 1998. Prostanoids counterbalance the bronchoconstrictor activity of endothelin-1 in pigs. *Prostaglandins Leukot., Essent Fatty Acids.* 58(3):177-183.
- Coakley R.J., Taggart C., Greene C., McElvaney N.G., O’Neill S.J., 2002. Ambient pCO<sub>2</sub> modulates intracellular pH, Intracellular oxidant generation, and interleukine-8 secretion in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 71:603-610.
- Coker P.J., Hernandez L.A., Peevy K.J., Adkins K., Parker J.C., 1992. Increased sensitivity to mechanical ventilation after surfactant inactivation in young rabbit lung. *Crit. Care Med.* 20:635-640.
- Cohen J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420:885-891.
- Chonghaile M., Higgins B., Laffey J.G., 2005. Permissive hypercapnia: role in protecting lung ventilator strategies. *Curr. Opin. Crit. Care Med.* 11:56-62.
- Chow A.K., Cena J., Schulz R., 2007. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 152:189-205.
- Cooper J.A., Van Der Zee H., Line B.R., Malik A.B., 1987. Relationship of end-expiratory pressure, lung volume and 99mTc-DTPA clearance. *J Appl. Physiol.* 63:1586-1590.
- Corbridge T.C., Wood L.D., Crawford G.P., Chudoba M.J., Yanos J., Sznajder J.I., 1990. Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142(2): 311-315.
- Costello M.L, Mathieu-Costello O., West J.B., 1992. Stress failure of alveolar epithelial cells studied by scanning electron microscopy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:1446-1455.

- D'Angelo E., Koutsoukou A., Della Valle P., Gentile G., Pecchiari M., 2008. Cytokine release, small airway injury and parenchymal damage during mechanical ventilation in normal open-chest rats. *J. Appl. Physiol.* 104(1):41-49.
- De Backer D., Creteur J., Preiser J-C., Dubois M-J. Vincent J-L., 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:98-104
- Dellinger R.P., Carlet J.M., Masur H., Gerlach H., Calandra T., Cohen J., Gea-Banacloche J., Keh D., Marshall J.C., Parker M.M., Ramsay G., Zimmerman J.L., Vincent J.L., Levy M.M. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. 2004. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 32:858–73.
- Dinarello C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112, 321S–329S
- Donaubauer B., Busch T., Lachmann R., Deja M., Petersen B., Francis R., Träger A., Ebsen M., Boemke W., Kaisers U., 2006. Low-doses inhalation of an endothelin-A receptor agonist in experimental acute lung injury: ET-1 plasma concentration and pulmonary inflammation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231(6):960-966.
- D'Ortho M.P., Jarreau P.H., Delacourt C., Macquin-Mavier I., Levame M., Pezet S., Harf A., Lafuma C., 1994. Matrix metalloproteinase and elastase activities in LPS-induced acute lung injury in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 266:L209-L216.
- Dos Santos C.C., Slutsky A.S., 2000. Mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J. Appl. Physiol.* 89:1645-1655.
- Doroszko A., Hurst T.S., Polewicz D., Sawicka J., Fert-Bober J., Johnson D.H., Sawicki G., 2010. Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury. *Proteome Sci.* 29:8.3.
- Dreyfuss D., Basset G., Soler P., Saumon G., 1985. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces



pulmonary microvascular injury in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132:880-884.

- Dreyfuss D., Soler P., Basset G., Saumon G., 1988. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume and positive end-expiratory pressure. *America Review of Respiratory disease.* 137:1159-1164.
- Dreyfuss D., Saumon G., 1992. Barotrauma is volutrauma, but which volume is the one responsible? *Intensive Care Medicine.* 18:139-141.
- Dreyfuss D., Soler P., Saumon G., 1995. Mechanical ventilation-induced pulmonary edema: interaction with previous lung alterations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1568-1575.
- Dreyfuss D., Saumon G., 1998. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental stuies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:294-323.
- Dreyfuss D., Martin-Lefevre L., Saumon G., 1999. Hyperinflation induced lung injury during alveolar flooding in rats: effect of perfluorocarbon instillation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:1752-1757.
- Duszyk M., Radomski M.V., 2000. The role of nitric oxide of ion channels in airway epithelium: implications for diseases of lung. *Free Radic. Res.* 33(5):449-459.
- Dyson A. Stidwill R., Taylor V., Singer M., 2007. Tissue oxygen monitoring in rodent model of shock. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293:H526-533
- Edwards Y.S., Shuterland L.M., Murray A.W., 2000. NO protects alveolar type II cells from stretch-induced apoptosis. A novel role for macrophages in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279(6):L1236-L1242.
- Egan E.A., Nelson R.M., Olver R.E., 1976. Lung inflation and alveolar permeability to non electrolytes in the adult sheep in vivo. *J. Physiol. (Lond.).* 260:409-424.
- Egan E.A., 1980. Response of alveolar epithelial solute permeability to changes in lung inflation. *J. Appl. Physiol.* 49:1032-1036.
- Engel C., Brunkhorst F.M., Bone H.G., Brunkhorst R., Gerlac H., Grond S., 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: result from a National prospective multi center study. *Intens. Care Med.* 33:606-618.

- Farre R., Granell S., Rotger M., Serrano-Mollar A., Closa D., Navajas D., 2005. Animal model of unilateral ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 31(3):487-490.
- Faridy E.E., Permutt S., Riley R.L., 1966. Effect of ventilation on surface forces in excised dogs' lungs. *J. Appl. Physiol.* 21:1453-1462.
- Faridy E.E., 1976. Effect of ventilation on movement of surfactant in airways. *Resp. Physiol.* 27:323-334. *Am.J Respir. Cell Mol. Biol.* 25:717-724.
- Feihl F. and Perret C., 1994. Permissive hypercapnia should we be? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:1722-1737.
- Ferry G., Lonchamp M., Pennel L., de Nanteuil G., Canet E., Tucker G.C., 1997. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an *in vivo* model of acute lung injury. *FEBS Lett.* 402:111-115.
- Fink M.P., 2002. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr. Opin. Crit. Care.* 8(1):6-11.
- Frank J.A., Wray C.M., McAuley D.F., Schwendener R., Matthay M.A., 2006. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291(6):L1191-L1198.
- Frisdal E., Gest V., Vieillard-Baron A., Levame M., Lepetit H., Eddahibi S., Lafuma C., Harf A., Adnot S., d'Ortho M-P., 2001. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 18:838-845.
- Foda H.D., Rollo E.E., Drews M., Conner C., Appelt K., Shalinsky D.R., Zucker S., 2001. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastad (AG3349).
- Fu Z., Costello M.L., Tsukimoto R., Prediletto R., Elliot A.R., Mathieu-Costello O., West J.B., 1992. High volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J. Appl. Physiol.* 73:123-133.
- Gehrke I., Pabst R., 1990. Cell composition and lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage of normal pigs of different ages in comparison with germ-free and pneumonic pigs. *Lung.* 168:79-92.

- Geiger R., Kleinsasser A., Meier S., Neu N., Pajk W., Fischer V., Tremel B., Stein J.I., Loeckinger A., 2008. Intravenous tezocentan improve gas Exchange and hemodynamics in acute lung injury secondary to meconium aspiration. *Intensive Care Med.* 34(2):368-376.
- Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D., Michel R.P., Levy R., Shennib H., Kimura S., Masaki T., Duguid W.P., Steward D.J., 1993. Expression of Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 328(24):1732-1739.
- Giaid A., Saleh D., 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lung of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 333(4):214-221.
- Greenfield L.J., Ebert P.A., Benson D.W., 1964. Effect of positive pressure ventilation on surface tension properties on lung extracts. *Anesthesiology.* 25:312-316.
- Greenlee K.J., Werb Z., Kheradmand F., 2007. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. *Physiol. Rev.* 87:69-89.
- Gushima Y., Ichikado K., Suga M., Okamoto T., Iyonaga K., Sato K., Miyakawa H., Ando M., 2001. Expression of matrix metalloproteinases in pigs with hyperoxia-induced acute lung injury. *Eur. Resp. J.* 18(5):827-837.
- Haitsma J.J., Uhlig S., Goggel R., Verbrugge S.J., Poelma D.L., Lachmann B., 2000. Ventilator induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med.* 287:1131-1137.
- Halbertsma F.J., Vaneker M., Pickkers P., Snijdelaar D.G., van Egmond J., Scheffer G.J., van der Hoeven H.G., 2008. Hypercapnic acidosis attenuates the pulmonary innate immune response in healthy mice. *Crit. Care Med.* 36:2403-2406.
- Hall S.M., Haworth S.G., 1992. Onset and evolution of pulmonary vascular disease in young children: abnormal postnatal remodeling studied in lung biopsies. *J. Pathol.* 166(2): 183-193.

- Haseneen N.A., Vaday G.G., Zucker S., Foda H.D., 2003. Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284:L541-547.
- Hasset P., Laffey J.G., 2007. Permissive hypercapnia: balancing risks and benefits in the peripheral microcirculation. *Crit. Care Med.* 35(9):2229-2231.
- Herget J., Suggett A.J., Leach E., Barer G.R., 1978. Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax.* 33:468-473.
- Hernandez L.A., Peevy K.J., Moise A.A., Parker J.C., 1989. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J. Appl. Physiol.* 66:2364-2368.
- Hernandez L.A., Coker P.J., May S., Thompson A.L., Parker J.C., 1990. Mechanical ventilation increases microvascular permeability in oleic injured lungs. *J. Appl. Physiol.* 69:2057-2061.
- Hickling K.G., Walsh J., Henderson S., Jackson R., 1990. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 16:372-377.
- Hickling K.G., Joyce C., 1995. Permissive hypercapnia in ARDS and its effects on tissue oxygenation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 107:201-208.
- Hinman L.E., Beilman G.J., Groehler K.E. Sammak P.J., 1997. Wound-induced calcium waves in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 273:L1242-1248.
- Hirano S., 1998 Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the beta 2 integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology.* 93(1):102-108.
- Hotchkiss R. S. *et al.*, 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 27, 1230–1251.
- Howell J.B.L., Permutt S., Proctor D.F., Riley R.L., 1961. Effect of inflation of the lung on different parts of pulmonary vascular bed. *J. Appl. Physiol.* 16:71-76.

- Ilif L.D., 1971. Extra-alveolar vessels and edema development in excised dog lungs. *Circ. Res.* 28:524-532.
- Imai Y., Kawano T., Miyasaka K., Takata M., Imai T., Okuyama K., 1994. Inflammatory chemical mediators during conventional ventilation and during high frequency oscillatory ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:1550-1554.
- Imanaka H., Shimaoka M., Matsuura N., Nishimura M., Ohta N., Kiyono H., 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophils infiltration, macrophage activation and TGF- $\beta$  1mRNA upregulation in rat lungs. *Anesthesia Analgesia.* 92:428-436.
- Kavanagh B.P. and Laffey J.G., 2006. Hypercapnia: permissive and therapeutic *Minerva Anesthesiol.* 72(6):567-576.
- Kim J.H., Crandall E.D., 1982. Effects of lung inflation on alveolar epithelial solute and water transport properties. *J. Appl. Physiol.* 52:1498-1505.
- Kim J.H., Suk M.H., Yoon D.W., Lee S.H., Hur G.Y., Jung K.H., Jeong H.C., Lee S.Y., Suh I.B., Shin C., Shim J.J., In K.H., Yoo S.H., Kang K.H., 2006. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 prevents neutrophilic inflammation in ventilator induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291(4):L580-587.
- Kim K. C., and Lee C. H., 2005. MAP kinase activation is required for the MMP-9 induction by TNF-stimulation. *Arch. Pharm. Res.* 28:1257–1262.
- Knowles H., Leek R., and Harris A.L., 2004. Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy. *Cancer Inflammation* 256: 189–204.
- Kobayashi Y., Matsumoto M., Kotani M., Makino T., 1999. Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langherans cell migration and maturation. *J Immunol.* 163(11):5989-5993.
- Kuiper J.W., Groeneveld A.B.J., Slutsky A.S., Plotz F.B., 2005. Mechanical ventilation and acute renal failure. *Crit. Care Med.* 33:1408-1415.
- Kuklin V., Kirov M., SoverashaevM., Andreasen T., Ingebretsen O.C., Ytrehus K., Bjertnaes L., 2005. Tezosentan-indecided attenuation of lung

injury in endotoxemic sheep is associated with reduced activation of protein kinase C. *Crit. Care.* 9(3):R211-217.

- Kusano K., Miyaura C., Inada M., Tamura T., Ito A., Nagase H., Kamoi K., Suda T., 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology.* 139(3):1338-1345.
- Laffey J.G. and Kavanagh B.P., 2000. Biological effects of hypercapnia (review). *Intens. Care Med.* 26:133-138.
- Laffey J.G., Tanaka M., Engelberts D., Luo X., Yuan S., Keith Tanswell A., Post M., Lindsay T., Kavanagh B.P., 2000. Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:2287-2294.
- Laffey J.G., Honan D., Hopkins N., Hyvelin J.M., Boylan J.F., McLoughlin P., 2004. Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169:46-56.
- Lai T., Cai S., Guo Z., 2010. Serum and lung endothelin-1 increased in a canine model of ventilator-induced lung injury. *Chin. Med. J.* 123(8):1021-1027.
- Lalu M.M., Csonka C., Giricz Z., Csont T., Schulz R., Ferdinandy P., 2002. Preconditioning decrease ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem. Biophys. Res.* 296:937-941.
- Landry D. W. and Oliver J. A., 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 345, 588–595.
- Lequier L., Joffe A.R., Robertson C.M., Dinu I.A., Wongswadiwat Y., Anton N.R., Ross D.B., Rebeyka I.M., 2008. Western Canadian Complex Pediatric Therapies Program Follow-up Group. Two-year survival, mental and motor outcome after extracardiac extracorporeal life support at less than five years of age. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136:976–983.
- Levi M. and ten Cate H., 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N. Engl. J. Med.* 341, 586–592.

- Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31: 1250- 1256.
- Liu M., Tanswell A.K., Post M., 1999. Mechanical force-induced signal transduction in lungs cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 277:L667-L683.
- Loick H.M., Wendt M., Rotker J., Theissen J.L., 1993. Ventilation with high end-expiratory airway pressure causes leukocyte retention in human lung. *J. Appl. Physiol.* 75:301-306.
- Macklin M.T. and Macklin C.C., 1994. Malignant interstitial emphysema of the lungs and mediastinum as an important occult complication in many respiratory diseases and other conditions: an interpretation of the clinical literature in the light of laboratory experiment. *Medicine.* 23:281-352.
- Madjdpour C., Jewell U.R., Kneller S., Ziegler U., Schwendener R., Booy C., Klausli L., Pasch T., Schimmer R.C., and Beck-Schimmer B., 2003. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L360–L367.
- Malhotra A., 2007. Low tidal volume ventilation in Acute Respiratory Distress Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357(11):1113-1120.
- Marasciulo F.L., Montagnani M., Potenza M.A., 2006. Endotheli-1: the yin and yang on vascular function. *Curr. Med. Chem.* 13(14):1655-1665.
- Mark E., 2007. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Essays Biochem.* 43:61-76.
- Markos J., Doerschuk C.M., English D., Wiggs B.R., Hogg J.C., 1993. Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 74:2627-2633.
- Marks J.D., Luce J.M. Lazar J.N., Wu J.N., Lipavsky A., Murray J.F., 1985. Effect of increases in lung volume on clearance of aerosolized solute from human lungs. *J. Appl. Physiol.* 59:1242-1248.
- Massaro G., Massaro D., 1983. Morphological evidence that large inflations of the lung stimulate secretion of surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:235-236.

- Matsuoka T., Kawano T., Miyasaka K., 1994. Role of high-frequency ventilation in surfactant-depleted lung injury as measured by granulocytes. *J. Appl. Physiol.* 76:539-544.
- McKeever K.H., Antas L.A., Kearns C.F., 2002. Endothelin response during and after exercise in horses. *Vet. J.* 164(1):38-46.
- Mead J., Takishima T., Leith D., 1970. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J. Appl. Physiol.* 28:596-608.
- Minamino T., Christou H., Hsieh C.M., Liu Y., Dhawan V., Abraham N.G., Perrella M.A., Mitsialis S.A. Kourembanas S., 2001. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8798–8803.
- Miller S.I., Ernst R.K., Bader M.W., 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:36-46.
- Miserocchi G., Negrini D., Del Fabbro M., Venturoli D., 1993. Pulmonary interstitial pressure in intact in situ lung: the transition to interstitial edema. *J. Appl. Physiol.* 74: 1171-1177.
- Mizuno S., Matsumoto K., Li M.Y., Nakamura T., 2005. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J.* 19(6):580-582.
- Moriyama K., Ishizaka A., Nakamura M., Kubo H., Kotani T., Yamamoto S., Ogawa E.N., Kajikawa O., Frevert C.W., Kotake Y., Morisaki H., Koh H., Tasaka S., Martin T.R., Takeda J., 2004. Enhancement of the endotoxin recognition pathway by ventilation with a large tidal volume in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286:L1114-L1121.
- Nakamura, T., Ebihara I., Shimada N., Shoji H., Koide H., 1998. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiberimmobilized polymyxin B treatment. *Am. J. Med.* 316:355–360.
- Nakano Y., Tasaka S., Saito F., Yamada W., Shiraishi Y., Ogawa Y., Koh H., Hasegawa N., Fujishima S., Hashimoto S., Ishizaka A., 2007. Endothelin-1 level in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Respirology.* 12(5):740-743.



- Nakos G., Batistatou A., Galiatsou E., Kostanti E., Koulouras V., Kanavaros P., Doulis A., Kitsakos A., Lekka M., Bai M., 2006. Lung and 'end organ' injury due to mechanical ventilation in animals: comparison between the prone and supine position. *Crit. Care med.* 10:R38.
- Nagaki M., Shimura M.N., Irokawa T., Sasaki T., Shirato K., 1995. Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir. Physiol.* 102(1):89-95.
- Nagase H., Woessner J.F.Jr., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biochem.* 274(31):21491-21494.
- Narimanbekov I.O., Rozycki H.J., 1995. Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model. *Exp. Lung Res.* 21:239-254.
- Negrini D., Passi A., De Luca G., Miserocchi G., 2003. Matrix proteoglycans in development of pulmonary edema. In: *Proteoglycans in lung disease*. Edit by Garg H.G., Roughley P.J. and Hales C.A., New York: Marcel Dekker, p. 143-168.
- Novota J., Herget J., 2002. Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol. Res.* 51:323-334.
- Nilsson R., Grossmann G., Robertson B., 1980. Pathogenesis of neonatal lung lesions induced by artificial ventilation: evidence against the role of barotraumas. *Respiration.* 40:218-225.
- Omlor G., Niehaus G.D., Maron M.B., 1993. Effect of peak inspiratory pressure on the filtration coefficient in the isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.* 74:3068-3072.
- Owen C.A., Hu Z., Barrick B., Shapiro S.D., 2003. Inducible expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 29:283-294.
- Pagenstecher A., Stalder A. K., Kincaid C. L., Volk B., Campbell I. L., 2000. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. *Am. J. Pathol.* 157:197–210

- Pardo A., Ridge K., Segura L., Sznajder J.I., Selman M., 1996. Gelatinase A and interstitial collagenase are upregulated during high tidal volume mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153(Suppl.):A531.
- Parker J.C., Townsley M.I., Rippe B., Taylor A.E., Thigpen J., 1984. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high airway pressures. *J. Appl. Physiol.* 57:1809-1816.
- Parker J.C., Hernandez L.A., Longenecker G.L., Peevy K., Johnson W., 1990. Lung edema caused by high peak inspiratory pressures in dogs: role of increased microvascular filtration pressure and permeability. *Am Rev. Respir. Dis.* 142:321-328.
- Parker J.C., Ivey C.L., Tucker A., 1998. Gadolinium prevents high airway pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 84:1113-1118.
- Parker J.C., 2000. Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury. *J. Appl. Physiol.* 89:2241-2248.
- Parsons S.L., Watson S.A., Brown P.D., Collins H.M., Steele R.J., 1997. Matrix metalloproteinases. *Br. J. Surg.* 84:160-166.
- Peek G.J., Mugford M., Tiruvoipati R., Wilson A., Allen E., Thalanany M.M., Hibbert C.L., Truesdale A., Clemens F., Cooper N., Firmin R.K., Elbourne D. 2009. CESAR trial collaboration. Efficacy and economic assessment of conventional ventilator support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomized controlled trial. *Lancet.* 374:1352–1363.
- Peltekova V., Engelberts D., Otulakowski G., Uematsu S., Post M., Kavanagh B.P., 2010. Hypercapnic acidosis in ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 36:869-878.
- Pelosi P., Rocco P., Negrini D., Passi A., 2007. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79(2): 285-297.
- Persson M.G., gustafsson L.E., Wiklund N.P., Moncada S., Hedqvist P., 1990. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary

circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol. Scand.* 140(4):449-457.

- Pingleton S.K., 1998. Complication of acute respiratory failure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:1463-1493.
- Pugin J., Dunn I., Jolliet P., Tassaux D., Magnenat J.L., Nicod L.P., Chevrolet J.C., 1998. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am. J. Lung Cell Mol. Physiol.* 275:L1040-L1050.
- Pugin J., Widmer M. C., Kossodo S., Liang C. M., Preas H. L. n., Suffredini A. F., 1999. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:458-464
- Rabinovitch M., Bothwell T., Hayakawa N., 1986. Pulmonary arterial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension. *Lab. Invest.* 55:632-653.
- Ranieri V.M., Suter P.M., Tortorella C., De Tullio R., Dayert J.M., Brienza A., Bruno F., Slutsky A.S., 1999. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 282:54-61.
- Ranieri V.M., Giunta F., Suter P.M., Slutsky A.S., 2000. Mechanical ventilation as a mediator of multi system organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 284:43-44.
- Reid L.M., 1986. Structure and function in pulmonary hypertension. New perceptions. *Chest.* 89:279-288.
- Riacerd J.D., Dreyfuss D., Saumon G., 2001. Production of inflammatory cytokines during ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:1176-1180.
- Ricciardolo F.L., Sterk P.J., Gaston B., Folkerts G., 2004. Nitric oxide in health and disease of respiratory system. *Physiol. Rev.* 84(3):731-765.
- Roberts I.S., 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:285-315.
- Rounds S., Hill N.S., 1984. Pulmonary hypertensive disease. *Chest.* 85(3):397-405.

- Rudiger A., Stotz M., Singer M., 2008. Cellular process in sepsis. *Swiss Med. WKLY.* 138(43-44):629-634.
- Sachs F., 1986. Biophysics of mechanoreception. *Membr. Biochem.* 6:173-195.
- Savov J., Silbajoris R., Young S.L., 1999. Mechanical ventilation of rat lung: effect on surfactant forms. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 277:L320-L326.
- Schoene R.B., Swenson E.R., Pizzo C.J., Hackett P.H., Roach R.C., Mills W.J., Henderson W.R., Martin T.R., 1988. The lung at high altitude: bronchoalveolar lavage in acute mountain sickness and pulmonary edema. *J Appl Physiol* 64: 2605–2613.
- Serrano C.V., Fraticelli A., Paniccia R., Teti A., Noble B., Corda S., Faraggiana T., Ziegelstein R.C., Zweier J.L., Capogrossi M.C., 1996. pH dependance of neutrophil-endothelial cell adhesion molecule expression. *Am. J. Physiol.* 271:C962-C970.
- Shibata H., Cregg N., Engelberts D., Takeuki A., Fedorko L., Kavanagh B.P., 1998. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:1578-1584.
- Skinnet S.C. Hirschl R.B., Bartlett R.H., 2006. Extracorporeal life support. *Semin. Pediatr. Surg.* 15(4):242-250.
- Skippet P., Kisson N., Waller D., Northway T., Krahn G., 2008. Sepsis and septic shock: progress and future considerations. *Indian J. Pediatr.* 75(6):599-607.
- Sladen A., Laver M.B., Pontoppidan H., 1968. Pulmonary complications and water retention in prolonged mechanical ventilation. *N. Engl. J. Med.* 279:448-453.
- Slutsky A.S., 1993. Mechanical ventilation: American College of Chest Physicians' Consensus Conference. *Chest.* 104:1833–59.
- Smitzko P.E., Wang C.H., Weisel R.D., de Almeida J.R., Anderson T.J., Verma S., 2003. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 108(16):1917-23.

- Snider M.T., Chaudhari S.N., Richard R.B., Whitcomb D.R., Russell G.B., 1987. Augmentation of CO<sub>2</sub> transfer in membrane lungs by the infusion of a metabolizable organic acid. *ASAIO Trans.* 33:345–351.
- Sommer N., Dietrich A., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Gunderman T., Schulz R., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N., 2008. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanism. *Eur. Respir. J.* 32:1639-1651.
- Stamenkovic I., 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 200:448–464.
- Stenmark K.R., Davie N.J., Reeves J.T., Frid M.G., 2005. Hypoxia, leucocytes, and the pulmonary circulation. *J. Appl. Physiol.* 98:715-721.
- Sternlicht M.D., Werb Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Bio.* 17:463-516.
- Stretton D., 1991. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 18(10):675-684.
- Sugiura M., McCulloch P.R., Wren S., Dawson R.H., Froese A.B., 1994. Ventilator pattern influences neutrophils influx and activation in atelectasis-prone rabbit lung. *J. Appl. Physiol.* 77:1355-1365.
- Takata M., Abe J., Tanaka H., Kitano Y., Doi S., Kohsaka T., Miyasaka K., 1997. Intra-alveolar expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene during conventional and high-frequency ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156(1):272-279.
- Tasker R.C. and Peters M.J., 1998. Combined lung injury , meningitis and cerebral edema: how permissive can hypercapnia be? *Intensive Care Med.* 24:616-619.
- The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.*;342:1301–8.
- Thorin E. and Webb D.J., 2010. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 459:951-958.
- Tilson M.D., Bunke M.C., Smith G.J., Katz J., Cronau L., Barash P.G., Baue A.E., 1997. Quantitative bacteriology and pathology of the lung in

experimental *Pseudomonas pneumonia* treated with positive end-expiratory pressure (PEEP). *Surgery*. 82:133-140.

- Todo G., Herman P.G., 1986. High-resolution computed tomography of the pig lung. *Invest. Radiol*. 21:689-696.
- Todorovitch-Hunter L., Johnson D.J., Ranger P., Keeley F.W., Rabinovitch M., 1988. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline: a biochemical and ultrastructural study. *Lab. Invest*. 58:184-195.
- Tozzi C.A., Thakker-Varia S., Yu Y.Y., 1998. Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 18:497-510.
- Tremblay L., Valenza F., Ribeiro S.P., Li J., Slutsky A.S., 1997. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin. Invest*. 99:944-952.
- Tremblay N.L., Slutsky A.S., 1998. Ventilator-induced injury: from barotraumas to biotrauma. *Proc. Ass. Am. Physicians*. 110(6):482-488.
- Tsukimoto K., Mathieu-Costello O., Prediletto R., Elliot A.R., West J.B., 1991. Ultrastructural appearances of pulmonary capillaries at high transmural pressures. *J. Appl. Physiol*. 71:573-582.
- Tsuno K., Prato P., Kolobow T., 1990. Acute lung injury from mechanical ventilation at moderately high air way pressures. *J. Appl. Physiol*. 69: 956-961.
- Tsuno K., Miura K., Takey M., Kolobow T., Morioka T., 1991. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak air way pressures. *Am. Rev. Resp. Dis*. 143:1115-1120.
- Van Beers B.E., Materne R., Annet L., Hermoye L., Sempoux C., Peeters F., Smith A.M., Jamart J., Horsmans Y., 2003. Capillarization of the sinusoids in liver fibrosis: noninvasive assessment with contrast-enhanced MRI in rabbit. *Magn. Reson Med*. 49(4):692-699.
- Van Lint P., Libert C., 2007. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leucocyte migration and inflammation. *J. Luek. Biol*. 82:1375-1381.

- Vanlaere I., Libert C., 2009. Matrix Metalloproteinases as drug targets in infections caused by Gram-Negative bacteria in septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2)::224-239.
- Vannucci R.C., Brucklarcher R.M., Vannucci S.J., 1997. Effect of carbon dioxide on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *Pediatr. Res.*42:24-29.
- Vannucci R.C., Towfighi J., Brucklarcher R.M., Vannucci S.J., 2001. Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr. Res.*42:799-803.
- Veldhuizen R.A., Marcou J., Yao L.J., McCaig L., Ito Y., Lewis J.F., 1996. Alveolar surfactant aggregate conversion in ventilated normal and injured rabbits. *Am. J. Physiol.* 270:L152-L158.
- Veldhuizen R.A., Slutsky A.S., Joseph M., McCaig L., 2001. Effects of mechanical ventilation of isolated mouse lungs on surfactant and inflammatory cytokines. *Eur. Respir. J.* 17:488-494.
- Verbrugge S.J., Bohm S.H., Gommers D., Zimmermann L.J., Lachmann B., 1998. Surfactant impairment after mechanical ventilation with large alveolar surface area changes and effects of positive end- expiratory pressure. *Br. J. Anaesth.* 80:360-364.
- Verbrugge S.J., Uhlig S., Neggers S.J.C.M., 1999. Different ventilation strategies affect lung function but do not increase tumor necrosis factor- $\alpha$  and prostacyclin production in lavaged rat lungs in vivo. *Anesthesiology.* 91:1834-1843.
- Verbrugge S.J., Lachman B., Kesecioglu J., 2007. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin. Physiol. Funct. Imaging.* 27(2):67-90.
- Villar J., Kacmarek R.M., Perez-Mendez L., Aguirre-Jaime A., 2006. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilator strategy improve outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit. Care Med.* 34:1311-1318.
- Volkt T., Kox W.J., 2000. Endothelium function in sepsis. *Inflamm. Res.* 49:185-198.

- Von Bethamm A.N., Brasch F., Nüsing R., Vogt K., Volk H.D., Müller K.M., Wendel A., Uhlig S., 1998. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157(1):263-272.
- Ward H.E. and Nicholas T.E., 1992. Effect of artificial ventilation and anaesthesia on surfactant turnover in rats. *Respir. Physiol.* 87:115-129.
- Waters C.M., Ridge K.M., Sunio G., Venetsanou K., Sznajder J.L., 1999. Mechanical stretching of alveolar epithelial cells increases Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. *J. Appl. Physiol.* 87:715-721.
- Webb H.H., Tierney D.F., 1974. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures: protection by positive end-expiratory pressure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 110:556-565.
- Weiler H., Lindner V., Kerlin B., Isermann B.H., Hendrickson S.B., Cooley B.C., Meh D.A., 2001. Characterization of a mouse model for thrombomodulin deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1531-1537.
- Weinberger B., Carbone T., England S., Kleinfeld A.M., Hiatt M., Hegyi T., 2001. Effects of perinatal hypoxia on serum unbound free fatty acids and lung inflammatory mediators. *Biol Neonate* 79: 61–66.
- West J.B., Tsukimoto K., Mathieu-Costello O., Prediletto L., 1991. Stress failure in pulmonary capillary. *J. Appl. Physiol.* 70:1731-1742.
- West J.B. and Mathieu-Costello O., 1999. Structure, strength, failure and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 543-557.
- West J.B., 2000. Pulmonary capillary stress failure. *J. Appl. Physiol.* 89: 2483-2489.
- Whatling C., McPheat W., Hurt-Camejo E., 2004. Matrix management. Assigning different roles for MMP-2 and MMP-9 in vascular remodeling. *ATVB.* 24:10-11.
- Whitehead T.C., Zhang H., Mullen B., Slutsky A.S., 2004. Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide. *Anesthesiology.* 101(1):52-58.



- Wolthuis E.K., Vlaar A.P., Choi G., Roelofs J.J., Juffermans N.P., Schultz M.J., 2009. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit. Care*.13(1):R1.
- Woo S.W., Hedley-Whyte J., 1972. Macrophage accumulation and pulmonary edema due to thoracotomy and lung overinflation. *J. Appl. Physiol.* 33:14-21.
- Wurfel M.M., 2007. Microarray-based analysis of ventilator-induced lung injury. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4(1):77-84.
- Wyszogrodski I., Kyei-Aboagye K., Tausch H.W. Jr., Avery M.E., 1975. Surfactant inactivation by hyperventilation: conservation by end-expiratory pressure. *J. Appl. Physiol.* 38:461-466.
- Yanada M., Kojima T., Ishiguro K., Nakayama Y., Yamamoto K., 2002. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin-deficient mice. *Blood.* 99:2455-2458.
- Yamada T., Ikegami M., Jobe A.H., 1990. Effects of surfactant subfraction on preterm rabbit lung function. *Pediatr. Res.* 27:592-598.
- Yassen K.A., Galley H.F., Webster N.R., 2001. Matrix metalloproteinase-9 concentrations in critically ill patients. *Anaesthesia.* 56:729-732
- Zampetaki A., Minamino T., Mitsialis S.A., Kourembanas S., 2003. Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation. *Exp Biol Med* 228: 42-446.
- Zanella A., Patroniti N., Isgrò S., Albertini M., Costanzi M., Pirrone F., Scaravilli V., Vergnano B., Pesenti A., 2009. Blood acidification enhances carbon dioxide removal of membrane lung: an experimental study. *Intensiv. Care Med.* 35:1484-1487.