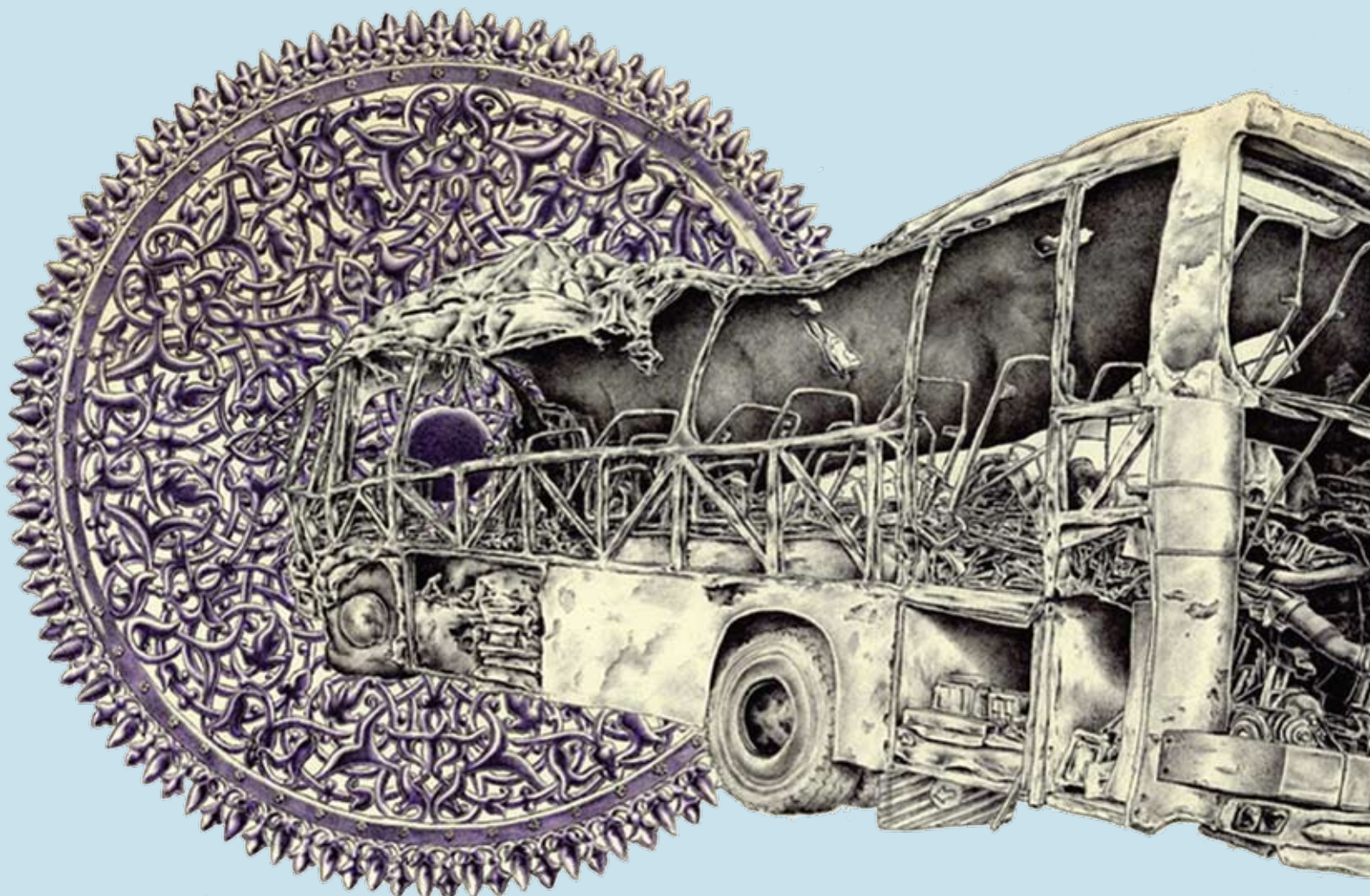


Οξειδωτικό στρες και Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

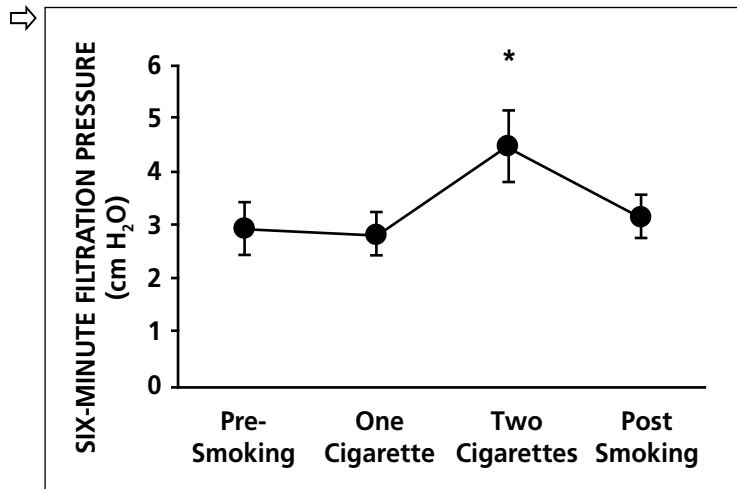
Επιμέλεια φακέλου: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΕΙΛΑΣ
Ειδ. Πνευμονολόγος, Επιμελητής Α΄ Κ.Α.Α. – Ν.Ν.Θ.Α «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»



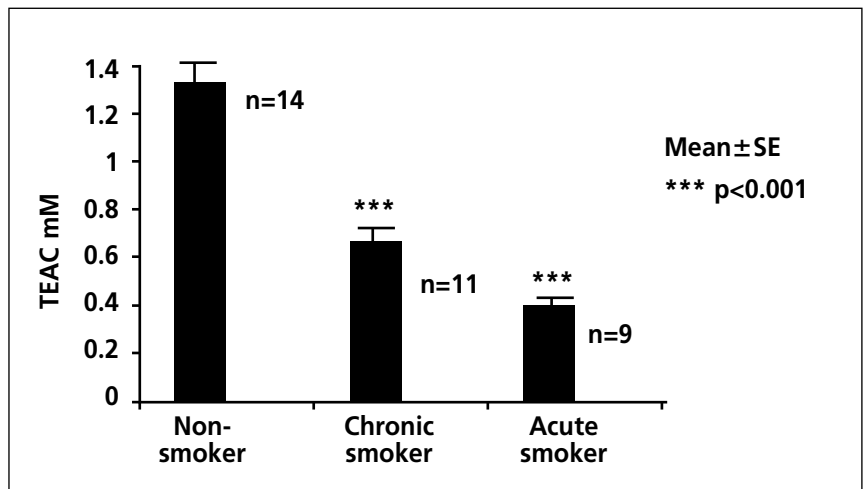
Το οξειδωτικό stress είναι η διαταραχή της ισορροπίας των οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών παραγόντων, δηλαδή μια υπερβολική αύξηση των οξειδωτικών και / ή μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Το οξειδωτικό stress θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αρκετών πνευμονικών παθήσεων, όχι μόνο μέσω της άμεσης βλαπτικής του επίδρασης, αλλά και μέσω μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη φλεγμονή των πνευμόνων. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει καταδείξει μια οξειδωτική «υπερφόρτωση» η οποία συνεπάγεται την αύξηση των δεικτών του οξειδωτικού stress στους αεροχώρους, στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, στο αίμα και στα ούρα καπνιστών και ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική

Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η παρουσία του οξειδωτικού stress έχει σημαντικές επιπτώσεις στην παθογένεια της ΧΑΠ. Αυτές περιλαμβάνουν την οξειδωτική απενεργοποίηση αντιπρωτεασών, τη βλάβη του αναπνευστικού επιθηλίου, τη συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία και τη γονιδιακή έκφραση προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Όσον αφορά στο τελευταίο, το οξειδωτικό stress ενδυναμώνει τη φλεγμονή που ήδη υπάρχει σε καπνιστές και σε ασθενείς με ΧΑΠ μέσω της ενεργοποίησης παραγόντων μεταγραφής, όπως ο NF-κΒ και η πρωτεΐνη AP-1. Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και προστατευτικά αντιοξειδωτικά γονίδια.





Σχήμα 1. Οι επιπτώσεις του καπνίσματος στην πίεση διήθησης των ουδετερόφιλων του αρτηριακού αίματος (δείκτης της ικανότητας των ουδετερόφιλων για παραμόρφωση). [Drost και συνεργάτες³⁹].



Σχήμα 2. Οι επιπτώσεις του καπνού του τσιγάρου στην αντιοξειδωτική ικανότητα (TEAC) του πλάσματος στο χρόνια και οξύ κάπνισμα. *** p<0.001

Οξειδωτικοί και Αντιοξειδωτικοί παράγοντες στη ΧΑΠ

William MacNee, MD
(CHEST 2000, 117:303S-317S)

Απόδοση στα Ελληνικά: **ΕΛΕΝΗ ΤΣΕΛΙΟΥ**
Ιατρός

Οι πηγές του αυξημένου οξειδωτικού stress σε ασθενείς με ΧΑΠ εντοπίζονται στο αυξημένο φορτίο οξειδωτικών προϊόντων που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου ή στις μεγάλες ποσότητες τοξικών παραγώγων του οξυγόνου (ROS) που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα, τοπικά και συστηματικά. Η εξάντληση ή η λειτουργική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών πιθανώς να συνεισφέρει στο οξειδωτικό stress. Η παρουσία περιορισμού ροής στη ΧΑΠ σχετίζεται με την διατροφική ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών και επομένως τα συμπληρώματα διατροφής μπορεί να αποδειχθούν μια ευεργετική θεραπευτική παρέμβαση. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες με καλή βιοδιαθεσιμότητα ή μόρια με δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων πιθανώς να αποτελούν θεραπείες που όχι μόνο θα προστατεύουν από τις άμεσες βλαπτικές επιδράσεις των οξειδωτικών, αλλά που ουσιαστικά θα αλλιάζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που πρωταγωνιστούν στην παθολογία της ΧΑΠ.

Η ΧΑΠ είναι μια βραδέως εξελισσόμενη νόσος, που χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής, σε μεγάλο βαθμό μη αναστρέψιμο¹. Ιστορικό καπνίσματος

τουλάχιστον 20 πακέτα έτη (pack years) είναι σύνηθες στους ασθενείς με ΧΑΠ, γεγονός που αντανακλά ότι το κάπνισμα είναι ο βασικός αιτιολογικός παράγοντας της νόσου, απέχοντας κατά πολύ από τους υπόλοιπους παράγοντες κινδύνου. Επομένως, η παθογένεια της ΧΑΠ συνδέεται ισχυρά με τις επιπτώσεις του καπνού του τσιγάρου. Αφού ο τελευταίος περιέχει 10¹⁷ μόρια / ρουφηξιά², έχει προταθεί πως στους καπνιστές υπάρχει σοβαρή διαταραχή της ισορροπίας των οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών παραγόντων και πως οι καπνιστές και οι ασθενείς με ΧΑΠ βιώνουν μια οξειδωτική υπερφόρτωση³.

Οξειδωτικοί παράγοντες στον καπνό του τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένα σύνθετο μίγμα με πάνω από 4.700 χημικά συστατικά, από τα οποία οι ελεύθερες ρίζες και οι άηλοι οξειδωτικοί παράγοντες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις⁴. Οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται τόσο στην πίσσα όσο και στην αέρια μορφή του καπνού του τσιγάρου. Η τελευταία εμπεριέχει περίπου 10¹⁵ ρίζες / ρουφηξιά, κυρίως αλκυλικές και ρίζες υπεροξειδίου. Το οξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένας ακόμη

οξειδωτικός παράγοντας που βρίσκεται στον καπνό του τσιγάρου σε συγκεντρώσεις από 500 έως 1000 ppm⁴. Το NO αντιδρά ταχέως με το ανιόν του υπεροξειδίου (O²⁻) προς σχηματισμό περοξυνιτρικού (ONOO⁻) και με ρίζες υπεροξειδίου προς σχηματισμό αλκυλπεροξυνιτρικού.

Η πίσσα του τσιγάρου περιέχει πιο σταθερές ρίζες, όπως οι ρίζες ημικινόνης που αντιδρούν με το οξυγόνο για να παράγουν O²⁻, ρίζες υδροξυλίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)⁴. Επιπλέον, η πίσσα έχει την ιδιότητα να δημιουργεί σύμπλοκες ενώσεις με μεταλλικά ιόντα και συγκεκριμένα μπορεί να προσδεθεί με ιόντα σιδήρου και να παράγει σύμπλοκα πίσσας-ημικινόνης και πίσσας-σιδήρου, τα οποία μπορούν να παράγουν H₂O₂^{5,6}.

Το επαλείφουν υγρό του επιθηλίου (ELF) και η βλέννη είναι η πρώτη γραμμή άμυνας των πνευμόνων ενάντια στα εισπνεόμενα οξειδωτικά προϊόντα. Δρουν παγιδεύοντας τις ασταθείς ρίζες που βρίσκονται στην αέρια φάση του καπνού του τσιγάρου. Ωστόσο, το συμπύκνωμα του καπνού του τσιγάρου (CSC) που σχηματίζεται στο ELF, ίσως εξακολουθεί να παράγει ROS σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΧΑΠ⁷. ⇨

Κυτταρικές πηγές οξειδωτικών προϊόντων

Η διαταραχή της ισορροπίας των οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών παραγόντων που προκαλείται από τον εισπνεόμενο καπνό του τσιγάρου μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω, από την απελευθέρωση ριζών οξυγόνου από τα φλεγμονώδη λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μακροφάγα) που μεταναστεύουν στους πνεύμονες των καπνιστών⁸. Αυξημένες ποσότητες οξειδωτικών, όπως O²⁻ και H₂O₂, απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα των καπνιστών συγκριτικά με εκείνα των μη καπνιστών⁹.

Ο σίδηρος είναι ένα κριτικής σημασίας στοιχείο σε πολλές οξειδωτικές αντιδράσεις. Η παραγωγή οξειδωτικών προϊόντων στο ELF των καπνιστών ενισχύεται επιπρόσθετα από την παρουσία αυξημένων ποσοτήτων σιδήρου στους αεροχώρους¹⁰. Ο ενδοκυττάριος σίδηρος των κυψελιδικών μακροφάγων είναι αυξημένος στους καπνιστές και αυξάνεται επιπλέον σε αυτούς που αναπτύσσουν χρόνια βρογχίτιδα, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές¹¹. Επιπρόσθετα, τα μακροφάγα των καπνιστών απελευθερώνουν περισσότερο ελεύθερο σίδηρο in vitro απ' ό,τι αυτά των μη καπνιστών¹².

Ο ελεύθερος, δισθενής σίδηρος μπορεί να συμμετάσχει στις αντιδράσεις Faber και Haber-Weiss, οι οποίες παράγουν ρίζες υδροξυλίου, μια ελεύθερη ρίζα που είναι εξαιρετικά καταστρεπτική για όλους τους ιστούς και ειδικά για τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς προάγει την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων.

Τα οξειδωτικά προϊόντα του καπνού μπορούν να προκαλέσουν άμεση βλάβη στα συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας των πνευμόνων (ελαστίνη και κολλαγόνο)¹³. Η σύνθεση και η αποκατάσταση της ελαστίνης μπορεί επίσης να διαταραχθεί από τον καπνό του τσιγάρου¹⁴, ο οποίος αυξάνει την πρωτεόλυση και επιταχύνει συνεπώς την ανάπτυξη του εμφυσήματος.

Το αυξημένο οξειδωτικό stress στους πνεύμονες μπορεί να πυροδοτήσει μερικά πρώιμα φλεγμονώδη γεγονότα.

Οξειδωτικό stress στους αεροχώρους

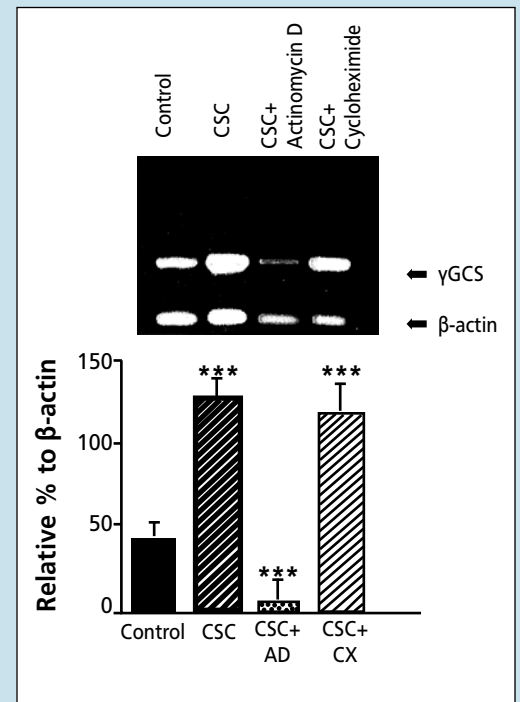
Το αναπνευστικό επιθήλιο είναι εξαιρετικά ευάλωτο στις επιδράσεις του οξειδωτικού stress, λόγω της άμεσης επαφής του με το εξωτερικό περιβάλλον. Το επαλείφουν υγρό του αναπνευστικού επιθηλίου (RTLF) παρεμβάλλεται μεταξύ

επιθηλιακών κυττάρων και εξωτερικού περιβάλλοντος και επομένως αποτελεί μια πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στα εισπνεόμενα οξειδωτικά. Τουλάχιστον τρεις διαδικασίες ευθύνονται για την οξειδωτική βλάβη που προκαλεί ο καπνός στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού:

1. άμεση τοξική επίδραση των συστατικών του καπνού (συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων ριζών) που έχουν διαπεράσει τον προστατευτικό φραγμό του RTLF,
2. καταστροφή των κυττάρων από τοξικά προϊόντα που παράγονται κατά την αλληλεπίδραση καπνού και RTLF,
3. αντιδράσεις που ακολουθούν την ενεργοποίηση φλεγμονωδών - ανοσολογικών μονοπατιών κατά τα στάδια 1 και 2¹⁵⁻¹⁷.

Η βλάβη του ενδοθηλίου μετά από έκθεση στον καπνό του τσιγάρου πιθανώς είναι ένα σημαντικό πρώιμο γεγονός, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση της διαπερατότητας του αναπνευστικού επιθηλίου¹⁸. Οι Lannan και συνεργάτες¹⁹ περιέγραψαν τη βλαβερή επίδραση του καπνού στο ανθρώπινο μονόστιβο κυψελιδικό επιθήλιο, που συνίσταται σε αυξημένη αποκόλληση επιθηλιακών κυττάρων, μειωμένη κυτταρική προσκόλληση και αυξημένη κυτταρόλυση.

Τα παραπάνω γεγονότα ήταν εν μέρει διαμεσολαβούμενα από οξειδωτικούς παράγοντες, αφού ήταν μερικώς αποτρέψιμα από την αντιοξειδωτική γλυουταθειόνη (GSH) σε συγκεντρώσεις (500μM) όπου είναι παρούσα στο ELF. Η εξωκυττάρια, αλλά και η ενδοκυττάρια γλυουταθειόνη, φαίνεται να είναι κριτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου μετά από έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Αυτό ήταν εμφανές στις μελέτες των Li και συνεργατών^{20,21} και Rahman και συνεργατών²², οι οποίες έδειξαν ότι η αυξημένη διαπερατότητα του μονόστιβου επιθηλίου in vitro και του κυψελιδικού επιθηλίου σε πνεύμονες ποντικών in vivo μετά από έκθεση σε CSC, συσχετίζεται με σημαντικές αλλαγές στην ομοιοσταση της γλυουταθειόνης. Οι συγκεντρώσεις της γλυουταθειόνης μειώθηκαν σημαντικά, συνοδευόμενες από μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων που συμμετέχουν στον αναγωγικό κύκλο της γλυουταθειόνης, όπως η υπεροξειδάση της γλυουταθειόνης (GP) και η γλυκοζο-6-φωσφορική δεϋδρογενάση. Επιπλέον, η μείωση μόνο της GSH των πνευμόνων μετά από θεραπεία με

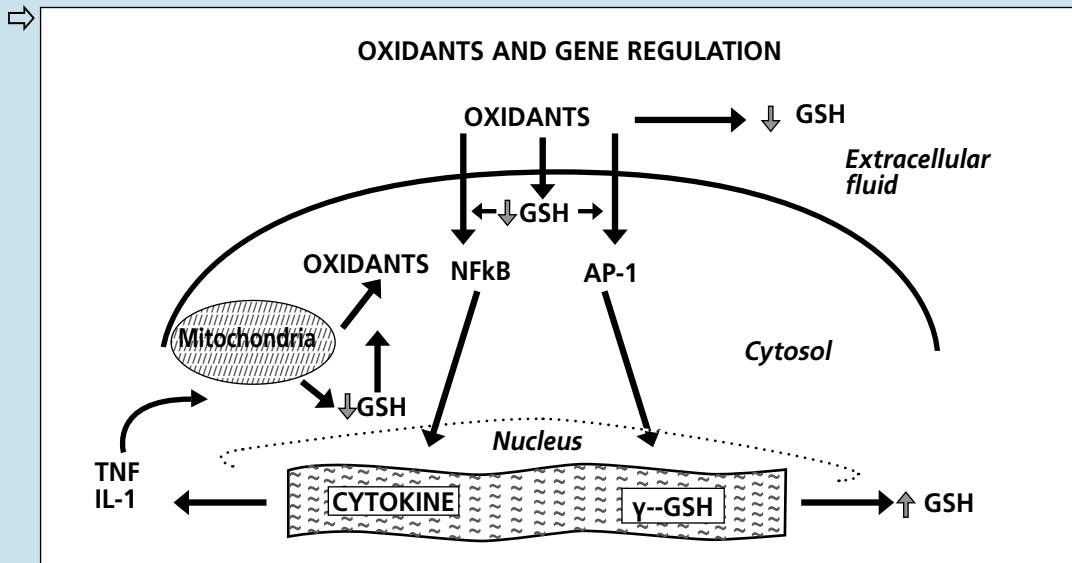


Σχήμα 3. Οι επιπτώσεις του καπνού του τσιγάρου στην έκφραση του mRNA της γGCS σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα που εκτίθενται σε CSC. Η έκφραση του γονιδίου της γGCS αυξάνεται μετά την έκθεση σε CSC (άνω εικονίδιο). Το αποτέλεσμα αυτό αναστέλλεται από την ακτινομυκίνη D (AD), αλλά όχι από την κυκλοξεμίμη (CX). [Rahman και συνεργάτες¹¹⁶].

τον αναστολέα της σύνθεσής της, σουλφοξαμινική βουταθειονίνη, μπορεί να αυξήσει τη διαπερατότητα του αναπνευστικού επιθηλίου τόσο in vitro όσο και in vivo²¹⁻²³.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των in vitro και in vivo πειραμάτων παρατηρήθηκαν και σε μελέτες σε ανθρώπινο πληθυσμό. Οι τελευταίες έδειξαν αυξημένη επιθηλιακή διαπερατότητα σε χρόνιους καπνιστές συγκριτικά με μη καπνιστές, όπως φάνηκε από την αυξημένη πνευμονική κάθαρση του 99mTc, με μια επιπλέον αύξηση της πνευμονικής κάθαρσης μετά από κάθε επεισόδιο καπνίσματος²⁴. Επομένως, ο καπνός του τσιγάρου έχει ένα επιζήμιο αποτέλεσμα στη λειτουργία του κυψελιδικού επιθηλίου, το οποίο είναι, εν μέρει, οξειδωτικώς - διαμεσολαβούμενο.

Το οξειδωτικό φορτίο των πνευμόνων ενισχύεται στους καπνιστές από τον αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων (κατά 10 φορές) και μακροφάγων (2 με 4 φορές) στον κυψελιδικό χώρο^{25,26}. In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι η αυτόματη απελευθέρωση ROS από τα κυψελιδικά λευκοκύτταρα αυξάνεται στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές²⁷⁻³¹. Πρόσφατα στοιχεία, από βρογχικές βιο-



Σχήμα 4. Οι επιπτώσεις των οξειδωτικών προϊόντων στο οξειδοαναγωγικό σύστημα της γλουταθειόνης και στους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1.

ψίες και νεκροτομικά παρασκευάσματα πνευμόνων, αποδεικνύουν ότι καπνιστές με μέτρια προς σοβαρή ΧΑΠ έχουν αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων στο βρογχικό και κυψελιδικό τοίχωμα³².

Φαίνεται, ακόμη, ότι σε ασθενείς με ΧΑΠ, το σύστημα ξανθίνη / οξειδάση ξανθίνης, το οποίο παράγει O_2^- , είναι αυξημένο στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)³³.

Οξειδωτικό stress και μετανάστευση ουδετερόφιλων στους πνεύμονες

Το πρώτο βήμα για την επιστράτευση των ουδετερόφιλων στους πνεύμονες, είναι ο εγκλωβισμός των κυττάρων αυτών στην πνευμονική μικροαγγειακή κυκλοφορία³⁴. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτό συμβαίνει στο πνευμονικό τριχοειδικό δίκτυο εξαιτίας του διαφορετικού μεγέθους ανάμεσα στα ουδετερόφιλα (μέση διάμετρος 7μm) και τα πνευμονικά τριχοειδή (μέση διάμετρος 5μm). Επομένως, ένα ποσοστό από τα ουδετερόφιλα της κυκλοφορίας πρέπει να μεταβάλλουν το σχήμα τους προκειμένου να «χωρέσουν» στα μικρότερης διαμέτρου πνευμονικά τριχοειδή. Πειράματα με ραδιοσημασμένα ή φθορίζοντα ουδετερόφιλα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι πνεύμονες περιέχουν μια μεγάλη δεξαμενή μη κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων, τα οποία είναι είτε ακινητοποιημένα είτε βραδέως κινούμενα μέσα στην πνευμονική μικροκυκλοφορία. Σε υγιή άτομα, πειράματα με ραδιοσημασμένα ουδετερόφιλα δείχνουν ότι ένα ποσοστό ουδετερόφιλων παγιδεύεται φυσιολογικά στην πνευμονική κυκλο-

φορία σε σύγκριση με ραδιοσημασμένα ερυθροκύτταρα³⁵. Άλλες μελέτες σε υγιή πάλη άτομα, έχουν δείξει την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην παραμόρφωση των ουδετερόφιλων μετρούμενη in vitro και στον επακόλουθο εγκλωβισμό τους στην πνευμονική μικροκυκλοφορία. Όσο λιγότερη παραμόρφωση έχουν υποστεί τα κύτταρα αυτά, τόσο μεγαλύτερος ο εγκλωβισμός τους στην πνευμονική μικροκυκλοφορία³⁵. Το παραπάνω είναι ένας πιθανός μηχανισμός για τη δημιουργία μιας δεξαμενής μη κυκλοφορούντων κυττάρων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία, χωρίς να προαπαιτείται να συσσωρεύονται και να προσκολλώνται στα μετατριχοειδικά φλεβίδια (μηχανισμός για τη δημιουργία δεξαμενής κυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία)³⁶. Ο εγκλωβισμός των ουδετερόφιλων στα πνευμονικά τριχοειδή παρέχει χρόνο στα ουδετερόφιλα για να αλληλεπιδράσουν με το τριχοειδικό ενδοθήλιο, πρωτίτως να προσκολληθούν σε αυτό, και έπειτα να μεταναστεύσουν διαμέσου της κυψελίδο - τριχοειδικής μεμβράνης στο διάμεσο ιστό και στους αεροχώρους των πνευμόνων, ως απάντηση σε κάποιο λοιμώδες ή φλεγμονώδες ερέθισμα.

Συνεπώς, οποιαδήποτε κατάσταση μπορεί να μειώσει την ικανότητα των ουδετερόφιλων να μεταβάλλουν το σχήμα τους, μπορεί πιθανότατα να αυξήσει τη δεξαμενή των ουδετερόφιλων στους πνεύμονες.

Μειωμένη ικανότητα των ουδετερόφιλων να μεταβάλλουν το σχήμα τους συμβαίνει κατά την κυτταρική ενεργοποίηση εξαιτίας της συναρμολόγησης του κυτταροσκελετού. Συγκεκριμένα, ο πολυ-

μερισμός των μικρονηματίων (F ακτίνη) κάνει το κύτταρο άκαμπτο. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να ενεργοποιηθούν κατά τη διέλευσή τους από την πνευμονική μικροκυκλοφορία από έναν αριθμό μεσοθαβητών, συμπεριλαμβανομένων κυτταροκινών που απελευθερώνονται από τοπικά κύτταρα, κυψελιδικά μακροφάγα, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Βλαβεροί εισπνεόμενοι παράγοντες, όπως ο καπνός του τσιγάρου, θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διέλευση κυττάρων από το πνευμονικό τριχοειδικό δίκτυο. Μελέτες σε ανθρώπινο πληθυσμό, χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένα ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα, δείχνουν μια παροδική αύξηση στον εγκλωβισμό των ουδετερόφιλων στους πνεύμονες κατά τη διάρκεια του καπνίσματος³⁷. Η αύξηση αυτή επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Με τη βοήθεια μιας in vitro τεχνικής διήθησης κυττάρων υπό θετική πίεση, αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα που εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου χάνουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το σχήμα τους³⁸. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από in vivo μετρήσεις σε ουδετερόφιλα του αίματος ενεργών καπνιστών (Σχήμα 1)³⁹.

Επειδή κάθε ρουφηξιά εισπνεόμενου καπνού περιέχει 10^{16} οξειδωτικά μόρια, τα τελευταία πιστεύεται ότι ευθύνονται για την επίδραση του καπνού στην ουδετεροφιλική παραμόρφωση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από in vitro πειράματα, όπου η μειωμένη ικανότητα των ουδετερόφιλων να μεταβάλλουν το σχήμα τους μετά από έκθεση σε καπνό επανακάθεται μετά από την προσθήκη αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη³⁸. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι το οξειδωτικό stress επεκτείνεται και στη συστηματική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια του καπνίσματος και επομένως πιθανώς μειώνει την ικανότητα των ουδετερόφιλων για παραμόρφωση και αυξάνει έτσι τον εγκλωβισμό τους στην πνευμονική μικροκυκλοφορία⁴⁰. Τα οξειδωτικά φαίνεται να επηρεάζουν το σχήμα των ουδετερόφιλων μέσω του πολυμερισμού της ακτίνης και της συνεπακόλουθης αλλαγής του κυτταροσκελετού³⁸.

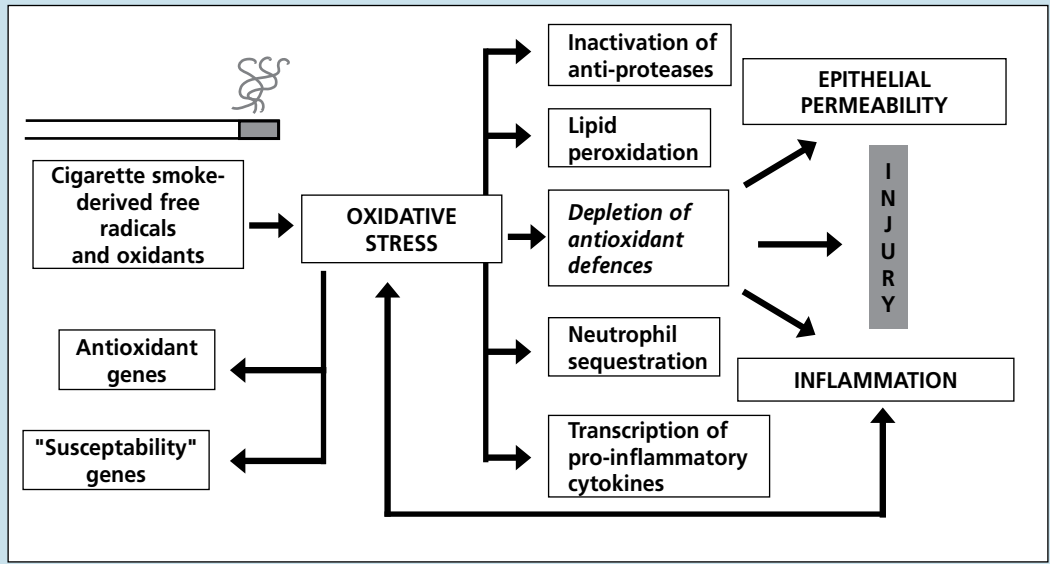
Συνεπώς, το κάπνισμα αυξάνει τον εγκλωβισμό των ουδετερόφιλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία, τουλάχιστον εν μέρει, εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας των ουδετερόφιλων για παραμόρφωση.

Από τον εγκλωβισμό των ουδετερόφι-

λων κι έπειτα, τα συστατικά του καπνού μπορούν να μεταβάλλουν την ουδετεροφιλική προσκόλληση στο ενδοθήλιο αυξάνοντας την έκφραση των CD18 ιντεγκρινών³⁹⁻⁴¹. Είναι γνωστό ότι οι τελευταίες επάγουν το σύστημα NADPH⁴². Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου αλληλάζει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο⁴⁰⁻⁴¹. Η ουδετεροφιλική προσκόλληση στο ενδοθήλιο αρτηριδίων και φλεβιδίων αυξάνεται σε ποντίκια που εισέπνευσαν καπνό τσιγάρου⁴⁰, γεγονός που θεωρείται πως διαμεσολαμβάνεται από O²⁻ προερχόμενο από τον καπνό, καθώς αναστέλλεται αν προηγηθεί θεραπεία με CuZnSOD⁴¹. Παρομοίως, εγκλιωβισμένα ουδετερόφιλα στην πνευμονική κυκλοφορία κουνελιών που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου, είχαν αυξημένη έκφραση των ιντεγκρινών CD18⁴¹ οι οποίες επάγουν το σύστημα οξειδωτικής NADPH⁴³.

Η αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης σε ζώα που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου μπορεί να οφείλεται στις δευτερογενείς φλεγμονώδεις επιπτώσεις του καπνίσματος, διαμεσολαμβούμενες από κυτταροκίνες. Η άμεση έκθεση στον καπνό του τσιγάρου in vitro, δεν αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης των ουδετερόφιλων ούτε ενισχύει λειτουργικά την προσκόλληση⁴⁴. Επομένως, εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί – συμπεριλαμβανομένου των οξειδωτικών – στον εγκλιωβισμό των ουδετερόφιλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία των καπνιστών. Επίσης, ανάλογοι οξειδωτικοί μηχανισμοί ίσως συμμετέχουν και κατά τις παροξύνσεις της ΧΑΠ^{45,46}.

Τα εγκλιωβισμένα ουδετερόφιλα ίσως απαντούν σε χημειοτακτικούς παράγοντες που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου και έτσι να ενδυναμώνεται η ικανότητά τους να προσκολληθούν στο αγγειακό ενδοθήλιο. Πειράματα σε μοντέλα ζώων μετά από έκθεση στον καπνό, έχουν δείξει ότι ο αυξημένος εγκλιωβισμός των ουδετερόφιλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία, in situ, συσχετίζεται με υπερέκφραση των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους⁴². Η ενεργοποίηση των εγκλιωβισμένων ουδετερόφιλων θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει την απελευθέρωση ROS και πρωτεασών σε ένα μικροπεριβάλλον όπου εκ φύσεως οι αντιπρωτεάσες και οι εξουδετερωτές ριζών έχουν περιορισμένη πρόσβαση. Συνεπώς, η καταστροφή του κυψελιδικού τοιχώματος, όπως συμβαίνει στο εμφύσημα, θα μπορούσε να είναι το



Σχήμα 5. Η οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων σε καπνιστές.

αποτέλεσμα μιας πρωτεολυτικής επίθεσης προερχόμενης από τον ενδοκυττάριο χώρο, χωρίς να υπάρχει η ανάγκη της μετανάστευσης των ουδετερόφιλων στους αεροχώρους.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, πολλοί μελέτες έχουν δείξει ότι οι χρόνιοι καπνιστές έχουν αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων στο BAL²⁴⁻²⁶. Ο εγκλιωβισμός ουδετερόφιλων στη μικροκυκλοφορία διευκολύνει την χημειοταξία. Μελέτες σε ανθρώπους μετά από έκθεση σε καπνό τσιγάρου, έδειξαν αυξημένη χημειοτακτική δραστηριότητα ή αυξημένα επίπεδα χημειοτακτικών παραγώγων στους αεροχώρους⁴⁹.

Ενδείξεις οξειδωτικού stress σε καπνιστές και ασθενείς με ΧΑΠ

Υπάρχουν, πλέον, αδιαμφισβήτητες ενδείξεις για την ύπαρξη αυξημένου οξειδωτικού stress σε καπνιστές και σε ασθενείς με ΧΑΠ⁵⁰⁻⁵². Απευθείας μέτρηση ειδικών δεικτών της οξειδωτικής βλάβης, οι οποίοι παράγονται από την υπερβολική δραστικότητα των ελεύθερων ριζών, μπορεί να γίνει με electron spin resonance. Δεν μπορεί, ωστόσο, να εφαρμοστεί επί του παρόντος για προσδιορισμό οξειδωτικών δεικτών σε ιστικά τεμάχια. Οι περισσότερες μελέτες βασίζονται επομένως σε έμμεσες μετρήσεις της δραστικότητας των ελεύθερων ριζών σε βιολογικά υγρά. Αν και αυτοί οι δείκτες αντανάκλουν το υποκείμενο οξειδωτικό stress, δεν γνωρίζουμε αν εμπλέκονται απαραίτητα στην παθογένεια της ΧΑΠ. Δείκτες οξειδωτικού stress ανευρίσκονται στο ELF, στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα και στα ούρα καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ.

Οξειδωτικό stress και διαταραχή ισορροπίας πρωτεασών - αντιπρωτεασών

Η υπόθεση ότι η διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών - αντιπρωτεασών στους πνεύμονες είναι ένα από τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά την παθογένεια του εμφυσήματος, επιβεβαιώθηκε σε έρευνες που αφορούν σε ασθενείς με ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης. Όσον αφορά στους καπνιστές με φυσιολογικά επίπεδα α1-αντιθρυψίνης, το φορτίο της ελαστάσης μπορεί να είναι αυξημένο εξαιτίας της αυξημένης επιστράτευσης λευκοκυττάρων στους πνεύμονες. Επομένως, ίσως υφίσταται λειτουργική ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης λόγω της οξειδωτικής απενεργοποίησής της, γεγονός που θεωρείται ότι συνεισφέρει στην παθογένεια του εμφυσήματος.

Ένα μεγάλο μέρος της ιατρικής βιβλιογραφίας έχει ασχοληθεί με την πιθανή διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών - αντιπρωτεασών στην παθογένεια του εμφυσήματος. Είναι σαφές ότι η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην αυξημένη ελαστάση των πνευμόνων και τη λειτουργική ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης είναι μια υπεραπλούστευση, καθώς και άλλες πρωτεάσες και αντιπρωτεάσες παίζουν πιθανώς κάποιο ρόλο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η δραστικότητα της α1-αντιθρυψίνης στο BAL ήταν μειωμένη περίπου κατά 40% συγκριτικά με μη καπνιστές⁵³. Η λειτουργική ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης θεωρείται ότι προκύπτει από την απενεργοποίηση της α1-αντιθρυψίνης μέσω της οξειδωτικής της μεθειονίνης από οξειδωτικά που εμπεριέχονται στον καπνό του

⇒ τσιγάρου⁵⁴. Τα τελευταία μπορούν, επίσης, να απενεργοποιήσουν την εκκρινόμενη ηλευκοπρωτεΐση, έναν σημαντικό αναστολέα της ουδετεροφιλικής ελαστάσης^{55,56}.

Η παραπάνω θεωρία υποστηρίχθηκε από *in vitro* πειράματα στα οποία η ανασταλτική δράση της α1-αντιθρυψίνης χάθηκε μετά από χορήγηση οξειδωτικών⁵⁷, συμπεριλαμβανομένου του καπνού του τσιγάρου⁵⁸. Επιπρόσθετα, η οξείδωση της μεθειονίνης στο μόριο της α1-αντιθρυψίνης επιβεβαιώθηκε στους πνεύμονες υγιών καπνιστών^{59,60}. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα μακροφάγα από τους πνεύμονες καπνιστών απελευθερώνουν αυξημένες ποσότητες ROS, που μπορούν επίσης να απενεργοποιήσουν την α1-αντιθρυψίνη *in vitro*⁵⁴. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος της α1-αντιθρυψίνης στους καπνιστές παραμένει ενεργό και είναι συνεπώς ακόμα ικανό να τους προστατέψει ενάντια στο αυξημένο φορτίο πρωτεασών. Πιο πρόσφατες μελέτες παρέχουν αντικρουόμενα στοιχεία σχετικά με τη μεταβολή της δραστηριότητας της α1-αντιθρυψίνης στους καπνιστές⁶⁰, γεγονός που ίσως οφείλεται σε τεχνικές διαφορές ανάμεσα στο σχεδιασμό των μελετών.

Οι οξείες επιπτώσεις του καπνίσματος στη δραστηριότητα της α1-αντιθρυψίνης στο BAL έχουν δείξει μια παροδική, μη σημαντική πτώση της δραστηριότητάς της μία ώρα μετά το κάπνισμα^{61,62}. Άρα, οι μελέτες που αξιολογούν τη δραστηριότητα της α1-αντιθρυψίνης κατά το χρόνιο ή το οξύ κάπνισμα δεν έχουν καταφέρει να αποσαφηνίσουν την εικόνα.

Αντιοξειδωτικοί παράγοντες στο βρογχοκυψελιδικό εκπλήγμα (BAL)

Οι σημαντικότεροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες στο BAL είναι η βηλενίνη, η ανηγμένη γλυουταθειόνη, το ουρικό οξύ, πρωτεΐνες (κυρίως η αλβουμίνη) και το ασκορβικό οξύ^{15,63}. Η βηλενίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη (σουλφυδρυλίδια) και επομένως, ένα σπουδαίο αντιοξειδωτικό στο BAL. Η βηλενίνη έχει στο μόριό της περιοχές σύνδεσης μετάλλων⁶⁴, οι οποίες εξουδετερώνουν αποτελεσματικά τις ρίζες υδροξυλίου⁶⁵ και μάλιστα και τις ρίζες OCl- / HOCl λόγω της αφθονίας σουλφυδρυλίων και δισουλφυδίων στο μόριό της. Εισπνεόμενες τοξικές ουσίες

αυξάνουν την έκκριση βηλενίνης. Ωστόσο, οι ρίζες οξυγόνου μειώνουν τις γλυκοπρωτεΐνες της βηλενίνης¹⁶ και είναι, έτσι, πιθανόν τα οξειδωτικά προϊόντα του καπνού του τσιγάρου να αλληλεπιδρούν με τις εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες του αναπνευστικού συστήματος.

Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία για την αντιοξειδωτική άμυνα του αναπνευστικού επιθηλίου των καπνιστών και ακόμα λιγότερα για τους ασθενείς με ΧΑΠ. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυουταθειόνη είναι αυξημένη στο BAL χρόνιων καπνιστών^{24,66,67}.

Παρά τον διπλασιασμό της γλυουταθειόνης στο BAL χρόνιων καπνιστών, κατά τη



διάρκεια του καπνίσματος ίσως συμβαίνει απότομη μείωση της γλυουταθειόνης και επομένως είναι πιθανό να μην επαρκεί για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress των πνευμόνων²⁰. Οι Rahman και συνεργάτες^{22,68} μελέτησαν τις οξείες επιπτώσεις του CSC στο μεταβολισμό της γλυουταθειόνης σε ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* και *in vivo* σε πνεύμονες ποντικών μετά από ενδοτραχειακή ενστάλλαξη CSC. Ανακάλυψαν μια δόσο - και χρονοεξαρτώμενη εξάντληση της ενδοκυττάριας γλυουταθειόνης, συνοδευόμενη από σύνθεση συνδέσεων GSH, γεγονός που επιβεβαιώνεται από παρόμοια αποτελέσματα σε μελέτες με πειραματόζωα *in vivo*^{22,68}. Επιπλέον, η δραστηριότητα των αναγωγικών ενζύμων της γλυουταθειόνης (GP και

γλυκοζο - 6 - φωσφορική δεϋδρογενάση) μειώθηκε παροδικά στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και σε πνεύμονες ποντικών μετά από έκθεση σε CSC. Αυτό πιθανώς αντανακλά την επίδραση ηλεκτροφίλων ριζών στις δραστικές περιοχές των ενζύμων. Η ομοιοστάση της γλυουταθειόνης είναι πιθανό να παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού φραγμού των κυψελίδων. Συγκεκριμένα, μειωμένα επίπεδα γλυουταθειόνης στα επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του φραγμού και αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης^{21,22}.

Οι Pacht και συνεργάτες⁶⁹, έδειξαν ελαττωμένα επίπεδα βιταμίνης E στο BAL καπνιστών σε σύγκριση με μη καπνιστές. Σε αντίθεση, οι Bui και συνεργάτες⁷⁰ παρατήρησαν μια θεαματική αύξηση της βιταμίνης C στο BAL καπνιστών σε σύγκριση με μη καπνιστές. Παρομοίως, τα κυψελιδικά μακροφάγα καπνιστών έχουν αυξημένα επίπεδα ασκορβικού οξέος, αλλά και αυξημένη κατανάλωση ασκορβικού⁷¹. Έχει επίσης αναφερθεί αυξημένη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδική δεσμουτάση [SOD] και καταλάση) στα κυψελιδικά μακροφάγα νεαρών καπνιστών⁷². Ωστόσο, οι Kondo και συνεργάτες⁷³ παρατήρησαν ότι η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου από τα κυψελιδικά μακροφάγα σε βαρείς καπνιστές συσχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, συγκριτικά με μη καπνιστές. Η δραστηριότητα των CuZnSOD, GSH - S - τρανσφεράση και GP βρέθηκε μειωμένη στα κυψελιδικά μακροφάγα βαρέων καπνιστών. Η ελαττωμένη αυτή δραστηριότητα δεν συσχετίστηκε με μειωμένη γονιδιακή έκφραση, αλλά αποδίδεται σε τροποποίηση του μετα - μεταγραφικού επιπέδου⁷⁴.

Οι προφανείς ασυμφωνίες ανάμεσα στις παραπάνω μελέτες είναι δυνατό να οφείλονται στο διαφορετικό ιστορικό καπνίσματος και κυρίως, στο χρόνο που μεσοληβεί ανάμεσα στο κάπνισμα του τελευταίου τσιγάρου και στη λήψη του BAL.

Οι McCusker και Hoidal⁷² κατέδειξαν αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στα κυψελιδικά μακροφάγα μετά από έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, γεγονός που συμβάλλει σε μειωμένη θνητότητα όταν τα hamsters εκτίθενται στη συνέχεια σε μίγμα >95% πλούσιο σε οξυγόνο. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα των

θηλαστικών αναπτύσσουν μια προσαρμοστική απάντηση στη χρόνια έκθεση σε οξειδωτικά, η οποία ίσως προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα από βλάβες επιπρόσθετου οξειδωτικού stress. Οι μηχανισμοί που επάγουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων στα ερυθροκύτταρα⁷⁵, στα κυψελιδικά μακροφάγα⁷² και στους πνεύμονες⁷⁴, είναι μέχρι τώρα άγνωστοι. Είναι όμως πιθανό να επάγονται από αντιοξειδωτικά γονίδια.

Η ισοπροστανή F2a - III στα ούρα - ένα ισομερές της προσταγλανδίνης που σχηματίζεται από την υπεροξείδωση του αραχιδονικού οξέος μέσω ελεύθερων ριζών - βρέθηκε πρόσφατα να είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΧΑΠ, συγκριτικά με υγιείς και ακόμη πιο αυξημένη κατά τις παροξύνσεις της ΧΑΠ⁷⁶. Η ισοπροστανή F2a - III είναι ένας από τους έμμεσους δείκτες του οξειδωτικού stress που αυξάνονται σε ασθενείς με ΧΑΠ⁷⁷⁻⁸⁰.

Ενδείξεις συστηματικού οξειδωτικού stress

Πρόσφατα, υπήρξε αξιολογώμετο ενδιαφέρον για τις συστηματικές επιπτώσεις της ΧΑΠ. Μια από τις εκδηλώσεις των συστηματικών επιπτώσεων είναι η παρουσία δεικτών του οξειδωτικού stress στο αίμα ασθενών με ΧΑΠ. Αυτό αντανακλάται στον αυξημένο εγκλιωτισμό ουδετερόφιλων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία κατά τη διάρκεια του καπνίσματος, αλλά και κατά τη διάρκεια των παροξύνσεων της ΧΑΠ, και ο οποίος διαμεσολαμβάνεται, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, από οξειδωτικά παράγωγα^{37-40,46}.

Οι Rahman και συνεργάτες⁴⁰ ανέφεραν αυξημένη παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με οξεία παρόξυνση ΧΑΠ, η οποία επέστρεψε σε φυσιολογικά επίπεδα όταν οι ασθενείς επανήλθαν σε σταθερή κλινική κατάσταση. Άλλες μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα ασθενών με ΧΑΠ υπερεκφράζουν μόρια προσκόλλησης στην κυτταρική τους επιφάνεια, γεγονός που επίσης διαμεσολαμβάνεται από οξειδωτικούς μηχανισμούς^{40,81}. Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων ίσως είναι πιο εκσεσημασμένη στα ουδετερόφιλα που είναι εγκλιωτισμένα στην πνευμονική μικροκυκλοφορία καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ, αφού από πειραματικά μοντέλα φλεγμονής σε πνεύμονες ζώων, φαίνεται ότι τα εγκλιωτισμένα ουδετερόφιλα

απελευθερώνουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ROS από τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα του ίδιου ζώου⁴⁸. Συνεπώς, τα εγκλιωτισμένα αυτά ουδετερόφιλα μπορεί να είναι μια σημαντική πηγή οξειδωτικού stress, η οποία είναι δυνατό να προάγει τη βλάβη των αεραγωγών στη ΧΑΠ και κυρίως κατά τις παροξύνσεις.

Η υπεροξείδωση των λιπών, μια διαδικασία που αν συνεχιστεί, ως αλυσιδωτή αντίδραση παράγει υπεροξειδία και αλδεύδες, προκύπτει από την επίθεση των ελεύθερων ριζών στα πολυακόρεστα λίπη και λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών. Τα προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπών μπορούν να μετρηθούν σε βιολογικά υγρά του σώματος με τη μορφή τοξικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS). Τα επίπεδα των TBARS στο πλάσμα ή στο BAL αυξάνονται σημαντικά σε υγιείς καπνιστές και ασθενείς υπό παρόξυνση ΧΑΠ, σε σύγκριση με υγιείς μη καπνιστές^{9,40}. Επομένως, ο προσδιορισμός των TBARS δεν έχει ειδικότητα ως δείκτης της υπεροξείδωσης των λιπών, εφόσον δεν αντανακλά άμεσα την αντίδραση της υπεροξείδωσης των λιπών. Σε άλλες μελέτες, μετρήθηκαν τα επίπεδα του λινοληϊκού οξέος, ενός δευτερεύοντος προϊόντος της υπεροξείδωσης των λιπών, και βρέθηκαν αυξημένα σε χρόνιους καπνιστές⁸². Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της F2 - ισοπροστανής στην κυκλοφορία, η οποία είναι πιο άμεσος δείκτης της υπεροξείδωσης των λιπών, ανιχνεύθηκαν στους καπνιστές⁸³. Ανάλογα, οι Lapenna και συνεργάτες⁸⁴ ανέφεραν αυξημένα επίπεδα φθοριζόντων παραγώγων της υπεροξείδωσης των λιπών σε καπνιστές.

Μια πρόσφατη μελέτη διερεύνησε την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών - αντιοξειδωτικών παραγώγων σε καπνιστές και ασθενείς υπό παρόξυνση ΧΑΠ, μετρώντας τις μεταβολές της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος. Οι Rahman και συνεργάτες⁴⁰ ανέφεραν πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ήταν σημαντικά μειωμένη σε καπνιστές μία ώρα μετά το κάπνισμα, και σε ασθενείς υπό παρόξυνση ΧΑΠ, σε σύγκριση με υγιείς, μη καπνιστές της ίδιας ηλικίας (Σχήμα 2).

Η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος καπνιστών ίσως οφείλεται σε μια αξιολογώμετη εξάντληση των σουλφιδρυλικών ομάδων των πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως συμβαίνει μετά την έκθεση σε καπνό τσιγά-

ρου in vitro⁸⁵⁻⁸⁹. Επομένως, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι τα οξειδωτικά προϊόντα στον καπνό του τσιγάρου, τόσο in vitro όσο και in vivo, μειώνουν αισθητά τα χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά παράγωγα του πλάσματος και συνεπώς, κατά αυτόν τον τρόπο μειώνεται η προστασία απέναντι στην υπεροξείδωση των κυτταρικών μεμβρανών.

Ατομικές ποικιλομορφίες στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των βιολογικών υγρών είναι ένας από τους λόγους που εξηγούν την επιρρέπεια κάποιων καπνιστών ως προς την ανάπτυξη της ΧΑΠ.

Παρομοίως, ερευνητές μέτρησαν τα σπουδαιότερα αντιοξειδωτικά του πλάσματος σε καπνιστές⁹⁰⁻⁹⁸. Οι μελέτες αυτές δείχνουν την εξάντληση του ασκορβικού οξέος, της βιταμίνης E, της βιτα - καρτενίνης και του σελήνιου στον ορό χρόνιων καπνιστών⁹²⁻⁹⁷. Επιπλέον, μειωμένα επίπεδα βιταμίνης E και βιταμίνης C βρέθηκαν σε λευκοκύτταρα καπνιστών⁹⁶⁻⁹⁸. Ωστόσο, τα κυκλοφορούντα ερυθρά των καπνιστών περιέχουν αυξημένα επίπεδα υπεροξειδικής δεσμωτάσης και καταλάσης, παρά την παρόμοια δραστηριότητα της GP, και επομένως δύνανται να προστατέψουν καλύτερα τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τις επιδράσεις της υπεροξείδωσης του υδρογόνου σε σύγκριση με τους μη καπνιστές⁷⁵.

Το ασκορβικό οξύ του πλάσματος είναι, πιθανώς, ένας σημαντικός αντιοξειδωτικός παράγοντας. Έχει αποδειχθεί ότι η αέρια φάση του καπνού του τσιγάρου προκαλεί in vitro υπεροξείδωση των λιπών στο πλάσμα, η οποία ελιττώνεται με το ασκορβικό οξύ⁸⁷. Το μονοξείδιο του αζώτου που εμπεριέχεται στον καπνό του τσιγάρου, όπως και το NO και το O²⁻ που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα, αντιδρούν και παράγουν περοξυνιτρικό, το οποίο είναι κυτταροτοξικό. Διαπιστώθηκε πρόσφατα ότι το περοξυνιτρικό μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, οξειδώνοντας ταχέως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και τα σουλφιδρυλικά του πλάσματος⁹⁹. Ενδείξεις δραστηριότητας NO / περοξυνιτρικού στο πλάσμα έχει διαπιστωθεί σε καπνιστές. Η νιτροποίηση υπο - ομάδων τυροσίνης ή πρωτεϊνών του πλάσματος οδηγεί στην παραγωγή 3 - νιτροτυροσίνης⁹⁹. Ο Petruzzelli και συν.¹⁰⁰ κατέδειξαν την παρουσία της 3 - νιτροτυροσίνης στο πλάσμα καπνιστών και μάλιστα σε υψηλότερα επίπεδα απ'ότι σε ένα μικρό πληθυσμό μη καπνιστών. Επιβεβαιώ- ➔

⇒ σαν, επίσης, ότι πράγματι το πλάσμα σε καπνιστές έχει χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας, τα οποία συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης¹⁰⁰. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα συσχετίζονται αρνητικά με την αυξημένη απελευθέρωση ριζών οξυγόνου από τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα σε ασθενείς με παρόξυνση ΧΑΠ⁴⁰.

Άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την παθογένεια της ΧΑΠ

Ο κύριος όγκος των διαθέσιμων γνώσεων για την παθογένεια της ΧΑΠ αφορά κυρίως στην ανάπτυξη του εμφυσήματος. Στη ΧΑΠ συμπεριλαμβάνονται επίσης, η χρόνια βρογχίτιδα και η νόσος των μικρών αεραγωγών. Πιστεύεται ότι οι παράγοντες που συντηρούν τη φλεγμονώδη διαδικασία και οι επιδράσεις της πρωτεολυτικής και οξειδωτικής βλάβης σχετίζονται και με αυτές τις νόσους, αν και πολύ λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες.

Μοντέλα πρόκλησης εμφυσήματος από την ελασάση σε πειραματόζωα, καταδεικνύουν επίσης υπερπλησία των καλικοειδών κυττάρων¹⁰¹. Η ουδετεροφιλική ελασάση φαίνεται να διεγείρει την έκκριση των βλεννοπαραγωγών αδένων και μπορεί επομένως να συνεισφέρει στην υπερέκκριση βλέννης που παρατηρείται στη χρόνια βρογχίτιδα¹⁰². Οξειδωτικά συστήματα, όπως της ξανθίνης / οξειδάση ξανθίνης, έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την έκκριση βλέννης¹⁰³.

Ενδείξεις για την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην οξειδωτική / αντιοξειδωτική ισορροπία και την απόφραξη των αεραγωγών

Το ουδετερόφιλο είναι ένα κριτικής σημασίας κύτταρο στην παθογένεια της ΧΑΠ. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και τον FEV1^{104,105}, και συγκεκριμένα οι μεταβολές στον αριθμό των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος συσχετίζονται με μεταβολές στον περιορισμό ροής¹⁰⁵. Άλλες μελέτες παρουσίασαν ενισχυτικές πληροφορίες για το ρόλο της απελευθέρωσης των ROS από τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα και την ανάπτυξη περιορισμού ροής. Οι Richards και συν.²⁸ ανέφεραν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημεία των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος και σε μετρήσεις του περιορισμού ροής σε νεαρούς καπνιστές. Ακόμα και το παθητι-

κό κάπνισμα έχει συσχετιστεί με αυξημένα λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος και αυξημένη απελευθέρωση ριζών οξυγόνου¹⁰⁶. Τα TBARS στο πλάσμα συσχετίζονται αντίστροφα με τον επί τοις εκατό του προβλεπόμενου FEV1, υποδεικνύοντας ότι η υπεροξείδωση των λιπών συσχετίζεται με τον περιορισμό ροής στο γενικό πληθυσμό¹⁰⁷.

Η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών βιταμινών και πνευμονικής λειτουργίας, έχει περιγραφεί στο γενικό πληθυσμό. Ο Britton και συνεργάτες¹⁰⁸ κατέδειξαν σε ένα πληθυσμό 2.633 ατόμων, την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης E και στην πνευμονική λειτουργία, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση ότι αυτή η αντιοξειδωτική δράση ίσως παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της ανάπτυξης της ΧΑΠ. Επομένως, τα διαιτητικά συμπληρώματα βιταμινών θα μπορούσε να είναι δυνητικά μια προστατευτική θεραπεία. Τέτοιες κλινικές μελέτες είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν¹⁰⁹, αλλά υπάρχουν τουλάχιστον μερικές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών βιταμινών μειώνουν το οξειδωτικό stress¹¹⁰.

Οξειδωτικό stress και γονιδιακή έκφραση

Προφλεγμονώδη γονίδια

Υπάρχουν, πλέον, αδιαμφισβήτητες αποδείξεις από βιοψίες πνευμόνων ότι στη ΧΑΠ φλεγμαίνονται οι αεραγωγοί και οι κυψελίδες³². Πολυάριθμοι δείκτες φλεγμονής είναι αυξημένοι στα πτύελα ασθενών με ΧΑΠ, όπως η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α)¹¹¹.

Γονίδια για πολλούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως είναι οι κυταροκίνες IL-8, TNF-α και το οξειδίο του αζώτου (NO), ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο TNF-κΒ. Ο τελευταίος βρίσκεται στο κυτταρόπλάσμα σε αδρανή μορφή, συνδεδεμένος με την ανασταλτική του πρωτεΐνη IκΒ. Πολλά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των κυταροκινών και των οξειδωτικών, ενεργοποιούν τον NF-κΒ, επάγοντας τον αποχωρισμό της IκΒ από τον NF-κΒ και την καταστροφή της IκΒ στα πρωτεώματα¹¹². Αυτή η κρίσιμη διαδικασία κατά τη φλεγμονώδη απάντηση είναι οξειδοαναγωγικό - ευαίσθητη. Σε πρώιμες μελέτες in vitro, χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές μακροφάγων, κυψελιδικών και βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων, έχει καταδειχθεί ότι τα οξειδωτικά προκα-

λούν την απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η IL-8, IL-1 και το NO και ότι τα συμβάντα αυτά συσχετίζονται με την αυξημένη έκφραση των ανάλογων γονιδίων, καθώς και με την αυξημένη πρόσδεση στο DNA ή την αυξημένη ενεργοποίηση του NF-κΒ^{113,114}.

Τα θειολικά αντιοξειδωτικά, όπως η N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC) και η νακυστελίνη, εμποδίζουν σε in vitro πειράματα την απελευθέρωση αυτών των φλεγμονωδών μεσολαβητών από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα μέσω ενός μηχανισμού αυξημένης ενδοκυττάριας γλυουταθειόνης και μειωμένης δραστηριότητας του NF-κΒ^{113,114}.

Αντιοξειδωτικά γονίδια

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την ύπαρξη αυξημένου οξειδωτικού φορτίου στους πνεύμονες καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ. Ένα σπουδαίο επακόλουθο του οξειδωτικού stress είναι η υπερέκφραση προστατευτικών αντιοξειδωτικών γονιδίων. Η αντιοξειδωτική γλυουταθειόνη συγκεντρώνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο ELF συγκριτικά με το πλάσμα¹¹⁵ και φαίνεται να παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο μαζί με τα οξειδοαναγωγικά της ένζυμα που εδράζονται στις κυψελίδες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μελέτες σε πληθυσμό ανθρώπων έδειξαν ότι η γλυουταθειόνη είναι αυξημένη στο ELF χρόνιων καπνιστών συγκριτικά με μη καπνιστές⁶³, μια αύξηση που δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του καπνίσματος⁹. Μελετήσαμε τον προστατευτικό της ρόλο σε in vivo πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια και in vitro μονόστιβες καλλιέργειες κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Η ενδοτραχειακή ενστάλλαξη CSC σε ποντίκια και η έκθεση των μονόστιβων επιθηλιακών κυττάρων σε καπνό τσιγάρου, μιμείται τις επιδράσεις του οξέος και χρόνιου καπνίσματος στους πνεύμονες^{20,21,68}. Υπάρχει μια εμφανής μείωση της γλυουταθειόνης στο βροχοκυψελιδικό έκπλυμα των ποντικών, η οποία συνοδεύεται από πτώση της συνολικής πνευμονικής γλυουταθειόνης 6 ώρες μετά την έκθεση^{21,68}. Παρομοίως, παρατηρήθηκε ελάττωση της ενδοκυττάριας γλυουταθειόνης και στα επιθηλιακά κύτταρα^{20,68}. Η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στη μείωση της ενδοκυττάριας και πνευμονικής γλυουταθειόνης, τόσο in vivo όσο και in vitro και την αύξηση της επιθηλιακής διαπερατότητας είναι γεγονός.

Βασιστήκαμε σε ένα in vivo μοντέλο

ενδοτραχειακής ενστάλλαξης CSC σε ποντίκια και στην *in vitro* έκθεση μονόστιβων επιθηλιακών κυττάρων σε καπνό τσιγάρου, ώστε να μελετήσουμε αφ' ενός τη ρύθμιση της γλυταθειόνης και του οξειδοαναγωγικού της συστήματος ως απάντηση στο CSC και άλλα οξειδωτικά προϊόντα και αφετέρου τη δυσαναλογία των επιπέδων γλυταθειόνης ανάμεσα στο οξύ και το χρόνιο κάπνισμα. Μετά την *in vitro* έκθεση του κυψελιδικού επιθηλίου σε CSC παρατηρείται μια αρχική μείωση της ενδοκυττάριας γλυταθειόνης και ακολουθεί μια αντιδραστική αύξηση εάν τα κύτταρα ξεπλυθούν και παραταθεί η έκθεσή τους στο CSC για 24 ώρες¹¹⁶. Ανάλογα μεταβάλλεται η γλυταθειόνη σε πνεύμονες ποντικών⁶⁸ και συσχετίζεται με την αύξηση της οξειδωμένης γλυταθειόνης. Ερευνήσαμε, επίσης, τη δραστηριότητα των κύριων ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση και στην οξειδοαναγωγή της γλυταθειόνης ως απάντηση στο CSC, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η αρχική ελάττωση της πνευμονικής και ενδοκυττάριας γλυταθειόνης μετά από έκθεση σε CSC συσχετίστηκε με τη μείωση της δραστηριότητας της γ -GCS, η οποία ανέκτησε τη δραστηριότητά της σε 24 ώρες^{62,115}. Υποθέτουμε ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυταθειόνης μετά την έκθεση σε CSC οφείλονται στην ενεργοποίηση του γονιδίου της γ -GCS από τα συστατικά του καπνού του τσιγάρου. Χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - αντίστροφης μεταγραφάσης καταδείξαμε ότι 12 με 24 ώρες μετά την *in vitro* έκθεση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων σε CSC σημειώνεται αύξηση στο mRNA της γ -GCS^{116,117}, (Σχήμα 4). Καταδείξαμε, επίσης, ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της γ -GCS συνέβη στο μεταγραφικό επίπεδο (Σχήμα 3).

Το τελευταίο, πιθανώς να οφείλεται στην ενεργοποίηση οξειδοαναγωγικού - ευαίσθητων μεταγραφικών παραγόντων, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης της γ -GCS. Μια σειρά από πειράματα έδειξε ότι το CSC ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα (AP)-1^{118,119}. Σε πειράματα απάλειψης γονιδίων, χρησιμοποιώντας την κατευθυνόμενη μεταλλάξιση σε ένα σύστημα αναφοράς, βρήκαμε ότι η εγγύς (AP)-1 είναι καθοριστική για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της γ -GCS, ως απάντηση σε ποικίλα οξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένου του καπνού του τσιγάρου¹¹⁹ και άρα και για τη σύνθεση της γλυταθειό-

νης στα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα. Συνεπώς, το οξειδωτικό stress προκαλεί την υπερέκφραση σημαντικών γονιδίων που συμμετέχουν στη σύνθεση της γλυταθειόνης στα πλαίσια ενός προσαρμοστικού ή προστατευτικού μηχανισμού. Τα γεγονότα αυτά πιθανόν να ευθύνονται για τα αυξημένα επίπεδα γλυταθειόνης στο ELF χρόνιων καπνιστών, ενώ οι πιο επιβλαβείς επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου μάλλον συμβαίνουν κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου, όπου οι πνεύμονες βρίσκονται σε ένδεια αντιοξειδωτικών, όπως η γλυταθειόνη. Η κυτταροκίνη TNF, που παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή της ΧΑΠ, μειώνει επίσης την ενδοκυττάρια γλυταθειόνη στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού ενδοκυττάριας οξειδωτικού stress, ενώ ακολουθεί μια αντιδραστική αύξηση 12 με 24 ώρες μετά, λόγω της ενεργοποίησης της (AP)-1 και της αυξημένης έκφρασης της γ -GCS¹¹⁹. Τα κορτικοστεροειδή έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες στη ΧΑΠ, αλλά η αποτελεσματικότητά τους είναι ακόμη αμφιλεγόμενη. Είναι αξιοσημείωτο ότι η δεξαμεθαζόνη, επίσης, μειώνει την ενδοκυττάρια γλυταθειόνη στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, χωρίς όμως τη συνεπακόλουθη, αντιδραστική αύξηση που επάγει ο TNF¹¹⁹. Η τελευταία, μάλλον, παρεμποδίζεται κατά τη συγχρόνηση δεξαμεθαζόνης¹¹⁹. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, πιθανώς να διαφωτίσουν την αποτελεσματικότητα των κορτικοστεροειδών σε ασθενείς με ΧΑΠ.

Οι Gilks και συν.¹²⁰ κατέδειξαν την αύξηση της έκφρασης ενός αριθμού αντιοξειδωτικών γονιδίων στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα ποντικών που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου για 14 ημέρες. Αν και η έκφραση του mRNA του SOD και της μεταλλοθειονίνης ήταν αυξημένη τις ημέρες 1 και 2 και επέστρεψε σε φυσιολογικά επίπεδα μέσα σε 7 ημέρες, το mRNA της GP δεν αυξήθηκε παρά μόνο μετά από 7 ημέρες έκθεσης, υπογραμμίζοντας έτσι τη σπουδαιότητα του οξειδοαναγωγικού συστήματος της γλυταθειόνης στη χρόνια προστασία ενάντια στις επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου.

Το γονίδιο cfos ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που ρυθμίζουν την αύξηση και διαφοροποίηση και η έκφραση των οποίων αποτελεί γενικά την πρώτη σημαντική απάντηση σε μια ποικιλία χημικών και φυσικών ερεθισμάτων¹¹².

Μελέτες σε ποικίλες κυτταρικές σειρές επιβεβαίωσαν την αυξημένη έκφραση του γονιδίου cfos ως απάντηση στο CSC¹²¹. Το περοξυνιτρικό και οι αλδεϋδες που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου, σε συγκεντρώσεις που είναι παρόντα στο CSC μπορούν να αναπαράγουν τα ίδια αποτελέσματα¹²¹. Η μείωση της ενδοκυττάριας γλυταθειόνης από το CSC ενισχύεται αν προηγηθεί χορήγηση σουλφοξαμινικής βουθειονίνης στα κύτταρα, ενώ αναστέλλεται αν προηγηθεί θεραπεία με NAC, που είναι ένα θειολικό αντιοξειδωτικό¹²¹. Οι παραπάνω μελέτες δίνουν έμφαση στη σπουδαιότητα των ενδοκυττάριας επιπέδων της αντιοξειδωτικής γλυταθειόνης.

Επομένως, το οξειδωτικό stress προάγει την αυξημένη έκφραση τόσο των προφλεγμονωδών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NFκB, όσο και των προστατευτικών γονιδίων π.χ της γ -GCS μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως η (AP)-1. Συνεπώς, μάλλον υφίσταται μια λεπτή ισορροπία στην έκφραση προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών γονιδίων ως απάντηση στον καπνό του τσιγάρου και η οποία είναι κριτικής σημασίας για την πιθανή πρόκληση κυτταρικής βλάβης (Σχήμα 4).

Η γνώση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τα γεγονότα αυτά, ίσως ανοίξει νέους θεραπευτικούς ορίζοντες στην αντιμετώπιση της ΧΑΠ.

Οξειδωτικό stress και τάση προς ανάπτυξη ΧΑΠ

Επειδή ένα μόνο ποσοστό, (15-20%), των καπνιστών είναι ευάλωτοι στις επιδράσεις του καπνίσματος και εμφανίζουν μια γρήγορη μείωση της FEV1 και αναπτύσσουν τελικά ΧΑΠ¹²², είναι σημαντικό να διακρίνουμε αυτούς που είναι πιο ευάλωτοι, αλλά και να ανακαλύψουμε τους μηχανισμούς της τάσης αυτής. Η γνώση των παραπάνω ίσως διαφωτίσει την παθογένεια της ΧΑΠ.

Οι πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια φαίνεται να είναι συχνότεροι σε καπνιστές που αναπτύσσουν ΧΑΠ συγκριτικά με μη καπνιστές¹²³. Αρκετοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς ίσως έχουν λειτουργική σημασία, όπως η συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του TNF- α γονιδίου (TNF-2), το οποίο μπορεί να σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα του TNF στη φλεγμονή και στην ανάπτυξη χρόνιας βρογχίτιδας¹²⁴. Σχετικός με τις επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου είναι ⇨

⇒ και ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο της μικροσωματικής εποξειδικής υδρολάσης, ένα ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό υψηλής δραστηριότητας εποξειδικών μεσοληβητών που είναι παρόντες στον καπνό του τσιγάρου¹²⁵. Το ποσοστό των ατόμων με χαμηλή δραστηριότητα της μικροσωματικής εποξειδικής υδρολάσης (ομοζυγώτες), ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με ΧΑΠ και σε μια υποομάδα ασθενών με τεκμηριωμένο εμφύσημα (ΧΑΠ 22%, εμφύσημα 19%) συγκριτικά με τους υγιείς (6%). Επομένως, είναι πιθανό ότι οι πολυμορφισμοί λειτουργικής σημασίας σε ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ή σε γονίδια αντιοξειδωτικών ενζύμων, διακρίνουν τους καπνιστές που είναι πιο ευάλωτοι στις βλαβερές επιδράσεις του καπνού.

Θεραπευτικές επιλογές που στοχεύουν στην αποκατάσταση της ισορροπίας οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών προϊόντων στη ΧΑΠ

Αν και υπάρχουν στοιχεία δηλωτικά της διαταραχής της ισορροπίας οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών προϊόντων σε καπνιστές και του πιθανού τους ρόλου στην παθογένεια της ΧΑΠ, υπάρχουν και οι αντίστοιχες, στοχευμένες θεραπευτικές επιλογές;

Διάφορες προσεγγίσεις επιχειρήθηκαν για την αποκατάσταση αυτής της ισορροπίας. Μια πιθανή προσέγγιση θα μπορούσε να στοχεύει στη φλεγμονώδη απάντηση, μειώνοντας τον εγκλωβισμό ή τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων από την πνευμονική κυκλοφορία στις κυψελίδες. Τέτοιες θεραπευτικές επιλογές είναι, πιθανόν, φάρμακα που μεταβάλλουν την ικανότητα των κυττάρων για παραμόρφωση και που, επομένως, εμποδίζουν τον εγκλωβισμό ή τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια προσκόλλησης που είναι απαραίτητα για τη μετανάστευση είτε εμποδίζοντας την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-8, LTβ4), οι οποίες προάγουν την ουδετεροφιλική μετανάστευση. Θα ήταν επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες οι οποίοι θα εμποδίζουν την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα ή θα τις εξουδετερώνουν μόλις αυτές δημιουργηθούν, ενδυναμώνοντας έτσι την αντιοξειδωτική ασπίδα των πνευμόνων.

Υπάρχουν πολλές θεραπευτικές επιλογές για να ενισχύσουμε την αντιοξειδωτική προστασία των πνευμόνων. Μια προσέγγιση θα ήταν ο μοριακός χειρισμός αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως της GP, ή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση της γλουταθειόνης ή τέλος, η δημιουργία μορίων με δραστηριότητα παρόμοια με αυτή των αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, SOD).

Μια άλλη θεραπευτική επιλογή θα ήταν η χορήγηση αντιοξειδωτικής θεραπείας. Επιχειρήθηκε η χορήγηση διάφορων αντιοξειδωτικών παραγόντων σε καπνιστές, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E¹²²⁻¹²⁴. Προσπάθειες για χορήγηση συμπληρωματικής πνευμονικής γλουταθειόνης έχουν γίνει, χρησιμοποιώντας την ίδια τη γλουταθειόνη ή πρόδρομες μορφές της¹³⁰. Η γλουταθειόνη από μόνη της δε μεταφέρεται επαρκώς μέσα στα περισσότερα ζωικά κύτταρα και αυτή η εξωκυττάρια περίσσεια γλουταθειόνης μπορεί να αποτελέσει πηγή θειούχων ριζών υπό συνθήκες οξειδωτικού stress.

Η νεφελοποιημένη γλουταθειόνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά, αλλά έχει φανεί ότι προκαλεί βρογχική υπεραντιδραστικότητα¹³². Η κυστεΐνη είναι μια θειόλη και αποτελεί το αμινοτελικό αμινοξύ στη σύνθεση της γλουταθειόνης¹³³. Η χορήγηση κυστεΐνης δεν είναι εφικτή γιατί οξειδώνεται προς ένα νευροτοξικό παράγωγο της κυστεΐνης¹³⁴. Το κυστεΐνικο-δανειοδοτικό σύστημα NAC συμπεριφέρεται σαν κυτταρική πρόδρομη μορφή της κυστεΐνης και αποακετυλιώνεται στο στομάχι σε κυστεΐνη μετά από per os χορήγηση. Μειώνει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και δύναται να αλληλεπιδράσει άμεσα με τα οξειδωτικά προϊόντα. Η χορήγηση της NAC, προκειμένου να αυξηθεί η γλουταθειόνη σε ασθενείς με ΧΑΠ, είχε ποικίλα επιτυχή αποτελέσματα^{135,136}. Όταν η NAC χορηγήθηκε per os σε χαμηλή δόση εφ'άπαξ, 600 mg/d, σε υγιείς, τα επίπεδά της στο πλάσμα παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα 2 ώρες μετά τη χορήγηση¹³⁵. Οι Bridgeman και συν.¹³⁶, έδειξαν ότι μετά από 5 ημέρες καθημερινής χορήγησης NAC, 600mg tid, σημειώθηκε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης στο πλάσμα. Ωστόσο, δεν υπήρξε ανάλογη αύξηση της γλουταθειόνης στο BAL ή στον πνευμονικό ιστό. Οι πληροφορίες αυτές υπονοούν ότι είναι δύσκολο να επιτευχθεί σταθερή αύξηση της πνευμονικής γλουταθειόνης μέσω της χορήγησης NAC σε άτομα

που δε βρίσκονται σε ένδεια γλουταθειόνης. Παρόλα αυτά, ευρωπαϊκές μελέτες έχουν δείξει ότι η NAC μειώνει τον αριθμό των ημερών που οι ασθενείς με ΧΑΠ βρίσκονται σε παρόξυνση¹³⁷⁻¹³⁸. Αυτό δεν επιβεβαιώθηκε όμως σε μια ανάλογη μελέτη της Βρετανικής Εταιρείας Θώρακος¹³⁹. Τα αντικρουόμενα συμπεράσματα των παραπάνω ερευνών οφείλονται σε διάφορους λόγους. Πρώτον, τα θετικά αποτελέσματα των μελετών της NAC αφορούν σε ασθενείς με σχετικά ήπια ΧΑΠ, ενώ στη βρετανική μελέτη οι ασθενείς είχαν σοβαρότερου σταδίου ΧΑΠ. Δεύτερον, και στις δύο μελέτες χορηγήθηκε σχετικά μικρή δόση NAC.

Η N-ακυστεΐνη (NAL) είναι ένα άλλος λυσίνης της NAC. Είναι επίσης μια βιολογική και οξειδωτική, θειολική ένωση, η οποία, σε αντίθεση με την NAC που είναι οξύ, έχει ουδέτερο pH. Η NAL μπορεί να χορηγηθεί σε εισπνεόμενη μορφή χωρίς σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες¹⁴⁰. Συγκριτικές μελέτες των αποτελεσμάτων της NAC και της NAL, βρήκαν ότι και οι δύο ενώσεις αύξησαν την ενδοκυττάρια γλουταθειόνη στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα¹⁴⁰ και ανέστειλαν την απελευθέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του ανιόντος του υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ¹⁴¹.

Τα περισσότερα ζωικά κύτταρα φυσιολογικά εξάγουν γλουταθειόνη, αλλά δεν την προσλαμβάνουν. Ο αιθυλεστέρας της γλουταθειόνης περιέχει μια αιθυλ-ομάδα που εστεροποιείται στο αμινοξύ γλυκίνη της γλουταθειόνης. Ο αιθυλεστέρας της γλουταθειόνης είναι πιο λιπόφιλος και επομένως εισέρχεται ταχύτερα και ευκολότερα στα κύτταρα από ότι η γλουταθειόνη. Ο μονο-εστέρας στη συνέχεια υδρολύεται σε γλουταθειόνη από τη μια μη ειδική κυτταροπλασματική εστεράση¹⁴². Ο μονο-αιθυλ-εστέρας της γλουταθειόνης ανθίσταται στη δράση του ενζύμου γ-γλουταμυλο-κυστεϊνική τρανσπεπτιδάση και έχει χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της γλουταθειόνης in vitro¹⁴³. Η θειαζολιδίνη είναι ένας εν δυνάμει χρήσιμος συζεύκτης για τη μεταφορά κυστεΐνης και έχει φανεί ότι προστατεύει ενάντια στην οξειδωτική βλάβη¹⁴⁴. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες σε πληθυσμό ανθρώπων που να επιβεβαιώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα.

Η μοριακή ρύθμιση της σύνθεσης της γλουταθειόνης - στοχεύοντας στη γGCS

- είναι μια πολλή υποσχόμενη θεραπεία της οξειδωτικής βλάβης των πνευμόνων. Η ενδοκυττάρια γλυουταθειόνη, πιθανώς αυξάνεται εάν αυξηθεί η δραστηριότητα της γGCS. Το τελευταίο μπορεί να γίνει εφικτό με τεχνικές γονιδιακής μεταφοράς, αν και αυτή θα ήταν μια ακριβή θεραπεία με δυσανάλογο κόστος για μια συχνή πάθηση, όπως είναι η ΧΑΠ. Ωστόσο, η γνώση του πώς ρυθμίζεται η γGCS ίσως επιτρέψει την ανάπτυξη άλλων νέων θεραπειών που θα αυξάνουν την γλυουταθειόνη.

Συνοπτικά, υπάρχουν πλέον πολύ καλές ενδείξεις για τη διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών προϊόντων στη ΧΑΠ και αυξανόμενες ενδείξεις ότι αυτή η διαταραχή είναι σημαντική στην παθογένεια της νόσου. Υπάρχουν αρκετές σοβαρές επιδράσεις του οξειδωτικού stress στους καπνιστές και οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη της ΧΑΠ (Σχήμα 5).

Το οξειδωτικό stress, ίσως είναι κριτικής σημασίας κατά τη φλεγμονώδη απάντηση που επάγει ο καπνός του τσιγάρου μέσω της υπερέκφρασης οξειδοαναγωγικο-ευαίσθητων μεταγραφικών παραγόντων και προφλεγμονωδών γονιδίων. Ωστόσο, εμπλέκεται εξίσου στην ενεργοποίηση προστατευτικών μηχανισμών μέσω της επαγωγής αντιοξειδωτικών γονιδίων. Η ίδια η φλεγμονή επάγει το οξειδωτικό stress στους πνεύμονες και πολυμορφισμοί σε γονίδια φλεγμονωδών μεσοληβητών ή σε αντιοξειδωτικά γονίδια ίσως ευθύνονται για την ευπάθεια ως προς τις βλαβερές επιδράσεις του καπνίσματος. Η γνώση των μηχανισμών του οξειδωτικού stress θα μπορούσε να επιτρέψει στο μέλλον τη χορήγηση αντιοξειδωτικών θεραπειών που θα επαληθεύουν την υπόθεση, ότι το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθογένεια της ΧΑΠ, αλλήλ και στη φλεγμονώδη διαδικασία και άλλων πνευμονικών νόσων που σχετίζονται με το κάπνισμα.

Βιβλιογραφία

- British Thoracic Society. Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52(Suppl 5):S1-S28.
- Church T, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64:111-126.
- Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:669-681.
- Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radicals hydrogen peroxides peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Annals N Y Acad Sci* 1993; 686:12-28.
- Zang KY, Stone K, Pryor WA. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1995; 19:161-167.
- Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radic Biol Med* 1989; 7:9-15.
- Chow CK. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann NY Acad Sci USA* 1993; 686:289-298.
- Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:833-838.
- Morrison D, Rahman I, Lannan S, et al. Epithelial permeability inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:473-479.
- Mateos F, Brock JF, Perez-Arellano JL. Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax* 1998; 53:594-600.
- Thompson AB, Bohling T, Heires A, et al. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *J Lab Clin Med* 1991; 117:494-499.
- Wesseliuss LJ, Nelson ME, Skikne BS. Increased release of ferritin and iron by iron loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 690-695.
- Cantin A, Crystal RG. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur J Respir Dis* 1985; 66(Suppl 139):7-17.
- Laurent P, Janoff A, Kagan HM. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:189-192.
- Cross CE, Van der Vliet A, O'Neill CA, et al. Oxidants antioxidants and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl 1):185-191.
- Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1984; 1:1328-1330.
- Dye JA, Adler KB. Effects of cigarette smoke on epithelial cells on the respiratory tract. *Thorax* 1994; 49:825-834.
- Jones JG, Lawler P, Crawley JCW, et al. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 1981; 66-68.
- Lannan S, Donaldson K, Brown D, et al. Effects of cigarette smoke and its condensates on alveolar cell injury in vitro. *Am J Physiol* 1994; 266:L92-L100.
- Li XY, Donaldson K, Rahman I, et al. An investigation of the role of glutathione in the increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1518-1525.
- Li XY, Rahman I, Donaldson K, et al. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax* 1996; 51:465-471.
- Rahman I, Li XY, Donaldson K, et al. Cigarette smoke glutathione metabolism and epithelial permeability in rat lungs. *Biochem Soc Trans* 1995; 23:2355.
- Li XY, Donaldson K, Brown D, et al. The role of tumour necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:185-195.
- Morrison D, Rahman I, Lannan S, et al. Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:473-479.
- Kilburn K, McKenzie W. Leukocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. *Science* 1975; 189:634-637.
- Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:833-838.
- Schaberg T, Haller H, Rau M, et al. Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *Eur Respir J* 1992; 5:387-393.
- Richards GA, Therson AJ, Carel A, et al. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence responses of activated blood phagocytes. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:181-187.
- Davis WB, Pacht ER, Spatafora M, et al. Enhanced cytotoxic potential of alveolar macrophages from cigarette smokers. *J Lab Clin Med* 1988; 111:293-298.
- Ludwig PW, Hoidal JR. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:977-980.
- Hoidal JR, Fox RB, LeMarbe PA, et al. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:85-89.
- Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998; 53:129-136 3145 Thomas L. Petty 42nd Annual Aspen Lung Conference: Mechanisms of COPD.
- Pinamonti S, Muzzuli M, Chicca C, et al. Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive lung disease. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:147-155.
- MacNee W, Selby C. Neutrophil traffic in the lungs, the role of hemodynamics, cell adhesion and deformability. *Thorax* 1993; 48:79-88.
- Selby C, Drost E, Wraith PK, et al. In vivo neutrophil sequestration within the lungs of man is determined by in vitro 'filterability'. *J Appl Physiol* 1991; 71:1996-2003.
- Hogg JC. Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol Rev* 1987; 67:1249-1295.
- MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, et al. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321:924-928.
- Drost EM, Selby C, Lannan S, et al. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6:287-295.
- Drost E, Selby C, Bridgeman MME, et al. Decreased leukocyte deformability following acute cigarette smoking in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1277-1283.
- Rahman I, Morrison D, Donaldson K, et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1055-1060.
- Lehr HA, Kress E, Menger MD, et al. Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters: inhibition by CuZnSOD. *Free Radic Biol Med* 1993; 14:573-581.
- Klut ME, Doerschuk CM, Hogg JC, et al. Activation of neutrophils within pulmonary microvessels of rabbits exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9:82-90.
- Nathan C, Srimal S, Farber C, et al. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989; 109:1341-1349.
- Selby C, Drost E, Brown D, et al. Inhibition of neutrophil adherence and movement by acute cigarette smoke exposure. *Exp Lung Res* 1992; 18:813-827.
- Selby C, Drost E, Lannan S, et al. Neutrophil retention in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:1359-1364.
- Rahman I, Skwarska E, MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52:565-568.
- Bosken CH, Doerschuk CM, English D, et al. Neutrophil kinetics during active cigarette smoking in rabbits. *J Appl Physiol* 1991; 71:830-837.
- Brown DM, Drost E, Donaldson K, et al. Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:531-539.
- Morrison D, Strieter RM, Donnelly SC, et al. Neutrophil chemokines in BALF and leukocyte conditioned medium from non-smokers and smokers. *Eur Respir J* 1998; 12:1067-72.
- MacNee W. Chronic obstructive pulmonary disease from science to the clinic: the role of glutathione in oxidant-antioxidant balance. *Monaldi Arch Chest Dis* 1997; 52:479-485.
- Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51:348-350.
- Repine JE, Bast A, Lankhorst I, et al. Oxidant stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-357.
- Stockley RA. Antielastases in lung lavage from patients with emphysema. In: Taylor JC, Mittman C, eds. *Pulmonary emphysema and proteolysis*. Orlando, FL: Academic Press, 1986; 277-282.
- Hubbard RC, Ogushi F, Fels GA, et al. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1987; 80:1289-1295.
- Kramps JA, Rudolphus A, Stolk J, et al. Role of antileukoprotease in the lung. *Ann N Y Acad Sci USA* 1991; 624:97-108.
- Kramps JA, van Twisk C, Dijkman DH. Oxidative inactivation of antileukoprotease is triggered by polymorphonuclear leukocytes. *Clin Sci* 1988; 75:53-62.
- Johnson D, Travis J. The oxidative inactivation of human 1-proteinase inhibitor: further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem* 1979; 254:4022-4026.
- Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers: in vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118:617-621.
- Gadek J, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979; 206:1315-1316.
- Stockley RA, Burnett D. Alpha 1-antitrypsin in infected and non-infected sputum. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:81-88.
- Abboud RT, Fera T, Richter A, et al. Acute effect of smoking on the functional activity of alpha-1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:1187-1189.
- Abboud RT, Fera T, Richter A, et al. Acute effect of smoking on the functional activity of alpha-1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1985;

- ⇒ 131:79–85.
63. Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, et al. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1990; 86:962–971.
 64. Cooper B, Creeth JM, Donald ASR. Studies of the limited degradation of mucus glycoproteins: the mechanism of the peroxide reaction. *Biochem J* 1985; 228:615–626.
 65. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1984; 1:1328–1330.
 66. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, et al. Normal alveolar epithelial lung fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987; 63:152–157.
 67. Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, et al. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation* 1989; 13:651–658.
 68. Rahman I, Li XY, Donaldson K, et al. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Biol* 1995; 269:L285–L292.
 69. Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, et al. Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *J Clin Invest* 1988; 77:789–796.
 70. Bui MH, Sauty A, Collet F, et al. Dietary vitamin C intake and concentrations in the body fluids and cells of male smokers and nonsmokers. *J Nutr* 1992; 122:312–336.
 71. McGowan SE, Parenti CM, Hoidal JR, et al. Differences in ascorbic acid content and accumulation by alveolar macrophages from cigarette smokers and non-smokers. *J Lab Clin Med* 1984; 104:127–134.
 72. McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:678–682.
 73. Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, et al. Current smoking of CHEST / 117 / 5 / MAY, 2000 SUPPLEMENT 3155
 74. York GK, Pierce TH, Schwartz LS, et al. Stimulation by cigarette smoke of glutathione peroxidase system enzyme activities in rat lung. *Arch Environ Health* 1976; 31:286–290.
 75. Toth KM, Berger EM, Buhler CJ, et al. Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from non-smokers. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:281–284.
 76. Pratico D, Basili S, Vieri M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2a-III: an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 158:1709–1714.
 77. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:813–816.
 78. Maziak W, Loukides S, Culpitt S, et al. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:998–1002.
 79. Culpitt SV, Paredi P, Kharitonov SA, et al. Exhaled carbon monoxide is increased in COPD patients regardless of their smoking habit. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:A787.
 80. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, et al. Breath condensate analysis of 8-isoprostane: a new approach for assessment of oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:A798.
 81. Noguera A, Busquets X, Saulea J, et al. Expression of adhesion molecules and g-proteins in circulating neutrophils in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1664–1668.
 82. Duthie GG, Arthur JR, James WPT. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:1061S–1063S.
 83. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995; 332:1198–1203.
 84. Lapenna D, Mezzetti D, Giola SD, et al. Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radic Biol Med* 1995; 19:849–85.
 85. O'Neill CA, Halliwell B, Van der Vliet A, et al. Aldehyde-induced protein modifications in human plasma: protection by glutathione and dihydrolipoic acid. *J Lab Clin Med* 1994; 124:359–370.
 86. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J* 1992; 286:607–611.
 87. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann NY Acad Sci USA* 1993; 686:72–90.
 88. Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, et al. Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung patients. *Chest* 1990; 98:930–935.
 89. Bridges AB, Scott NA, Parry GJ, et al. Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur J Med* 1993; 2:205–208.
 90. Duthie GG, Arthur JR, James WPT. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:1061S–1063S.
 91. Mazzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, et al. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 1995; 112:91–99.
 92. Antwerpen LV, Theron AJ, Myer MS, et al. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E and tissue injury. *Ann NY Acad Sci USA* 1993; 686:53–65.
 93. Pelletier O. Vitamin C status of cigarette smokers and non-smokers. *Am J Clin Nutr* 1970; 23:520–528.
 94. Chow CK, Thacker R, Bridges RB, et al. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986; 5:305–312.
 95. Bridges RB, Chow CK, Rehm SR. Micronutrients and immune functions in smokers. *Ann NY Acad Sci USA* 1990; 587:218–231.
 96. Theron AJ, Richards GA, Rensburg AJ, et al. Investigation of the role of phagocytes and antioxidant nutrients in oxidant stress mediated by cigarette smoke. *Int J Vitam Nutr Res* 1990; 60:261–266.
 97. Barton G, Roath OS. Leukocytic ascorbic acid in abnormal leukocyte states. *Int J Vitam Nutr Res* 1976; 46:271–274.
 98. Hemilla H, Roberts P, Wikstrom M. Activated polymorphonuclear leukocytes consume vitamin C. *FEBS Lett* 1984; 178:25–30.
 99. Van der Vliet A, Smith D, O'Neill CA, et al. Interactions of peroxynitrite and human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J* 1994; 303:295–301.
 100. Petruzzelli S, Puntoni R, Mimotti P. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1902–1907.
 101. Lucey EC, Stone PJ, Breuer R, et al. Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters with in vitro observations on elastolysis by these enzymes. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:362–366.
 102. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, et al. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990; 85:682–289.
 103. Adler KB, Holden-Stauffer WJ, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate release of high-molecular-weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1990; 85:75–85.
 104. Chan-Yeung M, Dy Buncio A. Leukocyte count, smoking and lung function. *Am J Med* 1984; 76:31–37.
 105. Chan-Yeung M, Abboud R, Dy Buncio A. Peripheral leukocyte count and longitudinal decline in lung function. *Thorax* 1988; 43:426–468.
 106. Anderson R, Theron AJ, Richards GA, et al. Passive smoking by human sensitizes circulating neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:570–574.
 107. Schunemann HJ, Muti P, Freudenheim JL, et al. Oxidative stress and Lung Function. *Am J Epiderm* 1997; 146:939–948.
 108. Britton JR, Pavord ID, Richards KA, et al. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1383–1387.
 109. Sridhar MK, Galloway A, Lean MEJ, et al. An out-patient nutritional supplementation programme in COPD patients. *Eur Respir J* 1994; 7:720–724.
 110. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:319–327.
 111. Keating SVM, Collins PD, Scott DM, et al. Differences in interleukin-8 and tumour necrosis factor-induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530–534.
 112. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998; 53:601–612.
 113. Watchorn T, Mulier B, MacNee W. Does increasing intracellular glutathione inhibit cytokine-induced nitric oxide release and Nf-kB activation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:A889.
 114. Parmentier M, Drost E, Hirani N, et al. Thiol antioxidants inhibit neutrophil chemotaxis by decreasing release of IL-8 from macrophages and pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:A286.
 115. Cross CE, Van der Vliet A, O'Neill CA, et al. Oxidants antioxidants and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl 10):185–191.
 116. Rahman I, Lawson MF, Smith CAD, et al. Induction of g-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1996; 396:21–25.
 117. Rahman I, Bel A, Mulier B, et al. Transcriptional regulation of g-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229:832–837.
 118. Rahman I, MacNee W. Characterization of g-glutamylcysteine-heavy subunit gene promoter: critical role for AP-1. *FEBS Lett* 1998; 427:129–133.
 119. Rahman I, Antonicelli F, MacNee W. Molecular mechanisms of the regulation of glutathione synthesis by tumour necrosis factor- α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274:5088–5096.
 120. Gilks CB, Price K, Wright JL, et al. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol* 1998; 152:269–278.
 121. Muller T, Gebel S. The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration. *Carcinogenesis* 1998; 19:797–801.
 122. Silverman EK, Speizer FE. Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1996; 80:501–522.
 123. Sandford AJ, Weir TD, Pare PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10:1380–1391.
 124. Huang S-L, Su C-H, Chang S-C. Tumour necrosis factor- α gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1436–1439.
 125. Smith CAD, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350:630–633.
 126. Clausen J. The influence of antioxidants on the enhanced respiratory burst reaction in smokers. *Ann N Y Acad Sci USA* 1991; 629:337–341.
 127. Davis WB, Pacht ER, Spatafora M, et al. Enhanced cytotoxic potential of alveolar macrophages from cigarette smokers. *J Lab Clin Med* 1998; 111:293–298.
 128. Hoshino E, Shariff R, Van Gossom A, et al. Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. *J Parenter Enter Nutr* 1990; 40:300–305.
 129. Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, et al. Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers Influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *J Clin Invest* 1988; 77:789–796.
 130. MacNee W, Bridgeman MME, Marsden M, et al. The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells. *Am J Med* 1991; 90:60s–66s.
 131. Ross D, Norbeck K, Moldeus P. The generation and subsequent fate of glutathionyl radicals in biological systems. *J Biol Chem* 1985; 260:15028–15032.
 132. Marrades RM, Roca J, Barbera J, et al. Nebulized glutathione induces bronchoconstriction in patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:425–430.
 133. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:711–760.
 134. Karlsen RL, Grofova I, Malthe-Soren D, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann N Y Acad Sci USA* 1993; 686:72–90.
 135. Bridgeman MME, Marsden M, MacNee W, et al. Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax* 1991; 46:39–42.
 136. Bridgeman MME, Marsden M, Selby C. Effect of N-acetylcysteine on the concentrations of thiols in plasma bronchoalveolar lavage fluid and lining tissue. *Thorax* 1994; 49:670–675.
 137. Bowman G, Backer U, Larsson S, et al. Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis* 1983; 64:405–415.
 138. Rasmussen JB, Glennon C. Reduction in days of illness after long-term treatment with N-acetylcysteine controlled-release tablets in patients with chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis* 1988; 1:351–355.
 139. British Thoracic Society Research Committee. Oral N-acetylcysteine and exacerbation rates in patients with chronic bronchitis and severe airways obstruction. *Thorax* 1985; 40:823–835.
 140. Gillissen A, Jaworska M, Orth M, et al. N-acetylcysteine: a novel lysine salt of N-acetylcysteine to augment cellular antioxidant defense in vitro. *Respir Med* 1997; 91:159–168.
 141. Nagy AM, Vanderbist F, Parij N, et al. Effect of the mucocactive drug N-acetylcysteine on the respiratory burst of human blood polymorphonuclear neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther* 1997; 10:287–292.
 142. Anderson ME, Powrie F, Puri R, et al. Glutathione monoethyl ester: preparation uptake by tissues and conversion to glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1985; 239:538–548.
 143. Tsan M, White JE, Rosano CL. Modulation of endothelial GSH concentrations: effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester. *J Appl Physiol* 1989; 66:1029–1034.
 144. Tsan MF, Phillips PG. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate protects cultured endothelial cells against hyperoxia-induced injury. *Inflammation* 12:113–121.