

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ-9 (MMP-9) ΣΤΟ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΡΔΑΡΑ ΜΑΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ-9 (MMP-9) ΣΤΟ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΡΔΑΡΑ ΜΑΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5899/1
Ημερ. Εισ.: 04-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087368

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Θεόδωρο Κυρόπουλο, Βιοχημικό καθώς η καθοδήγηση του υπήρξε πολύτιμη όχι μόνο για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, αλλά και για την διεύρυνση των επιστημονικών μου οριζόντων. Επίσης ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη και τον Λέκτορα Βιοχημείας κ. Νικόλαο Μπαλατσό για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και την εποικοδομητική κριτική τους. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Σμαράγδα Οικονομίδα και στην κ. Ειρήνη Τσιλιώνη, Βιοχημικοί, για την καλή συνεργασία και την βοήθεια που τόσο απλόχερα μου προσέφεραν.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους γονείς μου για την στήριξη και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	7
2.1. Ανατομία.....	7
2.2. Υπεζωκοτικό υγρό.....	8
2.3. Το υπεζωκοτικό υγρό και η διακίνηση του.....	9
3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ	10
3.1. Επιδημιολογία υπεζωκοτικών συλλογών	10
3.2. Παθοφυσιολογία.....	11
3.3. Ανάλυση υπεζωκοτικού υγρού	12
4. ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ	19
4.1. Παραπνευμονικές συλλογές και Εμπύημα.....	19
4.2. Φυματίωση.....	20
4.3. Κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές.....	21
4.4. Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.....	22
4.5. Ρευματοειδής αρθρίτιδα.....	22
5. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-9 (MMP-9)	23
5.1. Η οικογένεια των Μεταλλοπρωτεϊνών.....	23
5.2. Δομικά χαρακτηριστικά της MMP-9.....	25
5.3. Ρύθμιση της MMP-9.....	25
5.4. Ο ρόλος της MMP-9 σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.....	27
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
6.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
6.1. Πληθυσμός.....	29
6.2. Κριτήρια διάγνωσης.....	29
6.3. Συλλογή και διατήρηση των δειγμάτων.....	30
6.4. Μέθοδος προσδιορισμού της MMP-9.....	32
7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	34
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	42
11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	43
12. ABSTRACT.....	44
13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix Metalloproteinases-MMPs) αποτελούν μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών, με κεντρικό ρόλο στην αποικοδόμηση όλων των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Οι Ζελατινάσες, δηλαδή η Μεταλλοπρωτεϊνάση-2 (MMP-2) ή Ζελατινάση Α και η Μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9) ή Ζελατινάση Β, αποτελούν την πιο πολύπλοκη υποομάδα των MMPs από άποψη δομής και ρύθμισης της λειτουργίας τους. Η δράση τους συνδέεται με φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η αναπαραγωγή και αποκατάσταση τραυμάτων, αλλά και με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων. Στον πνεύμονα, διαταραχή των επιπέδων τους έχει παρατηρηθεί σε ασθένειες όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το άσθμα, ο καρκίνος του πνεύμονα και οι υπεζωκοτικές συλλογές.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές αποτελούν ένα συχνό διαγνωστικό και θεραπευτικό πρόβλημα στην καθημερινή κλινική πράξη. Για την ανάπτυξη τους, ευθύνονται διαταραχές στη σχέση παραγωγής-απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού. Η πρωτοπαθής νόσος αφορά συχνότερα τους πνεύμονες και σπανιότερα άλλα παρακείμενα όργανα (ήπαρ, πάγκρεας, οισοφάγο). Η διάγνωση τους γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων βιοχημικών εξετάσεων (μικροβιολογικών, βιοχημικών, κυτταρολογικών) καθώς και με βάση τη κλινική εικόνα του ασθενούς.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη συγκέντρωση της Μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή. Σκοπός της μελέτης ήταν η αποτίμηση της χρησιμότητάς της στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

2. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

2.1. Ανατομία

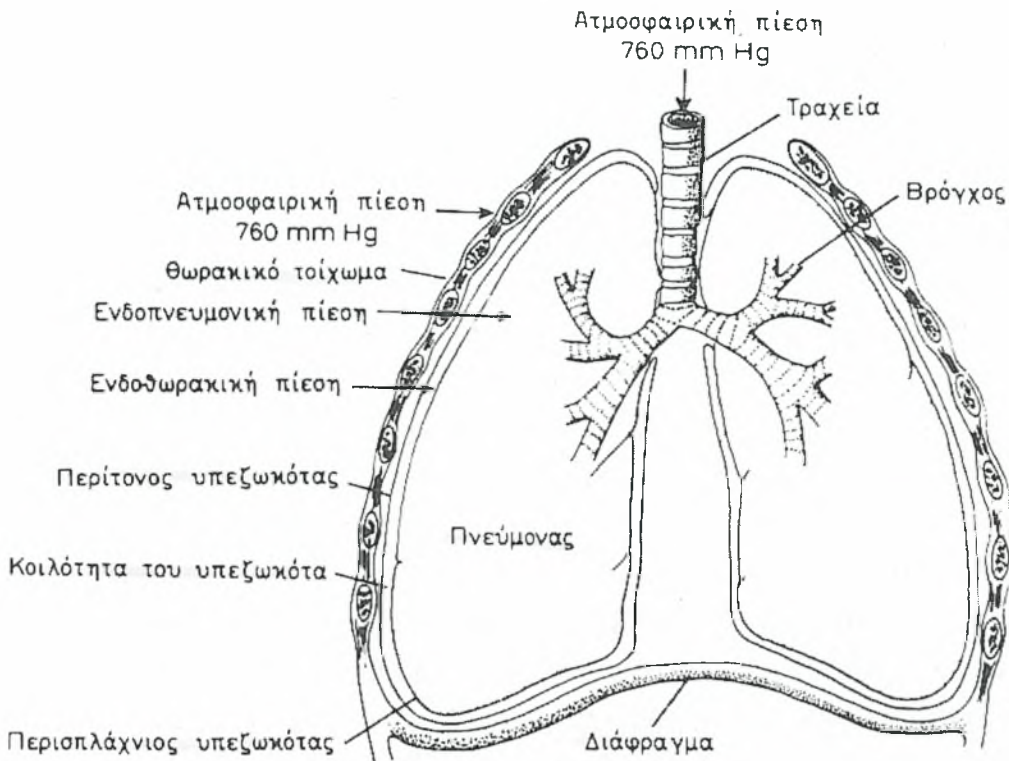
Κάθε πνεύμονας περιβάλλεται από ένα ορογόνο, ημιδιαφανή υμένα που ονομάζεται υπεζωκότας. Ο υπεζωκότας διαιρείται σε δύο πέταλα: το τοιχωματικό ή περίτονο πέταλο (parietal), που καλύπτει την έσω επιφάνεια του θωρακικού κλωβού, το μεσαύλιο και το διάφραγμα, και το σπλαχνικό πέταλο (visceral), που καλύπτει τον σύστοιχο πνεύμονα και τις μεσολόβιες σχισμές¹. Τα δυο πέταλα συνέρχονται στην πύλη του πνεύμονα, όπου διέρχονται τα πνευμονικά-βρογχικά αγγεία, οι στελεχιαίοι βρόγχοι και τα λεμφαγγεία. Ο χώρος μεταξύ του σπλαχνικού και του τοιχωματικού υπεζωκότα καλείται *υπεζωκοτική κοιλότητα* και έχει εύρος 10-20mm³ (Εικόνα 1). Μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού υπάρχει φυσιολογικά εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Αυτό το λεπτό στρώμα υγρού δρά ως λιπαντικό και επιτρέπει στο σπλαχνικό υπεζωκότα να γλιστρά χωρίς τριβή κατά μήκος του τοιχωματικού υπεζωκότα, με αποτέλεσμα οι αναπνευστικές κινήσεις να μην παρεμποδίζονται και να μην παρουσιάζουν διακοπές^{1, 3}.

Τόσο ο τοιχωματικός όσο και ο σπλαχνικός υπεζωκότας αιματώνονται από τη συστηματική κυκλοφορία (από αρτηριακούς κλάδους και από κλάδους των βρογχικών αρτηριών, αντίστοιχα). Επειδή τα τριχοειδή του σπλαχνικού υπεζωκότα παροχετεύονται στις πνευμονικές φλέβες, η υδροστατική του πίεση είναι ανάλογη των τριχοειδών της πνευμονικής αρτηρίας και σημαντικά μικρότερη από την υδροστατική πίεση των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότα. Οι ανατομικές αυτές διαφορές έχουν ιδιαίτερη σημασία στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού^{2, 4}.

Ο υπεζωκότας αποτελείται ιστολογικά από στρώμα επίπεδων μεσοθηλιακών κυττάρων και στρώμα συνδετικού ιστού, που περιέχει πλούσιο δίκτυο τριχοειδών και λεμφαγγείων. Εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνει ότι η επιφάνεια του υπεζωκότα καλύπτεται από μεγάλο αριθμό μικρολαχνών. Οι μικρολάχνες αυτές πιστεύεται ότι παράγουν γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υαλουρονικό οξύ που χρησιμεύουν στην άμβλυση της τριβής μεταξύ των δύο πετάλων⁴.

Κάτω από το σπλαχνικό υπεζωκότα υπάρχει ένα πυκνό δίκτυο λεμφαγγείων, που όμως δεν συμμετέχουν στις διαδικασίες κάθαρσης του υπεζωκοτικού υγρού καθώς δεν υπάρχουν επικοινωνίες μεταξύ αυτών και του

υπεζωκότα². Αντίθετα τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα επικοινωνούν με το υπεζωκοτικό υγρό μέσω ανοιγμάτων εύρους 2-12μm (stomata). Τα στόματα αυτά αποτελούν τις μοναδικές εξόδους κυττάρων και μεγαλομοριακών ενώσεων από το υπεζωκοτικό υγρό^{2,3}.



Εικόνα 1. Μερικά βασικά ανατομικά δεδομένα της θωρακικής κοιλότητας (Αθ. Σμοκοβίτη, Φυσιολογία, Εκδοτικός οίκος Αδ.Κυριακίδη, 2004: σ639).

2.2. Υπεζωκοτικό υγρό

Ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού που φυσιολογικά υπάρχει στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 0,1-0,2 ml/kg⁵. Το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό είναι διαυγές, άχρωμο, με μικρή ποσότητα πρωτεΐνης (<1,5g/100ml) και λίγα κύτταρα (1500-2000/mm³). Επικρατούν τα μονοκύτταρα και μονοπύρηνα κύτταρα με ποικίλο αριθμό λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και μεσοθηλιακών κυττάρων^{2,3}. Η συγκέντρωση νατρίου και χλωρίου στο υπεζωκοτικό υγρό είναι μικρότερη κατά 2-5% και 6-9% αντίστοιχα σε σχέση με το πλάσμα, τα διττανθρακικά είναι αυξημένα κατά 20-25%, άρα και το pH είναι περισσότερο αλκαλικό, ενώ η γλυκόζη και το κάλιο κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα⁶.

2.3. Το υπεζωκοτικό υγρό και η διακίνησή του

Η διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού δια μέσου του υπεζωκότα διέπεται από τον νόμο του Starling:

$$Q_t = L_p \times A [(P_{cap} - P_{ip}) - \sigma d (\pi_{cap} - \pi_{ip})]$$

όπου Q_t η ποσότητα του υγρού που διακινείται, L_p η σταθερά διήθησης, A η επιφάνεια της μεμβράνης, P και π η υδροστατική και κολλοειδωσμητική πίεση των τριχοειδών (cap) και υπεζωκοτικής κοιλότητας (ip), σd ο συντελεστής που εκφράζει την δυσκολία με την οποία περνούν την μεμβράνη διάφορα μεγάλα μόρια (ξεπερνά το 0,9)^{2, 4}.

	ΤΟΙΧΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ	ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	ΣΠΛΑΧΝΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ
ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	+30	-5	+24
ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	+34	5	+34
ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (cm H ₂ O)	6		0

Εικόνα 2. Υδροστατικές και κολλοειδωσμητικές πιέσεις (cm H₂O) στον τοιχωματικό, τον σπλαχνικό υπεζωκότα και την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τελικά υπάρχει μια διαφορά πίεσης 6 cm H₂O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Στην Εικόνα 2 αναγράφονται οι διάφορες πιέσεις που ρυθμίζουν την διακίνηση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Φαίνεται ότι η διακίνηση υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα γίνεται κυρίως από τον τοιχωματικό και λιγότερο από τον σπλαχνικό υπεζωκότα².

Ο φυσιολογικός ρυθμός παραγωγής του υπεζωκοτικού υγρού υπολογίζεται ότι στον άνθρωπο φθάνει τα 15-20 ml την ημέρα, ενώ η δυνατότητα απορρόφησης του ανέρχεται στο 25πλάσιο².

3. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

Ως υπεζωκοτική συλλογή ορίζεται η συγκέντρωση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα σε ποσότητα μεγαλύτερη των 10-20 ml. Αναπτύσσεται είτε όταν η παραγωγή υπεζωκοτικού υγρού είναι υπερβολική και/ή όταν η απορρόφηση είναι διαταραγμένη. Η υπεζωκοτική συλλογή μπορεί να αντιπροσωπεύει την βασική αιτία πολλών παθήσεων, αλλά συχνότερα παρατηρείται ως δευτερεύουσα εκδήλωση ή ως επιπλοκή άλλων εκδηλώσεων⁷. Η πρωτοπαθής νόσος αφορά συχνότερα τον υπεζωκότα και τον πνεύμονα και σπανιότερα άλλα παρακείμενα όργανα (ήπαρ, πάγκρεας, οισοφάγο). Επίσης, υπεζωκοτικές συλλογές εμφανίζονται σε συστηματικά νοσήματα, σε κακώσεις και μετά από λήψη φαρμάκων³.

3.1. Επιδημιολογία υπεζωκοτικών συλλογών

Η υπεζωκοτική συλλογή ανευρίσκεται περίπου στο 10% των ασθενών της εσωτερικής παθολογίας. Κύρια αιτία σε ποσοστό 30-40% αυτών είναι η καρδιακή ανεπάρκεια. Από τις συλλογές μη καρδιακής ανεπάρκειας, συχνότερη αιτία είναι η παραπνευμονική συλλογή, με το 75% των περιπτώσεων να είναι βακτηριακής προέλευσης και το 25% ιογενούς. Ακολουθούν σε συχνότητα οι κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, από τις οποίες οι μισές οφείλονται σε καρκίνο του

Πίνακας 1. Η κατά προσέγγιση ετήσια επίπτωση των διαφόρων τύπων υπεζωκοτικής συλλογής στις ΗΠΑ⁶.

Αιτιολογία	Αριθμός	Ποσοστό %	Ποσοστό συλλογών μη καρδιακής αιτιολογίας
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	500.000	37,5	
Άλλα αίτια		63,5	
Πνευμονία	400.000		48.0
Κακοήθεις παθήσεις	200.000		24.0
Πνευμονική εμβολή	150.000		18.0
Κίρρωση με ασκίτη	50.000		6.0
Παθήσεις του γαστρεντερικού	25.000		3.0
Νοσήματα του κολλαγόνου	6.000		0,7
Φυματίωση	2.500		0,3
Αμιάντωση	2.000		0,3
Μεσοθηλίωμα	1.500		0,2
Σύνολο	1.337.000	100%	100%

πνεύμονα ή του μαστού. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η κατά προσέγγιση ετήσια επίπτωση των διαφόρων τύπων υπεζωκοτικής συλλογής στις ΗΠΑ⁶.

3.2. Παθοφυσιολογία

Η υπεζωκοτική συλλογή μπορεί να προέλθει από ένα πλήθος παθοφυσιολογικών μηχανισμών, οι οποίοι διαταράσσουν την φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και την απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού⁷. Διαιρούνται σε εξιδρωματικές και διιδρωματικές συλλογές (Πίνακας 2).

Τα διιδρώματα προκαλούνται είτε από αυξημένη υδροστατική πίεση είτε από ελαττωμένη κολλοειδωσμητική πίεση του πλάσματος λόγω έλλειψης πρωτεϊνών^{7,8}. Η αιτιολογική τους διάγνωση δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα και οι συχνότερες αιτίες που τα προκαλούν είναι η καρδιακή ανεπάρκεια και η κίρρωση του ήπατος (Πίνακας 2)⁹. Στα διιδρώματα ο υπεζωκότας παραμένει ανέπαφος, σε αντίθεση με τα εξιδρώματα που προκαλούνται από παθολογοανατομικές του αλλοιώσεις. Οι εξιδρωματικές συλλογές σχηματίζονται από διάχυτη αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών, εντοπισμένες ρήξεις (π.χ. αιμοφόρων αγγείων, λεμφαγγείων, πνευμονικών αποστημάτων, οισοφάγου) ή διαταραχή της απορρόφησης (π.χ. αποκλεισμός λεμφαγγείων)^{7,8}. Οι κακοήθειες και οι παραπνευμονικές συλλογές είναι οι πιο συχνές αιτίες των εξιδρωμάτων (Πίνακας 2)⁹.

Η παθολογική αύξηση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς:

1. Αύξηση της υδροστατικής πίεση στη μικροκυκλοφορία του υπεζωκότα (καρδιακή ανεπάρκεια).
2. Ελάττωση της υδροστατικής πίεση εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας (ατελεκτασία πνεύμονα).
3. Ελάττωση της κολλοειδωσμητικής πίεσης (υπολευκωματιναιμία).
4. Αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών του υπεζωκότα (πλευρίτιδα).
5. Η ελάττωση της λεμφικής παροχέτευσης (νεοπλασία, φλεγμονές).
6. Παθητική μετακίνηση του περιτοναϊκού υγρού μέσω διαφραγματικών ελλειμμάτων λόγω της υφιστάμενης διαφοράς μεταξύ περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας^{2, 3}.

Πίνακας 2. Αίτια υπεζωκοτικών συλλογών ⁷.

Διιδρώματα	Εξιιδρώματα
Συχνά:	Συχνά:
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	Κακοήθειες
Κίρρωση του ήπατος	Παραπνευμονικές συλλογές
Υπολευκωματιναιμία	Φυματίωση
Περιτοναϊκές διυλίσσεις	Λιγότερα συχνά:
Λιγότερα συχνά:	Πνευμονική
Υποθυρεοειδισμός	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Νεφρικό σύνδρομο	Αυτοάνοσα νοσήματα
Στένωση μιτροειδούς	Έκθεση σε αμίαντα
Πνευμονική εμβολή	Παγκρεατίτιδα
Σπάνια:	Σπάνια:
Συμπιεστική περικαρδίτιδα	Σύνδρομο των κίτρινων νυχιών
Ουροθώρακας	Ναρκωτικά
απόφραξη άνω κοίλης	Λοιμώξεις προκαλούμενες από μύκητες
Ωθηκική υπερδιέγερση	

3.3. Ανάλυση υπεζωκοτικού υγρού

Σε κάθε υπεζωκοτική συλλογή επιβάλλεται διαγνωστική θωρακοπαρακέντηση και ανάλυση του υγρού πλην των εξαιρέσεων όπου η διάγνωση θεωρείται δεδομένη με βάση το ιστορικό, την κλινική και ακτινολογική εικόνα (συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια). Η ανάλυση του υπεζωκοτικού υγρού προσφέρει αξιόλογες διαγνωστικές πληροφορίες ή επιτρέπει ακόμη και μια σαφή διάγνωση².

▪ Διιδρώματα και εξιδρώματα

Η πρώτη διαγνωστική πράξη είναι να καθοριστεί αν το υπεζωκοτικό υγρό είναι διιδρώμα ή εξιδρώμα. Η διάκριση γίνεται με βάση τον προσδιορισμό τόσο της πρωτεΐνης όσο και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) ταυτόχρονα στο υπεζωκοτικό υγρό και στο αίμα. Όταν τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό, σε σχέση με φυσιολογικά επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό, είναι >30 g/l τότε πρόκειται για εξιδρώμα ενώ όταν είναι <30 g/l έχουμε διιδρώμα. Στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό είναι μεταξύ 25 και 35 g/l ή όταν το επίπεδο της πρωτεΐνης στον ορό είναι μη φυσιολογικό, τότε χρησιμοποιούνται τα κριτήρια Light⁵. Σύμφωνα με αυτά, για να οριστεί μια συλλογή ως εξιδρώμα θα πρέπει να πληρεί τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις¹⁰:

1. Η σχέση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του ορού είναι $>0,5$.
2. Η σχέση της LDH του υπεζωκοτικού υγρού προς την LDH του ορού είναι $>0,6$.
3. Η απόλυτη τιμή της LDH στο υπεζωκοτικό υγρό $>2/3$ των ανώτερων φυσιολογικών τιμών του ορού.

Όταν η συλλογή δεν εκπληρώνει κανένα από τα κριτήρια Light, τότε ορίζεται ως διιδρώμα. Ο κύριος λόγος για να χαρακτηριστεί μια συλλογή ως διιδρώμα ή εξιδρώμα, είναι πως στην περίπτωση διιδρώματος δεν απαιτείται περαιτέρω διαγνωστική διερεύνηση, παρά μόνο θεραπευτική αντιμετώπιση της πρωτογενούς αιτίας. Αντιθέτως, η διάγνωση της νόσου που προκαλεί εξιδρωματική συλλογή απαιτεί μια πιο εκτεταμένη προσέγγιση που περιλαμβάνει συνήθως τις ακόλουθες διαγνωστικές διαδικασίες:

1. Μακροσκοπική εμφάνιση του υπεζωκοτικού υγρού
2. Αριθμός και ο τύπος των κυττάρων
3. Μέτρηση της γλυκόζης και της LDH
4. Κυτταρολογική του υπεζωκοτικού υγρού
5. Καλλιέργεια του υπεζωκοτικού υγρού
6. pH
7. Αδενοδιαμινάση (ADA)

▪ Μακροσκοπική εξέταση

Κατά την μακροσκοπική εξέταση του υγρού, λαμβάνονται υπόψη το χρώμα, η θολερότητα, η γλοιότητα και η οσμή (Πίνακας 3)¹².

Η πιο εύκολη διάγνωση που μπορεί να πραγματοποιηθεί είναι μέσω της οσμής του υγρού. Εάν η οσμή είναι κοπρανώδης τότε ο ασθενής έχει εμπύημα το οποίο συνήθως οφείλεται σε αναερόβιους οργανισμούς. Εάν η οσμή μοιάζει με αυτή των ούρων, πρόκειται για ουροθώρακα. Η διάγνωση αυτή επιβεβαιώνεται με την ανεύρεση επιπέδων κρεατινίνης υψηλότερων από τα αντίστοιχα του ορού^{11,12}.

Πίνακας 3. Μακροσκοπική εκτίμηση του υπεζωκοτικού υγρού³.

Διαυγές αχυρόχρουν	: Τα περισσότερα διδρώματα-μερικά εξιδρώματα
Αιμορραγικό	: Νεόπλάσματα- πνευμονική εμβολή-κάκωση
Λευκό γαλακτώδες	: Εμπύημα-χυλοθώρακας-ψευδοχυλοθώρακας
Καφεοειδές	: Ρήξη αμοιβαδικού αποστήματος
Κιτρινοπράσινο	: Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Στοιχεία τροφής	: Ρήξη οισοφάγου
Ιξώδες αιμορραγικό	: Μεσοθηλίωμα
Δύσοσμο	: Αναερόβιο εμπύημα

Όσον αφορά την όψη, όταν το υγρό είναι αιματηρό επιβάλλεται η μέτρηση του αιματοκρίτη. Εάν είναι μεγαλύτερος του 50% του αιματοκρίτη του περιφερικού αίματος (δηλαδή >20%) τότε πρόκειται για αιμοθώρακα. Η παρουσία αίματος στο υγρό δεν προσδίδει κάτι σοβαρό όταν ο αιματοκρίτης είναι χαμηλότερος από 1%. Όταν είναι μεγαλύτερος από 1%, οι πιθανές διαγνώσεις είναι κακοήθεια, πνευμονική εμβολή ή τραύμα^{11,12}.

Όταν το υπεζωκοτικό υγρό είναι θολό ή έχει γαλακτώδη όψη, το δείγμα φυγοκεντρείται και εξετάζεται το υπερκείμενο. Εάν μετά την φυγοκέντρηση το δείγμα εμφανιστεί διαυγές η θολερότητα οφείλεται σε κύτταρα ή ράκη. Αντιθέτως, εάν δεν αλλάξει όψη και μετά τη φυγοκέντρηση, αποδίδεται σε υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων, γεγονός που παραπέμπει σε χυλοθώρακα ή

ψευδοχολοθώρακα. Η διάκριση του χυλοθώρακα από τον ψευδοχολοθώρακα γίνεται με τη μέτρηση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στο υπεζωκοτικό υγρό. Ο χυλοθώρακας έχει υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων (>110 mg/dl) και χαμηλή χοληστερόλη (<200 mg/dl), ενώ ο ψευδοχολοθώρακας χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (>200 mg/dl) και χαμηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων (<50 mg/dl)^{11, 12}.

Όσον αφορά την γλοιότητα του υγρού, ένα διαυγές ή αιματηρό αλλά πυκνότερο υγρό θέτει την υπόνοια κακοήθους μεσοθηλιώματος και οφείλεται στην αύξηση υαλουρονικού οξέος¹².

▪ Αριθμός και τύπος κυττάρων

Ο καθορισμός του τύπου των κυττάρων είναι χρήσιμος στον καθορισμό της αιτιολογίας της υπεζωκοτικής συλλογής. Όταν επικρατούν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (ποσοστό >50% επί των κυττάρων του υγρού), ο ασθενής πάσχει από οξεία διεργασία στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Εάν ο τύπος είναι πολυμορφοπύρηνος και συνυπάρχουν παρεγχυματικά διηθήματα, οι πιθανότερες διαγνώσεις είναι παραπνευμονική συλλογή, πνευμονική εμβολή ή βρογχογενής καρκίνος. Εάν δεν υπάρχουν παρεγχυματικά διηθήματα οι πιθανές διαγνώσεις είναι πνευμονική εμβολή, ιογενής λοίμωξη, νόσος του πεπτικού συστήματος, υπεζωκοτική συλλογή από αμίαντο ή οξεία φυματιώδης συλλογή (Πίνακας 4)¹¹.

Όταν ο υπεζωκότας προσβάλλεται από χρόνια διεργασία, επικρατούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα (ποσοστό >50%) και συνήθως πρόκειται για κακοήθεια, φυματίωση, πνευμονική εμβολή ή μία επιλυθείσα ιογενή πλευρίτιδα. Η ύπαρξη μεσοθηλιακών κυττάρων, αποκλείει τη διάγνωση φυματίωσης. Εάν στο υπεζωκοτικό υγρό του ασθενούς επικρατούν μικρά λεμφοκύτταρα, τα πιθανότερα ενδεχόμενα είναι η φυματίωση και η κακοήθεια (Πίνακας 4)¹¹.

Η ανεύρεση ηωσινόφιλων σε ποσοστό >10%, καταδεικνύει την πιθανότητα ύπαρξης αέρα ή αίματος στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Λιγότερο πιθανή είναι η διάγνωση υπεζωκοτικής συλλογής από αμίαντο, σύνδρομο Churg-Strauss, νόσος του Hodgkin ή συλλογή προκαλούμενη από φάρμακα (Πίνακας 4)¹¹.

▪ Μέτρηση της γλυκόζης και της γαλακτικής δευδρογενάσης (LDH)

Η μέτρηση του επιπέδου της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό είναι χρήσιμη, καθώς χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (<60 mg/dl ή 3.3 mmol/L) χαρακτηρίζει τέσσερις ασθένειες: παραπνευμονικές συλλογές, ρευματοειδής αρθρίτιδα, φυματώδεις ή κακοήθεις συλλογές¹¹. Τα επίπεδα της γλυκόζης στα διδρώματα και στα υπόλοιπα εξιδρώματα είναι παρόμοια με αυτά του ορού³. Πολύ χαμηλή τιμή γλυκόζης (<20 mg/dL) μπορεί να παρουσιάσουν ασθενείς με παραπνευμονική συλλογή ή εμπύημα, αλλά και ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η πλειοψηφία των ασθενών με φυματιώδη συλλογή έχει τιμές γλυκόζης υπεζωκοτικού υγρού περίπου 80 mg/dL (Πίνακας 4)^{12,13}.

Παρόλο που το επίπεδο της LDH χρησιμοποιείται για την διάκριση διδρωμάτων και εξιδρωμάτων, δεν είναι χρήσιμο για την διάκριση μεταξύ εξιδρωμάτων διαφορετικής αιτιολογίας. Προτείνεται η μέτρηση του επιπέδου της LDH για κάθε θωρακοπαρακέντηση που πραγματοποιείται, καθώς αποτελεί δείκτη του επιπέδου φλεγμονής του υπεζωκότα. Αν μετά από επανειλημμένες παρακεντήσεις η LDH του υπεζωκοτικού υγρού αυξάνεται, η φλεγμονή του υπεζωκότα επιδεινώνεται και η νόσος θα πρέπει να αντιμετωπιστεί επεμβατικά, ενώ σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει ύφεση της φλεγμονής του υπεζωκότα (Πίνακας 4)^{11,12}.

▪ Κυτταρολογική εξέταση

Η κυτταρολογική εξέταση του υπεζωκοτικού υγρού επισφραγίζει τη διάγνωση μιας κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής σε ποσοστό που ξεπερνάει το 50% των ασθενών. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την διαγνωστική ικανότητα της κυτταρολογικής εξέτασης. Για παράδειγμα, αν ο ασθενής πάσχει από κακοήθεια, αλλά η υπεζωκοτική συλλογή έχει άλλη αιτιολογία (όπως καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονική εμβολή, πνευμονία, υπολευκωματιναιμία), η κυτταρολογική εξέταση θα είναι αρνητική^{3,11}. Την τελευταία δεκαετία, χρησιμοποιούνται συχνά ιστοχημικές (με ειδικές χρώσεις) και ανοσοϊστοχημικές μελέτες (μονόκλωνα αντισώματα), για την αύξηση της διαγνωστικής ακρίβειας της κυτταρολογικής εξέτασης (Πίνακας 4)^{3,11}.

▪ Καλλιέργεια του υπεζωκοτικού υγρού

Το υπεζωκοτικό υγρό από ασθενείς με αδιάγνωστες εξιδρωματικές συλλογές θα πρέπει να αποστέλλεται για χρώση Gram και καλλιέργεια για αναζήτηση βακτηρίων (αερόβιων και αναερόβιων), μυκοβακτηρίων και μυκήτων¹².

▪ pH

Η τιμή του pH στο υπεζωκοτικό υγρό υγιών ανθρώπων είναι 7.6, υψηλότερη δηλαδή της τιμής του pH στο αίμα. Χαμηλή τιμή pH (<7.3), σε συνδυασμό με φυσιολογικές τιμές pH αίματος απαντάται σε συλλογές που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τιμή γλυκόζης και υψηλή LDH (έντονη φλεγμονή υπεζωκότα). Τιμές pH <7.0 επιβάλλουν την παροχέτευση μιας παραπνευμονικής συλλογής (Πίνακας 4)^{3,11}.

▪ Δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA)

Η μέτρηση της ADA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη δεδομένου τιμές μεγαλύτερες από 70 U/L σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα και το ιστορικό του ασθενούς επιβεβαιώνουν την διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας, ενώ τιμές χαμηλότερες από 40 U/L πρακτικά την αποκλείουν. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή εμπύημα επίσης μπορεί να έχουν υψηλές τιμές ADA στο υπεζωκοτικό υγρό, όμως η διάγνωση τους είναι εύκολη με βάση το ιστορικό και τη κλινική εικόνα του ασθενούς¹². Τελευταία και η ποσοτική εκτίμηση της ιντερφερόνης-γ χρησιμοποιείται για τον ίδιο σκοπό. Η τιμή της IFN-γ στο υπεζωκοτικό υγρό αυξάνει σημαντικά στη φυματιώδη πλευρίτιδα, με αποτέλεσμα να μπορούμε να την διακρίνουμε με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα από άλλες αιτίες εξιδρωματικών συλλογών (Πίνακας 4)¹¹.

Πίνακας 4. Συνήθεις εξετάσεις πλευριτικού υγρού⁵.

Εξετάσεις	Τιμές	Πιθανή διάγνωση
Λόγος πρωτεϊνών ΥΥ*/ ΟΡΟΥ	>0.5	Κάθε αιτία που προκαλεί εξίδρωμα
Γαλακτική Δεϋδρογονάση (LDH)	2/3	Κάθε αιτία που προκαλεί εξίδρωμα
LDH _{ΥΥ*} / LDH _{ΟΡΟΥ}	>0.6	Κάθε αιτία που προκαλεί εξίδρωμα
Λεμφοκύτταρα	50%	Κακοήθεια, φυματίωση, πνευμονική εμβολή,
Ουδετερόφιλα	50%	Παραπνευμονική συλλογή, πνευμονική εμβολή
Ηωσινόφιλα	10%	Χωρίς διάγνωση
Ph	<7.20	Επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή ή εμπύημα, φυματίωση, κακοήθεια
Γλυκόζη	>60 mg/dL (3.3 mmol/L)	Επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή ή εμπύημα, Φυματίωση (>20%), κακοήθεια (10%), ρευματοειδής αρθρίτιδα
Κυτταρολογική	Θετική	Κακοήθεια
Δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA)	>40 U/L (667 kat/L)	Φυματίωση (>90%), εμπύημα (60%), επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή (30%), κακοήθεια (5%), ρευματοειδής αρθρίτιδα

*ΥΥ= Υπεζωκοτικό Υγρό

4. ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

4.1. Παραπνευμονικές συλλογές και εμπύημα

Στις Ηνωμένες Πολιτείες περίπου ένα εκατομμύριο ασθενείς νοσηλεύονται κάθε χρόνο με πνευμονία. Σε ένα ποσοστό περίπου 20 με 40% του συνόλου των ασθενών, προκαλείται παραπνευμονική συλλογή. Η παραπνευμονική συλλογή είναι κάθε υπεζωκοτική συλλογή που προκαλείται ως συνέπεια είτε κάποιας πνευμονίας (ιικής ή βακτηριακής) είτε αποστήματος. Αυτού του τύπου οι υπεζωκοτικές συλλογές διακρίνονται σε μη επιπλεγμένες, επιπλεγμένες και εμπυήματα (Πίνακας 5)¹⁴. Οι ασθενείς που έχουν αναπτύξει παραπνευμονικές συλλογές εμφανίζουν μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με αυτούς που δεν έχουν αναπτύξει κι αυτό κυρίως γιατί δεν έχει γίνει έγκυρη διάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

Ως εμπύημα ορίζεται η ύπαρξη πύου στην υπεζωκοτική κοιλότητα¹⁴. Η ανάλυση του υπεζωκοτικού υγρού θα δείξει θετική καλλιέργεια ή χρώση Gram, ενώ δεν χρειάζονται βιοχημικές εξετάσεις για την διάγνωση του εμπυήματος. Η αντιμετώπιση των ασθενών με εμπύημα απαιτεί τη διοχέτευση με ενδοθωρακικό σωλήνα¹⁰.

Η διάκριση μεταξύ επιπλεγμένης και μη επιπλεγμένης παραπνευμονικής συλλογής μπορεί να γίνει με βιοχημική ανάλυση του πλευριτικού υγρού. Στη μη επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή η τιμή του pH είναι >7.2, της LDH <1000 U/L και της γλυκόζης >40 mg/dl, ενώ στην επιπλεγμένη οι αντίστοιχες τιμές είναι pH<7.2, LDH>1000 U/L και γλυκόζη <40 mg/dl. Στην δεύτερη περίπτωση είναι πιθανή και η εύρεση θετικής καλλιέργειας ή χρώσης Gram (Πίνακας 5). Όπως και στα εμπυήματα, η αντιμετώπιση των επιπλεγμένων συλλογών απαιτεί τη διοχέτευση του υγρού με ενδοθωρακικό σωλήνα. Οι μη επιπλεγμένες υπεζωκοτικές συλλογές συνήθως αντιμετωπίζονται απλά με αντιβιοτικά^{10,14}.

Η εξέλιξη μιας παραπνευμονικής συλλογής μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια. Το πρώτο είναι ένα εξιδρωματικό στάδιο, στο οποίο ο ασθενής εμφανίζει μία ταχεία αύξηση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Αν ο ασθενής δεν επισκεφτεί κάποιο γιατρό ή του χορηγηθεί λάθος αντιβιοτικό, η συλλογή θα προχωρήσει στο δεύτερο στάδιο, που είναι το ινοπυώδες. Το υγρό μολύνεται και προοδευτικά σχηματίζονται μικρές κοιλότητες. Σε αυτό το στάδιο το υπεζωκοτικό

υγρό πρέπει να διοχετευτεί, ενώ τη διαδικασία αυτή δυσχεραίνει η συνεχόμενη δημιουργία των κοιλοτήτων. Σε περίπτωση που η διοχέτευση του υγρού δεν πραγματοποιηθεί, η συλλογή θα εξελιχθεί στο τρίτο στάδιο, στο οποίο οι ινοβλάστες αναπτύσσονται στο υπεζωκοτικό υγρό τόσο από το τοιχωματικό όσο και από το σπλαγχνικό πέταλο, προκαλώντας έτσι την πάχυνση του υπεζωκότα¹⁴.

Πίνακας 5. Τύποι και χαρακτηριστικά παραπνευμονικών συλλογών¹⁰.

Στάδια	Μακροσκοπική παρατήρηση	Χαρακτηριστικά πλευριτικού υγρού
Μη επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή	Διαυγές υγρό	pH>7.2 LDH<1000 Γλυκόζη>40 mg/dl Μη εύρεση μικροοργανισμών σε καλλιέργεια ή χρώση Gram
Επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή	Διαυγές ή θολό υγρό	pH<7.2 LDH>1000 Γλυκόζη<40 mg/dl Πιθανή εύρεση μικροοργανισμών σε καλλιέργεια ή χρώση Gram
Εμπύημα	Καθαρό πύον	Πιθανή εύρεση μικροοργανισμών σε καλλιέργεια/ χρώση Gram

4.2. Φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές

Η φυματίωση είναι λοίμωξη που οφείλεται στο *Mycobacterium tuberculosis* και είναι η συχνότερη αιτία θανάτου λοιμώδους αιτιολογίας. Μέσα στο 2004, αναφέρθηκαν 9.000.000 νέα κρούσματα και περίπου 2.000.000 θάνατοι από φυματίωση. Η πανδημία του AIDS έχει συσχετιστεί με τον διπλασιασμό των περιστατικών στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή, που ανήκει στις εξωπνευμονικές μορφές φυματίωσης, αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των ασθενών με φυματίωση¹⁵.

Κατά τη διάρκεια της πρωτοπαθούς φυματίωσης, η είσοδος των αντιγόνων του μυκοβακτηρίου εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας ακολουθείται από αλληλεπίδραση με CD4+ T-λεμφοκύτταρα, έχοντας ως αποτέλεσμα μία καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας (δημιουργία συλλογής). Η συσσώρευση υγρού στη υπεζωκοτική κοιλότητα προκαλείται κυρίως από την

αύξηση διαπερατότητας των τριχοειδών. Μία δευτερεύουσα αιτία είναι η βλάβη της λεμφικής εκκαθάρισης των πρωτεϊνών και του υγρού^{7,15}. Η καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας επάγεται από T-βοηθητικά κύτταρα (Th1) που ενεργοποιούν τα μακροφάγα για την επαγωγή μηχανισμών καταστροφής των μυκοβακτηρίων¹⁵.

Η διάγνωση της φυματίωσης τίθεται με ανεύρεση μυκοβακτηρίων στα πτύλεα, στο υπεζωκοτικό υγρό ή στη βιοψία υπεζωκότα (ανεύρεση κοκκιώματος). Επίσης υψηλά επίπεδα ADA (>70 U/L) και INF- γ (>200 pg/ml) στο υπεζωκοτικό υγρό θέτουν με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα την διάγνωση. Το υπεζωκοτικό υγρό είναι εξιδρώμα, με επίπεδα ολικού λευκώματος συχνά υψηλότερα από 5,0 g/dl. Τα επίπεδα του σακχάρου είναι συνήθως υψηλότερα από 60 mg/dL, ενώ το pH κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα με εκείνα των κακοήθων συλλογών (περίπου 7,40). Στους περισσότερους ασθενείς κυριαρχούν τα μικρά λεμφοκύτταρα (>50%), ενώ επικράτηση των πολυμορφοπύρηνων μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων. Η ανεύρεση ηωσινόφιλων σε ποσοστό >10% αποκλείει τη διάγνωση φυματίωσης, εκτός από περιπτώσεις πνευμοθώρακα ή αν έχει προηγηθεί παρακέντηση^{15,16}.

4.3. Κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές

Οι υπεζωκοτικές συλλογές που συνοδεύουν κακοήθη νοσήματα αποτελούν συχνό διαγνωστικό και θεραπευτικό πρόβλημα. Ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού και τα λεμφώματα είναι υπεύθυνοι για το 75% των δευτεροπαθών κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών. Σπάνια μια συλλογή μπορεί να συνοδεύει μία νεοπλασία χωρίς να οφείλεται σε άμεση προσβολή του υπεζωκότα από τον όγκο (παρακαρκινική συλλογή)^{16,17}.

Το υπεζωκοτικό υγρό μπορεί να είναι ορώδες, οροαιματηρό ή συνηθέστερα αιματηρό, εξιδρώμα και πλούσιο σε T-λεμφοκύτταρα, ενώ ένα μικρό ποσοστό (περίπου 5%) των κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών είναι διιδρώματα. Η χαμηλή τιμή του pH (<7.30) και γλυκόζης (<60 mg/dl), υποδηλώνει μεγάλο αριθμό καρκινικών κυττάρων στον υπεζωκότα. Στο 10% των περιπτώσεων υπάρχει στο υγρό αυξημένη αμυλάση^{18,19}.

4.4. Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια

Η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί τη συχνότερη αιτία υπεζωκοτικών συλλογών στις αναπτυσσόμενες χώρες και είναι υπεύθυνη για την συντριπτική πλειοψηφία των διιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών²⁰.

Η συσσώρευση του υγρού στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια είναι περισσότερο συχνή στο αριστερό παρά στο δεξιό ημιθωράκιο. Το υγρό είναι συνήθως διίδρωμα, διαυγές αχυρόχρουν με επίπεδα λευκωμάτων χαμηλότερα από 3.0 g/dL. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι χαμηλότερος από 1000/mm³ (κυρίως μονοπύρηνα), ενώ η τιμή του pH είναι παρόμοια με αυτή του αίματος. Η τιμή της γαλακτικής δεϋδρογενάσης είναι <200 U/L, ενώ αυτή της χοληστερόλης <60 mg/dL^{21,22}.

4.5. Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα επιδρά στον υπεζωκότα πάνω από το 5% των περιπτώσεων και, όπως οι περισσότερες εκδηλώσεις της ασθένειας, είναι πιο συχνό φαινόμενο στους άνδρες. Η κλινική εικόνα των ασθενών μπορεί να μιμείται βακτηριακή πνευμονία ή να είναι ασυμπτωματικοί²³.

Το υγρό είναι συνήθως εξίδρωμα, πράσινο και θολό. Τα εμπύρηνα κύτταρα ποικίλουν από 100 κύτταρα/mm³ σε χρόνια συλλογή έως 15.000 κύτταρα/mm³ στην οξεία ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα ουδετερόφιλα επικρατούν στην οξεία φάση της νόσου, ενώ τα λεμφοκύτταρα στη χρόνια μορφή της. Οι ρευματοειδείς συλλογές εμφανίζουν χαμηλές τιμές γλυκόζης (<30 mg/dl), pH(<7,20) και LDH (>1000 IU/L)²³.

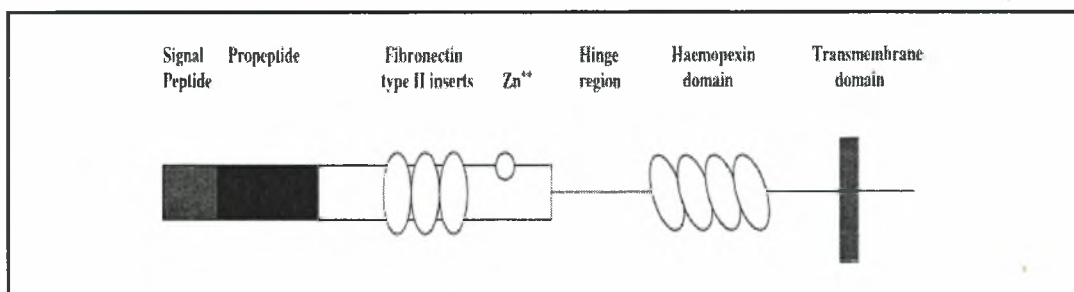
Οι υπεζωκοτικές συλλογές, ως δευτεροπαθείς ασθένειες της ρευματοειδής αρθρίτιδας, συχνά δεν απαιτούν θεραπεία. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αλλά συνήθως επιλύονται μετά την πάροδο κάποιων μηνών^{5,23}.

5. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ 9 (MMP-9)

5.1. Η οικογένεια των Μεταλλοπρωτεϊνών

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix Metalloproteinases-MMPs) αποτελούν μια οικογένεια ψευδάργυρο-εξαρτώμενων ενδοπρωτεϊνών, που είναι ικανές να αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο τύπου V, η λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες). Στον άνθρωπο, η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών αποτελείται από τουλάχιστον 21 ένζυμα, τα οποία ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες: κολλαγενάσες (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), ζελατινάσες (MMP-2, MMP-9), στρωμελυσίνες (MMP-3, MMP-10, MMP-11), μεμβρανικές μεταλλοπρωτεϊνάσες (MT-MMPs) και αταυτοποίητες μεταλλοπρωτεϊνάσες (Πίνακας 6)^{24,25}.

Η γενική δομή τους περιλαμβάνει ένα σηματοδοτικό πεπτιδίδιο, ένα προπεπτιδίδιο, μία καταλυτική περιοχή που περιλαμβάνει μια υψηλά συντηρημένη θέση πρόσδεσης του ψευδαργύρου και τέλος μια περιοχή αιμοπηξίνης. Επιπλέον οι ζελατινάσες περιέχουν μια περιοχή επαναλήψεων ινοσυνδεΐνης (ή φιμπρονεκτίνη) τύπου II. Οι MT-MMPs διαθέτουν μια διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αιμοπηξίνης. Τέλος η ματριλυσίνη (MMP-7) δεν διαθέτει περιοχή αιμοπηξίνης (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η γενική δομή των MMPs. Οι ζελατινάσες περιέχουν επιπλέον μία περιοχή επαναλήψεων ινοσυνδεΐνης τύπου II, ενώ οι MT-MMPs διαθέτουν μια διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αιμοπηξίνης.

Η Μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9) ανήκει στην κατηγορία των ζελατινών. Συντίθεται ως προένζυμο (MB: 92Kd) και εκκρίνεται από διάφορα κύτταρα όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, ινοβλάστες, οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και

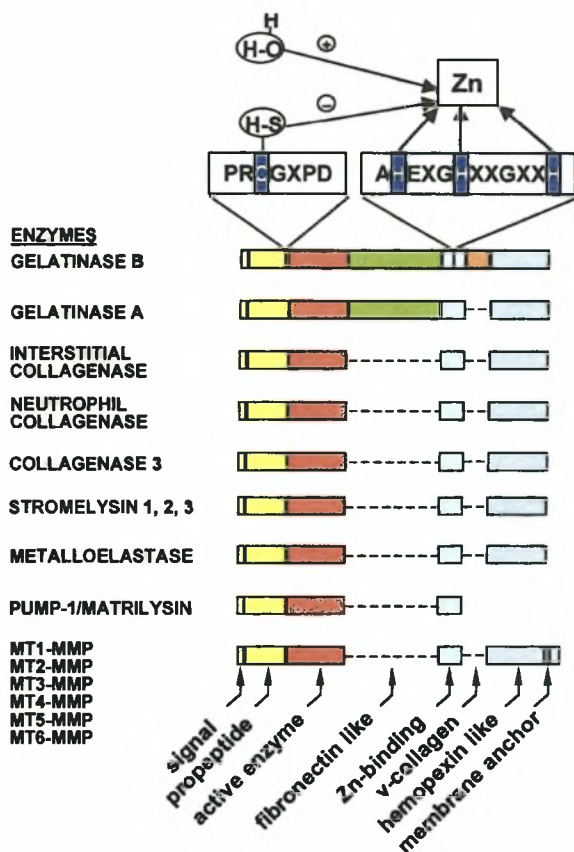
καρκινικά κύτταρα. Στον άνθρωπο, το γονίδιο της MMP-9 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20q11.1-13.1^{26, 27, 28}.

Πίνακας 6. Ταξινόμηση MMPs με βάση το υπόστρωμα²⁶.

		Υπόστρωμα
Κολλαγενάσες		
Διάμεση κολλαγενάση	MMP-1	Κολλαγόνο τύπου I, II, III, VII, VIII και X
Ουδετερόφιλη κολλαγενάση	MMP-8	
Κολλαγενάση-3	MMP-13	
Ζελατινάσες		
Ζελατινάση A	MMP-2	Ζελατίνη I, IV, V, X, ελαστίνη, λαμινίνη,
Ζελατινάση B	MMP-9	
Στρομελυσίνες		
Στρομελυσίνη-1	MMP-3	Κολλαγόνο τύπου III, IV, IX, X, ζελατίνη, ινোসυνδετίνη, λαμινίνη, προ-MMP-1
Ματριλυσίνη	MMP-7	ζελατίνη, ινোসυνδετίνη, προ-MMP-1
Στρομελυσίνη-2	MMP-10	Κολλαγόνο τύπου III, IV, IX, X, ζελατίνη, πρωτεογλυκάνη, λαμινίνη, προ-MMP-1
Στρομελυσίνη-3 Μεταλλοελαστάση	MMP-11 MMP-12	α-1-αντιπρωτεάση Ελαστίνη
Μεμβρανικού τύπου		
MT1-MMP	MMP-14	Προ-MMP-2, ζελατίνη και κολλαγόνα
MT2-MMP	MMP-15	Προ-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	Προ-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Άγνωστα
Αταυτοποίητες		
Κολλαγενάση του Xenopus	MMP-18/19	Άγνωστα
Εναμελυσίνη	MMP-20	Άγνωστα
	MMP-23/24	Άγνωστα

5.2. Δομικά χαρακτηριστικά της MMP-9

Οι ζελατινάσες, εκτός από την τυπική δομή των MMPs, διαθέτουν μία περιοχή επαναλήψεων ινοσυνδεΐνης τύπου II, στην οποία συνδέονται με μεγάλη συγγένεια η ζελατίνη, η ελαστίνη, η λαμίνη και το κολλαγόνου τύπου I και IV. Επιπλέον, η MMP-9 περιέχει μία περιοχή κολλαγόνου τύπου V υψηλά γλυκοζυλιωμένη, η οποία πιθανόν να επιδρά στην ειδικότητα του υποστρώματος. Στην περιοχή σύνδεσης του Zn^{2+} περιέχεται μια συντηρημένη ακολουθία, της οποίας οι τρεις ιστιδίνες (AHEEXGHXXGXXH) είναι υπεύθυνες για την σταθεροποίηση του Zn^{2+} . Στην μορφή του προενζύμου, η τέταρτη πρόσδεση του Zn^{2+} είναι με την σουφλυδρυλομάδα (-SH) της κυστεΐνης της συντηρημένης ακολουθίας PRCGXPD του προπεπτιδίου. Κατά την ενεργοποίηση της MMP-9, το προπεπτίδιο (~10kD) αποκόπτεται (Εικόνα 4)^{26, 27, 28}.



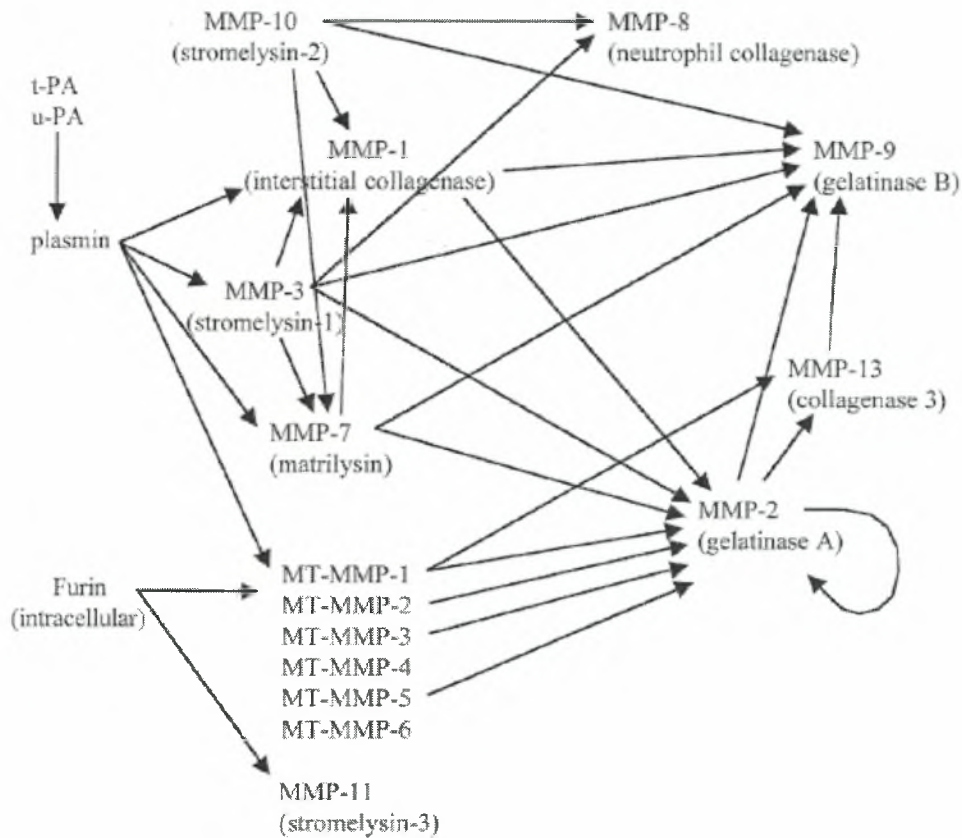
Εικόνα 4. Η δομή της MMP-9 ή Ζελατινάσης Β και σύγκριση με τις δομές των υπολοίπων μελών της οικογένειας των MMPs²⁷.

5.3. Ρύθμιση της MMP-9

Η MMP-9 ρυθμίζεται σε επίπεδο: μεταγραφής, ενεργοποίησης και αναστολής. Στο επίπεδο της μεταγραφής, η ρύθμιση της MMP-9 επάγεται από

ποικιλία εξωκυτταρικών διεγέρσεων, όπως κυτταροκίνες (IL-4 και IL-10), αυξητικοί παράγοντες και αλληλεπίδραση κυτάρου-κυτάρου ή κυτάρου ξενιστή^{26,27,28}.

Όπως προαναφέρθηκε η MMP-9 εκκρίνεται από τα κύτταρα σε μορφή προενζύμου. Η ενεργοποίηση του ενζύμου έχει βρεθεί πως γίνεται από πρωτεάσες, όπως καλλικρεΐνη ιστού, πρωτεάσες σερίνης-θρυψίνης, καθεψίνη G, χυμάση σιτευτικού κυτάρου και ουδετεροφιλική ελαστάση, η οποία είναι παρούσα στα αζουροφιλικά κοκκία των ουδετερόφιλων. Επίσης οι MMPs μπορούν να ενεργοποιήσουν η μία την άλλη, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας αλυσίδας ενεργοποίησης (Εικόνα 5). Πιθανόν η MMP-3 να είναι ο πιο αποτελεσματικός ενεργοποιητής της MMP-9^{26,27,28}.



Εικόνα 5: Το δίκτυο ενεργοποίησης της MMP-9 από MMPs²⁸.

Όταν η MMP-9 εκκριθεί και ενεργοποιηθεί, η ενεργότητα της μπορεί να ρυθμιστεί είτε με αποικοδόμηση είτε με αναστολή. Κυρίαρχος αναστολέας είναι η α₂-μακρογλοβίνη, ένας αναστολέας πρωτεασών που βρίσκεται στον ανθρώπινο ορό. Η ενεργή μορφή της MMP-9 δεσμεύεται από την α₂-μακρογλοβίνη και

απομακρύνεται από την κυκλοφορία μέσω υποδοχέων. Σημαντικό ρόλο στην αναστολή των MMPs κατέχουν οι ιστοειδικοί αναστολείς των MMPs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases-TIMPs*). Οι TIMPs είναι γλυκοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος από 20-30kDa. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τέσσερα διαφορετικά γονίδια των TIMP. Ο TIMP-1 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια με την MMP-9, ενώ οι TIMP-2 και TIMP-3 συνδέονται με χαμηλότερη συγγένεια^{26,27,28}.

5.4. Ο ρόλος της MMP-9 σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις

Η MMP-9 έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Ο ρόλος της στην φυσιολογία επιτυγχάνεται κυρίως με την ανακατασκευή των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Από την άλλη, η ανισορροπία μεταξύ αποικοδόμησης και εναπόθεσης των συστατικών αυτών, συχνά οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις^{26,27,28}.

Η δράση της MMP-9 έχει εντοπιστεί σε δύο φυσιολογικές διαδικασίες της ανθρώπινης ζωής: την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη (Πίνακας 7). Πιο συγκεκριμένα, εμπλέκεται στην ανακατασκευή του ενδομητριακού ιστού κατά τον έμμηνο κύκλο, στην εμφύτευση βλαστοκύστης, στην εμμηνόρροια (εκτός φυσικά από την περίοδο της εγκυμοσύνης), ενώ έχει διαπιστωθεί η δράση της και στην ανάπτυξη οργάνων (συκώτι). Η MMP-9 εμπλέκεται επίσης σε περιπτώσεις φλεγμονών και αποκατάστασης τραυμάτων (*wound healing*), καθώς εκκρίνεται από κύτταρα που εμπλέκονται σε αυτές τις καταστάσεις, όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, η παρουσία της MMP-9 στην αγγειογένεση μπορεί να οδηγήσει τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η νεοαγγειογένεση στους καρκινικούς όγκους^{26,27,28}.

Η έλλειψη ρυθμιστικών μηχανισμών της MMP-9 προκαλεί διαταραχή στην παραγωγή της, που συνακόλουθα οδηγεί σε ελαττωματική αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας. Στον Πίνακα 7 συνοψίζονται ασθένειες που έχει δειχθεί η συμμετοχή της MMP-9. Παραδείγματα είναι η πρόωρη διάρρηξη των αμνιοτικών μεμβρανών, η παθολογική αναρρόφηση οστού, φλεγμονές, μολύνσεις και οι κακοήθειες. Στον πνεύμονα, η δράση της MMP-9 έχει μελετηθεί στο άσθμα, στο πνευμονικό εμφύσημα και στη φυματίωση^{26,27,28}.

Πίνακας 7: Η MMP-9 σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις²⁸.

Φυσιολογικές καταστάσεις:

Αναπαραγωγή
Αποκατάσταση τραυμάτων
Κινητοποίηση λευκοκυττάρων
Φλεγμονές
Αύξηση και ανάπτυξη

Παθολογικές καταστάσεις:

Πρόωρη διάρρηξη μεμβρανών
Αποκατάσταση οστών
Φλεγμονές:
 Χρόνια τραύματα
 Κυστική ίνωση
 Άσθμα
 Πνευμονικό εμφύσημα
 Ρευματοειδής αρθρίτιδα
 Ανεύρυσμα κ.α.
Λοιμώδεις νοσήματα:
 AIDS
 HTLV-1 μυελοπάθεια
 Βακτηριακή σήψη
 Σηπτική αρθρίτιδα κ.α.
Αγγειακές ασθένειες:
 Στεφανιαία αθηροσκλήρωση
 Μυοκαρδιακή νέκρωση
 Εγκεφαλική νέκρωση
 Αρτηριακή βλάβη
Καρκίνο:
 Μετάσταση

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσο τα επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό και τον ορό, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. Πληθυσμός

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 95 ασθενείς, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για διαγνωστική διερεύνηση υπεζωκοτικής συλλογής. Σε όλους τους ασθενείς συμπληρώθηκε κοινό πρωτόκολλο στο οποίο καταγράφηκαν τα ακόλουθα (Εικόνα 6):

1. Η αιτία εισόδου, ο εντοπισμός της υπεζωκοτικής συλλογής (Αριστερά, Δεξιά, Άμφω) και η τελική διάγνωση.
2. Η βιοψία υπεζωκότα για τις περιπτώσεις όπου υπήρχε ένδειξη.
3. Η κυτταρολογική εξέταση του υπεζωκοτικού υγρού.
4. Η μικροβιολογική εξέταση του υπεζωκοτικού υγρού.
5. Η καλλιέργεια του υπεζωκοτικού υγρού.
6. Η γενική αίματος (αριθμός και τύπος λευκών αιμοσφαιρίων, Τ.Κ.Ε.).
7. Ο προσδιορισμός του σακχάρου, LDH, ολικών λευκωμάτων και ολικής ADA στο υπεζωκοτικό υγρό και το αίμα.

6.2. Κριτήρια διάγνωσης

Ο προσδιορισμός της αιτίας που προκάλεσε την υπεζωκοτική συλλογή βασίστηκε στη κλινική εικόνα, τον εργαστηριακό έλεγχο και την ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή. Μια συλλογή χαρακτηρίζεται ως λεμφοκυτταρικό εξίδρωμα με βάση τα κριτήρια του Light και αν ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στο υπεζωκοτικό υγρό είναι πάνω από 50%. Οι συλλογές ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες ομάδες σύμφωνα με τη τελική διάγνωση:

- **Παραπνευμονική συλλογή (n=15):** Η διάγνωση στηρίχθηκε στη παρουσία λοίμωξης του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος που συνοδευόταν από παρουσία εμπυρέτου, πνευμονικής διήθησης, πυώδους απόχρεμψης και ανταπόκριση στη θεραπεία με αντιβιοτικά. Σε όλες τις περιπτώσεις στο υπεζωκοτικό υγρό επικρατούσαν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα.
- **Εμπύημα (n=5):** Είναι η συλλογή πύου στην υπεζωκοτική κοιλότητα ή υγρού με θετική καλλιέργεια ή Gram χρώση.
- **Κακοήθεις συλλογές με πρωτοπαθή εστία στον πνεύμονα (n=37):** Η διάγνωση τέθηκε σε όλους τους ασθενείς με τη θετική κυτταρολογική εξέταση του υπεζωκοτικού υγρού ή τη βιοψία υπεζωκότα.
- **Άλλες κακοήθεις συλλογές (n=25):** Περιλαμβάνουν συλλογές με κακοήθη κύτταρα στην κυτταρολογική εξέταση, τα οποία αποδόθηκαν σε καρκίνο μαστού (n=1), μεσοθηλίωμα (n=4), καρκίνο νεφρού (n=3), μεταστατικό καρκίνο (n=7), λέμφωμα (n=1) και αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (n=9).
- **Φυματιώδης πλευρίτιδα: (n=6):** Η τελική διάγνωση τέθηκε με απομόνωση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης: α) στην καλλιέργεια πτυέλων και υπεζωκοτικού υγρού β) με χρώση Zielh Neelsen και γ) με βιοψία υπεζωκότα.
- **Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια (Διίδρωμα) (n=7):** Η διάγνωση βασίστηκε στο ιστορικό των ασθενών, στην κλινική εικόνα και τα αντικειμενικά ευρήματα της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και τα εργαστηριακά ευρήματα του υπεζωκοτικού υγρού που το χαρακτήριζαν ως διίδρωμα.

6.3. Συλλογή και διατήρηση των δειγμάτων

Από κάθε ασθενή συλλέχθηκε το υπεζωκοτικό υγρό της πρώτης παρακέντησης (20mL) και ταυτόχρονα 10mL φλεβικού αίματος, τα οποία υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση στις 1500rpm και 3000rpm αντίστοιχα για 10 λεπτά στους 4 °C. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο αποθηκευόταν στους -80 °C έως τη στιγμή της ανάλυσης.

A/α:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: _____

ΔΕΙΓΜΑ: Πλευριτικό υγρό Αίμα

ΚΛΙΝΙΚΗ:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:.....

ΗΛΙΚΙΑ:

ΚΑΠΝΙΣΜΑ (πακέτα/ημέρα X έτη):

ΑΙΤΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ:

ΥΠΕΖ. ΣΥΛΛΟΓΗ: ΔΕΞΙΑ ΑΡΙΣΤΕΡΑ

ΜΑΝΤΟΥΧ:

ΔΙΑΓΝΩΣΗ:

ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ: Βιοψία υπεζωκότα
Κυτταρολογική πλ. Υγρού
Μικροβιολογική πλ. Υγρού

ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ: Λευκά αιμοσφαίρια (αριθμός):
Τύπος λευκών αιμοσφαιρίων:
ΤΚΕ.....

ΑΙΜΑ:

Σάκχαρο:

LDH:

Λευκώματα:

Ολική ADA (ορού):

ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ:

Σάκχαρο:

LDH:.....

Λευκώματα:

Ολική ADA πλ. υγρού:

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:

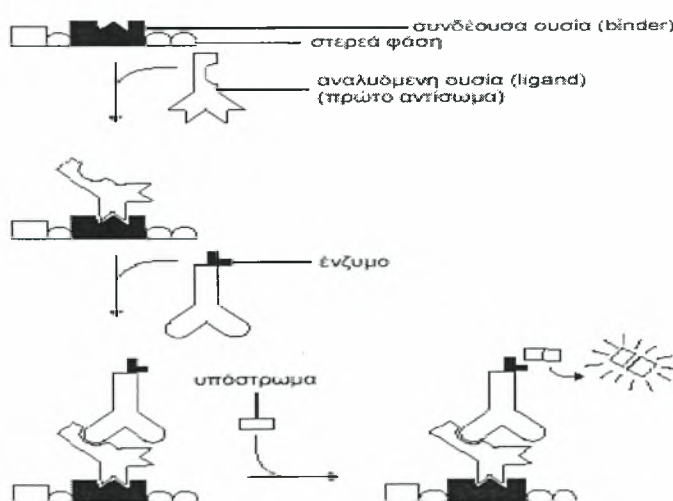
Εικόνα 6. Πρωτόκολλο για τη διάγνωση υπεζωκοτικής συλλογής.

6.4. Μέθοδος προσδιορισμού της MMP-9

• Ανοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (ELISA-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται σε ένα ολιγοκλωνικό σύστημα, στο οποίο μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένα επίτοπα του αντιγόνου. Τα αντιγόνα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα αλάτων μέσα στα βοθρία της μικροπλάκας με αποτέλεσμα να προσδένονται στα παγιδευμένα αντισώματα (MAbsI). Τα ελεύθερα αντιγόνα απομακρύνονται με πλύση. Τα πρώτο αντίσωμα MAbsI ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα (MAbsII) σημασμένο με υπεροξειδάση (HRP). Ακολουθεί επώαση κατά την οποία δημιουργείται το σύμπλοκο της μορφής: παγιδευμένο MAbsI_αντιγόνο- MAbsII_αντιγόνο και στη συνέχεια η μικροπλάκα πλένεται, ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσδεδμένα σημασμένα αντισώματα (Εικόνα 7)²⁹.

Το σημασμένο αντίσωμα καθίσταται ορατό με την προσθήκη χρωμογόνου υπό τη μορφή διαλύματος (TMB+H₂O₂), επάνω στο οποίο δρα η υπεροξειδάση για να παραχθεί ένα έγχρωμο τελικό προϊόν. Ακολουθεί επώαση και τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη H₂SO₄. Το ποσό του υποστρώματος που έχει καταναλωθεί, προσδιορίζεται εκτιμώντας την ποσότητα του έγχρωμο τελικού προϊόντος, με σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου στα 450nm. Η τιμή της απορρόφησης που καταγράφεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα (Εικόνα 7)²⁹.



Εικόνα 7. Διαγραμματική αναπαράσταση της μεθόδου ELISA.

Το πρωτόκολλο προσδιορισμού της MMP-9 (R&D Systems, MN, Minneapolis USA) περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Προετοιμασία αντιδραστηρίων, πρότυπων διαλυμάτων (standards) και δειγμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες. Για τα δείγματα απαιτείται εκατοστιαία αραιώση (100x) με προσθήκη 10μL δείγματος και 390μL Calibrator Diluent RD5-10.
2. Προσθήκη 100 μL Assay Diluent RD1-34 σε κάθε βοθρίο.
3. Προσθήκη 100μL Standard, Control ή δείγματος για κάθε βοθρίο σύμφωνα με τις οδηγίες. Επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση (500 ± 50 rpm).
4. Πλύσιμο 4 φορές με το Wash Buffer.
5. Προσθήκη 200 μL Conjugate σε κάθε βοθρίο. Επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση (500 ± 50 rpm).
6. Πλύσιμο 4 φορές με το Wash Buffer
7. Προσθήκη 200μL Substrate solution σε κάθε βοθρίο. Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση. Θα πρέπει η πλάκα να προστατευτεί από το φως.
8. Προσθήκη 50 μL Stop Solution σε κάθε βοθρίο. Φωτομέτρηση στα 450nm.

7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (SD). Η σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών ομάδων ελέγχθηκε με τη δοκιμασία unpaired t-test, ενώ η σύγκριση περισσότερων των δύο ομάδων ελέγχθηκε με one-way analysis of variance (Δοκιμασία Bonferroni). Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής έγινε με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk's test και όταν δεν υπήρχε κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία κατά Mann-Whitney. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν τιμές του $p < 0,05$. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Prism 4.0

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

▪ Γενικά χαρακτηριστικά υπεζωκοτικών συλλογών

Η αιτιολογία των υπεζωκοτικών συλλογών φαίνεται στον Πίνακα 8. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά του υπεζωκοτικού υγρού των 95 ασθενών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 8. Ταξινόμηση Υπεζωκοτικών Συλλογών (n=95).

Αιτιολογία	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό %
Διιδρώματα (Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια)	7	7,37
Εξιδρώματα	88	92,63
Παραπνευμονικές Συλλογές & Εμπυήματα	20	22,72
Φυματίωση	6	6,82
Κακοήθειες:	62	70,46
Καρκίνος πνευμονα	37	59,68
Άλλες κακοήθειες*	25	40,32

*Άλλες κακοήθειες: Μαστού (n=1), Μεσοθηλίωμα (n=4), Νεφρού (n=3), Μεταστατικός καρκίνος (n=7), Λέμφωμα (n=1) και αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (n=9).

	Διιδρώματα (n=7)	Φυματίωση (n=6)	Κακοήθεια (n=62)	ΠΣ και ΕΜΠ (n=15 +5=20)
Ηλικία (έτη)	79,43±9,64	52,00±20,03	66,48±10,63	54,37±4,07
Φύλο (Α/Θ)	5/2	5/1	42/20	15/5
Ολικές πρωτεΐνες ΥΥ (g/L)	3,21±0,34	5,28± 0,22	4,27±0,17	4,50± 0,30
Ολικές πρωτεΐνες ορού (g/L)	6,66±0,37	6,95±0,31	6,66±0,10	6,32±0,18
Ολικές πρωτεΐνες ΥΥ/Ορού	0,48±0,05	0,80±0,03	0,64± 0,02	0,67±0,04
LDH ΥΥ (U/L)	139,70±25,28	561,2±174,8	509,60±67,42	8948±4419
LDH ορού (U/L)	277,00±57,25	225,20±29,79	264,20±16,77	236,40±48,24
LDH ΥΥ/ορού	0,77±0,33	2,86±1,02	2,09±0,27	45,96±23,61
Αριθμός κυττάρων ΥΥ	704±125	2458±945	2451,0±325,9	91496±49181
Αριθμός λεμφοκυττάρων % ΥΥ	54,20±14,00	78,50±4,17	56,69±3,36	13,75±2,68
Αριθμός πολυμορφοπύρηνων κυττάρων % ΥΥ	22,00±14,43	17,17±4,21	16,88±2,74	73,25±3,33
Γλυκόζη ΥΥ (mg/dl)	135,40±16,01	88,00±15,28	110,3± 6,14	111,10± 18,75

Πίνακας 9. Δημογραφικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά υπεζωκοτικού υγρού και ορού. Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως Μέση τιμή ± Σταθερά απόκλιση (SD). ΥΥ= Υπεζωκοτικό Υγρό, ΠΣ= Παραπνευμονική Συλλογή, ΕΜΠ= Εμπύημα.

▪ **Διάκριση μεταξύ διιδρωμάτων και εξιδρωμάτων**

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό των ασθενών με διιδρωματική και εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή διαφορετικής αιτιολογίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας τα επίπεδα της MMP-9 βρέθηκαν αυξημένα στον ορό των ασθενών με εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή συγκρινόμενα με εκείνα των διιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών ($p=0,042$) (Διάγραμμα 1).

		Διιδρωμα (n=7)	Εξιδρωμα (n=88)	Κακοήθεια (n=62)	Φυματίωση (n=6)	ΠΣ (n=15)	ΕΜΠ (n=5)
MMP-9 (ng/ml)	ΥΥ	53,43±111,20	224,60±408,80	82,39±153,50	136,1±108,5	616,1±700,1	920,5±199,6
	ΟΡΟΣ	250,0±121,0	740,6±578,2	728,9±639,0	555,9±263,6	754,0±373,0	1023,0±461,8
	ΥΥ/ΟΡ	0,25±0,49	0,35±0,63	0,21±0,55	0,33±0,26	0,76±0,83	1,02±0,37

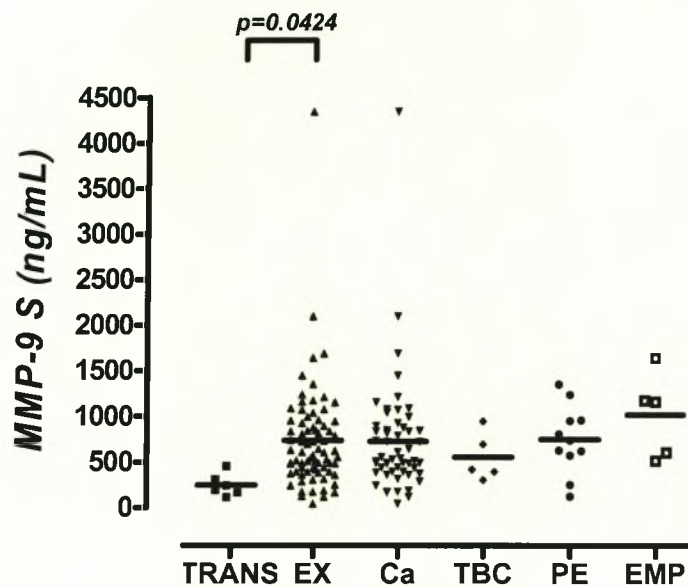
Πίνακας 10. Επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με διιδρωματική ή εξιδρωματική συλλογή. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση (SD). ΥΥ= Υπεζωκοτικό Υγρό, ΠΣ= Παραπνευμονική συλλογή, ΕΜΠ= Εμπύημα.

▪ **Επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό των ασθενών με εξιδρωματική συλλογή**

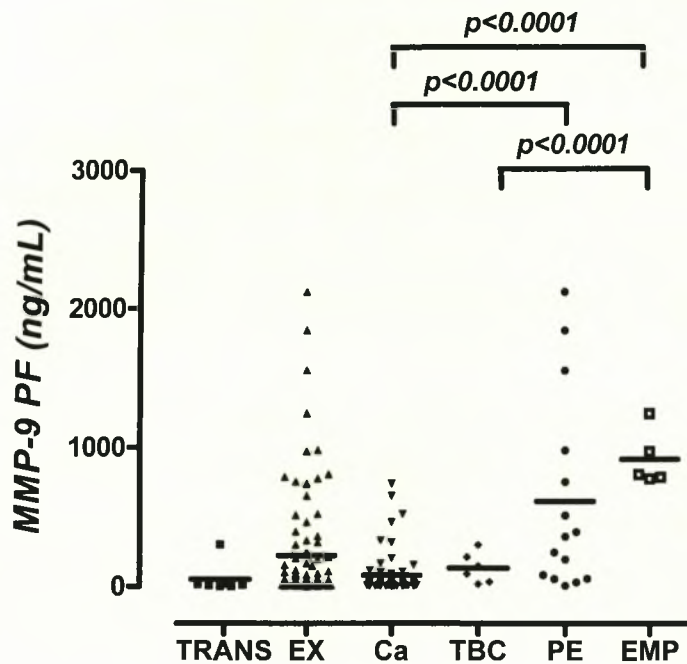
Στον ορό, τα επίπεδα της MMP-9 δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των εξιδρωμάτων διαφορετικής αιτιολογίας ($p>0,05$). Οι τιμές των συγκεντρώσεων της MMP-9 στον ορό βρέθηκαν υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές των συγκεντρώσεων στο υπεζωκοτικό υγρό (Πίνακας 10, Διάγραμμα 1).

Τα επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό των ασθενών με κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή βρέθηκαν σημαντικά χαμηλά ($82,39\pm 153,5$ ng/ml) συγκρινόμενα με αυτά του εμπυήματος ($920,5\pm 199,6$ ng/ml, $p<0,0001$) και της παραπνευμονικής συλλογής ($616,1\pm 700,1$ ng/ml, $p<0,0001$), (Πίνακας 10, Διάγραμμα 2). Σημαντικά αυξημένες βρέθηκαν οι τιμές της MMP-9 στο

υπεζωκοτικό υγρό των ασθενών με εμπύημα σε σχέση με αυτές των ασθενών με φυματιώδη συλλογή ($136,1 \pm 108,5$ ng/ml, $p < 0,0001$), (Πίνακας 10, Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1. Επίπεδα της MMP-9 στον ορό ασθενών με διδρωματική (TRANS, n=7) και εξιδρωματική συλλογή (EX, n=88). Οι εξιδρωματικές συλλογές περιλαμβάνουν κακοήθεις (Ca, n=62), φυματιώδεις (TBC, n=6), παραπνευμονικές συλλογές (PE, n=15) και εμπυήματα (EMP, n=5). Οι τιμές της MMP-9 εκφράζονται σε ng/ml. Κάθε σύμβολο απεικονίζει ένα δείγμα. Η οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη μέση τιμή.



Διάγραμμα 2. Επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με διδρωματική (TRANS, n=7) και εξιδρωματική συλλογή (EX, n=88). Οι εξιδρωματικές συλλογές περιλαμβάνουν κακοήθειες (Ca, n=62), φυματιώδεις (TBC, n=6), παραπνευμονικές συλλογές (PE, n=15) και εμπυήματα (EMP, n=5). Οι τιμές της MMP-9 εκφράζονται σε ng/ml. Κάθε σύμβολο απεικονίζει ένα δείγμα. Η οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη μέση τιμή.

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, έχουν καταγραφεί αρκετές μελέτες σχετικά με την δράση των MMPs, και ιδιαίτερα με την MMP-9. Η MMP-9 παρά το φυσιολογικό της ρόλο στον οργανισμό, έχει δείχτει ότι εμπλέκεται σε ένα μεγάλο φάσμα παθολογικών καταστάσεων. Η δράση της έχει μελετηθεί εκτενώς σε ασθένειες του πνεύμονα, όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, και η κυστική ίνωση. Όσον αφορά τις υπεζωκοτικές συλλογές η έρευνα βρίσκεται ακόμα σε πρώιμα στάδια.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στη καθημερινή κλινική πράξη και συχνά η αιτιολογία της διάγνωσης τους παραμένει άγνωστη δυσχεραίνοντας την αντιμετώπιση τους. Για τη διάγνωση τους χρησιμοποιούνται διάφορες εργαστηριακές δοκιμασίες στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό, οι οποίες περιλαμβάνουν τις ολικές πρωτεΐνες, την γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), τη γλυκόζη, το pH και τον τύπο των κυττάρων. Παρ' όλα αυτά ένα μεγάλο ποσοστό υπεζωκοτικών συλλογών παραμένει αδιάγνωστο, ιδιαίτερα όσον αφορά τη διάκριση των εξιδρωμάτων. Για τους παραπάνω λόγους είναι σημαντική η εύρεση βιοχημικών δεικτών που να συμβάλλουν στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τα επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή. Η συγκέντρωση της MMP-9 στον ορό βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα εξιδρώματα σε σχέση με τα διιδρώματα. Επίσης, οι τιμές της MMP-9 βρέθηκαν υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες στο υπεζωκοτικό υγρό. Οι αυξημένες τιμές στον ορό πιθανώς υποδηλώνουν πως η παρουσία της MMP-9 στην υπεζωκοτική κοιλότητα οφείλεται στη μεταφορά της μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, και όχι σε τοπική παραγωγή. Ωστόσο τα παραπάνω αποτελέσματα δεν επιβεβαιώνονται ή διαφωνούν με αυτά άλλων μελετών^{30,31} οι οποίες αναφέρουν μόνο τη συγκέντρωση της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό, ενώ διαφωνούν με αυτά των Eickelberg και συν.³², όπου έδειξαν πως οι τιμές της MMP-9 ήταν υψηλότερες στο υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τον ορό.

Στις ομάδες των ασθενών με εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή τα αποτελέσματα μας έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με εμπύημα και παραπνευμονικές συλλογές, σε σχέση με τις

κακοήθεις και τις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές. Παρόλο που οι τιμές της MMP-9 ήταν υψηλές στις κακοήθεις και τις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά και σε σχέση με τις τιμές των διιδρωμάτων. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με αυτά των Inglesias και συν.³³, όπου βρήκαν αυξημένες συγκεντρώσεις της MMP-9 στα εμπυήματα και τις παραπνευμονικές συλλογές. Άλλες μελέτες^{30,31,32,34} οι οποίες δεν περιείχαν ασθενείς με παραπνευμονικές συλλογές, έδειξαν στατιστικά αυξημένη συγκέντρωση της MMP-9 στις φυματιώδεις σε σχέση με τις κακοήθεις συλλογές, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα.

Οι αυξημένες τιμές της MMP-9 στα εμπυήματα και τις παραπνευμονικές συλλογές πιθανόν να οφείλονται στην έντονη ουδετεροφιλική απόκριση που παρατηρείται σε αυτές τις συλλογές, αφού η MMP-9 έχει βρεθεί πως βρίσκεται αποθηκευμένη στα κοκκία των ουδετερόφιλων³². Στις συλλογές φυματιώδους προέλευσης, τα μακροφάγα παίζουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας απελευθερώνοντας διάφορες πρωτεάσες και κυτταροκίνες, αλλά και επάγοντας την ανοσολογική απάντηση^{30,31}. Με βάση τα παραπάνω υποθέτουμε ότι η MMP-9 η οποία ανήκει στις πρωτεάσες, απελευθερώνεται από τα μακροφάγα και έτσι εμπλέκεται στην παθογένεση της φυματιώδους πλευρίτιδας.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Τα επίπεδα της MMP-9 στον ορό μπορούν να διακρίνουν τα διιδρώματα από τα εξιδρώματα.
2. Ο προσδιορισμός της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση των παραπνευμονικών συλλογών και του εμπυήματος από τις άλλες ομάδες εξιδρωματικών συλλογών.
3. Η εύρεση αυξημένων επιπέδων της MMP-9 στον ορό σε σχέση με το υπεζωκοτικό υγρό υποδηλώνει ότι η προέλευσή της οφείλεται στη συστηματική κυκλοφορία και όχι σε τοπική παραγωγή.

Ωστόσο, η διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για τη χρησιμότητα της MMP-9 στην κλινική και εργαστηριακή πράξη απαιτεί μεγαλύτερο αριθμών δειγμάτων.

11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης μας ήταν η μέτρηση και ανίχνευση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με υπεζωκοτική συλλογή, έτσι ώστε να αποτιμηθεί η χρησιμότητα της στη διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.

Μελετήθηκαν 95 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, οι συλλογές των οποίων ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες ομάδες σύμφωνα με τη τελική διάγνωση: παραπνευμονική συλλογή (n=15), εμπύημα (n=5), κακοήθεια (n=62), φυματιώδης πλευρίτιδα: (n=6) και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (διίδρωμα) (n=7). Η ανίχνευση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) έγινε με την χρήση της ανοσοπροσοφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (ELISA).

Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα επίπεδα της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με εμπύημα ($920,5 \pm 199,6$ ng/ml) και παραπνευμονικές συλλογές ($616,1 \pm 700,1$ ng/ml), σε σχέση με το υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με κακοήθειες ($82,39 \pm 153,5$ ng/ml, $p < 0,0001$) και φυματιώδεις συλλογές ($136,1 \pm 108,5$ ng/ml, $p < 0,0001$). Στον ορό, η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,042$) παρατηρήθηκε μεταξύ διιδρωμάτων ($250,0 \pm 121,0$ ng/ml) και εξιδρωμάτων ($740,6 \pm 578,2$ ng/ml).

Συμπερασματικά ο προσδιορισμός της MMP-9 στο υπεζωκοτικό υγρό συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση των παραπνευμονικών συλλογών και του εμπύματος από τις άλλες ομάδες εξιδρωματικών συλλογών. Επίσης, τα επίπεδα της MMP-9 στον ορό μπορούν να διακρίνουν τα διιδρώματα από τα εξιδρώματα. Τέλος, η εύρεση αυξημένων επιπέδων της MMP-9 στον ορό σε σχέση με το υπεζωκοτικό υγρό υποδηλώνει ότι η προέλευσή δεν οφείλεται σε τοπική παραγωγή.

12. ABSTRACT

The objective of the study was the detection and measurement of metalloproteinase-9 in the pleural fluid and serum of patients with pleural effusions, in order to investigate the diagnostic value of the enzyme in the differentiation of pleural effusions.

We studied 95 consecutive patients with pleural effusions who were admitted in the Respiratory Department of the University Hospital of Larissa. The effusions were classified as parapneumonic (n=15), empyema (n=5), malignant (n=62), tuberculous (n=6), and congestive heart failure (n=7). MMP-9 measurements were performed with enzyme-linked immunoabsorbent assays, (ELISA).

The levels of MMP-9 were significantly higher in the pleural fluid of patients with empyema ($920,5 \pm 199,6$ ng/ml) and parapneumonic effusions ($616,1 \pm 700,1$ ng/ml), compared to patients with malignant ($82,39 \pm 153,5$ ng/ml, $p < 0,0001$) and tuberculous effusions ($136,1 \pm 108,5$ ng/ml, $p < 0,0001$). In serum, the only statistical, significant difference ($p = 0,042$) was detected between transudates ($250,0 \pm 121,0$ ng/ml) and exudates ($740,6 \pm 578,2$ ng/ml).

The determination of MMP-9 in the pleural fluid could contribute in the differentiation of parapneumonic effusions and empyema from the other groups of exudative effusions. The levels of MMP-9 in the serum could distinguish the transudates and exudates. Finally, the high values of MMP-9 in the serum as regards to pleural fluid indicate that originates from the systemic circulation and not from local production.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Keith L. Moore. Κλινική Ανατομία, 3^η έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδη, 1998: 80-85.
2. Δημήτριος Α. Πατάκης. Επίτομη Πνευμονολογία. University Studio Press, 1994, 275-280.
3. Μ. Παπαδημητρίου. Εσωτερική Παθολογία Ι. University Studio Press, Θεσσαλονίκη 1998, 521-526.
4. Σωτηρίου Α. Ράπτη. Εσωτερική Παθολογία Ι. Επιστημονικές εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισσιανός», 1998, 494-496.
5. Najib M. Rahman, Stephen J. Chapman and Robert J. O. Davies. Pleural effusion: a structured approach to care. British Medical Bulletin 2004; 72: 31-47.
6. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. Eur Respir J 2003; 21:539-544
7. R. Albert, S. Spiro, J. Jett. Κλινική Πνευμονολογία ΙΙ. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2004; 925-930.
8. L. Zoocchi. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. Eur Respir J 2002; 15:45-1558.
9. Jose M. Porcel, Richard W Light. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. American Family Physician 2006; 73: 1211-1220.
10. A. Medford, N. Maskell. Pleural effusion. Postgrad Med J 2005, 81:702-7010.
11. R.W. Light. Diagnostic principles in pleural disease. Eur Respir J; 10: 476-461.
12. Ε. Στεφανάτου, Β. Διονυσοπούλου, Π. Φούντα, Α. Παπαμιχαλόπουλος. Διαγνωστική προσέγγιση πλευριτικής συλλογής. ΠΝΕΥΜΩΝ Συμπλήρωμα 2, Τόμος 13, 2000:15-22.
13. Tarn AC and Lapworth R. Biochemical analysis of pleural fluid: what should we measure? Ann Clin Biochem 2001; 38:311-322.
14. R.W. Light. Parapneumonic effusion and empyema. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 75-80.
15. Arun Gopi, Sethu M. Madhavan, Surendra K. Sharma, Steve A. Sahn. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. Chest 2007;131:880-889.

16. Sahn SA. Diagnosis and management of pleural effusions. American College of Chest Physician 2001, Lesson 3, Volume 15.
17. G. F. Tassi, G. Cardillo, G.P. Marchetti, F. Carleo & M. Martelli. Diagnostic and therapeutical management of malignant pleural effusion. Annals of oncology, 2006, 17 (Supplement 2);11-12.
18. American Thoracic Society. Management of malignant pleural effusions. Am j Respir Crit care Med (2000), 162:pp1987-2001.
19. Light RW. Pleural Diseases. 4th ed. Pleural effusions related to metastatic malignancies. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001:108-134.
20. A.Eid, J. J. keddissi, M. Samada, M. Tawk, K. Kimmell and G. Kinasewitz. Exudative effusions in congestive heart failure. Chest 2002, 122; 1518-1523.
21. Sahn SA. Diagnosis and management of pleural effusions. Chest 2002; 121:1915-1920.
22. Mitrouska I, Bouros D. The trans-exudative pleural effusion. Chest 2002; 122:1503-1504.
23. M. Cohen and S. Sahn. Resolution of pleural effusions. Chest 2001; 119:1547-1562.
24. K. Greenlee, Z. Werb and F. Kheradmand. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. Physiol. Rev 2007; 87: 68-98.
25. A.Nelson, B. Fingleton, M. Rothenberg and L. Matrisian. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. Journal of Cl. Oncology 2000; 18(5):1135-1149.
26. Opdenakker et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or MMP-9. Clinical reviews in Biochemistry and Molecular Biology 2002; 37(6): 375-536.
27. Opdenakker et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. Journal of Leukocyte Biology 2001; 69: 851-859.
28. J. Atkinson and R. Senior. Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. Am. J. Respir Cell Mol. Biol. 2003; 28: 12-14
29. Αναστάσιος Γερμενής. Ιατρική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση 2000.
30. G. Hoheisel, U. Sack, D.S.C. Hui, K. Huse, K.S Chan, K.K.Chan, K. Hartwig, E. Schuster, G.H. Scholz, J. Schauer. Occurrence of matrix