

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Αναστάσιος Ε. Γερμενής

ΚΑΙ

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Κων/νος Ι. Γουργουλιάνης

---

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΥΠΝΟΥ  
ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ  
ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ  
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ  
ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΑΠΝΟΙΑΣ ΣΤΟΝ ΥΠΝΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΦΑΝΗ Ι. ΚΑΛΑΛΑ**

*Ανοσολόγος - Ιατρός*

ΛΑΡΙΣΑ 2008

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/1232, άρθρο 202, παρ. 2).

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής** (επιβλέπων)

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Αποστολία Χατζηευθυμίου**

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Αποστολία Χατζηευθυμίου**

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

**Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς**

Καθηγητής Φυσιολογίας

**Νικηφόρος Β. Αγγελόπουλος**

Καθηγητής Ψυχιατρικής

**Ματθαίος Σπελέτας**

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

**Ζωή Δανιήλ**

Επίκουρη Καθηγήτρια Πνευμονολογίας



*Στους κόπους των γονιών μου*

*Στον Τάσο και τη Γιούλα που μου δίνουν κουράγιο*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....	11
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	15
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Διαταραχές του ύπνου και μεταβολές των ανοσιακών παραμέτρων.....</b>	<b>21</b>
1.1. Φυσιολογικός ύπνος .....	21
1.2. Στέρηση ύπνου .....	25
1.2.1. Μεταβολές των υποπληθυσμών των ανοσοδραστικών κυττάρων .....	25
1.2.2. Μεταβολές διαλυτών μεσολαβητών .....	26
1.3. Σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο .....	30
1.3.1. Δείκτες φλεγμονής .....	31
1.3.2. Διαταραχές υποπληθυσμών των ανοσοδραστικών κυττάρων .....	34
<b>2. Υποξία και ανοσιακό σύστημα .....</b>	<b>35</b>
2.1. Ο ρόλος του HIF-1 .....	36
2.2. Ο ρόλος των Kv1.3 διαύλων καλίου .....	38
2.3. Η επίδραση της υποξίας στους υποπληθυσμούς των ανοσοδραστικών κυττάρων ..	39
2.4. Η επίδραση της επανοξυγόνωσης .....	44
<b>3. Η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου .....</b>	<b>45</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>48</b>
<b>ΥΛΙΚΟ.....</b>	<b>50</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>54</b>
<b>Στατιστική ανάλυση .....</b>	<b>59</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>62</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>77</b>
<b>Διαταραχές των παρθένων και μνημονικών T-κυττάρων .....</b>	<b>78</b>
<b>Διαταραχές του TCR .....</b>	<b>80</b>
<b>Διαταραχές της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης.....</b>	<b>82</b>
<b>Διαταραχές σχετιζόμενες με τον BMI.....</b>	<b>84</b>
<b>Συμπεράσματα και προοπτικές .....</b>	<b>85</b>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	86
ABSTRACT .....	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89



## Συντομογραφίες

---

- ACTH** (Adrenocorticotrophic Hormone) = Φλοιοτρόπος ορμόνη
- AHI** (Apnoea Hypopnea Index) = Δείκτης απνοιών/υποπνοιών
- BMI** (Body Mass Index) = Δείκτης μάζας σώματος
- ConA** (Concanavalin A) = Κονκαναβαλίνη
- CCR** = Υποδοχέας για τις CC χημειοκίνες
- CXCR** = Υποδοχέας για τις CXCR χημειοκίνες
- CRF** (Corticotropin-Releasing Factor) = Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης
- CRH** (Corticotropin Releasing Hormone) = Εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης
- CRP** (C-reactive protein) = C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
- CTL** (Cytolytic T Lymphocyte) = Κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα
- ECD** (Phycocerythrin-Texas Red-x) = Φυκοερυθρίνη-Texas Red-x
- FITC** (Fluorescein) = Φλουοροσκεΐνη
- GCP** (Granulocyte Chemotactic Protein) = Χημειοτακτική πρωτεΐνη των ουδετεροφίλων
- GH** (Growth Hormone) = Αυξητική ορμόνη
- GHRH** (Growth Hormone Releasing Hormone) = Εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης
- HIF-1** (Hypoxia Inducible Factor-1) = Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1
- H/R** (Hypoxia/Reoxygenation) = Υποξία/Επανοξυγόνωση
- HRE** (Hypoxia Response Element) = Στοιχείο του DNA αποκρινόμενο στην υποξία
- ICAM-1** (Intercellular Adhesion Molecule 1) = Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1
- IFN** (Interferon) = Ιντερφερόνη
- IL** (Interleukin) = Ιντερλευκίνη
- IκB** (inhibitor of NF-κB) = Αναστολέας του NF-κB
- LFA** (Lymphocyte Function-Associated Antigen) = Αντιγόνο σχετιζόμενο με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων
- LPS** (Lipopolysaccharide) = Λιποπολυσακχαρίτης
- mAb** (monoclonal antibody) = Μονοκλωνικό αντίσωμα
- MCP** (Monocyte Chemoattractant Protein) = Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων
- nCPAP** (nasal Continuous Positive Airway Pressure) = Ρινική παροχή αέρος υπό συνεχή θετική πίεση
- NF-κB** (Nuclear Factor κB) = Πυρηνικός παράγοντας κB
- NK** (Natural Killer) = Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
- NO** (Nitric Monoxide) = Μονοξείδιο του αζώτου
- PARP** (Poly (ADP-ribose) polymerase) = Πολυ-(ADP-ριβόζη)-πολυμεράση
- PE** (Phycocerythrin) = Φυκοερυθρίνη
- PECY5** (Phycocerythrin-CY5) = Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5
- PHA** (Phytohaemagglutinin) = Φυτοαιματογλουτινίνη
- pi** (Positivity index) = βαθμός έκφρασης
- PMA** (Phorbol myristic acetate) = Φορβολ-μυριστικό-οξικό [οξύ]
- PWM** (PokeWeed mitogen) = Μιτογόνο από το φυτό PokeWeed

**ROS** (Reactive Oxygen Species) = Ενεργές ρίζες οξυγόνου  
**SOD** (Superoxide dismutase) = Δισμουτάση του υπεροξειδίου  
**TBARS** (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) = Ενεργές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος  
**TCR** (T Cell Receptor) = Υποδοχέας των T-κυττάρων  
**Th** (T-helper) = T-βοηθητικά κύτταρα  
**TNF** (Tumor Necrosis Factor) = Παράγοντας νέκρωσης των όγκων  
**TLR** (Toll-like Receptor) = Υποδοχέας που προσομοιάζει τους Toll  
**TSH** (Thyroid-Stimulating Hormone) = Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη  
**VCAM-1** (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) = Μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1  
**VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) = Αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου  
**ΗΕΓ** = Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα  
**ΗΚΓ** = Ηλεκτροκαρδιογράφημα  
**ΚΝΣ** = Κεντρικό νευρικό σύστημα  
**ΣΑΑΥ** = Σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Φανή Καλαλά του Ιωάννη  
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 27 Μαρτίου 1977  
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αθήνα  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμη  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: 28ης Οκτωβρίου 15 – 41223 Λάρισα  
Τηλ.: 2410-286457 – Κινητό τηλέφωνο: 6947-180518  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας – 411 10 Λάρισα  
Τηλ.: 2410-681859 – Fax: 2410-682580  
E-mail: fanikalala@hotmail.com  
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα), Γαλλικά (πολύ καλά)

### ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

1998 Bachelor of Science (BSc) in Immunology, School of Health and Life Sciences, King's College, University of London, UK – Grade 2.1  
2006 Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – Λίαν καλώς

### ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

2005 Ερευνητική Υποτροφία Πνευμονολογίας GSK

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. KARANIKAS V, SOUKOU F, **KALALA F**, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Low frequency of cytolytic CD8<sup>+</sup> T cell precursors specific for survivin and survivin-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy? *Cancer Immunology & Immunotherapy* (submitted)
2. KARANIKAS V, SPELETAS M, ZAMANAKOU M, **KALALA F**, LOULES G, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of Translational Medicine* (under revision)
3. SPELETAS M, LIADAKI K, **KALALA F**, DAIYOU C, KATODRITOU E, MANDALA E, KORANTZIS I, RITIS K, ZINTZARAS E, GERMENIS AE. TLR4 single nucleotide polymorphisms and thrombosis risk in patients with myeloproliferative disorders. *Thrombosis Research* (in press)
4. ZACHAROULIS D, POULTSIDIS A, KATSOGRIDAKIS E, **KALALA F**, NAKOU M, CHATZITHEOFILOU C. Radiofrequency-assisted partial splenectomy: Histopathological and immunological assessment of the splenic remnant in a porcine model. *Surg Endosc* 2007 (in press)
5. STEFANOY N, SATRA M, PAPANIKOLAOU V, **KALALA F**, GATSELIS N, GERMENIS AE, DALEKOS GN, TSEZOU A. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Experimental Biology and Medicine* 2006, 231:1653-1663

6. SPELETAS M, VYZANTIADIS TA, **KALALA F**, PLASTIRAS D, KOKOVIADOU K, ANTONIADIS A, KORANTZIS I. Pneumonia caused by *Candida krusei* and *Candida glabrata* in a patient with chronic myeloid leukemia receiving imatinib mesylate treatment. *Med Mycol* 2007, 18: 1-5
7. DANIIL Z, KARETSI E, ZAKYNTHINOS E, BAKRATSI E, **KALALA F**, GOURGOULIANIS KI. Pulmonary arterial hypertension in a patient with common variable immunodeficiency and unilateral bronchiectasis: Successful treatment with iloprost. *Eur J Inter Med* 2007,18: 333-335

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. KARANIKAS V, SPELETAS M, ZAMANAKOU M, **KALALA F**, LOULES G, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting*, San Diego USA 2008
2. KARANIKAS V, SOUKOU F, **KALALA F**, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Low-frequency CD8<sup>+</sup> T cell precursors specific for survivin and survivin-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy? *8<sup>th</sup> International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy*, Berlin 2008
3. KARANIKAS V, SOUKOU F, ZAMANAKOU M, **KALALA F**, GRAMMOUSTIANOU ES, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Quantitative and qualitative assessment of anti-tumour specific T cells in patients with lung cancer and cancer free individuals. *International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO 2008)*, Amsterdam 2008
4. SPELETAS M, GRAMMOUSTIANOU E-S, LOULES G, TSOHAS S, **KALALA F**, BRAIMI M, MANDALA E, KATODRITOU E, KARANIKAS V, GERMENIS AE. Overexpression of survivin and its variants in the bone marrow of patients with chronic myeloid leukaemia (CML) in remission: Restricting their use in immunotherapy? *4<sup>th</sup> International Greek Biotechnology Forum (IGBF-4)*, Athens 2008
5. SPELETAS M, KIOUMI A, LOULES G, **KALALA F**, KATODRITOU E, TSITOURIDIS I, HYTIROGLOU P, CHRISTAKIS J, KORANTZIS I, GERMENIS A. Analysis of SLC40A1 (Ferroportin 1) gene at mRNA level reveals rapidly the causative mutations in patients with hereditary hemochromatosis type IV. *12th Congress of the European Hematology Association*, Vienna 2007  
*Haematologica* 92(Suppl. 1):291, 2007
6. SPELETAS M, PLASTIRAS D, **KALALA F**, LIADAKI K, KATODRITOU E, MANDALA E, DAIΟΥ C, RITIS K, KORANTZIS I, GERMENIS A. Innate immunity and thrombosis: Association of TLR4-D299G and TLR4-T399I single nucleotide polymorphisms (SNPs) with thromboembolic disease in patients with myeloproliferative disorders (MPDs). *21st European Immunogenetics & Histocompatibility Conference*, Barcelona 2007  
*Tissue Antigens* 69:445, 2007
7. ΣΟΥΚΟΥ Φ, **ΚΑΛΑΛΑ Φ**, ΓΡΑΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΔΕΣΙΜΟΝΑΣ Ν, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β. Αντι-σαρβιβίνη CD8<sup>+</sup>-κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα. *4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας*, Σαντορίνη 2006
8. ΓΡΑΜΟΥΣΤΙΥΝΟΥ Ε, ΣΟΥΚΟΥ Φ, **ΚΑΛΑΛΑ Φ**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΧΕΒΑΣ Α, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β. Αντι-*hTERT* CD8<sup>+</sup>-κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα. *4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας*, Σαντορίνη 2006

9. **ΚΑΛΑΛΑ Φ**, ΣΟΥΚΟΥ Φ, ΓΡΑΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΚΑΛΑΦΑΤΗ Γ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β. Αντι-MAGE CD8<sup>+</sup>-κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα. *4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Σαντορίνη 2006*
10. **ΚΑΛΑΛΑ Φ**, ΓΡΑΜΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, ΣΟΥΚΟΥ Φ, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΝΗΣ Κ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ. CD8 T-κυτταρικές απαντήσεις έναντι ευρέως εκφραζομένων αντιγόνων των όγκων (TAA) στον καρκίνο του πνεύμονα. *15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Νοέμβριος 2006*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα ανοσοδραστικά κύτταρα αναγκάζονται να διαφοροποιηθούν, να ενεργοποιηθούν και να εκφράσουν, τελικά, τη λειτουργία τους, σε όργανα και ιστούς, όπου επικρατούν πολύ διαφορετικές συνθήκες οξυγόνωσης. Το γεγονός αυτό έχει δώσει αφορμή για μια μεγάλη σειρά μελετών, από τις οποίες προκύπτει ότι τα ανοσοδραστικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς προσαρμογής σε μεγάλο εύρος υποξικών συνθηκών, ώστε να μπορούν να ανταποκρίνονται επαρκώς στην κατά τόπους βιολογική αποστολή τους. Το θέμα έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τη βιβλιογραφία, αναφορικά με την επίδραση που έχουν στη λειτουργικότητα των ανοσοδραστικών κυττάρων οι υποξικές συνθήκες, που επικρατούν σε σημεία βλάβης του οργανισμού, όπως είναι η φλεγμονή και οι όγκοι. Οι περισσότερες από τις γνώσεις που υπάρχουν έχουν προκύψει είτε από μελέτες σε πειραματόζωα είτε από *in vitro* πειράματα, όπου όμως η αντιστοιχία των υποξικών συνθηκών με τις *in vivo* επικρατούσες δύσκολα στοιχειοθετείται. Παρότι αυτές οι μελέτες παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η υποξία επηρεάζει την ανοσιακή απάντηση, ελάχιστη προσπάθεια έχει καταβληθεί μέχρι σήμερα προς την κατεύθυνση διερεύνησης της ενδεχόμενης επίδρασης που μπορεί να έχει στην τελευταία η συστηματική υποξία του οργανισμού, που χαρακτηρίζει ένα πλήθος παθολογικών καταστάσεων. Οι ενδείξεις που υπάρχουν μέχρι στιγμής είναι ελάχιστες και προέρχονται κυρίως από μελέτες σε αθλητές ή σε ιπτάμενους της αεροπορίας.

Από την άλλη πλευρά, οι διαρκώς αυξανόμενες γνώσεις αναφορικά με τη λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού άξονα και τη σχέση της με το ανοσιακό σύστημα έχουν αποτελέσει το ερέθισμα για τη διερεύνηση ενδεχόμενης επίδρασης των διαταραχών του ύπνου με τις αμυντικές λειτουργίες του οργανισμού. Στον τομέα αυτόν, τα μέχρι σήμερα ευρήματα περιορίζονται σε διαταραχές ορισμένων παραμέτρων της ανοσιακής απάντησης υπό την επίδραση παρατεταμένης στέρησης ύπνου. Το συγκεκριμένο, βέβαια, θέμα καθίσταται καθημερινά πολυπλοκότερο, καθώς αυξάνονται οι γνώσεις της Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογίας και αποκαλύπτεται η παρεμβολή ενός ακόμη αδιευκρίνιστου, αλλά πάντως αμφίδρομου μηχανισμού, όπως είναι εκείνος της φλεγμονής.

Το σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο θεωρείται ως ένα μοντέλο ταυτόχρονης χρόνιας στέρησης ύπνου και υποξίας, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της υπόθεσης, αν και κατά πόσον τα παραπάνω πειραματικά ευρήματα έχουν *in vivo* σημασία. Μέχρι στιγμής, οι μόνες ανοσολογικές παράμετροι που έχουν μελετηθεί στο σύνδρομο είναι εκείνες που σχετίζονται με τη

φλεγμονή, σε μια προσπάθεια διευκρίνισης της σχέσης του με την παχυσαρκία και τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να μελετηθούν οι βραχυπρόθεσμες μεταβολές που ενδεχομένως μπορεί να προκαλέσει το υποξικό και νευροανοσολογικό ερέθισμα, που αντιπροσωπεύει συγκεκριμένης διάρκειας ύπνος αυτών των ασθενών, στους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων του αίματος. Ειδικότερα, οι λευκοκυτταρικοί υποπληθυσμοί ελέγχθηκαν ανοσοφαινοτυπικά και οι μεταβολές τους αξιολογήθηκαν με τη χρήση πολυπαραγοντικού μοντέλου, προκειμένου να διερευνηθεί σε ποιες ακριβώς από τις παραμέτρους της πολυπαραμετρικής μελέτης του ύπνου μπορεί να οφείλονται.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, σε υλικό ασθενών του Ιατρείου Ύπνου της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από το οποίο προέρχονται και οι παράμετροι της πολυκαταγραφικής μελέτης ύπνου, καθώς και τα υπόλοιπα στοιχεία των ασθενών, που χρησιμοποιήθηκαν.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής παρακολούθησης. Ειδικότερα, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στο μέντορα μου, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας) κ. Αναστάσιο Γερμενή για την τυπική αλλά και ουσιαστική εποπτεία της μελέτης. Τον ευχαριστώ όχι τόσο για την ανάθεση και την παρακολούθηση της διατριβής αλλά για τις ώρες πολύτιμης μαθητείας δίπλα του. Με εισήγαγε στον κόσμο της επιστήμης, μου ενέπνευσε το μικρόβιο της αναζήτησης και της έρευνας και μου δίδαξε τη σημασία των κατάλληλων επιλογών. Αποτελεί για μένα πρότυπο πόρευσης στη ζωή.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω, επίσης, στον Καθηγητή Πνευμονολογίας και Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας) κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για την πολύτιμη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και τις συμβουλές του καθόλη την πορεία της μελέτης. Δεν θα ξεχάσω ποτέ την αμέριστα υποστηρικτική στάση του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στην Ιατρική και της δραστηριοποίησής μου στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Η Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Α. Χατζηευθυμίου είχε ενεργό συμμετοχή κυρίως στη διαμόρφωση του ερευνητικού πρωτοκόλλου της διατριβής μου και γι' αυτό την ευχαριστώ πολύ.

Ευχαριστώ από καρδιάς την Επιμελήτρια κ. Χ. Παστάκα καθώς και το λοιπό ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Πνευμονολογικής Κλινικής για τη βοήθεια και την



άψογη συνεργασία τους κατά τη συλλογή του υλικού και των παραμέτρων της μελέτης ύπνου των ασθενών.

Ευχαριστώ ειλικρινά τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας για τη συνεργασία τους όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Ο καθένας, στο βαθμό που του αναλογούσε, φρόντισε για την ομαλή διεξαγωγή της μελέτης. Ιδιαίτερα, αναφέρω τους συναδέλφους και φίλους κκ Βασιλική Ζήση και Δημήτρη Πλαστήρα, η βοήθεια και συμπαράσταση των οποίων υπηρξε καταλυτική. Με υπομονή και ενδιαφέρον ήταν δίπλα μου σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ το συνεργάτη του Εργαστηρίου, EU Marie-Curie Fellow, κ. Βάιο Καρανίκα και τον Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα για την κριτική ματιά, τα εύστοχα σχόλια και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Η σχέση μου, βέβαια, με το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, χωρίς την εξαίρεση κανενός, δεν περιορίστηκε στο πλαίσιο της εκπόνησης της διατριβής μου. Στο Εργαστήριο αυτό θήτευσα και μαθήτευσα στα κρίσιμα για τη σταδιοδρομία μου, τελευταία έξι χρόνια της ζωής μου. Σ' αυτή την πορεία, ανέπτυξα στενές εργασιακές, επιστημονικές αλλά κι ανθρώπινες σχέσεις με όλα του τα μέλη, σχέσεις που θάναι αδύνατο ποτέ να λησμονήσω. Στον καθένα ξεχωριστά εκφράζω τις ευχαριστίες που του αναλογούν.

Κι επειδή η στιγμή αυτή γίνεται αυτόματα απολογιστική, θεωρώ επιβεβλημένο να καταθέσω δημόσια τις ευχαριστίες μου στο σεβαστό μου Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά. Καθόλη την παρουσία μου στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όχι μονάχα δεν αρνήθηκε ποτέ την όποια βοήθεια του ζήτησα, αλλά και γιατί ο ίδιος πολλές φορές βρήκε και υπόδειξε πολλές από τις ανάγκες μου, δίνοντας λύσεις που δεν περίμενα. Και είμαι βέβαιη ότι αυτή μου την τοποθέτηση θα συμμερίζονταν πολλοί από τους συμφοιτητές μου.

Στο ίδιο πλαίσιο, αισθάνομαι υποχρεωμένη να ευχαριστήσω τον αγαπητό μου Καθηγητή Χειρουργικής κ. Κώστα Βαγιανό, που, ξεπερνώντας τα όρια της συγγενικής μας σχέσης, επηρέασε θετικά κι αποφασιστικά, γενικά ως δάσκαλος αλλά και άμεσα πολλές φορές, τις αποφάσεις για την επιστημονική μου σταδιοδρομία.

Τελειώνοντας, συναισθάνομαι ότι οι μέχρι τώρα επιλογές, που έκανα σχετικά με τη σταδιοδρομία μου, καθώς κι εκείνες που σχεδιάζω για το μέλλον μου, μεταφράζονται σε ένα σημαντικό ψυχικό, κοινωνικό, αλλά και υλικό κόστος για την οικογένειά μου. Υπήρξαν, πολλές φορές, ακόμη κι ακατανόητες, αλλά υπηρετήθηκαν αδιαμαρτύρητα κι υπομονετικά, με μόνο κίνητρο την αμέριστη αγάπη όλων τους. Ξέρω πολύ καλά ότι η Επιστήμη καθυστερεί να δώσει, σ' αυτούς που της αφιερώνονται και στο κοινωνικό τους

περιβάλλον, την ανταπόδοση που περιμένουν. Όσο κι αν ακουστεί εγωιστικό, δεν έχω παρά να τους ευχηθώ ν' αντέξουν μαζί μου την αναμονή της. Και θάρθει...

## ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---



# **1. Διαταραχές του ύπνου και μεταβολές των ανοσιακών παραμέτρων**

## **1.1. Φυσιολογικός ύπνος**

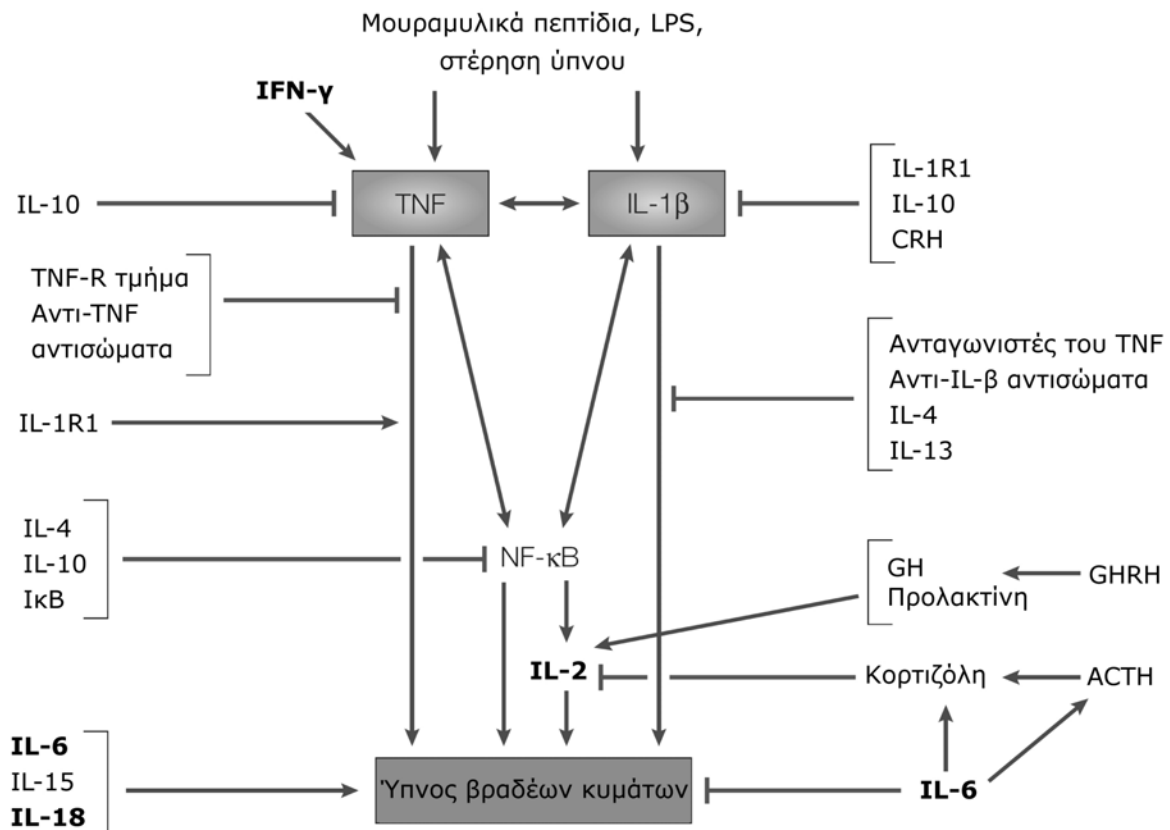
Παρόλο που ο ύπνος αποτελεί μια φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, λίγα είναι γνωστά τόσο για τους λόγους, για τους οποίους ο άνθρωπος κοιμάται όσο και για την ακριβή φυσιολογική σημασία του ύπνου. Έρευνες των τελευταίων ετών δείχνουν ότι και ακόμη και μικρή έλλειψη ύπνου έχει επιπτώσεις στην υγεία (γνωσιακές αλλά και συμπεριφορικές). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι ο ύπνος συνοδεύεται από μεταβολές της εγκεφαλικής δραστηριότητας, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέονται, άμεσα ή έμμεσα, με αλλαγές σε άλλα συστήματα του οργανισμού, όπως το νευροενδοκρινικό, το αναπνευστικό, το καρδιαγγειακό και το ανοσιακό.

Οι μηχανισμοί, με τους οποίους ο ύπνος και οι διαταραχές της αρχιτεκτονικής του επιδρούν στο ανοσιακό σύστημα, δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Υπάρχουν, όμως, ισχυρές ενδείξεις, τόσο για την άμεση επίδραση του ύπνου στην ανοσιακή απάντηση, όσο και για την παρουσία αμφίδρομης σχέσης μεταξύ τους. Επικρατεί, μάλιστα, η άποψη ότι η έλλειψη του ύπνου συνδέεται με επιρρέπεια σε λοιμώξεις, κυρίως ιογενούς αιτιολογίας, όπως επίσης και το ότι, αντίθετα, οι λοιμώξεις προκαλούν υπνηλία [1].

Τα πρώτα στοιχεία για τη σχέση του ύπνου με το ανοσιακό σύστημα εμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1970, όταν απομονώθηκε από ανθρώπινα ούρα ο παράγοντας S, μια ουσία που φάνηκε να επάγει τον ύπνο [2]. Η παραπάνω ουσία αποδείχτηκε ότι είναι ένα πεπτίδιο, δομικό συστατικό της πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων, το οποίο προκαλεί έκκριση IL-1β, ενός ανοσορρυθμιστικού παράγοντα που αποτελεί ισχυρό υπναγωγό. Διατυπώθηκε, λοιπόν, η υπόθεση ότι οι λοιμώξεις, εκλύοντας ανοσιακές απαντήσεις, μεταβάλλουν την έκφραση ενδογενών ανοσορρυθμιστικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους επιδρούν στον ύπνο. Οι παραπάνω παράγοντες είναι κυρίως κυτταροκίνες (ILs, TNF, IFNs) καθώς και διαλυτοί υποδοχείς τους, ουσίες, οι οποίες, εκτός από το ανοσιακό σύστημα, παράγονται και από το ΚΝΣ [3]. Στην εικόνα 1 φαίνονται τα μονοπάτια του ανοσιακού συστήματος που εμπλέκονται στον ύπνο. Οι κυτταροκίνες φαίνεται ότι πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια, για να θεωρηθούν ως ρυθμιστικές του ύπνου [4]. Από αυτές άλλες θεωρούνται ευοδωτικές του ύπνου (IL-1β, TNF-α), ενώ άλλες κατασταλτικές (IL-4, IL-10) [5]. Έχει δειχθεί ότι η εξωγενής χορήγηση IL-1β, TNF-α ή IL-18 αυξάνει τη διάρκεια του NREM ύπνου, μειώνει αυτή του REM ύπνου και αυξάνει το εύρος των βραδίων κυμάτων του ΗΕΓ. Αντίθετα, η χορήγηση IL-4 και IL-10 καταστέλλει τον NREM ύπνο. Οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων οι εξωγενώς χορηγούμενες κυτταροκίνες ασκούν την υπναγωγό ή μη δράση τους, δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί αλλά φαίνεται ότι σε αυτούς εμπλέκονται ορμόνες (GHRH, CRH), προσταγλανδίνες, η συνθάση του NO και η ενεργοποίηση του

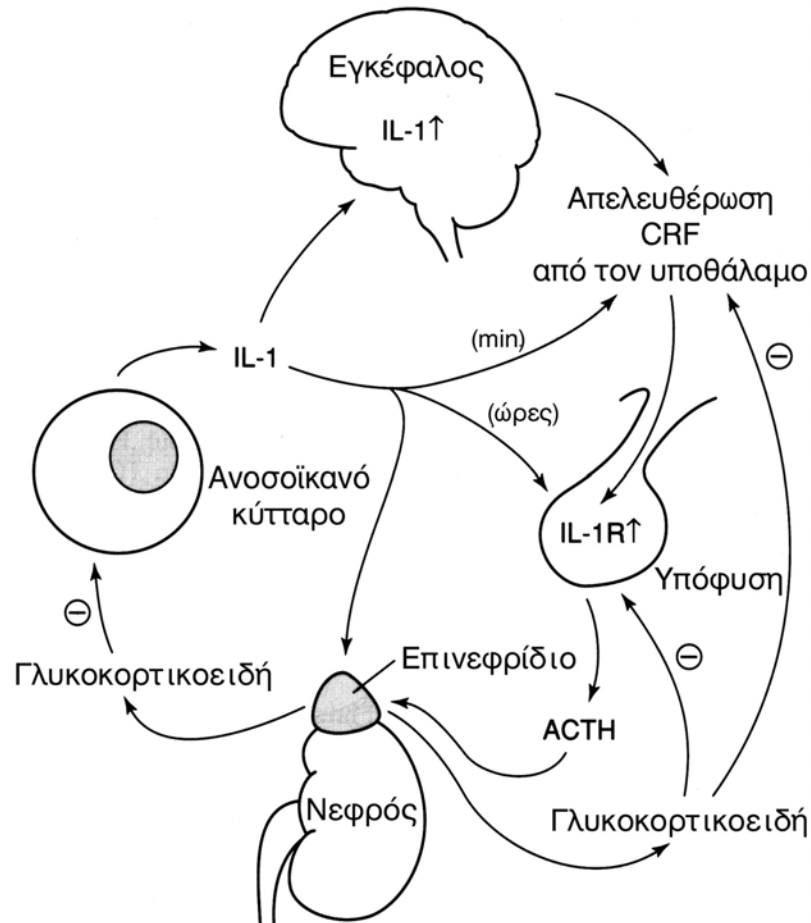
μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [5]. Οι ενδογενείς κυτταροκίνες, από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι ασκούν το ρυθμιστικό ρόλο τους μέσω ενός συνδυασμού ομοιοστατικών και νυχθημερήσιων μηχανισμών, όπως ο κύκλος εγρήγορσης-ύπνου και το ενδοκρινικό σύστημα.

ΕΙΚΟΝΑ 1. Σχηματική παράσταση της σχέσης του ύπνου με το ανοσιακό σύστημα (μεταφρασμένη από 1). Με μαύρα γράμματα σημειώνονται οι υπναγωγές κυτταροκίνες.



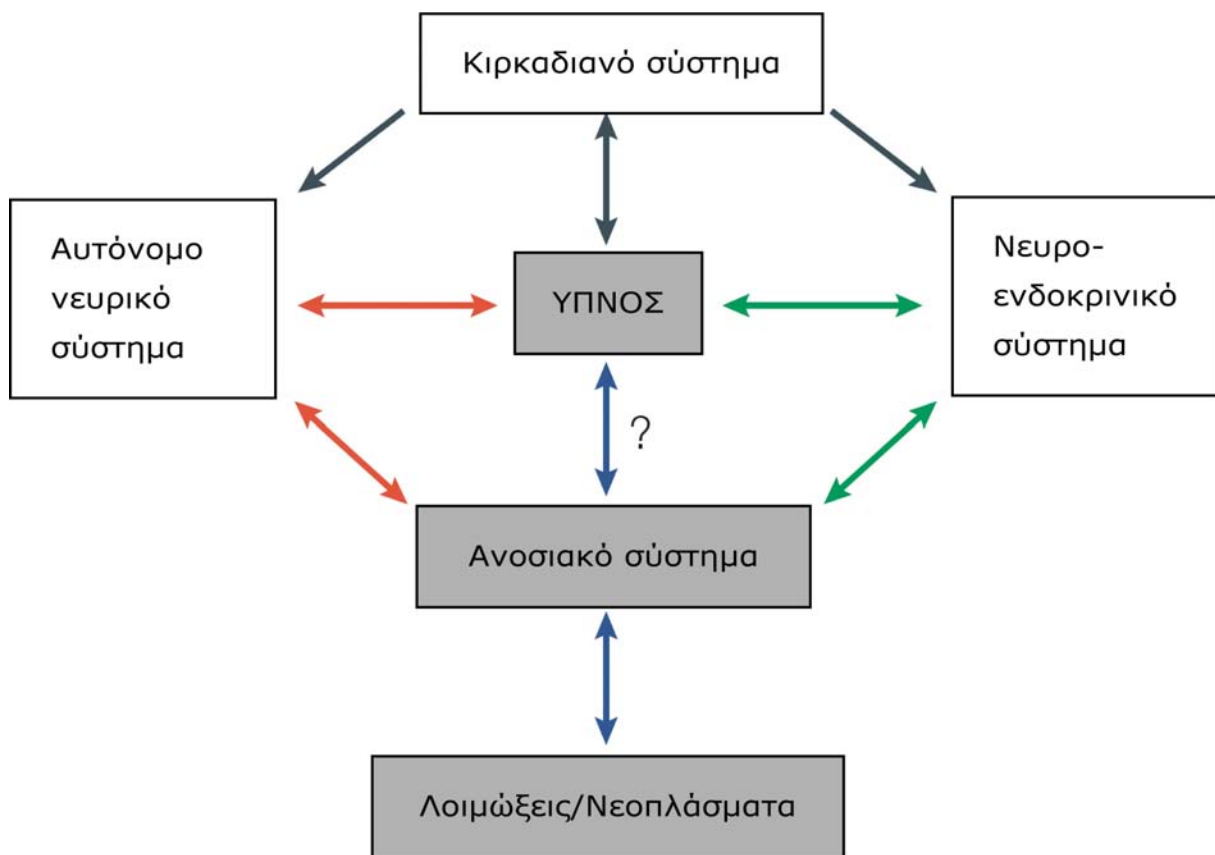
Οι ορμόνες εμπλέκονται στη ρύθμιση του ύπνου και το ενδοκρινικό σύστημα αποτελεί πρότυπο νυχθημερήσιου μηχανισμού [1]. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί η στήνη σχέση του νευροενδοκρινικού συστήματος με το ανοσιακό και η επίδραση του ύπνου στο ανοσιακό σύστημα θεωρείται ότι μεσολαβείται εν μέρει από το νευροενδοκρινικό σύστημα (εικ. 2). Είναι γνωστό ότι σε ζώα με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης και προλακτίνης παρατηρείται, επίσης, ανεπάρκεια τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας, η οποία αποκαθίσταται με τη χορήγηση των παραπάνω ορμονών [6]. Από την άλλη, παράγοντες του ανοσιακού συστήματος επηρεάζουν τις ορμόνες. Για παράδειγμα, η IL-6 αυξάνει τη συγκέντρωση της ACTH και της κορτιζόλης στο πλάσμα, ενώ μειώνει τη συγκέντρωση της TSH [7] (εικ. 3).

ΕΙΚΟΝΑ 2. Εξαπλουστευμένη παρουσίαση των αλληλεπιδράσεων του ανοσιακού με το νευροενδοκρινικό σύστημα (υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακός άξονας).



Ο νυχθημερήσιος ρυθμός είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του ύπνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων δεν παραμένουν σταθεροί κατά τη διάρκεια του εικοσιτετράωρου αλλά μεταβάλλονται ακολουθώντας νυχθημερήσιο ρυθμό. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής, δεν συμφωνούν πλήρως. Παρόλ' αυτά φαίνεται ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων φτάνει στο μέγιστο κατά τη διάρκεια της νύχτας και ελαχιστοποιείται κατά την εγρήγορση [8]. Αντίθετα, ο αριθμός των NK-κυττάρων φτάνει στο μέγιστο το απόγευμα και μειώνεται, όπως και η δραστηριότητά τους, τα μεσάνυχτα [8]. Τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι αντανακλούν την ανακατανομή των λευκών αιμοσφαιρίων μεταξύ του αίματος και της λέμφου, που επηρεάζεται από την ηλικία και την έμμηνο ρύση.

ΕΙΚΟΝΑ 3. Σχηματική παράσταση των σχέσεων του ύπνου με τις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις, το νευρικό, το ενδοκρινικό και το ανοσιακό σύστημα (μεταφρασμένη από 1).



Από μελέτες που αφορούν στα επίπεδα των κυτταροκινών κατά τη διάρκεια του κύκλου ύπνου-εγρήγορσης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του TNF αυξάνονται κατά τη διάρκεια του ύπνου και ότι ο νυχθημερήσιος ρυθμός της απελευθέρωσής του διαταράσσεται στο ΣΑΥ [9]. Επίσης, τα επίπεδα της IL-1β μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ημέρας φτάνοντας στο μέγιστο κατά την έναρξη του SWS [10]. Επιπλέον, και τα επίπεδα άλλων κυτταροκινών (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12), καθώς και ο πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων ως απάντηση σε μιτογόνα, δεν παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του εικοσιτετράωρου [1]. Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση των κυτταροκινών που σχετίζονται με τα μακροφάγα (π.χ. TNF) συμβαίνει παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων στο αίμα κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ η αύξηση των κυτταροκινών που σχετίζονται με τα T-κύτταρα (π.χ. IL-2) κατά τη διάρκεια της νύχτας είναι ανεξάρτητη με την ανακατανομή τους στο αίμα.

Ο ύπνος θεωρείται ότι υποστηρίζει, ενισχύει και βοηθά στην επανόρθωση των ανοσιακών λειτουργιών [1, 11]. Οι ευεργετικές ιδιότητες του ύπνου αναφέρονται σε διάφορες εκφάνσεις της ανοσιακής απάντησης που μεσολαβείται από τα T-κύτταρα. Έχει δειχθεί ότι ο φυσιολογικός, νυχτερινός ύπνος που ακολουθεί τον εμβολιασμό



έναντι του ιού της ηπατίτιδας Α και του ιού της γρίπης, αυξάνει τη συγκέντρωση των ειδικών έναντι των ιών αντισωμάτων, σε σύγκριση με καταστάσεις στέρησης ύπνου [12, 13]. Η παραγωγή της IL-2 [8] αλλά και της IL-12 από τα μονοκύτταρα και τις πρόδρομες μορφές δενδριτικών κυττάρων είναι, επίσης, αυξημένη κατά τη διάρκεια του ύπνου [14, 15]. Επιπλέον, η συγκέντρωση της IL-7 έχει βρεθεί αυξημένη στο πλάσμα κατά τον REM ύπνο και συσχετίζεται θετικά με το ποσοστό του, υποδεικνύοντας ότι ο ύπνος διευκολύνει τη δημιουργία μνημονικών T-κυττάρων [16]. Αντίθετα, δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο ποσοστό των κυκλοφορούντων  $mIL-15^+CD14^+$  μονοκυττάρων κατά τη διάρκεια του ύπνου.

## 1.2. Στέρηση ύπνου

Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο ύπνος επηρεάζει το ανοσιακό σύστημα, μέσω κυτταροκινών που παράγονται και ρυθμίζονται και από το ΚΝΣ. Οι ενδογενείς αυτές κυτταροκίνες δρουν με τη σειρά τους στο αυτόνομο νευρικό σύστημα και το νευροενδοκρινή άξονα, χωρίς να αποκλείεται και η συμμετοχή άλλων μονοπατιών. Για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του ύπνου στο ανοσιακό σύστημα έχουν γίνει μελέτες, στις οποίες ελέγχθηκε αν η έλλειψη ύπνου επηρεάζει, τόσο την κυτταρική ανοσία, όσο και τη χυμική, καθώς και τα επίπεδα δεικτών φλεγμονής (κυτταροκίνες, μόρια προσκόλλησης) στο αίμα.

### 1.2.1. Μεταβολές των υποπληθυσμών των ανοσοδραστικών κυττάρων

Τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων μετά από στέρηση ύπνου δεν συμφωνούν μεταξύ τους. Για παράδειγμα, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι πληθυσμοί των NK-κυττάρων και άλλων λεμφοκυττάρων μειώνονται μετά από στέρηση ύπνου [17, 18, 19] ενώ, αντίθετα, σε κάποιες άλλες έχει βρεθεί ότι οι παραπάνω πληθυσμοί αυξάνονται [8]. Αυτά τα αντιφατικά ευρήματα αποδίδονται, μερικώς τουλάχιστον, στο ότι στις αντίστοιχες μελέτες δεν έχει χρησιμοποιηθεί η ίδια διάρκεια στέρησης ύπνου, γεγονός όμως που υποδεικνύει τη σπουδαιότητα του βαθμού της στέρησης για το ανοσιακό σύστημα [1]. Επιβεβαιώνοντας την παραπάνω άποψη, όταν έγινε σύγκριση μεταξύ 40 και 64 ωρών στέρησης ύπνου, φάνηκε ότι ο απόλυτος αριθμός των κυκλοφορούντων βοηθητικών T-κυττάρων και των NK-κυττάρων μειώθηκε στις 40 ώρες αλλά ο αριθμός των NK-κυττάρων αυξήθηκε μετά από 64 ώρες στέρησης ύπνου [17]. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις, κυρίως από πειράματα σε αρουραίους, ότι η χρόνια έλλειψη ύπνου έχει διαφορετική επίδραση στο ανοσιακό σύστημα από την οξεία [20, 21, 22]. Οι αρουραίοι που υπεβλήθησαν σε στέρηση ύπνου, παρουσίασαν σημαντική καταστολή των *in vitro* κυτταρικών απαντήσεων σε μιτογόνα, η οποία εξαρτιόταν από τη διάρκεια της στέρησης. Εξελικτικά, αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι το ανοσιακό σύστημα

πρέπει να ενισχυθεί σε περίπτωση «έκτακτης» ανάγκης, όπως στην οξεία στέρηση ύπνου, αλλά χωρίς ύπνο τελικά η λειτουργία του συστήματος φθίνει.

Αλλαγές στη λειτουργία των ανοσοκυττάρων μπορεί να είναι πιο σημαντικές από τις αλλαγές του αριθμού τους. Έχει παρατηρηθεί από το 1979 ότι, σε υγιείς ενήλικες, η 48 ωρών έλλειψη ύπνου οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων μετά από διέγερσή τους με PHA [23]. Μετέπειτα μελέτες είτε επιβεβαίωσαν το παραπάνω εύρημα [8, 24] είτε δεν παρατήρησαν διαφορές [17, 25] σύμφωνα, βέβαια, με το σκοπό της καθεμιάς. Επίσης, η λυτική ικανότητα των NK-κυττάρων βρέθηκε μειωμένη σε μικρής διάρκειας στέρηση ύπνου, ενώ φαίνεται να αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η διάρκεια της στέρησης του ύπνου [17, 24]. Μειωμένη έχει βρεθεί και η φαγοκυτταρική ικανότητα των φαγοκυττάρων σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε 72 ωρών στέρηση ύπνου [1]. Αντιθέτως, μελετώντας την ανάπτυξη όγκων σε αρουραίους βρέθηκε ότι αρουραίοι στερημένοι από ύπνο για 10 μέρες είχαν μικρότερους όγκους, σε σχέση με εκείνους, στους οποίους στέρηση ήταν είτε μερική είτε ανύπαρκτη [26].

### *1.2.2. Μεταβολές διαλυτών μεσολαβητών*

Όσον αφορά τη χυμική ανοσία στους ανθρώπους, μόνο μια μελέτη αναφέρει μείωση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στο αίμα μετά από στέρηση ύπνου [19], εύρημα το οποίο δεν έχει αναπαραχθεί. Αντίθετα, από μελέτες σε ζώα έχει φανεί ότι η βραχείας διάρκειας έλλειψη ύπνου είναι πιθανό να μειώνει τον καταβολισμό της IgG, ενώ δεν είναι γνωστή η επίδραση μεγαλύτερης διάρκειας στέρησης ύπνου [27].

Από τις μελέτες που αναφέρονται στις αλλαγές των επιπέδων των κυτταροκινών στο αίμα μετά από στέρηση ύπνου, φαίνεται ότι η στέρηση διαταράσσει ως ένα βαθμό το φυσιολογικό νυχθημερήσιο ρυθμό της συγκέντρωσης των κυτταροκινών [1]. Για παράδειγμα, η φυσιολογική αύξηση των επιπέδων της IL-6 που παρατηρείται κατά την έναρξη του ύπνου, καθυστερεί σε περίπτωση στέρησης του ύπνου μέχρι την έλευσή του [28]. Αντίθετα, η παρατεταμένη στέρηση ύπνου (5 μέρες) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της IL-6, η οποία αντισταθμίζεται αν υπάρξει ύπνος 2 ωρών κάθε μέρα. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι οι κυτταροκίνες παίζουν κάποιο ρόλο στην ομοιοστατική ρύθμιση του ύπνου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι από μελέτες, όπου έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά πρωτόκολλα στέρησης ύπνου για τη διερεύνηση αλλαγών των κυτταροκινών στον ορό, δεν έχουν προκύψει τα ίδια συμπεράσματα [3, 29, 30, 31].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται μετά από στέρηση ύπνου, όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA (τροποποιημένος από 33). Η στέρηση ύπνου ενεργοποιεί κυτταρικούς και γενωμικούς δείκτες φλεγμονής, οι οποίοι κινητοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων των TNF-α και IL-6.

Γονίδιο	Κοινή ονομασία
<i>TNFAIP3</i>	TNF-α-επαγόμενη πρωτεΐνη 3
<i>IL1B</i>	IL-1β
<i>PPP1R15A</i>	Φωσφατάση 1, ρυθμιστική (ανασταλτική) υπομονάδα 15A
<i>CTS2</i>	Καθεψίνη Z
<i>CAP350</i>	Συνδεδεμένη με το κεντροσωμάτιο πρωτεΐνη 350
<i>IGHA2 /// MGC27165</i>	Σταθερή βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης α2 (δείκτης A2m) /// υποθετική πρωτεΐνη MGC27165
<i>PPP1R15A</i>	Φωσφατάση 1, ρυθμιστική (ανασταλτική) υπομονάδα 15A
<i>CD83</i>	CD83
<i>PMAIP1</i>	Επαγόμενη από το PMA πρωτεΐνη 1
<i>THBS1</i>	Θρομβοσπονδίνη 1
<i>CCL3 /// CCL3L1 /// MGC12815</i>	Συνδέτης 3 των χημειοκινών (C-C) /// Συνδέτης 3-like 1 των χημειοκινών (C-C) ligand 3-like 1 /// Συνδέτης 3 των χημειοκινών (C-C), κεντρομερικός
<i>KLF10</i>	Kruppel-like παράγοντας 10
<i>IER3</i>	Immediate early response 3
<i>IL8</i>	IL-8
<i>DDIT4</i>	Επαγόμενο από τη DNA-βλάβη μετάγραφο 4
<i>RHOB</i>	<i>ras</i> Homologue gene family, member B
<i>FOSB</i>	FBJ ιικό ογκογονίδιο του οστεοσαρκώματος των ποντικών, ομόλογο B
<i>EGFL5</i>	EGF-like πεδίο, multiple 5
<i>HBEGF</i>	Συνδεδεμένος με την ηπαρίνη EGF-like αυξητικός παράγοντας
<i>IL8</i>	IL-8
<i>DUSP1</i>	Φωσφατάση 1 διπλής ειδικότητας
<i>PER1</i>	Period homologue 1 ( <i>Drosophila</i> )

Για παράδειγμα, σε άτομα που υπεβλήθησαν σε στέρηση ύπνου 15, 39 και 63 ωρών, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επιπέδων της IL-1β στον ορό και καμία αλλαγή στα επίπεδα των IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α και IFN-γ [29]. Σε άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε στέρηση ύπνου 40 ωρών, τα επίπεδα της IL-6 βρέθηκαν μειωμένα, ενώ αυξημένα ήταν τα επίπεδα των IL-1β και IL-1ra [30]. Σε άλλο πρωτόκολλο στέρησης, τα επίπεδα της IL-6 και του υποδοχέα 1 του TNF-α ήταν αυξημένα, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στον υποδοχέα 2 του TNF-α, στον TNF-α, στον υποδοχέα της IL-2 και στην IL-10 [31]. Σημαντική αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF και

IL-1β καθώς και της IL-2 παρατηρήθηκε μετά από στέρηση ύπνου 24 ωρών και διέγερση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος με LPS και PHA, αντίστοιχα [32]. Η έλλειψη ύπνου έχει συσχετιστεί με αλλαγή στην έκφραση των κυτταροκινών TNF-α και IL-6, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης [33]. Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος με σύνδεση του LPS με τον μεμβρανικό TLR4, μετά από στέρηση ύπνου μιας νύχτας, οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των μονοκυττάρων που παρήγαγαν TNF-α και IL-6, καθώς και σε αύξηση της μεταγραφής του mRNA της IL-6 κατά 3 φορές και του mRNA του TNF-α κατά 2 φορές τουλάχιστον (πίν.1).

Παράλληλα με τα επίπεδα των κυτταροκινών στον ορό, μελετήθηκαν και τα επίπεδα των μορίων προσκόλλησης sICAM-1, sE-σελεκτίνη, sVCAM-1 [30] και της CRP [30, 34, 35], καθώς και η έκφραση του CD11b και της L-σελεκτίνης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων μετά από στέρηση ύπνου [36]. Συγκεκριμένα, μετά από στέρηση ύπνου 40 ωρών τα επίπεδα των sICAM-1 και sE-σελεκτίνης βρέθηκαν αυξημένα στον ορό, ενώ καμία αλλαγή δεν βρέθηκε στα επίπεδα του sVCAM-1 [30]. Η επίδραση της στέρησης στα επίπεδα της CRP δεν είναι ξεκαθαρισμένη μιας και άλλοτε αναφέρεται ότι αυξάνονται [30, 34], ενώ άλλοτε δεν παρατηρείται αλλαγή [35]. Μετά από στέρηση νυχτερινού ύπνου μερικών ωρών, το ποσοστό των CD11b<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων μειώθηκε και το ποσοστό των L-σελεκτίνη<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων αυξήθηκε, υπονοώντας ότι η οξεία στέρηση ύπνου μπορεί να επηρεάζει την μετανάστευση των παραπάνω πληθυσμών από το αίμα προς τους ιστούς [36]. Συγκεντρωτικά, οι συνέπειες της στέρησης ύπνου στις διάφορες παραμέτρους του ανοσιακού συστήματος φαίνονται στον πίνακα 2.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στις παραμέτρους του ανοσιακού συστήματος μετά από έλλειψη ύπνου φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητες της δράσης των ορμονών, κυρίως της κορτιζόλης και της ACTH, οι νυχθημερήσιοι ρυθμοί των οποίων δεν διαταράσσονται. Άρα, παρόλο που υπάρχει ισχυρή σχέση μεταξύ του ενδοκρινικού και του ανοσιακού συστήματος, οι ρόλοι τους στον ύπνο δεν εξαρτώνται πλήρως ο ένας από τον άλλο [1].

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συγκεντρωτική παρουσίαση των διαταραχών των ανοσιακών παραμέτρων που έχει δειχθεί ότι επηρεάζονται από τη στέρηση ύπνου (τροποποιημένος από 1).

Ανοσιακές παραμέτροι		Μερική στέρηση ύπνου (νύχτες)		Πλήρης στέρηση ύπνου (ώρες)				
		1	5	24	36	48	60	72
<b>Κύτταρα</b>								
Ουδετερόφιλα	Αριθμός	↑	↓	↑			↑	
	Λειτουργία	↑				↔		
Μονοκύτταρα	Αριθμός		↑	↑			↑	
	Λειτουργία							↓
NK-κύτταρα	Αριθμός		↓	↑ ή ↓	↓	↓	↑	
	Λειτουργία	↓			↓		↑	
CD4 <sup>+</sup> T-κύτταρα	Αριθμός		↓	↑ ή ↔	↓	↔	↓	
CD8 <sup>+</sup> T-κύτταρα	Αριθμός		↓	↑ ή ↔	↓	↔	↔	
B-κύτταρα	Αριθμός		↔ ή ↓	↔	↔			
	Λειτουργία		↓			↔		
<b>Επίπεδα ενδογενών κυτταροκινών</b>								
IL-1					↑			
IL-2					↑			
IL-6		↓	↓					
IL-10								↑
TNF receptor								↑
<b>Επίπεδα κυτταροκινών μετά από <i>in vitro</i> ενεργοποίηση</b>								
PHA		↓	↑	↓	↔	↓	↔	
PWM					↔ ή ↓		↔	
ConA		↓	↑					
LPS		↑						



ανοσολογικές παράμετροι που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής σε ασθενείς με ΣΑΑΥ είναι εκείνες που σχετίζονται με τη φλεγμονή, σε μια προσπάθεια διευκρίνισης της σχέσης του συνδρόμου με την παχυσαρκία και τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

### 1.3.1. Δείκτες φλεγμονής

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα δεικτών φλεγμονής στον ορό ασθενών με ΣΑΑΥ είναι υψηλότερα, σε σχέση με άτομα που δεν πάσχουν από το σύνδρομο. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών που προάγουν τη φλεγμονή (TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1, GCP-2) [9, 40, 41, 42, 43, 44] και των διαλυτών μορφών μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, L-σελεκτίνη, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη) [45], καθώς και ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων. Τα επίπεδα των TNF-α και IL-6 έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό των ασθενών. Φαίνεται ότι η αύξηση του TNF-α σχετίζεται άμεσα με τον κατακερματισμό του ύπνου, ενώ η αύξηση της IL-6 με το BMI των ασθενών. Τέλος, η αύξηση και των δύο είναι ανάλογη με τα διαστήματα της υποξίας. Φαίνεται, μάλιστα, ότι η αύξηση των επιπέδων στον ορό σχετίζεται μεν αλλά είναι ανεξάρτητη της παχυσαρκίας. Η αύξηση της IL-6 είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε απνοϊκούς ασθενείς που πάσχουν από υπέρταση, σε σχέση με αυτούς στους οποίους η αρτηριακή πίεση είναι φυσιολογική [5]. Τα επίπεδα των IL-6 και TNF-α έχουν συσχετιστεί με αυξημένη υπνηλία και κόπωση σε άλλα νοσήματα, κάτι που φαίνεται να ισχύει και στο ΣΑΑΥ, αφού η χορήγηση ενός ανταγωνιστή του TNF-α, του etanercept, μειώνει σημαντικά τόσο την υπνηλία όσο και τα επεισόδια απνοϊών/υποπνοϊών στους ασθενείς [46]. Η μείωση που παρατηρήθηκε, είναι 3 φορές μεγαλύτερη από αυτή που έχει αναφερθεί με τη χρήση του nCPAP, που αποτελεί το συνήθη τρόπο αντιμετώπισης της υπνηλίας και της υποξίας στο ΣΑΑΥ. Η χορήγηση του παραπάνω ανταγωνιστή μείωσε σημαντικά και τα επίπεδα της IL-6, γεγονός που αποδίδεται στην εξουδετέρωση της δράσης του TNF-α ο οποίος μπορεί να διεγείρει την έκκριση της IL-6. Αυξημένα στον ορό απνοϊκών ασθενών έχουν βρεθεί και τα επίπεδα των IL-8, MCP-1 και GCP-2 [8, 9], οι οποίες εμπλέκονται στη φλεγμονή προσελκύοντας τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα στο σημείο της βλάβης και διευκολύνοντας την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο. Η αύξηση αυτή είχε θετική συσχέτιση με τη σοβαρότητα του ΣΑΑΥ (υποξικό stress). Πιθανολογείται ότι η παραπάνω αύξηση μπορεί να οφείλεται και να σχετίζεται με το BMI των ασθενών, αφού είναι γνωστό ότι ο λιπώδης ιστός παράγει και εκκρίνει IL-8 [47].

Από τις προσπάθειες διερεύνησης των χαρακτηριστικών του ΣΑΑΥ, που ενδεχομένως εξηγούν τις αλλαγές στα επίπεδα των κυτταροκινών στον ορό των ασθενών [9], έχει προκύψει ότι:

- α. Το ΣΑΑΥ χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών που προάγουν τη φλεγμονή, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η αύξηση των IL-6 και TNF-α στο ΣΑΑΥ είναι παραπροϊόν της αυξημένης δραστηριότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.
- β. Παράλληλα με την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, στο ΣΑΑΥ έχει παρατηρηθεί μειωμένη δραστηριότητα του παρασυμπαθητικού συστήματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στο ΣΑΑΥ η δραστηριότητα του πνευμονογαστρικού νεύρου (μείζων κλάδος του παρασυμπαθητικού συστήματος) είναι μειωμένη [48], γεγονός στο οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί η αυξημένη κυκλοφορία των IL-6 και TNF-α στον ορό, αφού η *in vivo* διέγερσή του μειώνει την απελευθέρωση των IL-6, TNF-α και IL-1β [49].
- γ. Η υποξία που συνδέεται με την παθοφυσιολογία του ΣΑΑΥ, είναι γνωστό ότι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων φλεγμονωδών κυτταροκινών, κυρίως της IL-6.
- δ. Η παρατηρούμενη φλεγμονώδης αντίδραση στο ΣΑΑΥ μπορεί να είναι εντοπισμένη αλλά και γενικευμένη. Έχει παρατηρηθεί φλεγμονή των βρόγχων σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΑΑΥ, όπως αυτή ορίζεται από τη διήθησή τους από ουδετερόφιλα, την αύξηση της συγκέντρωσης της IL-8 στο υπερκείμενο βρογχικών εκκρίσεων και την αύξηση του εκπνεόμενου NO. Τα επίπεδα των δεικτών της φλεγμονής των βρόγχων συσχετίζονται θετικά με τους δείκτες υποξίας (AHI, δείκτης αποκορεσμού της αιμοσφαιρίνης) [50].
- ε. Το ΣΑΑΥ είναι πιο συχνό σε παχύσαρκους άνδρες μέσης ηλικίας. Οι απνοϊκοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερα ποσοστά κοιλιακού λιπώδους ιστού, καθώς και αυξημένα επίπεδα της ορμόνης λεπτίνης [5]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αύξηση του λιπώδους ιστού οδηγεί, άμεσα ή έμμεσα, σε αύξηση της παραγωγής IL-6, TNF-α και IL-8 [13, 51].

Το γεγονός ότι το ΣΑΑΥ έχει συσχετιστεί με βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων και ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, σε βαθμό που να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη νόσηση από παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, οδήγησε στη διερεύνηση των επιπέδων στον ορό δεικτών, που ήδη έχουν συνδεθεί με καρδιαγγειακή νοσηρότητα, όπως οι CRP, sCD40L, sP-σελεκτίνη, ICAM-1, VCAM-1, sL-σελεκτίνη, sE-σελεκτίνη [52, 53, 54, 55, 56, 57]. Η CRP είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, τα επίπεδα της οποίας μέσω επιδημιολογικών μελετών έχουν συσχετιστεί με την αθηροσκλήρυνση και τη στεφανιαία νόσο [58]. Τα επίπεδα της CRP βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στον ορό απνοϊκών ασθενών, σε σχέση με παχύσαρκους μάρτυρες και έχουν θετική συσχέτιση, τόσο με τα επίπεδα της IL-6, όσο και με τη βαρύτητα του ΣΑΑΥ [51, 52]. Η χρήση nCPAP μείωσε τα επίπεδα των IL-6 και CRP στον ορό στους ίδιους ασθενείς. Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και sL-



σελεκτίνης βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με ΣΑΑΥ πριν από τον ύπνο σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Μετά από τον ύπνο, όμως, μόνο τα επίπεδα των ICAM-1 και sL-σελεκτίνης παρέμειναν αυξημένα. Είναι πιθανό ότι το υποξικό stress, στο οποίο υποβάλλονται οι ασθενείς κάθε βράδυ, οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενδοθηλίου με αυξημένη παραγωγή και έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων καθώς και στην κυκλοφορία. Επίσης, τα επίπεδα των sCD40L, sP-σελεκτίνης έχουν βρεθεί αυξημένα και έχουν θετική συσχέτιση με τους δείκτες υποξίας και τη βαρύτητα του ΣΑΑΥ. Την πιθανότητα το υποξικό ερέθισμα να προκαλεί χρόνια και συνεχή φλεγμονή στο ενδοθήλιο ενισχύει το γεγονός ότι η χρήση του nCPAP μειώνει τα επίπεδα των ICAM-1, VCAM-1, sL-σελεκτίνης, sCD40L και sP-σελεκτίνης στον ορό. Επιπλέον, τα επίπεδα του VEGF βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού ΣΑΑΥ και συσχετίζονται θετικά με το βαθμό αποκορεσμού του οξυγόνου. Η αυξημένη κυκλοφορία του VEGF στον ορό μπορεί να θεωρηθεί ως μηχανισμός απάντησης στην υποξία, στην οποία εκτίθενται οι ασθενείς κατά τη διάρκεια του ύπνου λαμβάνοντας, όμως, υπόψη ότι τα επίπεδά του στον ορό δεν αντικατοπτρίζουν και την παραγωγή του από το ενδοθήλιο, αφού σε αυτά συμβάλλουν και άλλες πηγές, όπως τα αιμοπετάλια [59]. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τις ανοσιακές παραμέτρους που σχετίζονται με τη φλεγμονή στο ΣΑΑΥ είναι ελάχιστες, με μικρή συμμετοχή ασθενών και τα συμπεράσματα έχουν προκύψει από μετρήσεις των δεικτών φλεγμονής που κυκλοφορούν στον ορό, γεγονός που δεν αντανακλά απαραίτητα την έκφραση των παραπάνω μορίων από τα ανοσοδραστικά κύτταρα.

Η έκφραση των γονιδίων των κυτταροκινών και των μορίων προσκόλλησης που έχουν μελετηθεί, εξαρτάται από τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Ο NF-κΒ είναι ευαίσθητος στα επίπεδα του οξυγόνου, ενεργοποιείται από τα επίπεδα των ROS και οδηγεί στην έκφραση περισσότερων των 200 γονιδίων συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που προάγουν τη φλεγμονή και την αθηροσκλήρυνση. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα του NF-κΒ στα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα των απνοϊκών ασθενών [60, 61]. Η δραστηριότητα αυτή συνοδευόταν από αυξημένα επίπεδα στον ορό του VCAM-1 και της sE-σελεκτίνης (τα γονίδια τους εξαρτώνται από τη δράση του NF-κΒ) στους ίδιους ασθενείς. Η δραστηριότητα του NF-κΒ σχετιζόταν θετικά με τη βαρύτητα του συνδρόμου αλλά ήταν ανεξάρτητη του BMI των ασθενών.

Το υποξικό ερέθισμα οδηγεί στην παραγωγή ROS, τα οποία είναι τοξικά για τις βιομεμβράνες και συμβάλλουν στο οξειδωτικό stress, που υποστηρίζεται ότι χαρακτηρίζει το ΣΑΑΥ και εμπλέκεται στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα. Τα ευρήματα από τους δείκτες του ορού των ασθενών με ΣΑΑΥ που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του οξειδωτικού stress (υπεροξειδωση των λιπιδίων, δραστηριότητα του

ενζύμου SOD, δοκιμασία D-ROM, δοκιμασία TEAC) είναι αντιφατικά. Κάποιες μελέτες διαπιστώνουν αυξημένα επίπεδα ROS και TBARS στην κυκλοφορία καθώς και 8-ισοπροτανίου σε συμπυκνώματα εκπνεόμενου αέρα ασθενών [62, 63, 64], τα οποία παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη βαρύτητα του ΣΑΑΥ, και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μόνο των ασθενών που πάσχουν από σοβαρής μορφής σύνδρομο [65]. Άλλες μελέτες, όμως, δεν διαπίστωσαν διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού stress μεταξύ ασθενών και μαρτύρων [9, 66, 67] και υποστηρίζουν ότι στο ΣΑΑΥ υπάρχει ροπή προς τη φλεγμονώδη αντίδραση. Αντίθετα με τα ευρήματα στον ορό, έχει δειχθεί ότι, τόσο τα μονοκύτταρα, όσο και τα ουδετερόφιλα απνοϊκών ασθενών παράγουν αυξημένα ποσά υπεροξειδίου μετά από ενεργοποίησή τους με κατάλληλους διεγέρτες (PMA, fMLP, calcium ionophore A23) [68, 69]. Η παρατηρούμενη αύξηση μπορεί να αντιστραφεί με τη χρήση του nCPAP. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου δεν συσχετίζεται με τους δείκτες υποξίας και τη βαρύτητα του ΣΑΑΥ, υπονοώντας ότι δεν είναι η υποξία το ερέθισμα που οδηγεί στην ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων. Είναι γνωστό, παρόλ' αυτά, ότι άλλοι παράγοντες που ανευρίσκονται αυξημένοι στο ΣΑΑΥ, όπως η IL-6 και ο TNF- $\alpha$ , είναι ισχυρότατοι διεγέρτες της παραγωγής υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, με τη σειρά τους, κινητοποιούν μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης και καρδιαγγειακής νοσηρότητας.

### *1.3.2. Διαταραχές υποπληθυσμών των ανοσοδραστικών κυττάρων*

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και της σχέσης της με το ανοσιακό σύστημα και το ενδοθήλιο στο ΣΑΑΥ, έχουν μελετηθεί φαινοτυπικά και λειτουργικά υποπληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρυνση, όπως τα μονοκύτταρα, τα  $\gamma\delta^+$  T-λεμφοκύτταρα και τα CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα των ασθενών [69, 70, 71]. Πρώτον, βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται τα μόρια προσκόλλησης CD15 και CD11c στα μονοκύτταρα των απνοϊκών ασθενών, συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες [69]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα ίδια μονοκύτταρα προσκολλώνται πιο ισχυρά σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε καλλιέργεια *in vitro* και ότι τα μονοκύτταρα των μαρτύρων μετά από έκθεσή τους σε υποξία *in vitro* αύξησαν τα επίπεδα του CD15 στην επιφάνειά τους σε συγκρίσιμα ποσοστά με αυτά των απνοϊκών ασθενών. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι τα μόρια CD15 και CD11c μεσολαβούν τη σύνδεση των ενεργοποιημένων μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων με συνεπακόλουθη βλάβη του. Η υπερέκφραση των CD15 και CD11c συνοδεύεται από αυξημένη ενδοκυττάρια παραγωγή ROS, τόσο χωρίς αλλά και με διέγερση με PMA. Το ίδιο δεν παρατηρήθηκε σε άλλους υποπληθυσμούς των μονοκυττάρων, όπου είτε δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά (CD11b<sup>+</sup>) ή παρουσιάστηκε μόνο μετά από διέγερση με PMA (CD64<sup>+</sup>). Στα ουδετερόφιλα

πολυμορφοπύρρηνα, η αυξημένη παραγωγή ROS περιορίστηκε στους CD11c<sup>+</sup> και CD64<sup>+</sup> πληθυσμούς, οι οποίοι παράλληλα είναι σε θέση να ενισχύσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η χρήση του nCPAP μείωσε τα επίπεδα των CD15 και CD11c, την παραγωγή ROS από τα CD11c<sup>+</sup> μονοκύτταρα και την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Δεύτερον, τα γδ<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα των ασθενών υπερέκφραζαν τον κατασταλτικό υποδοχέα NKB1 και την L-σελεκτίνη, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη ενδοκυττάρια παραγωγή των IL-8 και TNF-α από αυτά, καθώς επίσης μειωμένη ήταν και η παραγωγή της IL-10 [70]. Τα γδ T-λεμφοκύτταρα των ασθενών προσκολλώνταν πιο ισχυρά σε μη ενεργοποιημένα, καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και η χρήση αντι-E/P-σελεκτίνης και αντι-TNF-α αντισωμάτων ήταν σε θέση να μειώσει την προσκόλληση των κυττάρων των ασθενών. Η κυτταρολυτική ικανότητα των γδ<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων των ασθενών έναντι καλλιεργημένων ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των μαρτύρων και μπορούσε να μειωθεί, αν προηγείτο η χρήση αντι-TNF-α. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα ποσοστά των υποπληθυσμών των γδ<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων που φέρουν τους δείκτες CD56 και CD16. Επιπλέον, η απομάκρυνση των CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> κυττάρων από τον ολικό πληθυσμό οδήγησε σε μικρή μόνο μείωση της κυτταρολυτικής τους ικανότητας.

Τρίτον, τα CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα των ασθενών παρουσίαζαν αυξημένη κυτταρολυτική δράση έναντι των κυττάρων K562 και HUVECs σε σχέση με τους μάρτυρες [71]. Η αυξημένη κυτταρολυτική ικανότητα φάνηκε να εξαρτάται από την παρουσία της περφορίνης και των υποδοχέων CD56, CD16, μόρια τα οποία βρέθηκαν επίσης αυξημένα στα CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα των ασθενών. Ο υποπληθυσμός των CD56<sup>bright</sup> κυττάρων, ο οποίος πιστεύεται ότι μεσολαβεί τις αρχικές διαντιδράσεις με το αγγειακό ενδοθήλιο, ήταν αυξημένος. Η χρήση του nCPAP μείωσε τόσο την κυτταρολυτική δράση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων όσο και την έκφραση του CD56 και είχε θετική συσχέτιση με την έκφραση του κατασταλτικού υποδοχέα NKB1.

## **2. Υποξία και ανοσιακό σύστημα**

Τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, καθώς διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν από το αίμα στους διάφορους ιστούς, όπου καλούνται να ασκήσουν τη δράση τους, εκτίθενται τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία). Είναι γνωστό ότι το εξωκυττάριο περιβάλλον διαφόρων ιστών υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι υποξικό [72], όπως επίσης και αυτό που χαρακτηρίζει τη χρόνια φλεγμονή και τον καρκίνο. Οι υποξικές συνθήκες που επικρατούν στο φυσιολογικό θύμο αδένια, αντιπροσωπεύουν μια αυστηρά ρυθμιζόμενη παράμετρο, αφού η υποξία έχει δείχθει ότι συμβάλλει στην επιβίωση των θυμοκυττάρων. Ακόμα και

στις ανατομικές περιοχές του φυσιολογικού σπληνός και των λεμφαδένων, που θεωρούνται μη υποξικές, τα επίπεδα του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλότερα από τα αναμενόμενα, σε σχέση με το P<sub>O<sub>2</sub></sub> του εισπνεόμενου αέρα [73].

Οι υποξικές συνθήκες φαίνεται ότι δεν είναι οι βέλτιστες για την αποτελεσματικότητα της ανοσιακής απάντησης, μιας και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη βακτηριοκτόνο δράση των φαγοκυττάρων και τη κυτταρολυτική δράση των λεμφοκυττάρων καθώς και για τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι η ανοσιακή απάντηση έναντι βακτηρίων, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* και *Chlamydia trachomatis*, είναι μειωμένη σε υποξικές συνθήκες [74].

## 2.1. Ο ρόλος του HIF-1

Ένα πλήθος μηχανισμών φαίνεται ότι εξυπηρετεί την προσαρμογή των ανοσοδραστικών κυττάρων στην υποξία, περισσότερο μελετημένος από οποίους είναι η αύξηση των επιπέδων και της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (HIF-1α και HIF-1β). Η ενεργοποίηση του HIF-1 επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς γλυκόζης, γλυκολυτικών ενζύμων, του παράγοντα VEGF και της συνθάσης του NO. Η δράση του πρωταρχικά είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας από τα ανοσοκύτταρα σε συνθήκες υποξίας μέσω της γλυκόλυσης (αντί της αναπνοής σε αερόβιες συνθήκες), καθώς και η προαγωγή της αγγειογένεσης, με τελικό σκοπό την επιβίωση των ανοσοκυττάρων [74].

Η σημασία του HIF-1 για την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος φάνηκε από τη μελέτη της ανεπάρκειάς του σε χιμαιρικά Hif<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> ποντίκια [75]. Τα αποτελέσματα της ανεπάρκειας εντοπίστηκαν σε συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, τη B-σειρά, όπου παρατηρήθηκαν μη φυσιολογικά B-1 λεμφοκύτταρα του περιτοναίου (με υψηλή έκφραση του δείκτη CD45), διαταραχές της ωρίμανσης των B-2 λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών, καθώς και εκδηλώσεις αυτοανοσίας (ύπαρξη αντι-dsDNA αντισωμάτων, εναποθέσεις IgG και IgM στους νεφρούς και πρωτεϊνουρία).

Από τη στιγμή που διαπιστώθηκε η ύπαρξη της ισομορφής I.1 του HIF-1α σε ενεργοποιημένα μέσω TCR T-κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του HIF-1α μεσολαβείται και από μη υποξικά μονοπάτια που έχουν σχέση με τον TCR και το PI3K. Προτάθηκε, λοιπόν, η άποψη ότι ο HIF-1α έχει ρυθμιστικό ρόλο στις λειτουργίες των T-κυττάρων στα σημεία φλεγμονής και υποξίας [74]. Σε μελέτες που έγιναν σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια βρέθηκε ότι: (α) Στα ποντίκια που αποσιωπήθηκε η ισομορφή I.1 (I.1<sup>-/-</sup> ποντίκια), δεν παρατηρήθηκε εμβρυϊκός θάνατος ούτε φαινοτυπικές διαφορές στα θυμοκύτταρα και στα T-κύτταρα σε σχέση με τα άγριου τύπου (wild type) ζώα. (β)

Ποντίκια των οποίων τα T-κύτταρα δεν εκφράζουν καμία ισομορφή του HIF-1α, βρέθηκε ότι παράγουν και εκκρίνουν περισσότερη IFN- $\gamma$  από τα άγριου τύπου ζώα μετά από ενεργοποίηση μέσω του TCR. Η παρατήρηση ισχύει και για τα CD4<sup>+</sup> και για τα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα. (γ) Η έλλειψη της ισομορφής (I.1<sup>-/-</sup> ποντίκια) οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 και IL-13 από κύτταρα των λεμφαδένων μετά από TCR-ενεργοποίηση, τόσο σε υποξικές όσο και σε μη υποξικές συνθήκες. (δ) Παρόλο που η ισομορφή I.1 αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του ολικού HIF-1α (<30%) στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, είναι αρκετή για να πυροδοτήσει την παραγωγή κυτταροκινών.

Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι, παράλληλα με το ρόλο του στην ομοιόσταση του O<sub>2</sub>, ο HIF-1α ρυθμίζει αρνητικά τις λειτουργίες των T-κυττάρων [76], χωρίς να έχει καταστεί δυνατή η μελέτη του ρόλου του στη λειτουργία των B-κυττάρων, κάτι που δεν ισχύει για τα κύτταρα της μυελικής σειράς [74]. Είναι γνωστό ότι τα ουδετερόφιλα διαφεύγουν της απόπτωσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> μέσω της μεσολαβούμενης από το HIF-1α ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B [77]. Θεωρείται ότι ο HIF-1α προσφέρει τον απαιτούμενο χρόνο στα ουδετερόφιλα για την παραγωγή ενέργειας και για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, με τις οποίες θα εκδηλωθεί η δράση τους σε συνθήκες υποξίας. Η αποσιώπηση του γονιδίου του HIF-1α στα κύτταρα της μυελικής σειράς ποντικών οδήγησε σε αντιφατικά αποτελέσματα [78, 79]. Σε ένα μοντέλο ζώων, η αποσιώπηση οδήγησε σε μείωση του μεταβολισμού, της βακτηριοκτόνου δράσης και της μετανάστευσης των μυελοκυττάρων [78], ενώ σε άλλο μοντέλο δεν επηρέασε τη συσσώρευσή τους στα σημεία της φλεγμονής και την παραγωγή ROS [79]. Και στα δύο μοντέλα, όμως, η ικανότητα των HIF-1α<sup>-/-</sup> ουδετεροφίλων να σκοτώνουν Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια ήταν μειωμένη. Παρουσιάζει, λοιπόν, ενδιαφέρον το γεγονός ότι η αποσιώπηση του HIF-1α στα κύτταρα της μυελικής σειράς ευοδώνει αντιφλεγμονώδεις εκδηλώσεις, ενώ στα T- και B-κύτταρα οδηγεί σε αυτοάνοσες εκδηλώσεις και ιστική βλάβη. Επιβεβαιώνεται η άποψη περί ανοσοκατασταλτικής δράσης της υποξίας και αντιστάθμισής της από τον HIF-1α, ο οποίος προστατεύει τα ανοσοκύτταρα για να μπορέσουν να επιτελέσουν τη λειτουργία τους σε υποξικές συνθήκες [74].

Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ένας ρόλος της υποξίας ρυθμιστικός του ανοσιακού συστήματος, τον οποίο εξυπηρετεί ο HIF-1α, μέσω του οποίου το μικροπεριβάλλον των ιστών που φλεγμαίνουν είναι σε θέση να ελέγξει την ανοσιακή απάντηση *in situ* [80, 81, 83]. Έχει βρεθεί ότι η υποξία που επικρατεί στους φλεγμαίνοντες ιστούς προστατεύει τα T-κύτταρα από τον επαγόμενο από το αντιγόνο κυτταρικό θάνατο (antigen-induced cell death, AICD), μια διαδικασία που πυροδοτείται από σήμα ενεργοποίησης του συμπλόκου αντιγόνο/TCR/CD3 [82]. Η υποξία, επάγοντας τη δράση του HIF-1α, οδηγεί στην έκφραση της αδρενομεδουλίνης (adrenomedullin, AM) πιθανώς

μέσω αυτοκρινούς μηχανισμού (autocrine regulatory loop mechanism), όπως φάνηκε από τη γονιδιακή ανάλυση DNA μικροσυστοιχιών στα T-κύτταρα σε υποξικές συνθήκες μετά από διέγερση του TCR/CD3. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι για τα T-κύτταρα η υποξία από μόνη της δεν είναι αρκετή για να παραχθεί και να δράσει ο HIF-1α, αλλά απαιτείται και διεγερτικό ερέθισμα από το σύμπλοκο TCR/CD3 κάτι που δεν ισχύει για τα καρκινικά κύτταρα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπό υποξικές συνθήκες αλλά επί απουσίας διεγερτικού σήματος TCR/CD3 τα T-κύτταρα δεν μπορούν να αποφύγουν το θάνατο. Αντίθετα, υπό υποξικές συνθήκες η παρουσία του διεγερτικού σήματος TCR/CD3 τα προστατεύει από το θάνατο και ευοδώνει την επιβίωση τους. Επιτρέπεται με αυτόν τον τρόπο η επιλεκτική επιβίωση των αντιγονο-ειδικών T-κυττάρων στις περιοχές της υποξίας (φλεγμονή, καρκίνος) με στόχο την εκδήλωση της δράσης τους.

## 2.2. Ο ρόλος των Kv1.3 διαύλων καλίου

Οι Kv1.3 δίαυλοι καλίου αντιπροσωπεύουν έναν άλλο μηχανισμό αντίληψης και προσαρμογής των T-κυττάρων στην υποξία. Τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν ευαίσθητους στο O<sub>2</sub> διαύλους, δηλαδή διαύλους K<sup>+</sup> εξαρτώμενους από το δυναμικό (Kv) και διαύλους που ενεργοποιούνται από το ασβέστιο (K<sub>(Ca)</sub>). Συγκεκριμένα, οι δίαυλοι K<sup>+</sup> επηρεάζουν έμμεσα το σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβείται από τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> για τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών, ρυθμίζοντας το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης τους [83]. Οι δίαυλοι Kv1.3 εκφράζονται από τα μη ενεργοποιημένα T-κύτταρα και η αναστολή τους καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και την έκκριση κυτταροκινών από αυτά [82, 84]. Έχει παρατηρηθεί ότι η υποξία επιδρά με δύο τρόπους στους ευαίσθητους στο O<sub>2</sub> διαύλους. Με έναν οξύ, ο οποίος εκδηλώνεται μέσα σε λεπτά, στα οποία αναστέλλεται η λειτουργία τους και με ένα χρόνιο, μετά από παρατεταμένη έκθεση στην υποξία, όπου μειώνεται η έκφραση από τα κύτταρα των ιδίων των διαύλων [85]. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τους Kv1.3 διαύλους των T-κυττάρων [86]. Η οξεία έκθεση στην υποξία (20 mmHg, 2 min) ανθρώπινων T-κυττάρων και λευχαιμικών Jurkat T-κυττάρων ανέστειλε τα Kv1.3 ρεύματα και στους δύο τύπους κυττάρων κατά 20%. Η παρατεταμένη έκθεση στην υποξία (1% O<sub>2</sub>, 24 ώρες) μείωσε εκλεκτικά τα Kv1.3 πρωτεϊνικά επίπεδα κατά 47% και η μείωση αυτή δεν συνοδευόταν από μείωση του Kv1.3 mRNA αλλά από σημαντική μείωση της πυκνότητας του K<sup>+</sup> ρεύματος [83].

Η επίδραση της υποξίας στη διαδικασία ενεργοποίησης των T-κυττάρων μέσω TCR, δεδομένης της αναστολής που αυτή προκαλεί στους Kv1.3 διαύλους [87], έδειξε ότι η υποξική αναστολή των Kv1.3 διαύλων οδηγεί σε αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, διαταραχή του μεμβρανικού δυναμικού, διαταραχή της φυσιολογικής μετακίνησης του Ca<sup>2+</sup> και αναστολή της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Η

είσοδος ιόντων  $Ca^{2+}$  στο T-κύτταρο που έπεται της σύνδεσης TCR-αντιγόνου, αποτελεί κομβικό γεγονός για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και μεσολαβείται από διαφόρους διαύλους ιόντων της επιφάνειας των T-κυττάρων μεταξύ των οποίων και οι δίαυλοι  $Kv1.3$  και  $K_{(Ca)}$ . Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο το 50% του πληθυσμού των T-κυττάρων αντιδρά στην υποξία με μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$ . Διατυπώθηκε, κατόπιν αυτού, η άποψη ότι η ευαισθησία στην υποξία μπορεί να εξαρτάται από την κατάσταση ενεργοποίησης των T-κυττάρων και από την αναλογία των διαύλων  $Kv1.3/K_{(Ca)}$  στην επιφάνειά τους [84]. Μέχρι στιγμής, στην προσπάθεια διερεύνησης του σηματοδοτικού μονοπατιού που κατά την υποξία ξεκινά από την αντίληψη των επιπέδων  $O_2$  από τους διαύλους  $Kv1.3$ , έχει διαπιστωθεί ότι η src-τυροσινική κίνηση Lck είναι απαραίτητη για την οξεία απόκριση στην υποξία, αφού προσδίδει στους διαύλους  $Kv1.3$  την ευαισθησία προς το  $O_2$  [88]. Η ενεργοποίηση της Lck επέρχεται πολύ γρήγορα μετά από τη σύνδεση του TCR με το αντιγονικό πεπτιδίον, με σκοπό την ενεργοποίηση του T-κυττάρου [89] αλλά δεν είναι σε θέση η ίδια να αναστείλει τους διαύλους. Φαίνεται ότι η λειτουργία της αφορά τη σταθεροποίηση της τυροσινο-φωσφορυλιωμένης μορφής των διαύλων  $Kv1.3$ , με σκοπό τη σωστή απόκριση τους σε συνθήκες υποξίας.

### **2.3. Η επίδραση της υποξίας στους υποπληθυσμούς των ανοσοδραστικών κυττάρων**

Από τις μέχρι τώρα μελέτες, κυρίως σε ποντίκια, φαίνεται ότι η υποξία δεν επιδρά με τον ίδιο τρόπο στα T- και τα B-λεμφοκύτταρα. Τα B-κύτταρα είναι σε θέση να παράγουν ανοσοσφαιρίνες σε υποξικές συνθήκες, ενώ η λειτουργία των T-κυττάρων παρεμποδίζεται από την υποξία [74]. Χαρακτηριστικά, έχειδειχθεί ότι η υποξία επηρεάζει διαφορετικά τα διαφοροποιημένα CTL από τα κύτταρα που βρίσκονται σε διαδικασία διαφοροποίησης [90]. Η λειτουργία των CTL, όπως αυτή καθορίζεται από την ικανότητα τους να λύουν κύτταρα-στόχους, δεν επηρεάζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, αφού τα χαμηλά επίπεδα είναι απαραίτητα για την εκδήλωση της δράσης τους. Αντίθετα, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των CTL, καθώς και οι κυτταροκίνες που παράγονται, διαφέρουν σε συνθήκες 2,5% έναντι 20% οξυγόνου. Παρά το γεγονός ότι δεν ευνοείται η ανάπτυξη των CTL σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, αυτά που επιβιώνουν είναι πιο ενεργοποιημένα και πιο λυτικά. Μια πιθανή εξήγηση για την παραπάνω παρατήρηση είναι η εκλεκτική επιβίωση αυτών που χαρακτηρίζονται ως  $TCR^{high} LFA^{high}$  CTL, μιας και η αυξημένη πυκνότητα των μορίων TCR και LFA (υπεύθυνα για την αναγνώριση του αντιγόνου και λειτουργία ως μόριο προσκόλλησης, αντίστοιχα) στην επιφάνειά τους είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της λυτικής τους δράσης. Επίσης, η υποξία ευνοεί τη μεταγραφή γονιδίων

των κυτταροκινών που περιέχουν το HRE, όπως αυτό του VEGF, σε σχέση με αυτά που δεν περιέχουν HRE, όπως αυτά της IFN- $\gamma$  και της IL-2.

Αντίθετα με αυτό που συμβαίνει στα CTL, η λυτική ικανότητα των NK-κυττάρων μειώνεται σε συνθήκες υποξίας, καθώς και η ενεργοποίησή τους από την IFN- $\alpha$  [91]. Σε ότι αφορά τα Th κύτταρα δεν έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής εμπεριστατωμένες έρευνες για τη διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας. Φαίνεται, όμως, ότι η υποξία αλλάζει την ισορροπία μεταξύ των Th1 και των Th2 κυττάρων με τη ζυγαριά να γέρνει προς τη Th2 κατεύθυνση [74].

Τα μακροφάγα υπό συνθήκες υποξίας αυξάνουν την παραγωγή των TNF, των TNF υποδοχέων και της IL-1 καθώς και την έκφραση των μορίων CD11 $\beta$  και CD18 ( $\alpha_M$ -ιντεγκρίνη και  $\beta_2$ -ιντεγκρίνη, αντίστοιχα). Τα τελευταία είναι πιθανό ότι διευκολύνουν τη μετανάστευση των κυττάρων από τα αγγεία προς τους φλεγμαίνοντες υποξικούς ιστούς. Η φαγοκυτταρική τους ικανότητα είναι μειωμένη, εντούτοις, μιας και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και τη διατήρηση του pH των λυσοσωμάτων. Από μελέτες σε ποντίκια υπάρχουν ενδείξεις ότι η υποξία αναστέλλει τη φλεγμονώδη δράση των ουδετεροφίλων, με σκοπό την προστασία των ιστών, π.χ. του πνεύμονα από την υπέρμετρη δράση τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Τα γονίδια, η έκφραση των οποίων στα μονοκύτταρα έχει δειχθεί ότι αυξάνεται μετά από έκθεση των κυττάρων στην υποξία (τροποποιημένος από 92).

Λειτουργίες	Γονίδια	Περιγραφή γονιδίων	Αύξηση έκφρασης
Αγγειογένεση	<i>ADM</i>	Αδρενομεδουλίνη	2,8
	<i>CALCRL</i>	Υποδοχέας ανάλογος της καλσιτονίνης	1,5
	<i>F3</i>	Παράγοντας πήξης III (ιστικός παράγοντας)	4,5
	<i>FGF1</i>	Όξινος ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 1	1,9
	<i>FLT1</i>	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων 1	14,8
	<i>MIF</i>	Ανασταλτικός της μετανάστευσης των μακροφάγων παράγοντας	10,1
	<i>SPP1</i>	Εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (οστεοποντίνη)	28,0
	<i>VEGF</i>	Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων	7,5
	<i>WNT5A</i>	Wingless-type 5A	1,7
Απόπτωση	<i>BCAT1</i>	Αμινοτρανσφεράση με διακλαδιζόμενες αλυσίδες 1	3,0
	<i>BNIP3</i>	BCL2/αδενοϊκή E1B 19-kDa-συνδεδεμένη πρωτεΐνη 3	16,5
	<i>BNIP3L</i>	BCL2/αδενοϊκή E1B 19-kDa – ανάλογος της συνδεδεμένης πρωτεΐνης 3	4,0
	<i>MCL1</i>	Αλληλουχία μυελογενούς λευχαιμίας 1 (BCL2-σχετιζόμενη)	1,8



Λειτουργίες	Γονίδια	Περιγραφή γονιδίων	Αύξηση έκφρασης
	<i>TNF</i>	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων	1,6
Κυτταρική προσκόλληση/Θεμέλιος ουσία	<i>F3</i>	Παράγοντας πήξης III (ιστικός παράγοντας)	4,5
	<i>MMP1</i>	Μεταλλοπρωτεϊνάση του στρώματος 1 (διάμεσος κολλαγονάση)	15,6
	<i>FN1</i>	Φιμπρονεκτίνη 1	2,0
	<i>SPP1</i>	Εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (οστεοποντίνη)	28,0
	<i>TIMP-1</i>	Ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης 1	1,5
Κυτταρικός κύκλος/διαφοροποίηση	<i>ADM</i>	Αδρενομεδουλίνη	2,8
	<i>BCAT1</i>	Αμινοτρανσφεράση με διακλαδιζόμενες αλυσίδες 1	3,0
	<i>CCNG2</i>	Κυκλίνη G2	1,8
	<i>INHBA</i>	Ανασταλτίνη β A (ακτιβίνη A)	4,0
	<i>MET</i>	Πρωτοογκογονίδιο <i>met</i> (Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων)	1,8
	<i>NDRG1</i>	Γονίδιο 1 που ρυθμίζεται από το <i>N-myc</i> (downstream)	4,1
	<i>NPM1</i>	Νουκλεοφοσμίνη	1,5
Μεταφορά γλυκόζης	<i>SLC2A1 (GLUT1)</i>	Οικογένεια 2 του μεταφορέα διαλυτών ουσιών (μεταφορέας γλυκόζης), μέλος 1	3,3
	<i>SLC2A3 (GLUT3)</i>	Οικογένεια 2 του μεταφορέα διαλυτών ουσιών (μεταφορέας γλυκόζης), μέλος 3	5,8
Γλυκόλυση	<i>ALDOA</i>	Αλδολάση A	1,6
	<i>ALDOC</i>	Αλδολάση C	5,3
	<i>ENO1</i>	Ενολάση 1	3,0
	<i>ENO2</i>	Ενολάση 2	38,9
	<i>GAPDH</i>	Γλυκεραλδεΐδο-3-φωσφορική αφυδρογονάση	1,6
	<i>GPI</i>	Φωσφορική ισομεράση της γλυκόζης	7,2
	<i>HK2</i>	Εξοκινάση 2	1,8
	<i>LDHA</i>	Γαλακτική αφυδρογονάση A	2,1
	<i>PDK1</i>	Κινάση της πυρουβικής αφυδρογονάσης, ισοένζυμο 1	24,5
	<i>PFKFB4</i>	Διφωσφατάση 4 της 6-φωσφοφρουκτο-2-κινασοφρουκτόζης-2,6	2,0
	<i>PFKP</i>	Φωσφοφρουκτοκινάση, αιμοπετάλια	7,0
	<i>PGAM1</i>	Φωσφογλυκερική μουτάση 1	2,4
	<i>PGK1</i>	Φωσφογλυκερική κινάση 1	2,6
	<i>TPI1</i>	Τριοξοφωσφορική ισομεράση 1	2,3
Ανοσιακή απάντηση	<i>ADORA2B</i>	Υποδοχέας A2b της αδενοσίνης	2,5
	<i>ARG1</i>	Αργινάση I	2,8
	<i>CCL2</i>	Συνδέτης της χημειοκίνης (CC μοτίβο) 2 (MCP-1)	0,6
	<i>CCR5</i>	Υποδοχέας της χημειοκίνης (CC μοτίβο) 5	0,6
	<i>CD55 (DAF)</i>	Επιταχύνων τη διάσπαση παράγοντας του συμπληρώματος (decay accelerating factor for complement)	1,8

Λειτουργίες	Γονίδια	Περιγραφή γονιδίων	Αύξηση έκφρασης
	<i>CTSC</i>	Καθεψίνη C	0,3
	<i>CTSD</i>	Καθεψίνη D	0,5
	<i>CXCR4</i>	Υποδοχέας της χημειοκίνης (CC μοτίβο) 4	1,9
	<i>IL1A</i>	Ιντερλευκίνη 1-α	3,2
	<i>IL4</i>	Ιντερλευκίνη 4	1,8
	<i>IL1RN</i>	Ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνη 1	3,1
	<i>IL6</i>	Ιντερλευκίνη 6	3,8
	<i>MIF</i>	Ανασταλτικός της μετανάστευσης των μακροφάγων παράγοντας	10,1
	<i>OASE1</i>	2,5-ολιγοαδενυλική συνθετάση 1	0,5
	<i>OASE2</i>	2,5- ολιγοαδενυλική συνθετάση 2	0,5
	<i>SPP1</i>	Εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (οστεοποντίνη)	28,0
	<i>TNF</i>	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων	1,6
Μεταβολισμός (μη γλυκολυτικός)	<i>ADM</i>	Αδρενομεδουλίνη	2,8
	<i>AK3</i>	Αδενυλική κινάση 3	2,5
	<i>ARG1</i>	Αργινάση I	2,8
	<i>BCAT1</i>	Αμινοτρανσφεράση με διακλαδιζόμενες αλυσίδες 1	3,0
	<i>CA12</i>	Καρβονική ανυδράση XII	3,9
	<i>EGLN1</i>	Egl nine homolog 1	4,6
	<i>ERO1L</i>	ΑΑνάλογο του ERO1	3,3
	<i>GBE1</i>	Πλευρικό ένζυμο 1 της γλυκάνης (1,4-α)	3,0
	<i>P4HA1</i>	Προκολλαγόνο-Προλίνη (2-oxoglutarate 4-dioxygenase I)	4,5
	<i>P4HA2</i>	Προκολλαγόνο-Προλίνη (2-oxoglutarate 4-dioxygenase II)	2,2
	<i>PAM</i>	Peptidylglycine α-amidating monoxygenase	4,1
	<i>PTGS2</i>	Συνθάση των προσταγλανδινών και κυκλοοξυγενάση 2	3,6
	<i>VLDLR</i>	Υποδοχέας πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης	5,3
Απάντηση στο stress	<i>DDIT4</i>	RTP801 που απαντά στο HIF-1	3,1
	<i>HIG2</i>	Επαγόμενη από την υποξία πρωτεΐνη 2	9,7
	<i>WSB1</i>	Πρωτεΐνη SWiP-1 που περιέχει SOCS box WD	2,4
Μεταγραφή/ Σηματοδότηση	<i>BACH1</i>	Καταστολέας της μεταγραφής Bach1	1,8
	<i>BHLHB2</i>	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	2,4
	<i>EGR1</i>	Early growth response 1	2,2
	<i>ENO1</i>	Ενολάση 1	3,0
	<i>ID2</i>	Αναστολέας της σύνδεσης του DNA 2	1,6
	<i>JMJD1A</i>	Zinc finger πρωτεΐνη	3,2
	<i>JUN</i>	Ογκογονίδιο <i>Jun</i>	2,2
	<i>MXI1</i>	Πρωτεΐνη 1 που αλληλεπιδρά με MAX	4,5
	<i>RAB7</i>	Μέλος της οικογένειας του ογκογονιδίου RAS	0,6

<b>Λειτουργίες</b>	<b>Γονίδια</b>	<b>Περιγραφή γονιδίων</b>	<b>Αύξηση έκφρασης</b>
	<i>NPM1</i>	Νουκλεοφосμίνη	1,5
	<i>SNAPC1</i>	Σύμπλεγμα που ενεργοποιεί το μικρό πυρηνικό RNA, πολυπεπίδιο 1	3,6

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα αθροίζονται εκλεκτικά σε υποξικές περιοχές των ιστών που φλεγμαίνονται, όπου έχει δείχθει ότι η υποξία τροποποιώντας την έκφραση του γονιδιώματός τους επηρεάζει τις φλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες [92]. Οι αλλαγές της έκφρασης αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν αγγειογενετικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, πρωτεΐνες του στρώματος, υποδοχείς υπολειμμάτων (scavenger receptors), μόρια προσκόλλησης και συνδιεγερτικά μόρια (πίν. 3). Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι η υποξία ελέγχει αυστηρά και το δίκτυο των χημειοκινών στα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς, όχι μόνο με τη ρύθμιση της παραγωγής συγκεκριμένων χημειοκινών από αυτά, αλλά και με τη ρύθμιση της δράσης τους μέσω αλλαγών στους υποδοχείς τους. Για παράδειγμα, σε συνθήκες υποξίας, έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση των CCL3, CXCL1, CXCL8 και CXCR4, καθώς και αναστολή των CCL2 και CCR5. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η υποξία επάγει την έκφραση, την παραγωγή και την έκκριση της χημειοκίνης CCL20 από τα μονοκύτταρα, η οποία είναι χημειοτακτικός παράγοντας για τα άωρα δενδριτικά κύτταρα, τα ενεργοποιημένα μνημονικά T-κύτταρα και τα παρθένα B-κύτταρα. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι η υποξία, μέσω των αλλαγών που επιφέρει στο σύστημα των χημειοκινών, ενισχύει την προσέλκυση των πληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων στις φλεγμαίνουσες περιοχές, για να επιτελέσουν τη δράση τους.

#### **2.4. Η επίδραση της επανοξυγόνωσης**

Τέλος, λόγω του ότι, συνήθως, η έκθεση σε υποξία συνοδεύεται από H/R, μελετήθηκε η επίδρασή της στα κύτταρα και διαπιστώθηκε ότι οδηγεί στη δημιουργία τοξικών ROS. Η κυτταροτοξικότητα αυτή συνίσταται, κυρίως, σε βλάβη του DNA και, ειδικότερα, σε σχηματισμό μικροκυρήνων, μείωση του δείκτη κυταροκίνησης πολλαπλασιασμού (cytokinesis block proliferation index) και συνακόλουθη ενεργοποίηση των οδών επιδιόρθωσής του [93]. Αν η επιδιόρθωση δεν επιτύχει, το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο, μέσω απόπτωσης και όχι νέκρωσης. Το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται, περιλαμβάνει μείωση του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, ενεργοποίηση των κασπασών-9, και -3, καθώς και της PARP, και σε ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπάση-8/Bid/Bax [94, 95]. Επίσης, σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα υπό υποξικές συνθήκες, παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών p53 και p63, οι οποίες εμπλέκονται στη διαδικασία της επαγόμενης από το οξειδωτικό stress απόπτωσης [93, 95]. Η διαδικασία της απόπτωσης, σε αυτή την περίπτωση, εξαρτάται από την παρουσία ROS. Η αύξηση της έκφρασης της p53 δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών p21 και Bax, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν επηρεάζεται η επαγόμενη από την p53 ενεργοποίηση (transactivational activity). Αυτό που φαίνεται, ως εκ τούτου, να επηρεάζεται είναι ο κυτταρικός κύκλος. Η H/R, δηλαδή, ενεργοποιώντας κινάσες ελέγχου του κυτταρικού

κύκλου (checkpoint kinases), οδηγεί στη φωσφορυλίωση των Cdc25C και Cdc2 και προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M [93].

### 3. Η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου

Αν και το ΣΑΑΥ αφορά σε μεγάλο ποσοστό του γενικού πληθυσμού, όπως έχει ήδη αναφερθεί, διάφοροι λόγοι οδηγούν στην υποδιάγνωσή του, με αποτέλεσμα 93% των γυναικών και το 82% των ανδρών με ήπιο ή σοβαρό ΣΑΑΥ να παραμένουν αδιάγνωστοι [96]. Παρουσιάστηκε, λοιπόν, η ανάγκη αυστηρότερου προσδιορισμού των κριτηρίων που χαρακτηρίζουν το ΣΑΑΥ και ιδιαίτερα η ανάγκη χρησιμοποίησης καταλληλότερων τεχνικών για τη διάγνωσή του.

Παραδοσιακά, η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου θεωρείται η “gold standard” μέθοδος για τη διάγνωση του ΣΑΑΥ. Πρόκειται για μια μελέτη που διεξάγεται τη νύχτα για την καταγραφή πολλαπλών παραμέτρων που αφορούν τον ύπνο του ασθενούς. Οι πληροφορίες που συλλέγονται χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) σε αυτές που σχετίζονται άμεσα με τον ύπνο (ΗΕΓ, ηλεκτροοφθαλμογράφημα, ηλεκτρομυογράφημα), (β) σε αυτές που σχετίζονται με την καρδιακή λειτουργία (ΗΚΓ), και (γ) σε αυτές που σχετίζονται με την αναπνοή (ροή του αέρα, συμμετοχή των θωρακικών και κοιλιακών μυών στην αναπνοή, οξυμετρία). Η μελέτη αναλύεται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων δεικτών-διαγνωστικών κριτηρίων, που υποδεικνύουν, τόσο την παρουσία της διαταραχής της αναπνοής κατά τη διάρκεια του ύπνου, όσο και τη σοβαρότητά της. Συγκεκριμένα, οι δείκτες αυτοί είναι ο αριθμός των απνοιών και υποπνοιών, ο δείκτης απνοιών- υποπνοιών και ο αριθμός των μικροαφυπνίσεων. Τα προηγούμενα χρόνια διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια χρησιμοποιούνταν από διαφορετικά διαγνωστικά κέντρα για τη διάγνωση του ΣΑΑΥ, με αποτέλεσμα η αξιολόγηση και η σύγκριση των πολυσωματογραφικών μελετών μεταξύ τους να είναι δύσκολη. Το πρόβλημα αυτό έχει εξαλειφθεί τα τελευταία χρόνια, μετά από την αποδοχή των διαγνωστικών κριτηρίων που τέθηκαν από την Παγκόσμια Εταιρεία Διαταραχών της Αναπνοής στον Ύπνο [97]. Παρόλ' αυτά, η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου θεωρείται ότι δεν έχει αξιολογηθεί σε ότι αφορά στην εγκυρότητα και στην αξιοπιστία της, όπως θα έπρεπε για μια “gold standard” διαγνωστική δοκιμασία [98].

Ως *άπνοια* χαρακτηρίζεται η διακοπή της ροής του αέρα για τουλάχιστον 10 sec και ταξινομείται ως *αποφρακτική* ή *κεντρική* ανάλογα με την παρουσία ή όχι αναπνευστικής προσπάθειας. *Υπόπνοια*, σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικανικής Εταιρείας Ύπνου (όπως προέκυψε από το Chicago consensus conference 1999), είναι είτε η μείωση της ροής του αέρα (>50%) είτε η μείωση της ροής του αέρα (<50%), που συνοδεύεται από αποκορεσμό της αιμοσφαιρίνης (>3%), είτε η εμφάνιση μικροαφυπνίσεων που τεκμηριώνεται από ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα [99].

Οι *μικροαφυπνίσεις* είναι επεισόδια διάρκειας 3-15 sec κατά τη διάρκεια του ύπνου, που χαρακτηρίζονται από αιφνίδια μεταβολή της συχνότητας στο ΗΕΓ που μοιάζει με τη συχνότητα εγρήγορσης [95].

Ο *AHI* καθορίζει τη σοβαρότητα του συνδρόμου και αποτελεί το μέσο αριθμό απνοιών-υποπνοιών που παρατηρούνται ανά ώρα ύπνου.  $AHI > 5$  θεωρείται μη φυσιολογικός αλλά όχι απαραίτητα κλινικά σημαντικός. Παρουσιάζει ασθενή συσχέτιση με την αυξημένη ημερήσια υπνηλία, αυξάνεται φυσιολογικά με την ηλικία και δεν είναι σε θέση να προγνώσει θνητότητα ή θνησιμότητα [100]. Επίσης, για την εκτίμηση της βαρύτητας του συνδρόμου σημαντικός είναι και ο *δείκτης μικροαφυπνίσεων*, δηλαδή ο αριθμός των μικροαφυπνίσεων ανά ώρα ύπνου.

Ο κλασικός ορισμός του ΣΑΑΥ προϋποθέτει τη συνύπαρξη αυξημένου δείκτη απνοιών-υποπνοιών *AHI* με εκσεσημασμένη ημερήσια υπνηλία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει να θεωρείται ότι ένα άτομο πάσχει από το σύνδρομο, όταν παρουσιάζει  $AHI > 5$  και ταυτόχρονα πιστοποιούνται καρδιαγγειακές και νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις (κλινικά και εργαστηριακά) επί απουσίας ημερήσιας υπνηλίας. Το ΣΑΑΥ χαρακτηρίζεται ως ήπιο όταν  $5 < AHI < 15$ , ως μετρίου βαθμού όταν  $15 < AHI < 30$  και ως σοβαρού βαθμού όταν  $AHI > 30$ . Η αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων είναι καλή για το σοβαρό και μέτριο ΣΑΑΥ, ενώ για το ήπιο συχνά χρειάζεται και δεύτερη μελέτη ύπνου, για να προκύψουν σαφή συμπεράσματα [101].

Μια αμφιλεγόμενη οντότητα, το *σύνδρομο αυξημένης αντίστασης των ανώτερων αεραγωγών* (upper airway resistance syndrome), είναι πιθανό να αποτελεί πρώιμη εκδήλωση του ΣΑΑΥ. Συνίσταται σε έντονο ροχαλητό, ημερήσια υπνηλία, έντονες αναπνευστικές προσπάθειες με εμφάνιση μικροαφυπνίσεων αλλά φυσιολογικό δείκτη απνοιών-υποπνοιών ( $AHI < 5$ ).



## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---





## ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 44 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς (35 άνδρες, 9 γυναίκες), οι οποίοι παρουσίαζαν κλινικές ενδείξεις ΣΑΑΥ και προσήλθαν στο Εργαστήριο Διαταραχών της Αναπνοής της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας) για πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου, η οποία περιλάμβανε:

- ΗΕΓ, ηλεκτρομυογράφημα και ηλεκτροφθαλμογράφημα για τη σταδιοποίηση του ύπνου και την εκτίμηση του δείκτη μικροαφυπνίσεων (arousal index).
- ΗΕΚ με δύο προκάρδιες απαγωγές για την εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας.
- Οξυμετρία.
- Μικρόφωνο για τον έλεγχο του ροχαλητού.
- Ειδική απαγωγή για τη θέση του σώματος.
- Ειδικές απαγωγές για τις κινήσεις των ποδιών με σκοπό τυχόν ανάδειξη του συνδρόμου ανήσυχων κάτω άκρων
- Ειδικούς αισθητήρες-θερμίστορες για την καταγραφή της ροής του αέρα στη μύτη και στο στόμα. Συγκεκριμένα, οι θερμίστορες ανιχνεύουν τις μεταβολές της θερμοκρασίας μεταξύ εισπνοής (ψυχρός αέρας) και εκπνοής (θερμός αέρας) και, κατά συνέπεια, τη ροή αέρα στη μύτη και στο στόμα. Η μέτρηση αυτή είναι ποιοτική, δηλαδή μετρά αν υπάρχει κίνηση αέρα.
- Εκτίμηση της αναπνευστικής προσπάθειας με τη χρήση ειδικών ελαστικών ζωνών που εφαρμόζουν στον θώρακα και στην κοιλιά. Αν καταγράφεται κίνηση στο θώρακα ή στην κοιλιά, οι άπνοιες χαρακτηρίζονται ως αποφρακτικές, ενώ επί απουσίας κίνησης θεωρούνται κεντρικές.

Από την πολυκαταγραφική μελέτη του ύπνου προκύπτουν δείκτες οι οποίοι χαρακτηρίζουν τον ύπνο των ασθενών και προσφέρουν πληροφορίες που αφορούν τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ύπνου και την έκθεση σε υποξία. Από τους δείκτες αυτούς στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- ΑΗΙ (βλ. Γενικό Μέρος)
- Ο αριθμός των απνοιών κατά τη διάρκεια της μελέτης (βλ. Γενικό Μέρος)
- Ο αριθμός των υποπνοιών κατά τη διάρκεια της μελέτης (βλ. Γενικό Μέρος)
- Ο δείκτης μικροαφυπνίσεων (βλ. Γενικό Μέρος)
- Ο αριθμός των αποφρακτικών απνοιών, δηλαδή ο αριθμός των επεισοδίων, κατά τα οποία παρατηρείται μείωση της ροής του αέρα κατά 50% και συνοδεύονται από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες εισπνοής αέρα διάρκειας >10 sec.

- Ο αριθμός των κεντρικών απνοιών, δηλαδή ο αριθμός των επεισοδίων, κατά τα οποία παρατηρείται διακοπή της ροής του αέρα και συνοδεύονται από αναπνευστική προσπάθεια διάρκειας τουλάχιστον 10 sec.
- Ο αριθμός των μεικτών απνοιών, δηλαδή ο αριθμός των επεισοδίων, κατά τα οποία παρατηρείται κεντρική άπνοια διάρκειας τουλάχιστον 10 sec και ακολουθούνται από αποφρακτική άπνοια.
- Ο μέσος κορεσμός του αίματος σε O<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της μελέτης.
- Ο δείκτης αποκορεσμού, δηλαδή ο αριθμός των αποκορεσμών του αίματος ανά ώρα ύπνου που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της μελέτης.
- <90% O<sub>2</sub> saturation (min), δηλαδή το χρονικό διάστημα της μελέτης, κατά το οποίο ο κορεσμός του αίματος σε O<sub>2</sub> είναι <90%.
- Min O<sub>2</sub> minimum levels, δηλαδή ο ελάχιστος αριθμός αναπνοών όπου τα επίπεδα του O<sub>2</sub> είναι τα ελάχιστα κατά τη διάρκεια της μελέτης.
- Η διάρκεια του REM ύπνου σε λεπτά.
- Ο ολικός χρόνος ύπνου σε λεπτά.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης.

	N	Μέση τιμή	SD	Εύρος
Ηλικία (έτη)	44	50,16	12,45	22 – 76
BMI	43	30,66	5,44	19,85 – 47,84
Αρπνοεα Ηγρορνεα Index	44	35,97	27,41	1,9 – 99,7
Αριθμός υποπνοιών	44	24,63	20,99	1,5 – 96,1
Αποφρακτικές άπνοιες	44	9,93	13,30	0 – 54,3
Κεντρικές άπνοιες	44	0,48	1,19	0 – 6,9
Μικτές άπνοιες	44	0,95	2,12	0 – 10
Αριθμός απνοιών	44	11,35	14,39	0 – 55,6
Μέσος κορεσμός O <sub>2</sub>	44	93,04	2,83	82 – 97
Δείκτης αποκορεσμού	44	36,33	28,54	1,3 – 99,9
<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	43	39,86	63,96	0 – 303,0
Min O <sub>2</sub> minimum levels	44	79,68	9,01	51 – 92
Δείκτης αφύπνισης	40	39,94	16,71	15,6 – 69,6
Epworth Sleeping Scale	43	8,98	4,77	0 – 19
REM ύπνος (%TST)	36	11,89	6,34	0 – 23,8
Ολικός χρόνος ύπνου (min)	37	350,89	66,75	170,0 – 449,5

Στον πίνακα 4 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και οι παράμετροι που παρακολουθούνταν κατά την πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου, ενώ στον πίνακα 5 φαίνονται τα ίδια χαρακτηριστικά των ασθενών ταξινομημένων σύμφωνα με τη σοβαρότητα του συνδρόμου αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο (φυσιολογικά άτομα, ήπιο σύνδρομο, μέτριας βαρύτητας, σοβαρό).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης, ταξινομημένων ανάλογα με το ΑΗΙ.

	ΑΗΙ <5			ΑΗΙ 5–15			ΑΗΙ 15–30			ΑΗΙ >30		
	N	Μέση τιμή	SD	N	Μέση τιμή	SD	N	Μέση τιμή	SD	N	Μέση τιμή	SD
Ηλικία (έτη)	4	34,00	13,37	8	56,38	11,51	9	47,00	7,65	23	52,04	12,07
BMI	4	28,23	6,21	8	27,57	5,651	8	32,61	6,49	23	31,48	4,58
Αρπνοα Υπορρνοα Index	4	3,03	0,99	8	7,65	2,00	9	22,54	4,87	23	56,80	21,01
Αριθμός υποπνοιών	4	2,65	,96	8	6,76	2,08	9	16,73	5,76	23	37,75	20,93
Αποφρακτικές άπνοιες	4	0,33	0,43	8	0,80	,65	9	5,52	6,35	23	16,50	15,19
Κεντρικές άπνοιες	4	0,08	0,15	8	0,09	,125	9	0,09	0,17	23	0,84	1,57
Μικτές άπνοιες	4	0	0	8	0,03	0,07	9	0,23	0,27	23	1,72	2,74
Αριθμός απνοιών	4	0,40	,37	8	0,90	0,75	9	5,81	6,29	23	19,05	15,95
Μέσος κορεσμός O <sub>2</sub>	4	94,50	1,92	8	94,65	1,71	9	93,82	1,62	23	91,91	3,29
Δείκτης αποκορεσμού <90% O <sub>2</sub> saturation (min)	4	3,73	2,12	8	5,90	3,02	9	24,36	9,04	23	57,27	22,61
Min O <sub>2</sub> minimum levels	4	,63	,63	8	4,31	6,85	8	14,06	13,21	23	68,02	76,00
Min O <sub>2</sub> minimum levels	4	89,25	2,06	8	85,50	3,02	9	82,22	3,77	23	75,00	9,78
Δείκτης αφύπνισης	4	35,25	17,78	7	28,76	15,64	7	26,91	7,59	22	48,49	14,42
Erworth Sleeping Scale	3	6,00	1,00	8	7,25	4,33	9	8,56	4,72	23	10,13	5,05
REM ύπνος (%TST)	3	7,50	6,61	5	14,84	6,29	7	14,76	7,86	21	10,87	5,52
Ολικός χρόνος ύπνου (min)	3	310,33	47,44	5	365,20	55,26	7	374,64	62,27	22	345,61	72,34

## ΜΕΘΟΔΟΙ

Από τους ασθενείς της μελέτης και μετά από γραπτή συγκατάθεση τους, γινόταν αιμοληψία 10 mL φλεβικού αίματος από παρακέντηση περιφερικής φλέβας, πριν αρχίσει η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου και αμέσως μετά από την αφύπνισή τους. Το δείγμα αίματος συλλεγόταν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA και διατηρείτο σε θερμοκρασία δωματίου (21 °C) μέχρι την ανάλυσή του, η οποία γινόταν εντός 4-12 ωρών από τη συλλογή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων.

FITC	PE	ECD	PC5
<b>Βοηθητικά Τ-κύτταρα</b>			
CD45RA	CD45RO	CD3	CD4
HLA-DR	CD69	CD3	CD4
CD25	CD28	CD3	CD4
TCRγδ	TCRαβ	CD3	CD4
CD18	CD62L	CD3	CD4
Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD4
<b>Κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα</b>			
HLA-DR	CD69	CD3	CD8
CD25	CD28	CD3	CD8
CD16	CD56	CD3	CD8
CD18	CD62L	CD3	CD8
Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD8
<b>NK-κύτταρα</b>			
CD18	CD69	CD3	CD16/56
CD11b	CD62L	CD3	CD16/56
Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD16/56
<b>B-κύτταρα</b>			
CD45RA	CD45RO	CD19	CD20
HLA-DR	CD69	CD19	CD20
CD25	CD28	CD19	CD20
CD5	CD62L	CD19	CD20
Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD19	CD20

Η ανάλυση περιλάμβανε γενική εξέταση αίματος, η οποία γινόταν σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή MicroDiff 18 (Beckman-Coulter) και ανοσοφαινοτυπικό έλεγχο σε κυτταρόμετρο ροής Epics XL-MCL (4 colour analysis, Beckman-Coulter). Ο

ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος γινόταν σε εναιώρημα μέχρι  $10^4$  λευκοκυττάρων/μL. 100 μL ολικού αίματος επωαζόταν με 10 μL από το κάθε mAb για 15 min σε σκοτεινό θάλαμο και σε θερμοκρασία δωματίου (21°C). Στη συνέχεια, γινόταν λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο Multi-Q-PREP (Coulter) και ακολουθούσε η κυτταρομετρική ανάλυση εντός 2 ωρών [102, 103]. Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των υποπληθυσμών αφορούσε τόσο τον προσδιορισμό του ποσοστού του υποπληθυσμού που εκφράζει τον κάθε δείκτη, όσο και το βαθμό έκφρασης του στον ίδιο υποπληθυσμό. Ο βαθμός έκφρασης (pi) αποτελεί μέτρο εκτίμησης του αριθμού των μορίων κάθε συγκεκριμένου δείκτη που εκφράζεται στη μεμβράνη των κυττάρων και υπολογίζεται ως ο λόγος της μέσης έντασης φθορισμού της κατανομής αυτών των κυττάρων, προς τη μέση ένταση φθορισμού του ιστοτυπικού control.

Στους πίνακες 6 και 7 φαίνονται οι συνδυασμοί των mAb και της σήμανσής τους με φθοριοχρώματα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων του αίματος, αντίστοιχα. Στον πίνακα 8, παρατίθενται τα βιολογικά χαρακτηριστικά των επιφανειακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και στον πίνακα 9 τα χαρακτηριστικά των αντίστοιχων mAb [104].

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των μονοκυττάρων και των ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων.

FITC	PE	ECD	PC5
<b>Μονοκύτταρα</b>			
CD15	CD62L	CD14	CD45
CD64	CD11c	CD14	CD45
CD25	CD69	CD14	CD45
CD18	CD11b	CD14	CD45
Ιστοτυπικό control	Ιστοτυπικό control	CD14	CD45
<b>Ουδετερόφιλα</b>			
CD18	CD11b	CD45	CD16/56
CD15	CD11c	CD45	CD16/56
CD64	CD69	CD45	CD16/56
CD11a	CD62L	CD45	CD16/56
Ιστοτυπικό control	Ιστοτυπικό control	CD45	CD16/56

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των λευκοκυτταρικών αντιγόνων που μελετήθηκαν.

<b>Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα</b>	<b>Βιολογικός ρόλος</b>	<b>Κυτταρική κατανομή</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
<b>CD3</b>	Τμήμα του συμπλέγματος του TcR	Θυμοκύτταρα, ώριμα T κύτταρα	105
<b>CD4</b>	Συνυποδοχέας των τάξης II MHC μορίων. Υποδοχέας της gp120 του HIV-1	T – βοηθητικά, μονοκύτταρα-μακροφάγα	106, 107
<b>CD5</b>	Συνδέτης του CD72	Ώριμα T κύτταρα, θυμοκύτταρα, B-1a υποπληθυσμό των B κυττάρων	108
<b>CD8</b>	Συνυποδοχέας των τάξης I MHC μορίων	T κυτταρολυτικά, υποπληθυσμό των NK-κυττάρων, θυμοκύτταρα	106, 109
<b>CD11a</b>	Υπομονάδα αL της ιντεγκρίνης LFA-1, συνδέεται με τα μόρια προσκόλλησης CD54 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3	Λεμφοκύτταρα (T και B), ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα - μακροφάγα	110
<b>CD11b</b>	Υπομονάδα αM της ιντεγκρίνης CR3, συνδέεται με τα μόρια προσκόλλησης CD54, iC3b και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας.	NK κύτταρα, μυελοειδή κύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα - μακροφάγα	110
<b>CD11c</b>	Υπομονάδα αX της ιντεγκρίνης CR4	Μονοκύτταρα – μακροφάγα, NK-κύτταρα, ουδετερόφιλα	110
<b>CD14</b>	Υποδοχέας του συμπλέγματος LPS-LBP (LPS-Binding Protein)	Μονοκύτταρα – μακροφάγα	111, 112
<b>CD15 (Lewis x)</b>	Πεντασακχαρίτης που εκφράζεται στα γλυκοπεπτιδία και στις γλυκοπρωτεΐνες πολλών κυτταρικών μεμβρανών	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα – μακροφάγα, ηωσινόφιλα	113
<b>CD16</b>	Χαμηλής συγγένειας υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG (FcγRIII), μεσολαβητής της φαγοκυττάρωσης	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, NK-κύτταρα	114, 115
<b>CD18</b>	Υπομονάδα της ιντεγκρίνης b2, συνδέεται με τις ιντεργκρίνες της ομάδας α (CD11a, CD11a, CD11a)	Λευκοκύτταρα	110



<b>Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα</b>	<b>Βιολογικός ρόλος</b>	<b>Κυτταρική κατανομή</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
<b>CD19</b>	Συνυποδοχέας των Β-κυττάρων (μετέχει στην ανάπτυξη, ενεργοποίηση και διαφοροποίησή τους)	Β-κύτταρα	116, 117
<b>CD20</b>	Μετέχει στην ενεργοποίηση των Β-κυττάρων	Β-κύτταρα	118
<b>CD25</b>	Χαμηλής συγγένειας υποδοχέας της IL-2 (IL-2Ra)	Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα, μονοκύτταρα	119, 120
<b>CD28</b>	Ενεργοποίηση παρθένων Τ-κυττάρων, συνδέεται με τα CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2)	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> ), Ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	121, 122
<b>CD45 (LCA)</b>	Ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	Λευκοκύτταρα	123, 124
<b>CD45RA</b>	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (μνημονικά) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα – μακροφάγα	123, 124
<b>CD45RO</b>	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (παρθένα) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα	123, 124
<b>CD56</b>	Ισότυπος του N-CAM (μόριο προσκόλλησης)	NK κύτταρα	125, 126
<b>CD62L</b>	Μόριο προσκόλλησης, συνδέεται με τα CD34 και GlyCAM, μεσολαβεί στην κύλιση των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων επί του ενδοθηλίου	Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα, μονοκύτταρα, NK κύτταρα	127
<b>CD64</b>	Υψηλής συγγένειας υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG (FcγRI)	Μονοκύτταρα-μακροφάγα	114, 115
<b>CD69</b>	Πρώιμος δείκτης ενεργοποίησης	Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	128
<b>HLA-DR</b>	Μόριο MHC τάξης II, συμμετέχει στην αντιγονοπαρουσίαση και συνδέεται με το CD4	Μονοκύτταρα-μακροφάγα, δένδριτικά, Β-κυττάρων, ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα	129
<b>TCR-αβ</b>	Τ κυτταρικός υποδοχέας με αλυσίδες α/β	Τ-λεμφοκύτταρα	105, 130
<b>TCR-γδ</b>	Τ κυτταρικός υποδοχέας με αλυσίδες γ/δ	Υποπληθυσμός Τ-κύτταρα (σε κοιλότητες)	105, 131

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

<b>Μονοκλωνικά αντισώματα</b>	<b>Παρασκευάστρια εταιρεία</b>	<b>Κλώνος</b>	<b>Αριθμός καταλόγου</b>	<b>Lot. no</b>
αντι-CD3 (ECD)	Beckman-Coulter	UCHT1	AO7748	10
αντι-CD4 (PC5)	Beckman-Coulter	13B8.2	AO7752	04
αντι-CD5 (FITC)	Beckman-Coulter	BL1a	AO8932	01
αντι-CD8 (FITC)	Beckman-Coulter	B9.11	AO7758	01
αντι-CD11a (FITC)	Beckman-Coulter	Bear1	IM0530	33
αντι-CD11b (PE)	Beckman-Coulter	Bear1	IM2581	11
αντι-CD11c (PE)	Beckman-Coulter	BU15	IM1760	24
αντι-CD14 (ECD)	Beckman-Coulter	RM052	IM2707	30
αντι-CD15 (FITC)	Beckman-Coulter	8045	IM1423	50
αντι-CD16 (FITC)	Beckman-Coulter	3G8	IM0814	32
αντι-CD18 (FITC)	Beckman-Coulter	7E4	IM1568	15
αντι-CD19 (ECD)	Beckman-Coulter	J4.119	AO7770	12
αντι-CD20 (PC5)	Beckman-Coulter	B9E9 (HRC20)	IM2644	17
αντι-CD25 (FITC)	Beckman-Coulter	B1.49.9	IM0478	03
αντι-CD28 (PE)	Beckman-Coulter	CD28.2	IM2071	13
αντι-CD45 (ECD)	Beckman-Coulter	J.33	AO7784	16
αντι-CD45 (PC5)	Beckman-Coulter	J.33	AO7785	17
αντι-CD45RA (FITC)	Beckman-Coulter	ALD11	AO7786	02
αντι-CD45RO (PE)	Beckman-Coulter	UCHL1	AO7787	03
αντι-CD56 (PE)	Beckman-Coulter	N901 (NKH-1)	IM2073	16
αντι-CD64 (FITC)	Beckman-Coulter	22	IM1604	50
αντι-CD62L (PE)	Beckman-Coulter	DREG56	IM2214	12
αντι-CD69 (PE)	Beckman-Coulter	TP1.55.3	IM0463	37
αντι-HLA-DR (FITC)	Beckman-Coulter	B8.12.2	IM0463	37
αντι-HLA-DR (PE)	Beckman-Coulter	B8.12.2	IM0464	42
αντι-TLR4 (PE)	eBioscience	HTA125	12-9917-73	EO12055
αντι-TCR-αβ (PE)	Beckman-Coulter	BMAO31	IM1467	22
αντι-TCR- γδ (FITC)	Beckman-Coulter	IMMU510	IM1571	19

## Στατιστική ανάλυση

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression analysis) με τη χρήση του λογισμικού SPSS 11.5 for Windows. Ως εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήθηκε η εκατοστιαία μεταβολή της εκάστοτε παραμέτρου και ως ανεξάρτητες μεταβλητές οι παράμετροι της πολυκαταγραφικής μελέτης ύπνου, καθώς και η ηλικία, ο BMI των ασθενών και η προ του ύπνου τιμή κάθε εξαρτημένης μεταβλητής.

Αρχικά, από τις παραμέτρους της πολυκαταγραφικής μελέτης ύπνου επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν, ως ανεξάρτητες μεταβλητές στο μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης, οι δείκτες υποξαιμίας, άπνοιας/υπόπνοιας και εγκεφαλογραφικού ύπνου που παρουσίαζαν την ισχυρότερη συσχέτιση (Spearman correlation) με τους υπόλοιπους της αντίστοιχης ομάδας δεικτών. Όπως προκύπτει από τις συσχετίσεις που φαίνονται στους πίνακες 10–12, οι δείκτες αυτοί ήταν το χρονικό διάστημα του ύπνου κατά το οποίο οι ασθενείς είχαν κορεσμό σε O<sub>2</sub> <90% (<90% O<sub>2</sub> saturation), ο αριθμός αποφρακτικών άπνοιών κατά τη διάρκεια της μελέτης ύπνου και ο δείκτης μικροαφυπνίσεων.

Στις περιπτώσεις που η παραπάνω προσέγγιση ανέδειξε ισχυρές συσχετίσεις, η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης επαναλήφθηκε με ανεξάρτητες μεταβλητές το σύνολο των παραμέτρων της πολυκαταγραφικής μελέτης ύπνου, την ηλικία, τον BMI των ασθενών και την προ του ύπνου τιμή κάθε εξαρτημένης μεταβλητής.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Συσχετίσεις (Spearman correlation) μεταξύ των δεικτών υποξαιμίας στο σύνολο των ασθενών.

		Μέσος κορεσμός O <sub>2</sub>	Δείκτης αποκορεσμού	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)
<b>Δείκτης αποκορεσμού</b>	Συντελεστής συσχέτισης	-0,505		
	P (2-tailed)	0,000		
	N	44		
<b>&lt;90% O<sub>2</sub> saturation (min)</b>	Συντελεστής συσχέτισης	-0,730	0,721	
	P (2-tailed)	0,000	0,000	
	N	43	43	
<b>Min O<sub>2</sub> minimum levels</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,515	-0,714	<b>-0,812</b>
	P (2-tailed)	0,000	0,000	0,000
	N	44	44	43

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Συσχετίσεις (Spearman correlation) μεταξύ των δεικτών άπνοιας/υπόπνοιας στο σύνολο των ασθενών.

		<b>Αρπνοea Hyporpea Index</b>	<b>Αριθμός υποπνοιών</b>	<b>Αριθμός αποφρακτικών απνοιών</b>	<b>Κεντρικές άπνοιες</b>	<b>Μικτές άπνοιες</b>
<b>Αριθμός υποπνοιών</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,894				
	P (2-tailed)	0,000				
	N	44	44			
<b>Αποφρακτικές άπνοιες</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,747	0,468			
	P (2-tailed)	0,000	0,001			
	N	44	44	44		
<b>Κεντρικές άπνοιες</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,453	0,230	0,562		
	P (2-tailed)	0,002	0,133	0,000		
	N	44	44	44		
<b>Μικτές άπνοιες</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,638	0,493	0,610		
	P (2-tailed)	0,000	0,001	0,000		
	N	44	44	44		
<b>Αριθμός απνοιών</b>	Συντελεστής συσχέτισης	0,765	0,493	<b>0,989</b>	0,618	0,671
	P (2-tailed)	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
	N	44	44	44	44	44

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Συσχετίσεις (Spearman correlation) μεταξύ των δεικτών εγκεφαλογραφικού ύπνου στο σύνολο των ασθενών.

		<b>Δείκτης μικροαφυπνίσεων</b>	<b>Epworth Sleeping Scale</b>	<b>REM ύπνος (%TST)</b>
<b>Epworth Sleeping Scale</b>	Συντελεστής	<b>0,424</b>		
	συσχέτισης			
	P (2-tailed)	0,007		
	N	39		
<b>REM ύπνος (%TST)</b>	Συντελεστής	-0,330	-0,292	
	συσχέτισης			
	P (2-tailed)	0,053	0,084	
	N	35	36	
<b>Συνολικός χρόνος ύπνου (min)</b>	Συντελεστής	-0,101	-0,073	0,338
	συσχέτισης			
	P (2-tailed)	0,563	0,668	0,044
	N	35	37	36

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 13 φαίνονται οι τιμές των ανοσοφαινοτυπικών παραμέτρων που μελετήθηκαν, πριν και μετά από την πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου και στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αρχικής ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Οι προ και μετά την πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου τιμές (μέση τιμή ± SD) των παραμέτρων που μελετήθηκαν, στο σύνολο των ασθενών της μελέτης.

	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
<b>Λεμφοκύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	3000,76±636,15	2390,39±636,14
Ποσοστό (%)	0,35± 0,72	0,34±0,07
<b>Βοηθητικά T-κύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	1106,80±413,79	848,73±334,77
CD45RA <sup>+</sup>	0,32±0,15	0,33±0,15
ρi CD45RA <sup>+</sup>	4,20±1,40	4,18±1,38
HLA-DR <sup>+</sup>	0,03±0,07	0,04±0,08
ρi HLA-DR <sup>+</sup>	6,22±3,42	5,41±2,17
CD25 <sup>+</sup>	0,08±0,04	0,10±0,14
ρi CD25 <sup>+</sup>	1,50±0,35	1,54±0,36
TCRγδ <sup>+</sup>	0,04±0,02	0,04±0,02
ρi TCRγδ <sup>+</sup>	2,19±0,61	2,18±0,63
CD18 <sup>+</sup>	0,91±0,09	0,89±0,15
ρi CD18 <sup>+</sup>	2,89±0,72	2,89±0,82
CD45RO <sup>+</sup>	0,68±0,11	0,68±0,11
ρi CD45RO <sup>+</sup>	15,31±2,87	15,35±2,73
CD69 <sup>+</sup>	0,05±0,12	0,02±0,02
ρi CD69 <sup>+</sup>	2,24±1,89	1,84±0,59
CD28 <sup>+</sup>	0,88±0,12	0,88±0,12
ρi CD28 <sup>+</sup>	3,42±1,06	3,45±1,03
TCRαβ <sup>+</sup>	0,79±0,20	0,81±0,19
ρi TCRαβ <sup>+</sup>	2,40±0,85	2,42±0,75
CD62L <sup>+</sup>	0,78±0,07	0,78±0,07
ρi CD62L <sup>+</sup>	11,99±2,72	12,29±2,84
<b>Κυτταρολυτικά T-κύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	442,58±248,94	372,23±201,48
CD45RA <sup>+</sup>	45,34±9,98	41,74±18,03
ρi CD45RA <sup>+</sup>	9,43 ±3,06	9,99 ±3,16

	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
CD45RO <sup>+</sup>	52,07 ±13,08	51,04 ±2,31
ρi CD45RO <sup>+</sup>	13,08 ±3,51	12,61± 2,31
TCRαβ <sup>+</sup>	71,78 ±15,50	69,45 ±0,72
ρi TCRαβ <sup>+</sup>	2,35 ±1,54	2,22 ±0,72
HLA-DR <sup>+</sup>	0,03±0,03	0,04±0,03
ρi HLA-DR <sup>+</sup>	2,65±1,48	2,77±1,68
CD25 <sup>+</sup>	0,02±0,02	0,04±0,07
ρi CD25 <sup>+</sup>	0,94±0,32	1,73±4,06
CD16 <sup>+</sup>	0,07±0,20	0,07±0,21
ρi CD16 <sup>+</sup>	2,32±2,98	1,89±1,36
CD18 <sup>+</sup>	0,97±0,04	0,96±0,04
ρi CD18 <sup>+</sup>	4,12±1,62	4,30±1,94
CD69 <sup>+</sup>	0,07±0,09	0,05±0,02
ρi CD69 <sup>+</sup>	2,82±2,08	2,76±2,00
CD28 <sup>+</sup>	0,54±0,20	0,53±0,19
ρi CD28 <sup>+</sup>	3,12±1,78	7,02±25,34
CD56 <sup>+</sup>	0,10±0,06	0,11±0,07
ρi CD56 <sup>+</sup>	2,92±1,69	2,78±1,52
CD62L <sup>+</sup>	0,50±0,12	0,50±0,12
ρi CD62L <sup>+</sup>	14,72±8,61	12,94±7,48
<b>Β-κύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	384,63±152,31	254,51±143,95
CD45RA <sup>+</sup>	0,10±0,01	0,10±0,01
ρi CD45RA <sup>+</sup>	11,18±2,76	9,38±3,07
HLA-DR <sup>+</sup>	0,97±0,04	0,96±0,07
ρi HLA-DR <sup>+</sup>	10,98±5,04	9,67±4,48
CD25 <sup>+</sup>	0,03±0,02	0,03±0,03
ρi CD25 <sup>+</sup>	1,41±1,06	1,09±0,80
CD5 <sup>+</sup>	0,14±0,05	0,14±0,05
ρi CD5 <sup>+</sup>	1,56±0,34	1,28±0,36
CD45RO <sup>+</sup>	0,01±0,01	0,01±0,01
ρi CD45RO <sup>+</sup>	1,03±2,29	0,85±1,52
CD69 <sup>+</sup>	0,06±0,06	0,05±0,05
ρi CD69 <sup>+</sup>	1,47±0,47	2,14±2,42
CD28 <sup>+</sup>	0,02±0,03	0,02±0,02
ρi CD28 <sup>+</sup>	1,17±0,35	1,39±0,70
CD62L <sup>+</sup>	0,85±0,11	0,85±0,16
ρi CD62L <sup>+</sup>	12,10±4,35	15,19±8,58

	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
<b>ΝΚ-κύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	249,75±119,60	237,08±117,06
CD18 <sup>+</sup>	0,98±0,07	0,99±0,01
ρi CD18 <sup>+</sup>	7,95±3,08	6,89±2,89
CD11b <sup>+</sup>	0,69±0,16	0,75±0,13
ρi CD11b <sup>+</sup>	2,55±0,79	2,30±0,74
CD69 <sup>+</sup>	0,22±0,12	0,18±0,09
ρi CD69 <sup>+</sup>	2,02±1,08	2,23±1,38
CD62L <sup>+</sup>	0,41±0,15	0,40±0,14
ρi CD62L <sup>+</sup>	18,10±11,14	18,77±15,55
<b>Μονοκύτταρα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	458,10±184,53	397,38±162,11
Ποσοστό (%)	0,05±0,01	0,05±0,01
CD15 <sup>+</sup>	0,41±0,21	0,45±0,23
ρi CD15 <sup>+</sup>	3,07±1,27	3,10±1,40
CD64 <sup>+</sup>	0,99±0,01	0,99±0,01
ρi CD64 <sup>+</sup>	3,16±1,27	3,35±0,79
CD25 <sup>+</sup>	0,02±0,04	0,02±0,02
ρi CD25 <sup>+</sup>	1,02±0,44	1,16±0,61
CD18 <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,00±0,00
ρi CD18 <sup>+</sup>	10,52±3,67	9,60±2,57
CD62L <sup>+</sup>	0,81±0,17	0,84±0,12
ρi CD62L <sup>+</sup>	13,35±11,04	11,38±10,35
CD11c <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,00±0,00
ρi CD11c <sup>+</sup>	13,17±5,24	11,98±5,33
CD69 <sup>+</sup>	0,08±0,01	0,08±0,01
ρi CD69 <sup>+</sup>	1,30±1,11	1,78±1,84
CD11b <sup>+</sup>	0,97±0,16	1,00±0,00
ρi CD11b <sup>+</sup>	32,10±12,13	51,05±24,56
<b>Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα</b>		
Απόλυτος αριθμός (/μL)	5416,16±2144,86	4577,43±1946,71
Ποσοστό (%)	0,60±0,07	0,61±0,07
CD18 <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,00±0,00
ρi CD18 <sup>+</sup>	5,55±1,62	4,93±2,63
CD15 <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,00±0,00
ρi CD15 <sup>+</sup>	53,41±16,17	58,61±20,30
CD64 <sup>+</sup>	0,07±0,08	0,07±0,08
ρi CD64 <sup>+</sup>	1,26±0,49	1,87±3,50
CD11a <sup>+</sup>	0,96±0,07	0,97±0,03
ρi CD11a <sup>+</sup>	1,62±0,30	1,71±0,29



	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
CD11b <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,00±0,00
ρi CD11b <sup>+</sup>	46,94±29,69	57,47±44,90
CD11c <sup>+</sup>	0,98±0,05	0,97±0,06
ρi CD11c <sup>+</sup>	6,30±3,36	6,49±3,30
CD69 <sup>+</sup>	0,02±0,02	0,02±0,01
ρi CD69 <sup>+</sup>	1,94±1,03	2,73±2,42
CD62L <sup>+</sup>	0,97±0,04	0,98±0,04
ρi CD62L <sup>+</sup>	16,87±10,54	18,59±9,46

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Τα αποτελέσματα της αρχικής ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης.

	Στατιστική σημαντικότητα (P)					
	R <sup>2</sup>	BMI	Age	Αποφρακτικές άπνοιες	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	Δείκτης μικροαφυπνίσεων
<b>Λεμφοκύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,048	0,496	0,538	0,574	0,979	0,614
Ποσοστό (%)	0,216	0,148	0,720	0,199	0,357	0,574
<b>T-κύτταρα</b>						
TCRγδ <sup>+</sup>	0,454	0,215	<b>0,019</b>	0,427	0,111	0,416
ρi TCRγδ <sup>+</sup>	0,384	<b>0,009</b>	0,180	0,662	0,519	<b>0,048</b>
<b>Βοηθητικά T-κύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,167	0,785	0,995	0,147	0,991	0,207
CD45RA <sup>+</sup>	0,207	0,927	0,163	0,607	0,582	0,885
ρi CD45RA <sup>+</sup>	0,267	<b>0,009</b>	0,375	0,595	0,493	0,853
HLA-DR <sup>+</sup>	0,080	0,311	0,870	0,752	0,779	0,641
ρi HLA-DR <sup>+</sup>	0,430	0,829	0,588	0,580	0,343	0,401
CD25 <sup>+</sup>	0,086	0,536	0,689	0,928	0,765	0,552
ρi CD25 <sup>+</sup>	0,083	0,577	0,808	0,969	0,747	0,871
CD18 <sup>+</sup>	0,327	0,601	0,620	0,925	0,965	0,380
ρi CD18 <sup>+</sup>	0,081	0,523	0,376	0,649	0,195	0,738
CD45RO <sup>+</sup>	0,145	0,888	0,075	0,878	0,870	0,699
ρi CD45RO <sup>+</sup>	0,250	0,922	0,681	0,648	0,856	0,910
CD69 <sup>+</sup>	0,368	0,086	0,659	0,998	0,290	<b>0,038</b>
ρi CD69 <sup>+</sup>	0,361	0,367	0,434	0,858	0,173	0,503

	Στατιστική σημαντικότητα (P)					
	R <sup>2</sup>	BMI	Age	Αποφρακτικές άπνοιες	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	Δείκτης μικροαφυπνίσεων
CD28 <sup>+</sup>	0,123	0,094	0,672	0,701	0,497	0,769
ρi CD28 <sup>+</sup>	0,368	<b>0,009</b>	0,794	0,573	0,702	0,576
TCRαβ <sup>+</sup>	0,482	<b>0,028</b>	0,063	0,384	<b>0,046</b>	0,985
ρi TCRαβ <sup>+</sup>	0,382	0,119	0,094	0,919	0,985	0,972
CD62L <sup>+</sup>	0,222	0,480	0,636	0,457	0,480	0,345
ρi CD62L <sup>+</sup>	0,129	0,598	0,683	0,252	0,808	0,577
<b>Κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,262	0,544	0,878	0,634	0,238	0,495
TCRαβ <sup>+</sup>	0,385	0,226	0,546	0,588	<b>0,025</b>	0,152
ρi TCRαβ <sup>+</sup>	0,673	0,117	0,699	0,907	0,982	0,088
CD45RA <sup>+</sup>	0,177	0,294	0,240	0,287	0,185	0,822
ρi CD45RA <sup>+</sup>	0,271	0,425	0,663	0,557	0,793	0,324
CD45RO <sup>+</sup>	0,542	0,099	<b>0,006</b>	0,074	0,747	0,189
ρi CD45RO <sup>+</sup>	0,643	0,582	<b>0,031</b>	0,633	0,829	0,610
HLA-DR <sup>+</sup>	0,056	0,883	0,492	0,705	0,608	0,841
ρi HLA-DR <sup>+</sup>	0,365	0,508	0,609	0,675	0,358	0,610
CD25 <sup>+</sup>	0,103	0,640	0,876	0,977	0,929	0,224
ρi CD25 <sup>+</sup>	0,412	0,990	0,507	0,673	0,376	0,261
CD16 <sup>+</sup>	0,021	0,896	0,759	0,948	0,726	0,824
ρi CD16 <sup>+</sup>	0,303	0,077	0,409	0,713	0,605	0,253
CD18 <sup>+</sup>	0,193	0,819	<b>0,021</b>	0,348	0,494	0,541
ρi CD18 <sup>+</sup>	0,336	0,688	0,906	0,790	0,082	0,091
CD69 <sup>+</sup>	0,354	0,631	0,907	0,706	0,817	0,873
ρi CD69 <sup>+</sup>	0,260	0,261	0,819	0,237	0,270	0,238
CD28 <sup>+</sup>	0,296	0,516	0,446	0,506	0,596	0,145
ρi CD28 <sup>+</sup>	0,110	0,978	0,836	0,623	0,371	0,484
CD56 <sup>+</sup>	0,094	0,474	0,758	0,451	0,208	0,361
ρi CD56 <sup>+</sup>	0,229	0,835	0,296	0,409	0,935	0,123
CD62L <sup>+</sup>	0,248	0,950	0,275	0,222	0,399	0,775
ρi CD62L <sup>+</sup>	0,314	0,718	0,443	0,055	0,231	<b>0,023</b>
<b>Β-κύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,148	0,917	0,376	<b>0,048</b>	0,395	0,363
CD45RA <sup>+</sup>	0,951	0,298	0,282	0,425	0,829	0,860
ρi CD45RA <sup>+</sup>	0,098	0,790	0,683	0,578	0,518	0,316
HLA-DR <sup>+</sup>	0,019	0,686	0,858	0,718	0,971	0,960

	Στατιστική σημαντικότητα (P)					
	R <sup>2</sup>	BMI	Age	Αποφρακτικές άπνοιες	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	Δείκτης μικροαφυπνίσεων
pi HLA-DR <sup>+</sup>	0,303	0,934	0,356	0,833	0,625	0,924
CD25 <sup>+</sup>	0,359	0,578	0,488	0,564	0,176	0,125
pi CD25 <sup>+</sup>	0,274	0,618	0,532	0,320	0,950	0,219
CD5 <sup>+</sup>	0,661	0,867	0,671	0,661	0,135	0,839
pi CD5 <sup>+</sup>	0,239	0,603	0,504	0,213	0,488	0,187
CD45RO <sup>+</sup>	0,668	0,381	0,711	0,053	<b>0,037</b>	0,886
pi CD45RO <sup>+</sup>	0,145	0,841	0,922	0,910	0,688	0,611
CD69 <sup>+</sup>	0,352	0,271	0,812	0,904	<b>0,029</b>	<b>0,029</b>
pi CD69 <sup>+</sup>	0,209	0,640	0,416	0,770	0,085	0,090
CD28 <sup>+</sup>	0,321	0,363	0,160	0,854	0,148	0,053
pi CD28 <sup>+</sup>	0,261	0,957	0,392	0,933	0,244	0,296
CD62L <sup>+</sup>	0,340	0,715	0,898	0,558	0,141	0,220
pi CD62L <sup>+</sup>	0,242	0,944	0,381	0,285	0,950	0,374
<b>ΝΚ-κύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,270	0,555	0,371	0,817	0,407	0,554
CD18 <sup>+</sup>	0,995	0,336	0,453	0,874	0,310	0,530
pi CD18 <sup>+</sup>	0,101	0,986	0,270	0,860	0,493	0,579
CD11b <sup>+</sup>	0,596	0,378	0,331	0,432	0,836	0,271
pi CD11b <sup>+</sup>	0,467	0,286	0,311	0,293	0,328	<b>0,042</b>
CD69 <sup>+</sup>	0,346	0,348	0,659	0,956	0,843	0,369
pi CD69 <sup>+</sup>	0,204	0,514	0,873	0,252	0,646	0,127
CD62L <sup>+</sup>	0,193	0,653	0,824	0,696	0,094	0,572
pi CD62L <sup>+</sup>	0,203	0,270	0,606	0,401	0,706	0,093
<b>Μονοκύτταρα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,299	0,209	0,814	0,143	0,573	<b>0,022</b>
Ποσοστό (%)	0,402	<b>0,046</b>	0,499	0,185	0,916	<b>0,010</b>
CD15 <sup>+</sup>	0,204	0,425	0,617	0,355	0,157	0,317
pi CD15 <sup>+</sup>	0,203	0,873	0,933	0,099	0,328	0,737
CD64 <sup>+</sup>	0,383	0,799	0,667	0,542	0,239	0,454
pi CD64 <sup>+</sup>	0,355	0,879	0,507	0,077	0,233	0,803
CD25 <sup>+</sup>	0,240	0,588	0,061	0,925	0,801	0,218
pi CD25 <sup>+</sup>	0,155	0,934	0,963	0,537	0,898	0,988
CD18 <sup>+</sup>	0,305	0,731	0,688	0,604	0,187	0,235
pi CD18 <sup>+</sup>	0,153	0,435	0,372	0,083	0,121	0,381
CD62L <sup>+</sup>	0,610	0,063	0,441	0,732	0,851	0,888

	Στατιστική σημαντικότητα (P)					
	R <sup>2</sup>	BMI	Age	Αποφρακτικές άπνοιες	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	Δείκτης μικροαφυπνίσεων
ρi CD62L <sup>+</sup>	0,361	<b>0,029</b>	0,188	0,426	0,729	0,512
CD11c <sup>+</sup>	0,135	0,874	0,917	0,216	0,582	0,110
ρi CD11c <sup>+</sup>	0,158	0,920	0,467	0,659	0,810	0,965
CD69 <sup>+</sup>	0,092	0,855	0,686	0,752	0,477	0,616
ρi CD69 <sup>+</sup>	0,065	0,527	0,838	0,878	0,935	0,531
CD11b <sup>+</sup>	1,000	0,224	0,911	0,872	0,567	0,187
ρi CD11b <sup>+</sup>	0,279	0,964	0,723	0,428	0,776	0,967
<b>Ουδετερόφιλα πολυμορφούρηνα</b>						
Απόλυτος αριθμός (/μL)	0,181	0,404	0,188	0,459	0,527	0,501
Ποσοστό (%)	0,397	<b>0,027</b>	0,718	0,214	0,147	0,897
CD18 <sup>+</sup>	0,447	0,507	0,875	<b>0,006</b>	0,328	0,675
ρi CD18 <sup>+</sup>	0,263	0,484	0,969	0,104	0,508	0,555
CD15 <sup>+</sup>	0,158	0,479	0,821	0,542	0,651	0,980
ρi CD15 <sup>+</sup>	0,318	0,360	0,880	0,078	0,618	0,786
CD64 <sup>+</sup>	0,108	0,500	0,879	0,393	0,488	0,797
ρi CD64 <sup>+</sup>	0,077	0,632	0,995	0,577	0,406	0,463
CD11a <sup>+</sup>	0,892	0,408	0,566	0,575	0,492	0,429
ρi CD11a <sup>+</sup>	0,331	0,564	0,960	<b>0,041</b>	0,524	0,649
CD11b <sup>+</sup>	0,131	0,513	0,810	0,907	0,564	0,323
ρi CD11b <sup>+</sup>	0,131	0,653	0,973	0,709	0,938	0,474
CD11c <sup>+</sup>	0,277	0,762	0,831	0,420	0,147	0,710
ρi CD11c <sup>+</sup>	0,156	0,740	0,926	0,979	0,912	0,575
CD69 <sup>+</sup>	0,280	0,482	0,651	0,237	0,366	0,976
ρi CD69 <sup>+</sup>	0,171	0,516	0,986	0,933	0,657	0,588
CD62L <sup>+</sup>	0,431	0,194	0,949	0,605	0,977	0,364
ρi CD62L <sup>+</sup>	0,139	0,669	0,958	0,947	0,936	0,410

Η παραπέρα ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, σύμφωνα με την προσέγγιση που αναφέρεται στο κεφάλαιο της Στατιστικής ανάλυσης, έδειξε τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 15. Στον πίνακα παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, οι οποίες, σύμφωνα με την προσέγγιση που ακολουθήθηκε, είναι προτυπωμένες (adjusted) σύμφωνα με την προ του ύπνου τιμή κάθε εξαρτημένης μεταβλητής, την ηλικία και τον BMI των ασθενών, αλλά και όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους της πολυκαταγραφικής μελέτης ύπνου.

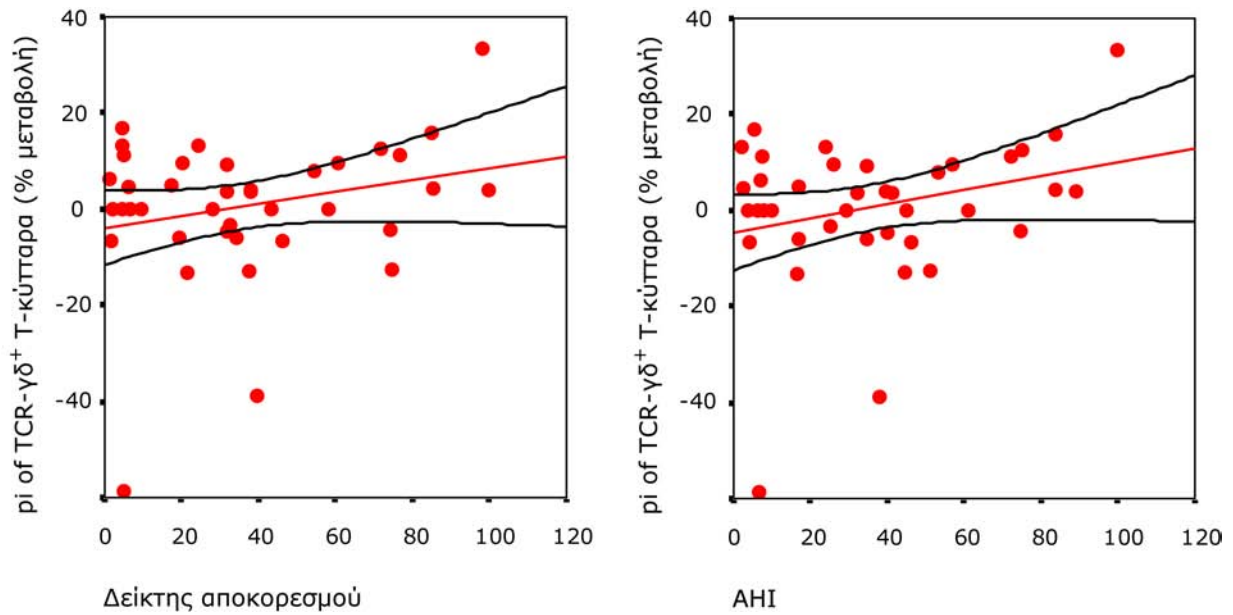
ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης.

	<b>Ανεξάρτητες μεταβλητές</b>	<b>P</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>T-κύτταρα</b>			
<b>TCRγδ<sup>+</sup></b>	Ηλικία	0,028	0,634
<b>ρi TCRγδ<sup>+</sup></b>	Ηλικία	0,011	0,706
	Δείκτης αποκορεσμού	0,040	
	AHI	0,018	
<b>Βοηθητικά T-κύτταρα</b>			
<b>ρi CD45RA<sup>+</sup></b>	BMI	0,042	0,518
	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	0,044	
<b>CD28<sup>+</sup></b>	BMI	0,016	0,684
	Κεντρικές άπνοιες	0,001	
<b>TCRaβ<sup>+</sup></b>	Μικτές άπνοιες	0,010	0,788
	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	0,003	
	Min O <sub>2</sub> minimum levels	0,033	
<b>Κυτταρολυτικά T-κύτταρα</b>			
<b>CD18<sup>+</sup></b>	Ηλικία	0,046	0,567
<b>TCRaβ<sup>+</sup></b>	Δείκτης μικροαφυπνίσεων	0,069	0,043
<b>ρi TCRaβ<sup>+</sup></b>	Δείκτης μικροαφυπνίσεων	0,008	0,702
	Epworth Sleeping Scale	0,017	
<b>ρi CD45RA<sup>+</sup></b>	Δείκτης μικροαφυπνίσεων	0,049	0,697
	Συνολικός χρόνος ύπνου	0,021	
<b>CD45RO<sup>+</sup></b>	Ηλικία	0,017	0,787
	Μέσος κορεσμός O <sub>2</sub>	0,035	
<b>ρi CD45RO<sup>+</sup></b>	Epworth Sleeping Scale	0,047	0,808
<b>Μονοκύτταρα</b>			
<b>ρi CD62L<sup>+</sup></b>	BMI	0,043	0,613
<b>CD11c<sup>+</sup></b>	Αριθμός υποπνοιών	0,024	
	Δείκτης αποκορεσμού	0,021	
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	<90% O <sub>2</sub> saturation (min)	0,015	1,000
	Min O <sub>2</sub> minimum levels	0,013	
	Δείκτης μικροαφυπνίσεων	0,002	
<b>Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα</b>			
<b>CD11c<sup>+</sup></b>	Κεντρικές άπνοιες	0,000	0,814
<b>Pi CD11c<sup>+</sup></b>	Μέσος κορεσμός O <sub>2</sub>	0,045	0,416

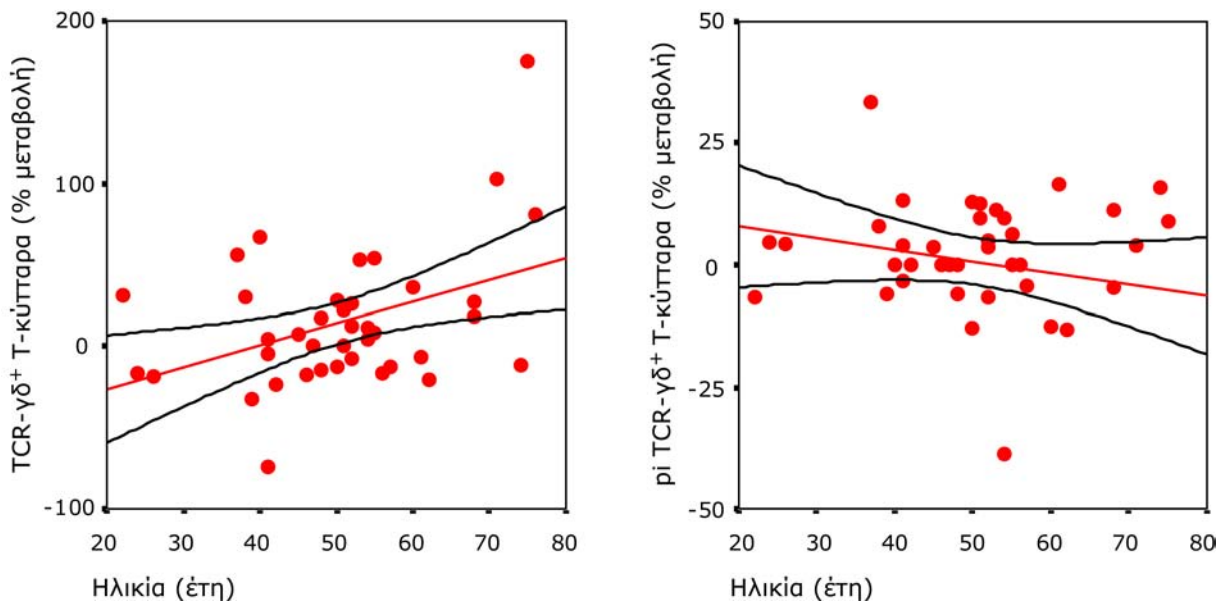
Συνοψίζοντας τα στοιχεία του πίνακα 15, τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν ως ακολούθως:

- α. Παρατηρείται ισχυρή θετική συσχέτιση του βαθμού έκφρασης του TCRγδ στον αντίστοιχο υποπληθυσμό των T-κυττάρων, με τους δείκτες υποξαιμίας (εικ. 5). Το ποσοστό των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων παρουσιάζει ισχυρή θετική συσχέτιση με την ηλικία, ενώ ο βαθμός έκφρασης του υποδοχέα συσχετίζεται ισχυρά μεν αλλά αρνητικά με την ηλικία των ασθενών (εικ. 6).
- β. Οι δείκτες υποξαιμίας συσχετίζονται θετικά με το ποσοστό των TCRαβ<sup>+</sup> βοηθητικών και κυτταρολυτικών T-κυττάρων, και, σε μικρότερο βαθμό, με το βαθμό έκφρασης του υποδοχέα (εικ. 7).
- γ. Στα βοηθητικά T-κύτταρα παρατηρείται ισχυρή θετική εξάρτηση του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA, που χαρακτηρίζει τον υποπληθυσμό των παρθένων (naive) βοηθητικών T-κυττάρων, με τους δείκτες υποξαιμίας αλλά και με τον BMI των ασθενών (εικ. 8).
- δ. Ανάλογη ισχυρή αλλά αρνητική εξάρτηση του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA με τους δείκτες υποξαιμίας παρατηρείται και στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα. Ο βαθμός έκφρασης του μορίου CD45RA στα κύτταρα αυτά συσχετίζεται επίσης αρνητικά με το συνολικό χρόνο ύπνου (εικ. 9).
- ε. Στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα παρατηρείται, επίσης, ισχυρή εξάρτηση του αριθμού των μνημονικών μορφών τους (CD45RO<sup>+</sup>) με τους δείκτες υποξαιμίας αλλά και με την ηλικία των ασθενών (εικ. 10).
- στ. Στα βοηθητικά T-κύτταρα παρατηρείται ισχυρή θετική εξάρτηση της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD28 με τον αριθμό των κεντρικών απνοιών και με τον BMI των ασθενών (εικ. 11).
- ζ. Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης παρουσιάζει, γενικώς, ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τους δείκτες υποξαιμίας και, σε ορισμένους υποπληθυσμούς, με τον BMI και την ηλικία των ασθενών (εικ. 12).
- η. Οι δείκτες υποξαιμίας ή άλλη από τις παραμέτρους των ασθενών δεν εμφάνισαν καμία συσχέτιση με την έκφραση κανενός μεμβρανικού μορίου στα B-κύτταρα και στα NK-κύτταρα.

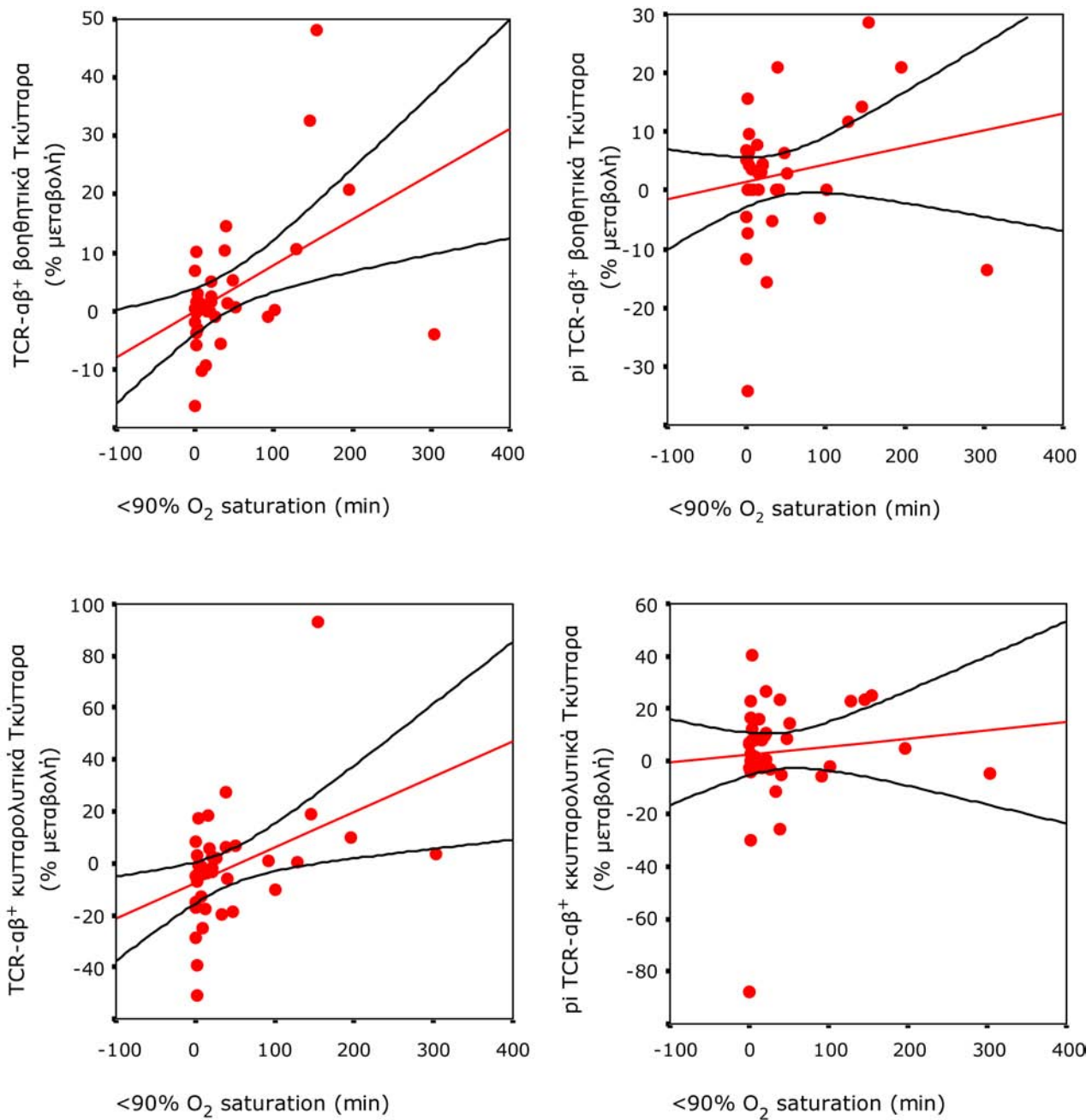
ΕΙΚΟΝΑ 5. Η ισχυρή θετική συσχέτιση του βαθμού έκφρασης του TCRγδ με τους δείκτες υποξαιμίας.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Οι συσχετίσεις του ποσοστού των TCRγδ<sup>+</sup> Τ-κυττάρων και του βαθμού έκφρασης του υποδοχέα με την ηλικία των ασθενών.

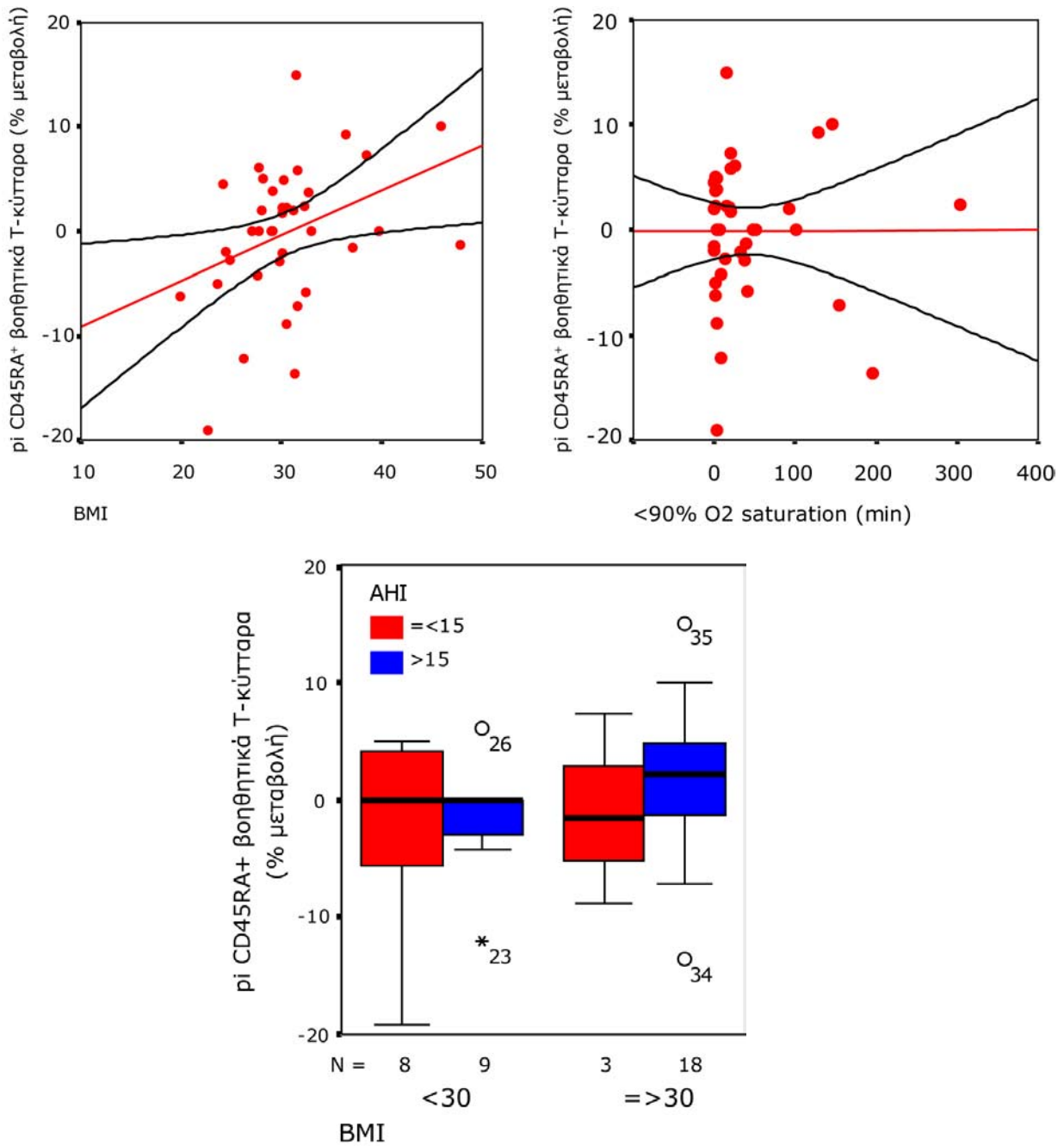


ΕΙΚΟΝΑ 7. Οι συσχετίσεις του ποσοστού των TCRαβ<sup>+</sup> βοηθητικών (πάνω) και κυτταρολυτικών T-κυττάρων με τον <90% O<sub>2</sub> saturation και οι αντίστοιχες συσχετίσεις με το βαθμό έκφρασης του υποδοχέα.

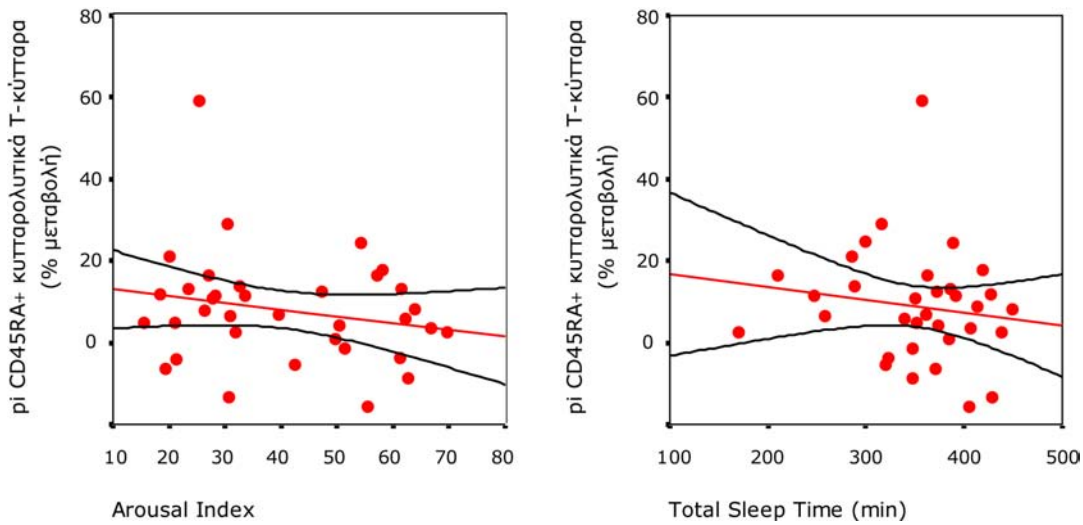




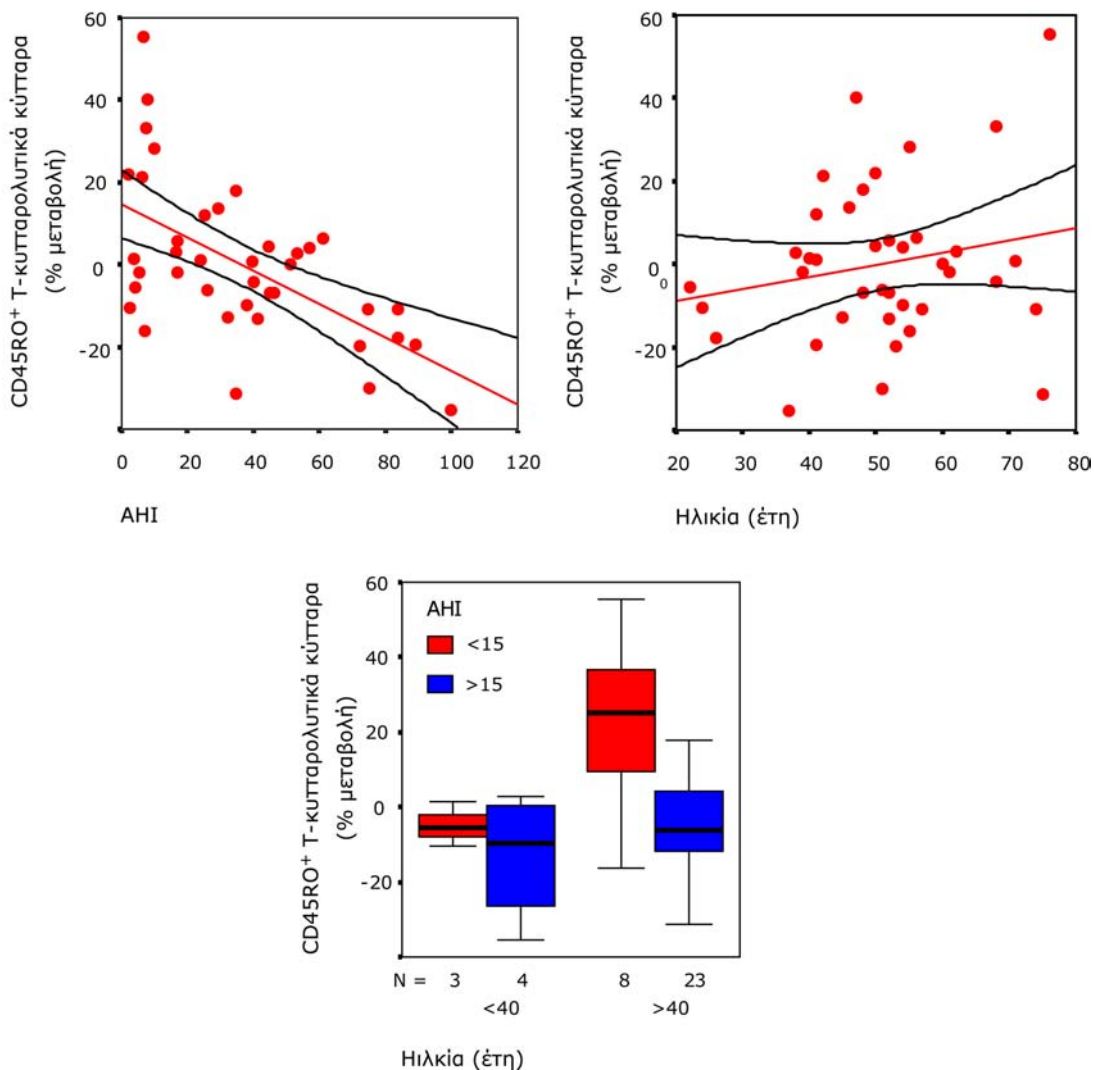
ΕΙΚΟΝΑ 8. Οι ισχυρές θετικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA στα βοηθητικά T-κύτταρα, του BMI (αριστερά) και της υποξαιμίας (δεξιά). Στο διάγραμμα boxplot (κάτω) φαίνεται η πολύ σημαντικότερη επίδραση που, ως εξ αυτής της συσχέτισης, έχει ο BMI σε ασθενείς με διαφορετικό ΑΗΙ.



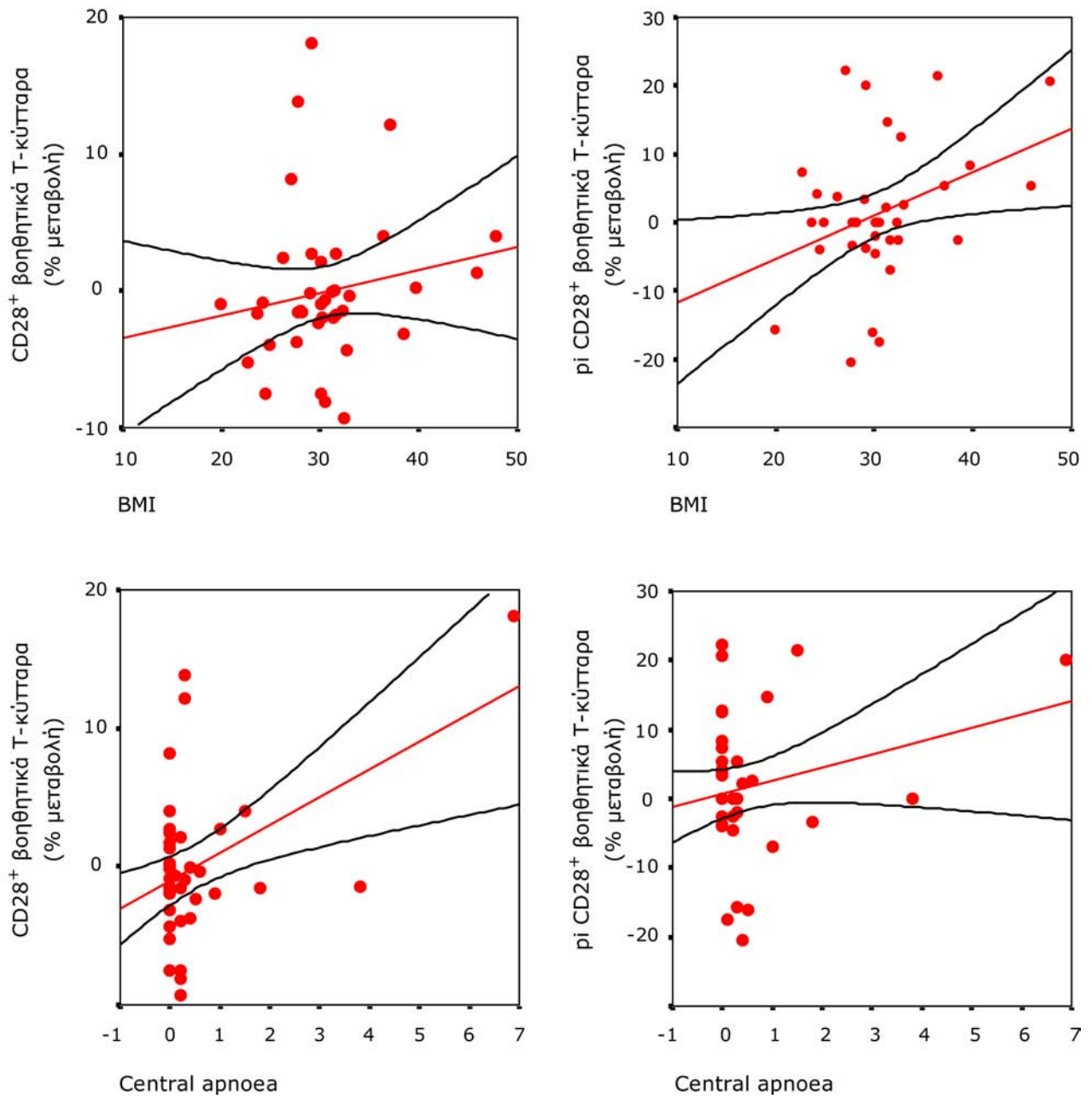
ΕΙΚΟΝΑ 9. Οι συσχετίσεις της έκφρασης του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα με το δείκτη μικροαφυπνίσεων και το συνολικό χρόνο ύπνου.



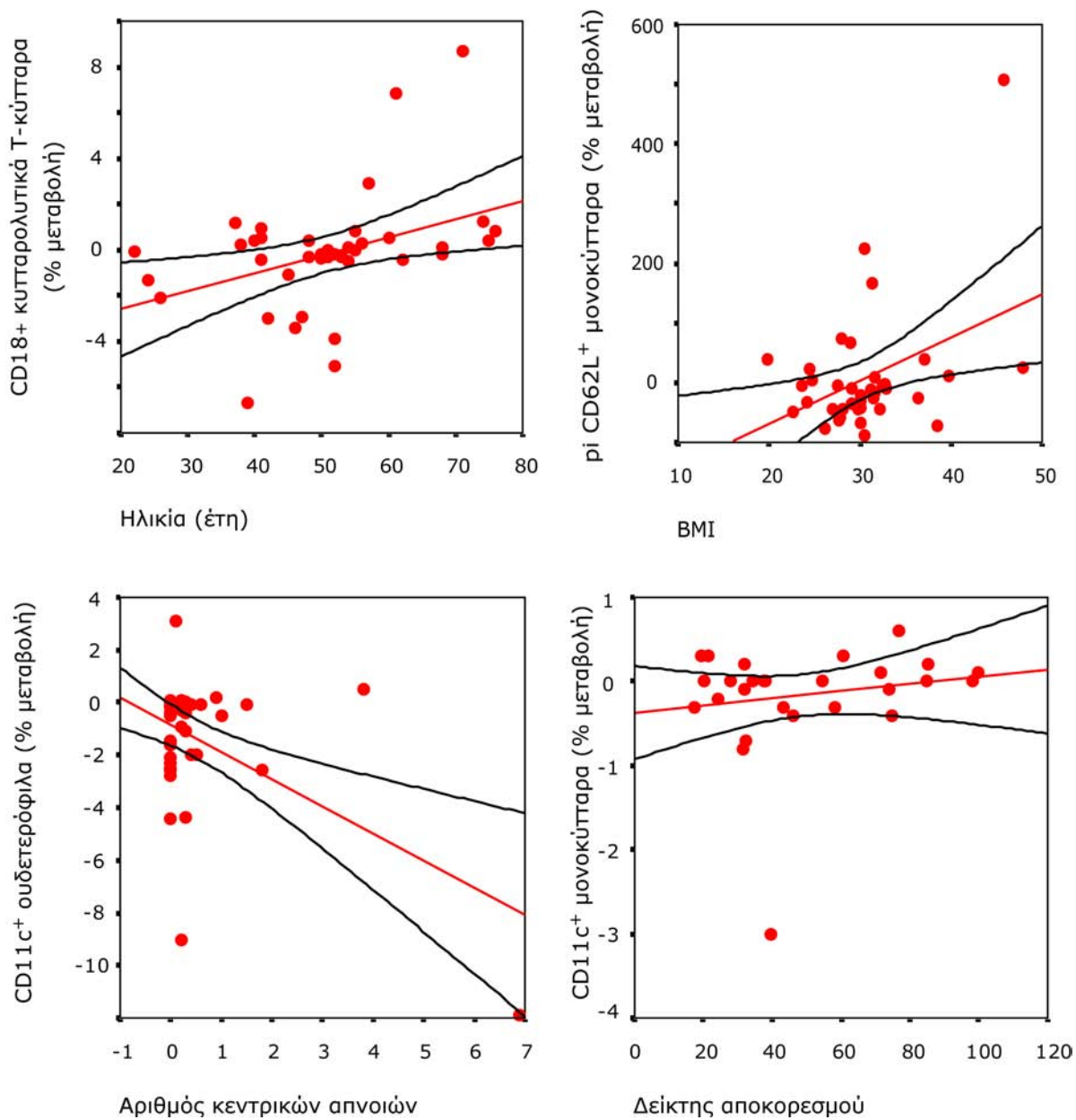
ΕΙΚΟΝΑ 10. Οι ισχυρές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ του ποσοστού των CD45RO κυτταρολυτικών T-κυττάρων και του AHI (αριστερά) και της ηλικίας (δεξιά). Στο διάγραμμα boxplot (κάτω) φαίνεται η πολύ σημαντικότερη επίδραση που, ως εξ αυτής της συσχέτισης, έχει ο AHI σε ασθενείς διαφορετικής ηλικίας.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Οι ισχυρές θετικές συσχετίσεις της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD28 στα βοηθητικά T-κύτταρα με τον BMI και τον αριθμό των κεντρικών απνοιών.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Αντιπροσωπευτικές ισχυρές συσχετίσεις της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης σε διάφορους λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΣΑΑΥ αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της αναπνοής στον ύπνο, η οποία συνεπάγεται τη στέρηση ύπνου και την ανάπτυξη υποξαιμίας στους πάσχοντες. Όπως λεπτομερώς αναπτύσσεται στο Γενικό Μέρος, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η στέρηση ύπνου συνοδεύεται από μεταβολές διαφόρων κυτταρικών και χυμικών παραμέτρων του ανοσιακού συστήματος, οι οποίες, αν και σχετίζονται με τις ανάλογες νευροενδοκρινικές αλλαγές, δεν εξαρτώνται αποκλειστικά και μόνο από αυτές [1]. Από την άλλη πλευρά, σε πειραματικές κυρίως συνθήκες, έχει δειχθεί ότι η υποξία επηρεάζει την έκφραση ενός πλήθους γονιδίων που, άμεσα ή έμμεσα, σχετίζονται με τη λειτουργία των ανοσοδραστικών κυττάρων και την ανοσιακή απάντηση [92]. Ισχυρές ενδείξεις [74] υποστηρίζουν ότι το γεγονός αυτό αντιπροσωπεύει προσαρμοστικό μηχανισμό του ανοσιακού συστήματος, μιας και τα κύτταρά του αναγκάζονται να διαφοροποιηθούν, να ενεργοποιηθούν και να εκφράσουν, τελικά, τη λειτουργία τους, σε όργανα και ιστούς, όπου επικρατούν πολύ διαφορετικές συνθήκες οξυγόνωσης, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. στο μικροπεριβάλλον της φλεγμονής ή των όγκων).

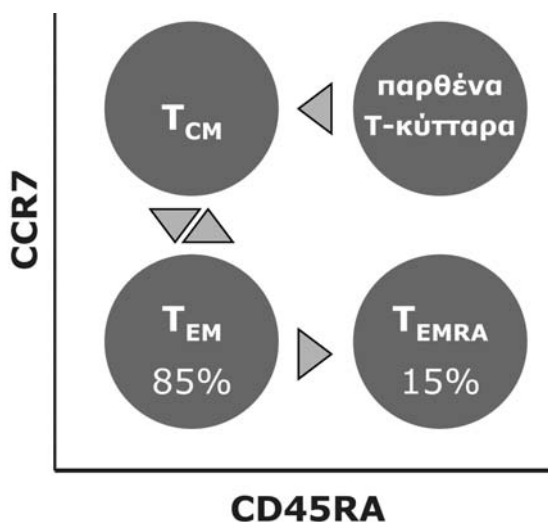
Από τα παραπάνω αναμένεται ότι η στέρηση ύπνου και η διαλείπουσα υποξία, που χαρακτηρίζουν το ΣΑΑΥ, ενδέχεται να προκαλούν στους ασθενείς ανοσιακές διαταραχές, οι οποίες δεν αποκλείεται να ευθύνονται και για κάποιες από τις κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου. Μέχρι στιγμής, οι ανοσιακές διαταραχές που συνοδεύουν το ΣΑΑΥ έχουν, κατά βάση, εξεταστεί στο πλαίσιο της χρόνιας ήπιας φλεγμονής, με την οποία έχει συνδεθεί η νοσηρότητα του συνδρόμου, και τα κυριότερα ευρήματα των σχετικών μελετών αφορούν διαταραχές της μετανάστευσης των ανοσοδραστικών κυττάρων [69].

Μετά από αυτά, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνηθούν πιθανές διαταραχές των υποπληθυσμών των ανοσοδραστικών κυττάρων του περιφερικού αίματος και της έκφρασης συγκεκριμένων μεμβρανικών μορίων με καθορισμένες λειτουργίες, οι οποίες θα μπορούσαν, σύμφωνα με τα παραπάνω, να είναι συνέπεια του συνδυασμού της στέρησης ύπνου, της διαλείπουσας υποξίας και της φλεγμονής που συνοδεύουν το σύνδρομο. Ειδικότερα, στη μελέτη μας ελέγχθηκε η επίπτωση που πιθανόν έχει ο συνδυασμός των παραπάνω διαταραχών, στις ανοσολογικές παραμέτρους που προαναφέρθηκαν, κατά τη διάρκεια μιας συνεδρίας ύπνου πολυκαταγραφικής μελέτης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των παραμέτρων πριν και αμέσως μετά από την πολυκαταγραφική μελέτη αξιολογήθηκαν με πολυπαραμετρική ανάλυση, ώστε να απομακρυνθεί η συγχυτική επίδραση της μιας ή της άλλης διαταραχής, αλλά και να σταθμιστούν σύμφωνα με τις προ της πολυκαταγραφικής μελέτης τιμές των παραμέτρων.

## Διαταραχές των παρθένων και μνημονικών T-κυττάρων

Το σημαντικότερο από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, στο βαθμό τουλάχιστον που το θέμα δεν έχει απασχολήσει τη μέχρι τώρα σχετική βιβλιογραφία, είναι οι διαταραχές των T-κυττάρων και ειδικότερα εκείνες που αφορούν τους υποληθυσμούς των παρθένων και μνημονικών T-κυττάρων, αλλά και την ωρίμανση του TCR (βλ. επόμενο κεφάλαιο).

Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι, στο ΣΑΑΥ, η υποξία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα, ο οποίος αφενός προκαλεί μείωση του ποσοστού των κυκλοφορούντων μνημονικών (CD45RO<sup>+</sup>) κυτταρολυτικών (CD8<sup>+</sup>) T-κυττάρων και αφετέρου επηρεάζει αντιθετικά το βαθμό έκφρασης του CD45RA στα βοηθητικά και στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα (εικ. 13). Υπό την επίδραση, δηλαδή, της υποξίας, ο βαθμός έκφρασης του CD45RA στα μεν βοηθητικά T-κύτταρα αυξάνει, ενώ στα κυτταρολυτικά ελαττώνεται.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Η διαφοροποίηση των T-κυττάρων ως συνάρτηση της έκφρασης των μορίων CD45RA και CCR7 (υποδοχέας χημειοκινών –CCL19 και CCL21– με λειτουργία μορίου προσκόλλησης). Τα T-κύτταρα ωριμάζουν στο θύμο, από τον οποίο εξέρχονται ως παρθένα κύτταρα, κύτταρα δηλαδή που δεν έχουν έκθει σε επαφή με το αντιγόνο (non-experienced). Ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηριστικό των παρθένων T-κυττάρων είναι το μόριο CD45RA. Μετά από την επαφή τους με το αντιγόνο, τα T-κύτταρα διαφοροποιούνται προς κεντρικά μνημονικά κύτταρα (T<sub>CM</sub>) που δεν εκφράζουν CD45RA αλλά χαρακτηρίζονται από τον ισότυπο CD45RO. Όταν αυτά τα κύτταρα έλθουν ξανά

σε επαφή με το αντιγόνο, διαφοροποιούνται προς δραστικά μνημονικά κύτταρα (T<sub>EM</sub>), τα οποία εκφράζουν τη δράση τους μετά από την εκ νέου έκφραση του CD45RA.

Η επίδραση του υποξικού ερεθίσματος στον υποπληθυσμό των μνημονικών CTL φαίνεται ότι είναι τόσο ισχυρή, ώστε να αναστρέφεται η αύξηση που προκαλείται από την ηλικία και η οποία, γνωστή από τη βιβλιογραφία, επιβεβαιώθηκε και στη μελέτη μας. Η απόδοση της μεταβολής του αριθμού των μνημονικών CTL σε ενδεχόμενη επίδραση της υποξίας στη μετανάστευσή τους δεν υποστηρίζεται από τα αποτελέσματά μας, επειδή δεν παρατηρήθηκαν ανάλογες μεταβολές των υπεύθυνων μορίων προσκόλλησης.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια μόνο σχετική μελέτη [90], η οποία υπαινίσσεται συσχέτιση της υποξίας με τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε πειραματόζωα, χωρίς όμως να περιλαμβάνει προσδιορισμό των CD45RO<sup>+</sup> κυττάρων. Τα ευρήματά μας, πάντως, βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση του αριθμού των μνημονικών CTL θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί σε

κάποιου βαθμού αναστολή της διαφοροποίησής τους. Το ενδιαφέρον, όμως, της συγκεκριμένης μελέτης έγκειται στο ότι η καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των CTL, που δείχθηκε υπό την επίδραση της υποξίας, αντirroπείται από την αυξημένη δυνατότητα ενεργοποίησης των CTL που επίσης συνοδεύει την υποξία.

Το μόριο CD45 είναι μία τύπου 1 διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων αιμοποιητικών κυττάρων [123, 132]. Συναντάται σε αφθονία στην επιφάνεια των T- και B-κυττάρων και εκτιμάται ότι καταλαμβάνει μέχρι και το 10% της κυτταρικής επιφάνειάς τους. Το κυτταροπλασματικό του τμήμα τού προσδίδει την ιδιότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης (protein tyrosine phosphatase, PTPase), η δράση της οποίας είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των ανοσοδραστικών κυττάρων, με κύριους μοριακούς στόχους τα μέλη της Src-οικογένειας. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι είναι και φωσφατάση της κινάσης Janus (Jak), γεγονός που λειτουργικά τού αποδίδει επιπλέον ιδιότητες, αντιθετικές των ήδη διαπιστωμένων. Από τη μία, ως PTPase, η δράση της είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον υποδοχέα του αντιγόνου φωσφορυλίωση της τυροσίνης, την υδρόλυση του PIP<sub>2</sub>, την ενεργοποίηση των Vav-1 και Ras, την κινητοποίηση του Ca<sup>2+</sup>, την παραγωγή κυτταροκινών, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων. Από την άλλη, ως Jak φωσφατάση, ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ανοσοδραστικών κυττάρων που μεσολαβείται από υποδοχείς κυτταροκινών, π.χ. της IL-3 και των ιντερφερονών (π.χ. της IFN-α). Το εξωκυττάριο τμήμα του αποτελείται από πέντε δομικές περιοχές, οι οποίες δεν σχηματίζουν πεδίο, αλλά μια δομή που προεξέχει και φέρει Ο-συνδεόμενες αλυσίδες γλυκάνης [132].

Η βιολογία του μορίου παρουσιάζει ενδιαφέρον, μιας και υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές του (με μοριακό βάρος 180-235 kD) που προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή διαφόρων εξονίων (εξόνια 4/A, 5/B, 6/C και 7) του γονιδίου, τα οποία κωδικοποιούν για αλληλουχίες του εξωκυττάριου τμήματος που διαθέτουν Ο-συνδεόμενες θέσεις γλυκοζυλίωσης (του NH<sub>2</sub>-τμήματος) [132]. Είναι γνωστό ότι η εναλλακτική συρραφή ρυθμίζεται από πρωτεΐνες που προσδένονται σε αλληλουχίες τού υπό ρύθμιση γονιδίου και επηρεάζουν την αναγνώριση των θέσεων συρραφής από το βασικό μηχανισμό συρραφής. Φαίνεται, επίσης, να ρυθμίζεται με τρόπο ειδικό για τον ιστό και την κατάσταση διαφοροποίησης του κυττάρου, μέσω ειδικών για τον ιστό παραγόντων. Ταυτόχρονα, ο μηχανισμός της εναλλακτικής συρραφής μπορεί να ρυθμιστεί και μέσω απόκρισης σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως αυτό της διέγερσης από τον TCR. Μετά τη σύνδεση του TCR με το αντιγόνο, έπεται μια σημαντική αλλαγή στην έκφραση των επιφανειακών ισομορφών του CD45 [133]. Μέχρι στιγμής, δεν έχει αναγνωρισθεί ο/οι προσδέτης/ες για το εξωκυττάριο πρωτεϊνικό τμήμα του CD45, αλλά τρία μόρια που συνδέονται με το υδατανθρακικό του τμήμα: η γκαλεκτίνη-1, το CD22 και το πλούσιο σε κυστεΐνες πεδίο του υποδοχέα της μαννόζης. Υπάρχουν ενδείξεις, όμως, ότι η πρόσδεση του πρωτεϊνικού τμήματος ρυθμίζει τη

δραστηριότητα της φωσφατάσης. Είναι πιθανό, δηλαδή, οι διαφορετικές ισομορφές του CD45 να ρυθμίζουν τη λειτουργία των T-κυττάρων μέσω της διαφορετικής ικανότητας τους για αλληλεπίδραση είτε με τον προσδέτη είτε μεταξύ τους είτε με τον TCR. Παρόλο που θεωρητικά ο αριθμός των πιθανών ισομορφών που μπορούν να προκύψουν είναι μεγάλος, μόνο έξι συναντώνται ευρέως: η e3\_8, η 378 (RO), η 3578 (RB), η 34578 (RAB), η 35678 (RBC) και η 345678 (RABC) [123].

Η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών είναι ειδική του κυτταρικού τύπου και εξαρτάται από την κατάσταση διαφοροποίησης του λευκοκυττάρου. Τα Β-κύτταρα εκφράζουν την υψηλού μοριακού βάρους ισομορφή CD45RABC. Τα ανώριμα CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> θυμοκύτταρα εκφράζουν, κυρίως, τις χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφές, ενώ τα ώριμα CD4<sup>+</sup> ή CD8<sup>+</sup> θυμοκύτταρα, καθώς και τα CD4<sup>+</sup> ή CD8<sup>+</sup> κύτταρα της περιφέρειας, εκφράζουν πολλαπλές ισομορφές. Η έκφραση των ισομορφών μεταβάλλεται, επίσης, και κατά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Τα παρθένα (μη ενεργοποιημένα) T-κύτταρα εκφράζουν την υψηλού μοριακού βάρους ισομορφή CD45RB και τη χαμηλή CD45RO μετά από την ενεργοποίησή τους. Ο CD45RO φαινότυπος μνήμης είναι αναστρέψιμος, αφού το κύτταρο είναι σε θέση να εκφράσει εκ νέου και τις άλλες ισομορφές, εφόσον μεταβληθεί η κατάσταση ενεργοποίησής του [123]. Η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τον τρόπο σηματοδότησης του TCR. Η έκφραση της CD45RABC ισομορφής είναι σε θέση άμεσα να ενισχύσει την TCR σηματοδότηση, ενώ αντίθετα η CD45RO ισομορφή απαιτεί και παρουσία συνδιεγερτικού σήματος για την ευόδωση της σηματοδότησης [134].

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα ευρήματα της μελέτης μας, εκτός από ενδεχόμενη ευαισθησία των παρθένων ή των μνημονικών κυττάρων στο υποξικό ερέθισμα, θα μπορούσαν να ερμηνευθούν από τυχόν επίδραση, την οποία το υποξικό ερέθισμα ασκεί στους, εν πολλοίς άγνωστους μέχρι στιγμής, μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των ισομορφών του CD45. Αν ισχύει αυτή η υπόθεση, δεν αποκλείεται η διαταραχή αυτή να επηρεάζει και τη δυνατότητα ενεργοποίησης των κυτταρολυτικών T-κυττάρων.

Στο σημείο αυτό, αναφέρεται ότι στο υλικό της μελέτης μας παρατηρήθηκε, επίσης, ότι ο βαθμός έκφρασης του CD45RA στα βοηθητικά T-κύτταρα παρουσιάζει θετική συσχέτιση, τόσο με τους δείκτες υποξίας, όσο και με το BMI των ασθενών. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε κάποια αθροιστική, αντίστοιχη με την παραπάνω, επίδραση της φλεγμονής που συνοδεύει την παχυσαρκία, πάνω στη ρύθμιση της έκφρασης των ισομορφών του CD45 ή σε μια αντιρροπιστική κινητοποίηση του υποπληθυσμού των παρθένων λεμφοκυττάρων.

## **Διαταραχές του TCR**

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι, στο ΣΑΑΥ, η υποξία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα, ο οποίος συσχετίζεται θετικά, τόσο με τον αριθμό των κυκλοφορούντων TCRγδ<sup>+</sup>



T-κυττάρων, όσο και με τον αντίστοιχο των TCRαβ<sup>+</sup> βοηθητικών και κυτταρολυτικών T-κυττάρων.

Τα T-κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους TCR αποτελούμενο από γδ, αντί από αβ αλυσίδες, αντιπροσωπεύουν μικρό ποσοστό των περιφερικών λεμφοκυττάρων, που ανέρχεται στο 1-10%. Η πλειοψηφία τους εκφράζει τον Vγ9/Vδ2 TCR και το φαινότυπο CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους, αντίθετα με τον αβ T-κυτταρικό πληθυσμό, είναι η ικανότητα να αναγνωρίζουν και να αποκρίνονται σε μη πεπτιδικά και μη επεξεργασμένα από το ανοσοπρωτεόσωμα φωσφοαντιγόνα, με διαδικασία μη υποκείμενη σε HLA-περιορισμό, καθώς και η ολιγικλωνική έκπτυξή τους. Λίγα είναι γνωστά για το φυσιολογικό ρόλο τους. Το γεγονός, όμως, ότι αντιδρούν έναντι αντιγόνων των μυκοβακτηριδίων και των παρασίτων καθώς και έναντι καρκινικών κυττάρων υποδεικνύει κάποιο βασικό ρόλο τους στην ανοσοεπιτήρηση. Φαίνεται ότι τα γδ T-κύτταρα ρυθμίζουν τόσο την έναρξη, την εξέλιξη όσο και την έκβαση της ανοσιακής απάντησης που στρέφεται έναντι μικροοργανισμών και ιδιαίτερα ιών. Είναι πιθανόν ότι η πιο σημαντική λειτουργία τους είναι η αντι-ιική προστασία. Αφού διεγερθούν από τα φωσφοαντιγόνα, παράγουν μεγάλα ποσά κυτταροκινών, κυρίως IFN-γ και TNF-α, επηρεάζοντας έτσι τη διαφοροποίηση των βοηθητικών T-κυττάρων προς Th1- και Th2-κύτταρα [135].

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την ηλικία [136, 137]. Σε αντίθεση με τις μελέτες αυτές, οι οποίες αναφέρονται κυρίως σε υγιείς υπερήλικες, στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών των κυττάρων προϊούσης της ηλικίας, η οποία είναι πολύ πιθανό ότι αποτελεί συνέπεια της ισχυρής θετικής συσχέτισης του αριθμού τους με τους υποξικούς δείκτες. Φαίνεται, δηλαδή, ότι το υποξικό ερέθισμα, στους ασθενείς με ΣΑΑΥ, είναι ικανό να αναστρέφει τη ηλικιακή συσχέτιση του αριθμού των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων με την ηλικία, που παρατηρείται στα υγιή άτομα.

Από τη μελέτη μας φαίνεται, επίσης, ότι η αύξηση αυτή του TCRγδ<sup>+</sup> T-κυτταρικού υποπληθυσμού ενδέχεται να έχει και λειτουργικές συνέπειες, μιας και, παράλληλα με τον αριθμό τους, αυξάνεται και ο βαθμός έκφρασης του υποδοχέα. Τα αποτελέσματά μας αυτά είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα των Dyugonskaya et al [70], οι οποίοι, αν και δεν παρατήρησαν μεταβολή του αριθμού των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων, συγκρίνοντας ασθενείς με ΣΑΑΥ με φυσιολογικά άτομα, βρήκαν σημαντικές διαφορές στην ικανότητά τους να παράγουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες, αποδίδοντας σε αυτό τους το εύρημα ενδεχόμενη συμμετοχή αυτών των κυττάρων στην ανάπτυξη της ενδοθηλιακής βλάβης που συνοδεύει το σύνδρομο.

Ως προς την αιτιολογία των μεταβολών που παρουσιάζουν τα TCRγδ<sup>+</sup> T-κύτταρα στο ΣΑΑΥ, είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε επαγόμενη από την υποξία διαταραχή της μετανάστευσης (migration) και της εγκατάστασής τους (homing). Αν και τα αποτελέσματά μας δεν επιβεβαιώνουν σχετικές παρατηρήσεις των Dyugonskaya et al [70], στη μελέτη των οποίων βρέθηκε αύξηση της έκφρασης της L-σελεκτίνης από τα TCRγδ<sup>+</sup> T-κύτταρα και, κατά

συνέπεια, αύξηση της προσκολλητικότητας τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν τις παραπάνω λειτουργίες τους παραμένουν σε σημαντικό βαθμό αδιευκρίνιστες. Σημαντικές πειραματικές ενδείξεις, πάντως, υποδεικνύουν ότι η μετανάστευση των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων ελέγχεται πολύ περισσότερο από υποδοχείς των φλεγμονωδών κυτταροκινών και λιγότερο από υποδοχείς εγκατάστασης, όπως ο CCR7, που ευθύνονται για τη μετανάστευση των υπόλοιπων λεμφοκυττάρων [135]. Κατόπιν τούτου, είναι πολύ πιθανό ότι τον υποκείμενο αιτιολογικό παράγοντα των παρατηρουμένων διαταραχών των TCRγδ<sup>+</sup> T-κυττάρων αποτελεί η φλεγμονή ή ότι, σε κάθε περίπτωση, οι διαταραχές αυτές, είτε αιτιολογικά είτε ως επιφαινόμενα, αντανακλούν την πολύπλοκη αλληλεξάρτηση της υποξίας και της φλεγμονής που χαρακτηρίζει το σύνδρομο.

Γενικώς, τόσο η αύξηση του αριθμού των TCRγδ<sup>+</sup>, όσο και η παράλληλη αύξηση των TCRαβ<sup>+</sup> T-κυττάρων, που βρέθηκε στη μελέτη μας να επάγονται από το υποξικό ερέθισμα στους ασθενείς με ΣΑΑΥ, δεν αποκλείεται να αντιπροσωπεύουν αντιρροπιστική κινητοποίηση των κυττάρων της ειδικής ανοσίας σε λοιμώδη ερεθίσματα, στα οποία οι ασθενείς αυτοί βρίσκονται περισσότερο εκτεθειμένοι, λόγω ακριβώς της μόνιμης ενεργοποίησης των φλεγμονωδών μηχανισμών τους. Υποστηρικτικό αυτής της άποψης είναι το εύρημα ότι στα βοηθητικά T-κύτταρα παρατηρείται, επίσης, αύξηση του συνδιεγερτικού μορίου CD28.

### **Διαταραχές της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης**

Οι διαταραχές των μορίων προσκόλλησης αποτελούν ίσως την περισσότερο μελετημένη στη βιβλιογραφία ανοσολογική παράμετρο των ασθενών με ΣΑΑΥ [56,57,59,69]. Βασικός στόχος των σχετικών εργασιών είναι η διερεύνηση τυχόν σχέσης της προσκολλητικότητας των φλεγμονωδών κυττάρων με το ενδοθήλιο, σε μια προσπάθεια με ερμηνευθεί η ενδοθηλιακή βλάβη και, κατά συνέπεια, η αυξημένη επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων σε αυτούς τους ασθενείς. Στο σημείο αυτό, όμως, πρέπει να τονιστεί η βασική μεθοδολογική προσέγγιση αυτών των μελετών, σε σχέση με τη δική μας. Σε όλες τις μελέτες της βιβλιογραφίας, το θέμα προσεγγίζεται είτε με μετρήσεις διαλυτών μορίων προσκόλλησης είτε, σπανιότερα, με μετρήσεις της έκφρασής τους σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, πάντοτε όμως συγκρίνοντας ανοϊκούς ασθενείς με φυσιολογικά άτομα. Γενικό συμπέρασμα των εργασιών, που έχουν γίνει μέχρι τώρα, είναι ότι οι ανοϊκοί ασθενείς παρουσιάζουν αύξηση της συγκέντρωσης στον ορό ή και της έκφρασης διαφόρων μορίων προσκόλλησης, σε σχέση με τα υγιή άτομα.

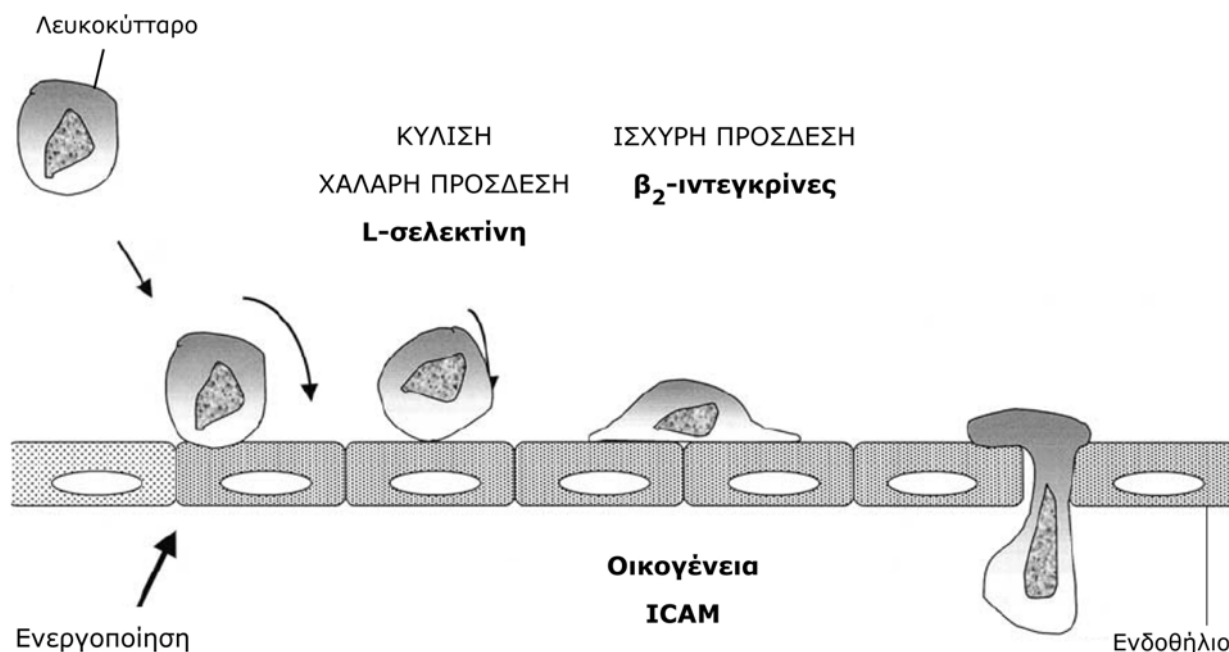
Όπως έχει και παραπάνω τονιστεί, ο σχεδιασμός της δικής μας μελέτης επιτρέπει τη συναγωγή συμπερασμάτων, σε σχέση με την επίδραση συγκεκριμένων και όχι υποθετικών παραγόντων των ασθενών με ΣΑΑΥ, με τις ανοσολογικές παραμέτρους. Έτσι, στο συγκεκριμένο επίπεδο των μορίων προσκόλλησης, η μελέτη μας δείχνει ότι (α) το BMI, αλλά όχι και η υποξία, συσχετίζεται ισχυρά με αύξηση της έκφρασης της L-σελεκτίνης (CD62L) από τα φλεγμονώδη κύτταρα (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα), και (β)

αντίθετα, η υποξία, αλλά όχι και το BMI, συσχετίζεται ισχυρά με ελάττωση της έκφρασης των  $\beta_2$ -ιντεγκρινών (CD11b, CD11c) στην επιφάνεια των ίδιων κυττάρων.

Η L-σελεκτίνη ευθύνεται για την κύλιση (rolling) και τη χαλαρή πρόσδεση (tethering) των λευκοκυττάρων πάνω στο ενδοθήλιο των αγγείων (εικ. 13). Η υπερέκφρασή της διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της φλεγμονής και στη δημιουργία της αγγειακής βλάβης. Η άμεση πρωτεολυτική διάσπαση του μορίου και η αποκοπή του από την κυτταρική επιφάνεια λειτουργεί ως ρυθμιστικός μηχανισμός περιορισμού της αγγειακής φλεγμονής. Έτσι, τα κυκλοφορούντα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα φαίνεται ότι χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση L-σελεκτίνης [138]. Σύμφωνα με αυτά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι ο BMI των ασθενών με ΣΑΑΥ σχετίζεται αρνητικά με την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων.

Οι  $\beta_2$ -ιντεγκρίνες συμμετέχουν, στη συνέχεια, στη σταθερή πρόσδεση των μονοπυρήνων/φαγοκυττάρων πάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο (εικ. 14). Η πρόσδεση αυτή εξυπηρετείται από τη σύνδεσή τους με μόρια της οικογένειας ICAM που εκφράζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και προϋποθέτει ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων αλλά και των ίδιων των μορίων τους, γεγονός που επάγεται, μεταξύ άλλων, και από την L-σελεκτίνη [138]. Πρωτεολυτική διάσπαση των  $\beta_2$ -ιντεγκρινών δεν παρατηρείται και, κατά συνέπεια, δεν προσδιορίζονται διαλυτές μορφές αυτών των μορίων.

ΕΙΚΟΝΑ 14. Η διαδικασία μετανάστευσης των λευκοκυττάρων από τον ενδαγγειακό προς τον εξωαγγειακό χώρο. Φαίνεται η συμμετοχή της L-σελεκτίνης και των  $\beta_2$ -ιντεγκρινών στις συγκεκριμένες φάσεις.



Από τα παραπάνω γίνεται, κατ' αρχήν, σαφές ότι η αναγωγή των μέχρι σήμερα σχετικών αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας δεν είναι δυνατό να συσχετιστεί μονοπαραγοντικά με κάποιες από τις διαταραχές των ασθενών με ΣΑΑΥ. Οι διάφοροι

παράγοντες που συνυπάρχουν στο σύνδρομο, κυρίως η υποξία και η φλεγμονή, συνεπάγονται πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις, τουλάχιστον στο επίπεδο της κυτταρικής προσκόλλησης, το τελικό αποτέλεσμα των οποίων φαίνεται ότι είναι αρκετά δύσκολο να προσδιοριστεί.

## **Διαταραχές σχετιζόμενες με τον BMI**

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προκύπτει ότι ο BMI των ασθενών με ΣΑΑΥ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα, ο οποίος συσχετίζεται θετικά με μια σειρά παραμέτρων και συγκεκριμένα (α) με το βαθμό έκφρασης του CD45RA στα βοηθητικά T-κύτταρα, (β) το βαθμό ενεργοποίησης των βοηθητικών T-κυττάρων, όπως αυτός μπορεί να εκτιμηθεί από την έκφραση του συνδιεγερτικού μορίου CD28, και (γ) με το βαθμό έκφρασης του μορίου προσκόλλησης CD62L στη μεμβράνη των μονοκυττάρων.

Οι επιμέρους αυτές συσχετίσεις σχολιάστηκαν παραπάνω. Η επίδραση όμως του BMI, που αναδεικνύεται από τη μελέτη μας, αποτελεί μια από τις λίγες *in vivo* ενδείξεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, αναφορικά με την πολύπλευρη σχέση της παχυσαρκίας με το ανοσιακό σύστημα.

Μέχρι πρόσφατα και παρόλο που από πληθυσμιακές μελέτες ήταν γνωστό ότι η παχυσαρκία σχετιζόταν με αύξηση της συγκέντρωσης κάποιων δεικτών φλεγμονής στον ορό, ο λιπώδης ιστός πιστευόταν ότι ήταν μια απλή αποθήκη ενέργειας [139, 140]. Πιο σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι, τελικά, πρόκειται για έναν ενδοκρινή ιστό, που παράγει πληθώρα πρωτεϊνών, στις οποίες περιλαμβάνονται κυτταροκίνες (φλεγμονώδεις αλλά και αντιφλεγμονώδεις), ιντερλευκίνες, παράγοντες του συμπληρώματος, πρωτεΐνες οξειας φάσης και πρωτεΐνες που προσομοιάζουν με ορμόνες, όπως η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη. Η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών φαίνεται να έχει θετική συσχέτιση με τα αποθέματα του λιπώδους ιστού, η μείωση των οποίων μετέβαλλε την παραγωγή τους από αυτόν. Οι TNF-α και IL-6, όντας φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που εκκρίνονται και από το λιπώδη ιστό, έχουν συσχετιστεί με επιπλοκές της παχυσαρκίας, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη. Η παραγωγή αθηρογενετικών χημειοκινών, από τον υποδόριο αλλά και από τον περιαγγειακό λιπώδη ιστό, μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης και αντίστασης στην ινσουλίνη. Η διήθηση του ιστού από μακροφάγα και η συνακόλουθη ενεργοποίησή τους έχει, επίσης, συσχετιστεί με τις επιπλοκές της παχυσαρκίας. Ο λιπώδης ιστός των παχύσαρκων έχει θεωρηθεί ως υποξική ανατομική περιοχή, στην οποία παράγονται τοπικά χημειοτακτικοί παράγοντες (κυρίως των μακροφάγων) που επάγονται από την υποξία λόγω της έκφρασης του HIF-1α ο οποίος παράλληλα διεγείρει και την έκφραση της λεπτίνης [141]. Από τη άλλη, είναι γνωστό ότι η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη διαθέτουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, επηρεάζοντας τη λειτουργία, τόσο των T-κυττάρων, όσο και των μονοκυττάρων. Ο λιπώδης ιστός, δηλαδή, φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το ανοσιακό σύστημα συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη φλεγμονή που παρατηρείται στην παχυσαρκία. Είναι, λοιπόν, πιθανό ότι οι

παρατηρηθείσες στη μελέτη μας ανοσοφαινοτυπικές διαταραχές στους ασθενείς με ΣΑΑΥ, σχετίζονται με την παραγωγή κυτταροκινών και άλλων ανοσοδραστικών ουσιών από το λιπώδη ιστό τους.

### **Συμπεράσματα και προοπτικές**

Οι μέχρι τώρα μελέτες των ανοσιακών διαταραχών σε ασθενείς με ΣΑΑΥ, αν και εξαιρετικά περιορισμένες, αποσκοπούσαν να αναδείξουν διαφορές που ενδεχομένως παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί, σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στόχος της δικής μας μελέτης ήταν να ελεγχθεί κατά πόσο το υποξικό ερέθισμα, που συνεπάγεται ο κατακερματισμένος ύπνος των ασθενών, είναι ικανό να επάγει συγκεκριμένες ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές στα ανοσοδραστικά κύτταρα.

Από τα αποτελέσματά μας, επιβεβαιώνεται ότι το υποξικό ερέθισμα, που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια μιας συνεδρίας ύπνου, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα, υπεύθυνο για μια πληθώρα μεταβολών σε κύτταρα, τόσο της φυσικής, όσο και της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Έχοντας υπόψη τη δραστική συμμετοχή του HIF στην έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων των λευκοκυττάρων, όπως αυτή έχει αποκαλυφθεί από *in vitro* μελέτες, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι μεταγραφικός αυτός παράγοντας μπορεί να αποτελεί τον κοινό παρονομαστή αυτών των διαταραχών. Το θέμα παραμένει ανοικτό για παραπέρα διερεύνηση.

Η μελέτη μας αποκάλυψε, επίσης, ότι, σε σημαντικό βαθμό, οι ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ΣΑΑΥ, βρίσκονται σε ανεξάρτητη συνάρτηση από το BMI των ασθενών. Σε πολλές μάλιστα περιπτώσεις, οι παρατηρούμενες διαταραχές ήταν αποτέλεσμα της συνδυαστικής επίδρασης της υποξίας και του BMI. Από το γεγονός αυτό προκύπτει ότι το ανοσιακό σύστημα των ασθενών με ΣΑΑΥ βρίσκεται υπό τη συνδυαστική επίδραση μιας σειράς παραγόντων, χωρίς να μπορεί να υποστηριχθεί με βεβαιότητα ότι οι συνέπειές τους είναι αρνητικές για τη λειτουργία του ούτε ότι οι παρατηρούμενες διαταραχές έχουν αιτιολογική βάση ή αντιπροσωπεύουν απλά επιφαινόμενα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ της μελέτης ήταν να ελεγχθεί αν το υποξικό ερέθισμα, που συνεπάγεται ο κατακερματισμένος ύπνος των ασθενών με σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο (ΣΑΑΥ), είναι ικανό να επάγει συγκεκριμένες ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές στα ανοσοδραστικά κύτταρα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 44 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς (35 άνδρες και 9 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $50,16 \pm 12,45$  ετών), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου, στο πλαίσιο διάγνωσης πιθανού ΣΑΑΥ. Από τους ασθενείς γινόταν συλλογή δείγματος φλεβικού αίματος, πριν αρχίσει η πολυκαταγραφική μελέτη ύπνου και αμέσως μετά από την αφύπνισή τους. Στα δείγματα αίματος γινόταν γενική εξέταση αίματος και ανοσοφαινοτυπική μελέτη των ανοσοδραστικών κυττάρων, με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής και των κατάλληλων φθοριοσημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση πολυπαραγοντικής ανάλυσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (α) Παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση του βαθμού έκφρασης του TCR $\gamma\delta$  στον αντίστοιχο υποπληθυσμό των T-κυττάρων, με τους δείκτες υποξαιμίας. Το ποσοστό των TCR $\gamma\delta^+$  T-κυττάρων βρέθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή θετική συσχέτιση με την ηλικία, ενώ ο βαθμός έκφρασης του υποδοχέα συσχετίζεται ισχυρά μεν αλλά αρνητικά με την ηλικία των ασθενών. (β) Οι δείκτες υποξαιμίας βρέθηκαν να συσχετίζονται θετικά με το ποσοστό των TCR $\alpha\beta^+$  βοηθητικών και κυτταρολυτικών T-κυττάρων, και, σε μικρότερο βαθμό, με το βαθμό έκφρασης του υποδοχέα. (γ) Στα βοηθητικά T-κύτταρα παρατηρήθηκε ισχυρή θετική εξάρτηση του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA, που χαρακτηρίζει τον υποπληθυσμό των παρθένων (naïve) βοηθητικών T-κυττάρων, με τους δείκτες υποξαιμίας αλλά και με τον BMI των ασθενών. (δ) Ανάλογη ισχυρή αλλά αρνητική εξάρτηση του βαθμού έκφρασης του μορίου CD45RA με τους δείκτες υποξαιμίας παρατηρήθηκε και στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα. Ο βαθμός έκφρασης του μορίου CD45RA στα κύτταρα αυτά συσχετίζεται επίσης αρνητικά με το συνολικό χρόνο ύπνου. (ε) Στα κυτταρολυτικά T-κύτταρα παρατηρήθηκε, επίσης, ισχυρή αρνητική εξάρτηση του αριθμού των μνημονικών μορφών τους (CD45RO $^+$ ) με τους δείκτες υποξαιμίας αλλά και με την ηλικία των ασθενών. (στ) Στα βοηθητικά T-κύτταρα παρατηρήθηκε ισχυρή θετική εξάρτηση της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD28 με τον αριθμό των κεντρικών απνοιών και με τον BMI των ασθενών. (ζ) Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης βρέθηκε ότι παρουσιάζει, γενικώς, ισχυρή συσχέτιση με τους δείκτες υποξαιμίας και, σε ορισμένους υποπληθυσμούς, με τον BMI και την ηλικία των ασθενών. (η) Οι δείκτες υποξαιμίας ή άλλη από τις παραμέτρους των ασθενών δεν εμφάνισαν καμία συσχέτιση με την έκφραση κανενός μεμβρανικού μορίου στα B-κύτταρα και στα NK-κύτταρα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Το υποξικό ερέθισμα που προκαλείται στους ασθενείς με ΣΑΑΥ, κατά τη διάρκεια μιας συνεδρίας ύπνου, επάγει μια σειρά ανοσοφαινοτυπικών μεταβολών σε κύτταρα,

τόσο της φυσικής, όσο και της ειδικής ανοσίας. Σημαντική επίδραση στις παραμέτρους που μελετήθηκαν, δείχθηκε ότι έχει, επίσης, ο BMI των ασθενών, καθώς και, σε πολλές περιπτώσεις, η συνδυαστική επίδρασή του με το υποξικό ερέθισμα.

## **ABSTRACT**

### **Immune-cell alterations related with polysomnography parameters in patients with obstructive sleep apnoea**

*Fani Kalala*

Department of Immunology & Histocompatibility

(Director: Prof. A.E. Germenis)

and

Respiratory Medicine Department

(Director: Prof. K.I. Gourgoulianis)

Faculty of Medicine – School of Health Sciences

University of Thessaly

**OBJECTIVE** The objective of the study was to investigate whether the hypoxic stimulus, that correlates with the sleep fragmentation of patients that suffer from Obstructive Sleep Apnoea (OSA), is able to induce specific immunophenotypic alterations of immune reactive cells.

**MATERIAL AND METHODS** 44 randomly selected patients (35 men and 9 women, mean age  $50,16 \pm 12,45$  years) that were referred to the Respiratory Medicine Department in order to undergo full polysomnography (PSG) for the diagnosis of OSA were included in the study. Peripheral blood samples were collected from the patients just before the commencement of the PSG and, as soon as, it ended. The blood samples were assessed with a complete blood count and with immunophenotypic analysis of immune reactive cells. Flow cytometry was employed for the immunophenotypic analysis by which the expression of specific cell surface markers, with the use of the appropriate fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies, was determined. Multiple regression was used for the statistical analysis of the results.

**RESULTS** (a) A strong positive correlation of the TCR $\gamma\delta$  pi/fluorescence intensity of the receptor on TCR $\gamma\delta^+$  T-cells with the hypoxemia markers was observed. The TCR $\gamma\delta^+$  T-cell percentage was positively correlated with the age of the patients while at the same time its pi/fluorescence intensity showed negative correlation with the age of the patients. (b) The hypoxemia markers were found to positively correlate with the percentage of the TCR $\alpha\beta^+$  T-helper and T-cytolytic cells and, to a lesser extent, to the receptor's pi/fluorescence intensity. (c) The pi/fluorescence intensity of the CD45RA molecule, characteristic of the naïve T-helper cell subpopulation, was strongly and positively correlated with both the hypoxemia markers and the BMI of the patients. (d) An analogous but negative correlation of the

pi/fluorescence intensity of the CD45RA with the hypoxemia markers was observed at the T-cytolytic cell subset. The pi/fluorescence intensity of the molecule was, also, correlated with the total sleep time of the patients. (e) The number of the memory (CD45RO<sup>+</sup>) cytolytic T-cells was strongly but negatively correlated with both the hypoxemia markers and the patients age. (f) The expression of the costimulatory molecule CD28 on T-helper cells was positively correlated with the central apnoea number and the patients BMI. (g) A strong positive correlation of the expression of adhesion molecules in general with the hypoxemia markers was observed and, as far as, certain subpopulations are concerned with the patients BMI and age as well. (h) The hypoxemia markers or any other of the patients parameters had no correlation with the expression of any membrane molecule of B and NK cells.

**CONCLUSION** Exposure to hypoxia, as that seen after one night of sleep of OSA patients, evokes a series of immunophenotypic alterations on cells of both the innate and adaptive immune system. The BMI of the patients, as well as, in some cases its combinatorial effect with hypoxia were, also, shown to significantly affect the parameters studied.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BRYANT P, TRINDER J, CURTIS N. Sick and tired : does sleep have a vital role in the immune system? *Nat Rev Immunol* 2004, 4:457-467
2. OPP MR. Cytokines and sleep: the first hundred years. *Brain Behav Immun* 2004, 18:295-297
3. MAJDE JA, KRUEGER JM. Links between the innate immune system and sleep. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 116:1188-1198
4. KRUEGER JM, OBAL FJ, FANG J, KUBOTA T, TAISHI P. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 933:211-221
5. MILLS PJ, DIMSDALE JE. Sleep apnea: a model for studying cytokines, sleep, and sleep disruption. *Brain Behav and Immun* 2004, 18: 298-303
6. GALA RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991, 198:513-527
7. SPÄTH-SCHWALBE E, HANSEN K, SCHMIDT F, SCHREZENMEIER H, MARSHALL L, BURGER K, FEHM HL, BORN J. Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous system sleep functions in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:1573-1579
8. BORN J, LANGE T, HANSEN K, MOLLE M, FEHM HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 1997, 158:4454-4464
9. ENTZIAN P, LINNEMANN K, SCHLAAK M, ZABEL P. Obstructive sleep apnoea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153:1080-1086
10. MOLDOFSKY H, LUE FA, EISEN J, KEYSTONE E, GOROZYNSKI RM. The relationship of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. *Psychosom Med* 1986, 48:309-318
11. MARSHALL L, BORN J. Brain-immune interactions in sleep. *Int Rev Neurobiol* 2002, 52: 93-131
12. SPIEGEL K, SHERIDAN JF, VAN CE. Effect of sleep deprivation on response to immunization. *JAMA* 2002, 288: 1471-1472
13. Lange T, Perras B, Fehm HL, Born J. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom Med* 2003, 65:831-835
14. LANGE T, DIMITROV S, FEHM HL, WESTERMANN J, BORN J. Shift of monocyte function toward cellular immunity during sleep. *Arch Intern Med* 2006, 166:1695-1700
15. DIMITROV S, LANGE T, NOHROUDI K, BORN J. Number and function of circulating human antigen-presenting cells regulated by sleep. *Sleep* 2007, 30:401-411
16. BENEDICT C, DIMITROV S, MARSHALL L, BORN J. Sleep enhances serum interleukin-7 concentrations in humans. *Brain Behav and Immun* 2007, 21: 1058-1062
17. DINGES DF, DOUGLAS SD, ZAUGG L, CAMPBELL DE, MCMANN JM, WHITEHOUSE WG, ORNE EC, KAPOOR SC, ICAZA E, ORNE MT. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 1994, 93:1930-1939
18. ÖZTÜRK L, PELIN Z, KARADENİZ D, KAYNAK H, ÇAKAR L, GÖZÜKIRMIZI E. Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res* 1999, 2:107-111
19. BØYUM A, WIİK P, GUSTAVSSON E, VEIBY OP, RESELAND J, HAUGEN AH, OPSTAD PK. The effect of strenuous exercise, calorie deficiency and sleep deprivation on white blood cells, plasma immunoglobulins and cytokines. *Scand J Immunol* 1996, 43:228-235

- 
20. EVERSON CA. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am J Physiol* 1993, 265: R1148-1154
  21. RECHTSCHAFFEN A, GILLILAND MA, BERGMANN BM, WINTER JB. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 1983, 221:182-184
  22. LANDIS CA, WHITNEY JD. Effects of 72 hours sleep deprivation on wound healing in the rat. *Res Nurs Health* 1997, 20:259-267
  23. PALMBALD J, PETRINI B, WASSERMAN J, AKERSTEDT T. Lymphocyte and granulocyte reactions during sleep deprivation. *Psychosom Med* 1979, 41: 273-278
  24. IRWIN M, MCCLINTICK J, COSTLOW C, FORTNER M, WHITE J, GILLIN JC. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular responses in humans. *FASEB J* 1996, 10:643-653
  25. MOLDOFSKY H, LUE FA, DAVIDSON JR, GORCZYNSKI R. Effects of sleep deprivation on human immune functions. *FASEB J* 1989, 3:1972-1977
  26. BERGMANN BM, RECHTSCHAFFEN A, GILLILAND MA, QUINTANS J. Effect of extended sleep deprivation on tumour growth in rats. *Am J Physiol* 1996, 271: R1460-1464
  27. RENEGAR KB, FLOYD R, KRUEGER JM. Effect of sleep deprivation on serum influenza-specific IgG. *Sleep* 1998, 21:19-24
  28. REDWINE L, HAUGER RL, GILLIN JC, IRWIN M. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol and melatonin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 3597-3603
  29. DINGES DF, DOUGLAS SD, HAMARMAN S, ZAUGG L, KAPOOR S. Sleep deprivation and human immune function. *Adv Neuroimmunol* 1995, 5:97-110
  30. FREY DJ, FLESHNER M, WRIGHT JR KP. The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults. *Brain Behav and Immun* 2007, 21: 1050-1057
  31. SHEARER WT, REUBEN JM, MULLINGTON JM, PRICE NJ, LEE BN, SMITH EO, SZUBA MP, VAN DONGEN HP, DINGES DF. Soluble TNF- $\alpha$  receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:165-170
  32. UTHEGENANNT D, SCHOOLMANN D, PIETROWSKY R, FEHM HL, BORN J. Effects of sleep on the production of cytokines in humans. *Psychosom Med* 1995, 57: 97-104
  33. IRWIN MR, WANG M, CAMPOMAYOR CO, COLLADO-HIDALGO A, COLE S. Sleep deprivation and activation of morning levels of cellular and genomic markers of inflammation. *Arch Intern Med* 2006, 166: 1756-1762
  34. MEIER-EWERT HK, RIDKER PM, RIFAI N, REGAN MM, PRICE NJ, DINGES DF, MULLINGTON JM. Effect of sleep loss on C-reactive protein , an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2004, 43:678-683
  35. DIMITROV S, LANGE T, BENEDICT C, NOWELL MA, JONES SA, SCHELLER J, ROSE-JOHN S, BORN J. Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *Faseb J* 2006, 20:E1599-1609
  36. REDWINE L, DANG J, IRWIN M. Cellular adhesion molecule expression, nocturnal sleep and partial night sleep deprivation. *Brain Behav and Immun* 2004, 18:333-340
  37. YOUNG T, PALTA M, DEMPSEY J, SKATRUD J, WEBER S, BADR S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993, 328:1230-1235
  38. YOUNG T, PEPPARD PE, GOTTLIEB DJ. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnoea. A population health Perspective. *Am J Resp Crit Care Med* 2002, 165:1217-1239
  39. MALHOTRA A, WHITE DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2002,360:237-245

- 
40. VGONTZAS AN, PAPANICOLAOU DA, BIXLER EO, KALES A, TYSON K, CHROUSSOS GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:1313-1316
  41. VGONTZAS AN, PAPANICOLAOU DA, BIXLER EO, HOPPER K, LOTSIKAS A, LIN HM, KALES A, CHROUSSOS GP. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:1151-1158
  42. LIU H, LIU J, XIONG S, SHEN G, ZHANG Z, XU Y. The change of interleukin-6 and tumor necrosis factor in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Tongji Med Univ* 2000, 20:200-202
  43. OHGA E, TOMITA T, WADA H, YAMAMOTO H, NAGASE T, OUCHI Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8 and MCP-1. *J Appl Physiol* 2003, 94:179-184
  44. ALZOGHAIBI MA, BAHAMMAM ASO. Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: a pilot study. *Sleep Breath* 2005, 9:119-126
  45. OHGA E, NAGASE T, TOMITA T, TERAMOTO S, MATSUTE T, KATAYAMA H, OUCHI Y. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol* 1999, 87:10-14
  46. VGONTZAS AN, ZOUMAKIS E, LIN HM, BIXLER O, TRAKADA G, CHROUSSOS GP. Marked decrease in sleepiness in patients with sleep apnea by etanercept, a tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:4409-4413
  47. BRUUN JM, PEDERSEN SB, RICHELSEN B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:1267-1273
  48. NELESEN RA, YU H, ZIEGLER MG, MILLS PJ, CLAUSEN JL, DIMSDALE JE. Continuous positive airway pressure normalizes cardiac autonomic and hemodynamic responses to a laboratory stressor in apneic patients. *Chest* 2001, 119: 1092-1101
  49. BOROVIKOVA LV, IVANOVA S, ZHANG M, YANG H, BOTCHKINA GI, WATKINS LR, WANG H, ABUMRAD N, EATON JW, TRACEY KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000, 405: 458-462
  50. DEVOUASSOUX G, LEVY P, ROSSINI E, PIN I, FIOR-GOZLAN M, HENRY M, SEIGNEURIN D, PEPIN JL. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2007, 119: 597-603
  51. VISSER M, BOUTER LM, MCQUILLAN GM, WENNER BH, HARRIS TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999, 282: 2131-2135
  52. SHAMSUZZAMAN AS, WINNICKI M, LANFRANCHI P ET AL. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002, 105: 2462-2464
  53. YOKOE T, MINOGUCHI K, MATSUO H, ODA N, MINOGUCHI H, YOSHINO G, HIRANO T, ADACHI M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003, 107:1129-1134
  54. KOBAYASHI K, NISHIMURA Y, SHIMADA T, YOSHIMURA S, FUNADA Y, SATOUCHI M, YOKOYAMA M. Effect of continuous positive airway pressure on soluble CD40 ligand in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2006, 129: 632-637

- 
55. MINOGUCHI K, YOKOE T, TAZAKI T, MINOGUCHI H, ODA N, TANAKA A, YAMAMOTO M, OHTA S, O'DONNELL CP, ADACHI M. Silent brain infraction and platelet activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175: 612-617
  56. OHGA E, NAGASE T, TOMITA T, TERAMOTO S, MATSUTE T, KATAYAMA H, OUCHI Y. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol* 1999, 87: 10-14
  57. CHIN K, NAKAMURA T, SHIMIZU K, MISHIMA M, MIYASAKA M, OHI M. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Medicine* 2000, 109: 562-567
  58. HAVERKATE F, THOMPSON SG, PYKE SD ET AL. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. Angina pectoris Study Group. *Lancet* 1997, 349:462-466
  59. SCHULZ R, HUMMEL C, HEINMANN S, SEEGER W, GRIMMINGER F. Serum levels of Vascular Endothelial Growth Factor are elevated in patients with obstructive Sleep Apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002,165:67-70
  60. HTOO AK, GREENBERG H, TONGIA S, CHEN G, HENDERSON T, WILSON D, LIU SF. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep Breath* 2006, 10: 43-50
  61. YAMAUCHI M, TAMAKI S, TOMODA K, YOSHIKAWA M, FUKUOKA A, MAKINODAN K, KOYAMA N, SUZUKI T, KIMURA H. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2006, 10:189-193
  62. CHRISTOU K, MARKOULIS N, MOULAS AN, PASTAKA C, GOURGOULIANIS KI. Reactive Oxygen Metabolites (ROMs) as an index of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath* 2003, 7:105-109
  63. LAVIE L, VISHNEVSKY A, LAVIE P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004, 27: 123-128
  64. CARPAGNANO GE, KHARITONOV SA, RESTA O, FOSCHINO-BARBARO MP, GRAMICCIONI E, BARNES PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002, 122: 1162-1167
  65. CHRISTOU K, MOULAS AN, PASTAKA C, GOURGOULIANIS KI. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med* 2003,4: 225-228
  66. OZTURK L, MANSOUR B, YUKSEL M, YALCIN AS, CELIKOGLU F, GOKHAN N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin Chim Acta* 2003, 332: 83-88
  67. WALI SO, BAHAMMAM AS, MASSAELI H, PIERCE GN, ILISKOVIC N, SINGAL PK, KRYGER MH. Susceptibility of LDL to oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Sleep* 1998, 1:290-296
  68. SCHULZ R, MAHMOUDI S, HATTAR K, SIBELIUS U, OLSCHESKI H, MAYER K, SEEGER W, GRIMMINGER F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of cpontinuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162: 566-570
  69. DYUGOVSKAYA L, LAVIE P, LAVIE L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165: 934-939
  70. DYUGOVSKAYA L, LAVIE P, LAVIE L. Phenotypic and functional characterization of blood  $\gamma\delta$  T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168: 242-249

- 
71. DYUGOVSKAYA L, LAVIE P, HIRCH M, LAVIE L. Activated CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2005,25:820-828
  72. VANDERKOOI JM, ERECINSKA M, SILVER IA. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am J Physiol* 1991, 260:C1131-1150
  73. VAUPEL P, BRAUNBECK W, THEWS G. Respiratory gas exchange and PO<sub>2</sub> distribution in splenic tissue. *Adv Exp Med Biol* 1973, 37A:401-406
  74. SITKOVSKY M, LUKASHEV D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 $\alpha$  and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:712-721
  75. KOJIMA H, GU H, NOMURA S, CALWELL CC, KOBATA T, CARMELIET P, SEMANZA GL, SITKOVSKY V. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -deficient chimeric mice. *PNAS* 2002, 99:2170-2174
  76. LUKASHEV D, KLEBANOV B, KOJIMA H, GRINBERG A, OHTA A, BERENFELD L, WENGER RH, OHTA A, SITKOVSKY M. Cutting edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 2006, 177:4962-4965
  77. ZAREMBER KA, MALECH H. HIF-1 $\alpha$ : a master regulator of innate host defenses? *J Clin Invest* 2005, 115:1702-1704
  78. CRAMER T, YAMANISHI Y, CLAUSEN BE, FÖRSTER I, PAWLINSKI R, MACKMAN N, HAASE VH, JAENISCH R, CORR M, NIZET V, FIRESTEIN GS, GERBER HP, FERRARA N, JOHNSON RS. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003, 112:645-657
  79. PEYSSONNAUX C, DATTA V, CRAMER T, DOEDENS A, THEODORAKIS EA, GALLO RL, HURTADO-ZIOLA N, NIZET V, JOHNSON RS. HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005, 115:1806-1815
  80. NALDINI A, CARRARO F, SILVESTRI S, BOCCI V. Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J Cell Physiol* 1997, 173:335-342
  81. GRIMSHAW MJ, BALKWILL FR. Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation-a potential mechanism. *Eur J Immunol* 2001, 31:480-489
  82. MAKINO Y, NAKAMURA H, IKEDA E, OHNUMA K, YAMAUCHI K, YABE Y, POELLINGER L, OKADA Y, MORIMOTO C, TANAKA H. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol* 2003, 171:6534-6540
  83. LEWIS RS, CALAHAN MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1995, 13:623-653
  84. CHANDY KG, DECOURSEY TE, CALAHAN MD, MCLAUGHLIN C, GUPTA S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 1984, 160:369-385
  85. LOPEZ-BARNEO J, PARDAL R, ORTEGA-SAENZ P. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 2001, 63:259-287
  86. CONFORTI L, PETROVIC M, MOHAMMAD D, LEE S, MA Q, BARONE S, FILIPOVICH AH. Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. *J Immunol* 2003, 170: 695-702

- 
87. ROBBINS JR, LEE S, FILIPOVICH AH, SZIGLIGETI P, NEUMEIER L, PETROVIC M, CONFORTI L. Hypoxia modulates early events in T cell receptor-mediated activation in human T lymphocytes via Kv1.3 channels. *J Physiol* 2005, 564: 131-143
  88. SZIGLIGETI P, NEUMEIER L, DUKE E, CHOUGNET C, TAKIMOTO K, LEE SM, FILIPOVIC, CONFORTI L. Signalling during hypoxia in human T lymphocytes-critical role of the src protein tyrosine kinase p65Lck in the O<sub>2</sub> sensitivity of Kv1.3 channels. *J Physiol* 2006, 573:357-370
  89. PALACIOS EH, WEISS A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004, 23:7990-8000
  90. CALDWELL CC, KOJIMA H, LUKASHEV D, ARMSTRONG J, FARBER M, APASOV SG, SITKOVSKY MV. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol* 2001, 167:6140-6149
  91. FINK T, EBBESEN P, KOPPELHUST U, ZACHAR V. Natural killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under in vivo oxygen conditions. *Scand J Immunol* 2003, 58:607-612
  92. BOSCO MC, PUPPO M, SANTANGELO C, ANFOSSO L, PFEFFER U, FARDIN P, BATTAGLIA F, VARESI L. Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *J Immunol* 2006, 177:1941-1955
  93. KIM BM, CHOI JY, KIM YJ, WOO HD, CHUNG HW. Reoxygenation following hypoxia activates DNA-damage checkpoint signaling pathways that suppress cell-cycle progression in cultured human lymphocytes. *FEBS Letters* 2007, 581:3005-3012
  94. KIM BM, CHUNG HW. Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes. *BBRC* 2007, 363:745-750
  95. CHOI JY, KIM BM, KIM YJ, WOO HD, CHUNG HW. Hypoxia/reoxygenation-induced cytotoxicity in cultured human lymphocytes. *BBRC* 2007, 352:366-371
  96. YOUNG T, EVANS L, FINN L, PALTA M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 1997, 20: 705-706
  97. LITTNER M. Polysomnography in the diagnosis of the obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: where do we draw the line? *Chest* 2000, 118:286-288
  98. CHESSON AL JR, FERBER RA, FRY JM, GRIGG-DAMBERGER M, HARTSE KM, HURWITZ TD, JOHNSON S, KADER GA, LITTNER M, ROSEN G, SANGAL RB, SCHMIDT-NOWARA W, SHER A. The indications for polysomnography and related procedures. *Sleep* 1997, 20:423-487
  99. AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE TASK FORCE. Sleep-related disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 1999, 22:667-689
  100. BENNETT JA, KINNEAR WJ. Sleep on the cheap: the role of overnight oximetry in the diagnosis of sleep apnea hypopnea syndrome. *Thorax* 1999, 54: 958-959
  101. LE BON O, HOFFMANN G, TECCO J, STANER L, NOSEDA A, PELC I, LINKOWSKI P. Mild to moderate sleep respiratory events: one negative night may not be enough. *Chest* 2000, 118:353-359
  102. RIESEBERG M, KASPER C, REARDON KF, SCHEPER T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, 56:350-360

- 
103. HERZENBERG LA, DE ROSA SC. Monoclonal antibodies and the FACKS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 2000, 21:383-390
  104. SCHEFFOLD A, KERN F. Recent developments in flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:350-360
  105. KUHNS MS, DAVIS MM, GARCIA KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006; 24:133-9.
  106. RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:419-66.
  107. KONIG R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:75-83.
  108. DONO M, CERRUTI G, ZUPO S. The CD5<sup>+</sup> B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2105-11
  109. COLE DK, GAO GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator. *Cell Mol Immunol* 2004, 1:81-88.
  110. HARRIS ES, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 2000; 275:23409-12.
  111. TRIANTAFILOU M, TRIANTAFILOU K. Lipopolysaccharide: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23:301-304.
  112. JERALA R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 2007; 297:353-63.
  113. FUKUDA M, HIRAOKA N, YEH JC. C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. *J Cell Biol* 1999; 147:467-70.
  114. RAVETCH JV, BOLLAND S. IgG-Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001, 19:275-290.
  115. TAKAI T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2005, 25:1-18
  116. SATO S, JANSEN PJ, TEDDER TF. CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B-lymphocyte signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13158-62.
  117. BOBBITT KR, JUSTEMENT LB. Regulation of MHC class II signal transduction by the B-cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol* 2000; 165:5588-96.
  118. PEROSA F, FAVOINO E, CARAGNANO MA, PRETE M, DAMMACCO F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2005; 4 :526-31.
  119. WANG X, RICKERT M, GARCIA KC. Structure of the quaternary complex of interleukine-2 with each alpha, beta and gammac receptors. *Science* 2005; 310:1159-63.
  120. KIM HP, IMBERT J, LEONARD WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:349-6.
  121. SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 116-126.
  122. GREENWALD RJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:515-548.
  123. HOLMES N. CD45: al is not yet crystal clear. *Immunology* 2006; 117:145-155.
  124. HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003, 21:107-137
  125. CROSSIN KL, KRUSHEL LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000; 218:260-279.
  126. PANICKER AK, BUHUSI M, THELEN K, MANESS PF. Cellular signaling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci* 2003; 8:d900-11.

- 
127. NICHOLSON IC. CD62L (L-selectin). *J Biol Regul Homeost Agents* 2002, 16:144-146.
  128. SANCHO D, GOMEZ M, SANCHEZ-MADRID F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005, 26:136-140.
  129. TURNER D. The human leukocyte antigen (HLA) system. *Vox Sang* 2004, 87(Suppl 1):87-90.
  130. FAVIER B, BURROUGHS NJ, WEDDERBURN L, VALITUTTI S. TCR dynamics on the surface of living T cells. *Int Immunol* 2001, 13:1525-1532
  131. MOSER B, EBERL M. Gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007, 215:89-102
  132. PENNINGER JM, IRIE-SASAKI J, SASAKI T, OLIVEIRA-DOS-SANTOS A. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2001, 2: 389-396
  133. LYNCH KW, WEISS A. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre- mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 70-80
  134. CHUI D, ONG CJ, JOHNSON P, TEH HS, MARTH JD. Specific CD45 isoforms differentially regulate T cell receptor signaling. *EMBO J* 1994, 13: 798-807
  135. MOSER B, EBERL M.  $\gamma\delta$  T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007, 215: 89-102
  136. ARGENTATI K, RE F, DONNINI A, TUCCI MG, FRANCESCHI C, BARTOZZI B, BERNARDINI G, PROVINCIALI M. Numerical and functional alterations of circulating  $\gamma\delta$  T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* 2002, 72: 65-71
  137. COLONNA-ROMANO G, POTESTIO M, AQUINO A, CANDORE G, LIO D, CARUSO C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002, 37: 205-211
  138. BLANKENBERG S, BARBAUX S, TIRET L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003, 170:191- 203
  139. JUGE-AUBRY CE, HENRICHOT E, MEIER CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005, 19: 547-566
  140. FERRANTE JR AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007, 262: 408-414
  141. CLEMENT K, LANGIN D. Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J Intern Med* 2007, 262: 422-430