ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

¨*Αποπτωτικοί και Αντιαποπτωτικοί βιοδείκτες παιδιατρικών και ενήλικων ασθενών με σήψη ή SIRS – Συσχέτιση με βιοδείκτες στρες*¨

Μηλιαράκη Μαριάννα

Εντατικολόγος Παίδων- Επιμ. Β’ ΜΕΘ Παίδων ΠΑΓΝΗ

Ηράκλειο, Ιούνιος 2023

UNIVERSITY OF CRETE -SCHOOL OF MEDICINE

DOCTORAL DISSERTATION

“Apoptotic and antiapoptotic biomarkers in pediatric and adult patients with sepsis or SIRS- Associations with stress biomarkers”

Marianna Miliaraki

Pediatric Intensivist- PICU Consultant PAGNI

Heraklion, June 2023

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπριασούλης Γεώργιος

Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παίδων, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης (επιβλέπων)

Νανάς Σεραφείμ

Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μέλος συμβουλευτικής τριμελούς και επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Γεωργόπουλος Δημήτριος

Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Μέλος συμβουλευτικής τριμελούς και επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Κονδύλη Ευμορφία

Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Ηλία Σταυρούλα

Επίκουρη Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παίδων, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Μαντζουράνη Μαρίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Καλπαδάκη Χριστίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Περιεχόμενα

Πρόλογος – Ευχαριστίες ... 11

Συντομογραφίες ... 13

Περίληψη ... 15

Summary ... 17

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ... 19

Εισαγωγή ... 21

Σήψη και σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης ... 25

- Αναδρομή ορισμών ... 25
- Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) ... 28
- Σήψη- Επιδημιολογία ... 28
- Παθογένεια και παθοφυσιολογία στη σήψη ... 29
- Υπερφλεγμονή και ανοσοκαταστολή στη σήψη ... 34
- Διαταραχές Μικροκυκλοφορίας στη σήψη ... 36
- Ιστική Υποξία ... 37
- Πολυοργανική Δυσλειτουργία ... 38
- Το μέλλον στη διαγνωστική ακριβείας σε σχέση με τη σήψη ... 39

Μορφές ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου ... 40

- Αποπτωτικοί μηχανισμοί και Σήψη ... 46
- Φλεγμονώδεις και μη φλεγμονώδεις κασπάσες ... 51

Αντιαποπτωτικά μονοπάτια στη σήψη ... 53

- Αναστολείς της Απόπτωσης ... 53
- Σημαντικότερες IAPs (Survivin, XIAP) ... 55
- Ισομορφές της πρωτεΐνης survivin ... 58

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ... 63

Σκοπός της μελέτης ... 65

Μεθοδολογία ... 67

Σχεδιασμός Μελέτης ... 67

Δείγμα της μελέτης ... 67

Κλινικά χαρακτηριστικά ... 67
Μέτρα έκβασης ... 68
Εργαστηριακές αναλύσεις ... 68
- 1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων ... 68
- 2. Ποσοτικοποίηση της μεταγραφικής και μεταφραστικής έκφρασης της πρωτεΐνης survivin ... 68
- 2.1. Απομόνωση RNA ... 69
- 2.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του RNA ... 71

Ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση σε φάσμα φωτός 260-280nm ... 71
Ποιοτική ανάλυση RNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ... 71
- 2.3 Σύνθεση cDNA ... 72
- 2.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ... 74

Φθορίζουσες χρωστικές ... 76
- 2.5. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο ... 77

Ποσοτικοποίηση cDNA ... 81
- 2.6. Πρωτεομική Ανάλυση ... 83
- 3. Ποσοτικός προσδιορισμός οξειδωτικού στρες ... 86

Στατιστική Μεθοδολογία ... 87
Αποτελέσματα ... 89
Περιγραφική Στατιστική Ανάλυση ... 89
- Δημογραφικά Χαρακτηριστικά Ασθενών ... 89

Στατιστικά αποτελέσματα ... 92
- Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ... 92
- Συσχετίσεις ... 100
- Συσχετίσεις των βιομορίων της μελέτης με κοινούς εργαστηριακούς δείκτες ... 101
- Διαγνωστική διάκριση αρχόμενης σηπτικής κατάστασης ... 102
- Ανάλυση αντιστοίχισης τάσης βαθμολογίας (Propensity score) για τον λόγο TOS/TAC ... 104
- Πρόβλεψη θνητότητας ... 105

Συζήτηση ... 111

- Οξειδωτικό στρες 111
- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα 112
- Ανισορροπία TOS/TAC 113
- Αποπτωτική/αντιαποπτωτική κατάσταση και οξειδωτικά/αντιοξειδωτικά μονοπάτια 114
- Αποπτωτική και αντιαποπτωτική κατεύθυνση στους σηπτικούς ασθενείς της μελέτης 115
- Αποπτωτική δραστηριότητα σε λοιμώδη και μη λοιμώδη νοσήματα 116
- Οικογένεια αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών 120
- Αντιαποπτωτική δραστηριότητα σε λοιμώδη και μη λοιμώδη φλεγμονώδη νοσήματα 120
- Αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin 122
- Αντιαποπτωτικές ισομορφές της πρωτεΐνης survivin 123
- Αντιαποπτωτικοί συμπαράγοντες- πρωτεΐνη XIAP 124

Προοπτική της μελέτης 125

- Εφαρμογές αναστολής του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης 125

Περιορισμοί της μελέτης 126

Συμπεράσματα 127

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 129

Επιστημονικές δημοσιεύσεις-ανακοινώσεις 149

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε ως προέκταση των σπουδών και πολύτιμων εμπειριών μου από την κλινική πράξη, έχοντας εστιάσει τα τελευταία χρόνια στον τομέα της Εντατικής Θεραπείας Παίδων. Πρόκειται για το αποτέλεσμα μιας πολύχρονης και συστηματικής μελέτης των βαρέως πασχόντων ασθενών, με στόχο τη συνεισφορά επιπρόσθετων γνώσεων στο πάντα επίκαιρο και μείζον πρόβλημα της σηπτικής κατάστασης, που έντονα απασχολεί ακόμα και σήμερα την επιστημονική κοινότητα, πολύ δε περισσότερο τον χώρο της εντατικής θεραπείας.

Πρώτα και πάνω από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μπριασούλη Γεώργιο, για τη σπάνια και συγκινητική συνεισφορά του, όχι μόνο στην διατύπωση και ολοκλήρωση μιας πλειάδας επιστημονικών προτάσεων, αλλά και για την παροχή άφθονης γνώσης και συμβουλευτικής ασφάλειας, τα οποία καθόρισαν την προετοιμασία και τη συγκρότησή μου ως επιστήμονα τα τελευταία χρόνια. Οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Σεραφείμ Νανά και κ. Δημήτριο Γεωργόπουλο για την πολύ πρόθυμη συμβολή τους στην επίλυση προβλημάτων και τη χορήγηση συμβουλευτικών οδηγιών για τη διεκπεραίωση της έρευνας.

Προσωπικές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην καθηγήτρια και διευθύντριά μου κ. Ηλία Σταυρούλα για τις συνεχείς, πολύτιμες και πάντα στοχευμένες συμβουλές της, καθόλη την πορεία της επιστημονικής μου εξέλιξης. Επίσης, θερμά ευχαριστώ την κ. Κονδύλη Ευμορφία και την κ. Καλπαδάκη Χριστίνα για την πάντα καίρια συμβουλευτική τους υποστήριξη. Επίσης, σημαντική, σε όλα τα στάδια της μελέτης, ήταν και η συμβολή του συναδέλφου κ. Μπριασούλη Παναγιώτη, ο οποίος με την ουσιαστική υποστήριξη και την εμψύχωση του συνέβαλε καθοριστικά στο να επιτευχθεί κάτι άρτιο.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Πολονύφη Αικατερίνη και Μαντζουράνη Μαρίνα, για την απεριόριστη συνεισφορά τους στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών διαδικασιών, καθώς χωρίς την αγάπη και την κατευθυντήρια γραμμή τους η παρούσα εργασία θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί. Για τις εργαστηριακές αναλύσεις αναφορικά με την οξειδωτική κατάσταση των σηπτικών ασθενών, καθοριστική ήταν η συμβολή των κυρίων Παπασωτηρίου Ιωάννη, Μιχαλακάκου Καλλιόπης και Καρακωνσταντάκη Θεόδωρου.

Οφείλω επιπλέον να ευχαριστήσω το προσωπικό της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας Παίδων και Ενηλίκων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για την υπομονή και αμέριστη κατανόηση που επέδειξαν έως την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου την οικογένειά μου και τα πολύ αγαπημένα μου πρόσωπα, για τη συνεχή, αποφασιστική και ανεξάντλητη ηθική υποστήριξή τους σε όλα τα επίπεδα. Ως εκ τούτου, το παρόν σύγγραμμα είναι αφιερωμένο σε εκείνους.

Συντομογραφίες

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ApoVs	Apoptotic Vesicles
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AUROC	Area Under the Receiver Operating characteristic Curve
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein family
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BIR	Baculovirus IAP Repeat
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
COX-2	Cycloxygenase-2
CPC	Chromosomal Passenger Complex
CRP	C-Reactive Protein
DAMPs	Damage-Associated Molecular Pattern molecules
Diablo	Direct Inhibitor of Apoptosis proteins -Binding protein with Low pI
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FADD	Fas-associated death domain
GSDMD	Gasdermin D
HBXIP	Hepatitis B X-interaction protein
HRP	Avidin-Horseradish Peroxidase
IAPs	Inhibitors of apoptosis
ICU	Intensive Care Unit

IL-6	Interleukin-6
LOS	Length of stay
LPS	Lipopolysaccharide
MARS	Mixed Antagonist Response Syndrome
MLKL	Mixed-Lineage Linase domain -Like protein
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NK	Natural killer cells
NO	Nitric Oxide
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules
PICS	Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism syndrome
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment score
RIPK	Receptor Interacting Protein Kinases
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
Smac	Secondary Mitochondria-derived Activator of Caspase
TAC	Total antioxidant capacity
TAMOF	Thrombocytopenia-associated multiple organ failure
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOS	Total oxidative stress
WBC	White blood cells
WT	Wild Type
XIAP	X-linked IAP

Περίληψη

Εισαγωγή: Η σήψη οφείλεται σε μια δυσλειτουργική ανοσιακή απάντηση σε ποικίλους λοιμώδεις παράγοντες, με δυσμενή έκβαση σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών. Τα τελευταία χρόνια, διαμορφώνεται ένα ιδιαίτερο ερευνητικό πεδίο, το οποίο αποσκοπεί στην αποκρυπτογράφηση των οξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών, όπως και των αποπτωτικών (κασπάσες) ή αντιαποπτωτικών διεργασιών (πρωτεΐνη survivin), που ενεργοποιούνται κατά τη σηπτική διαδικασία και που ίσως αποτελούν ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία σηπτικών ασθενών στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ).

Μέθοδοι: Η παρούσα προοπτική μελέτη διεξήχθη σε δείγμα βαρέως πασχόντων ενήλικων (n= 145) και παιδιατρικών ασθενών (n=67) με σήψη, συγκρινόμενων με ασθενείς με μη λοιμώδους αιτιολογίας φλεγμονή (n=112 και 116 για ενήλικες και παιδιά αντίστοιχα) και υγιείς μάρτυρες (n=89 και n=38 για ενήλικες και παιδιά αντίστοιχα), οι οποίες αποτέλεσαν τις δύο ομάδες ελέγχου της μελέτης. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών (-WT, -2B, -3B και -ΔEx3) της πρωτεΐνης survivin. Η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης σε δείγματα ορού των ασθενών χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει την ενζυμική δραστηριότητα των αποπτωτικών κασπασών -3, -8 και -9, της πρωτεΐνης Bax (Bcl-2-associated X protein) και Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI), αλλά και των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) και survivin. Μια φωτομετρική ανάλυση ποσοτικοποίησης των ολικών προϊόντων υπεροξείδωσης λιπιδίων, καθώς και της ενζυματικής αντίδρασης αυτών με προκαθορισμένη ποσότητα εξωγενώς προστιθέμενης οξειδωτικής ουσίας χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος προσδιορισμού της ολικής οξειδωτικής (Total oxidative stress-TOS) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total antioxidant capacity -TAC) αντίστοιχα.

Αποτελέσματα: Ο λόγος της οξειδωτικής κατάστασης ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα (TOS/TAC) ανευρέθηκε αυξημένος στην ομάδα της σήψης (Σ), συγκριτικά με τους ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (Τ) και τους υγιείς μάρτυρες (Υ) ($p<0.001$). Αναφορικά με την αποπτωτική κατάσταση των σηπτικών ενήλικων ασθενών, καταγράφηκε τάση μεταγραφικής υπερέκφρασης τόσο της επαγόμενης από το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάσης-9 ($p= 0.014$), όσο και της εκτελεστικής κασπάσης-3 ($p=0.020$), ταυτόχρονα με στατιστικά σημαντική πτωτική τάση για την πρωτεΐνη Bax ($p=0.040$) στη σήψη, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου Τ και Υ. Σημαντικά αυξημένα ήταν και τα επίπεδα ορού της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin στη σήψη ($p= 0.001$), συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου, ενώ αυξητική τάση καταγράφηκε και για την αντιαποπτωτική XIAP στη σήψη ($p=0.084$). Όσον αφορά τη μεταγραφική δραστηριότητα της survivin, οι γονιδιακές ισομορφές της survivin -WT, -2B και -ΔEx3 ανευρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στην ομάδα της σήψης, σε σύγκριση με την ομάδα της μη-λοιμώδους φλεγμονής και τους υγιείς μάρτυρες ($p=0.001$ για όλους τους ελέγχους στους ενηλίκους σηπτικούς ασθενείς αντίστοιχα). Οι σηπτικοί παιδιατρικοί ασθενείς παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin στον ορό ($p=0.022$),

ταυτόχρονα με την αυξημένη μεταγραφική έκφραση της ισομορφής survivin-2B (p=0.037) και της αποπτωτικής κασπάσης-9 (p=0.017), συγκριτικά με τις δύο ομάδες ελέγχου.

Σε ανάλυση λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Receiver operating characteristic -ROC ανάλυση), ο λόγος TOS/TAC αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας εξελισσόμενης σήψης (εμβαδόν κάτω από την καμπύλη AUROC=0.977, 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης 0.953-1, p<0.001). Επίσης, στην πρόβλεψη της θνητότητας, ο λόγος TOS/TAC πέτυχε την καλύτερη AUROC = AUROC=0.787 (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης 0.695-0.878, p<0.001).

Συμπεράσματα: Η ενεργοποίηση του οξειδωτικού στρες και η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, συνοδευόμενη από υπερέκφραση των αποπτωτικών κασπασών -3 και -9 και των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών XIAP και survivin, αλλά και από σύγχρονη μεταφραστική διέγερση των ισομορφών του αντιαποπτωτικού μονοπατιού της survivin, φαίνεται ότι χαρακτηρίζει μια εξελισσόμενη σηπτική διαδικασία. Η μελέτη των οξειδωτικών, αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μονοπατιών θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εφαλτήριο στην αποκρυπτογράφηση της παθοφυσιολογίας της σήψης.

Λέξεις-κλειδιά: Σήψη, οξειδωτικό στρες, απόπτωση, αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, κασπάσες, survivin

Summary

Background: Sepsis is a maladaptive inflammatory process in response to infectious agents, related to immune dysfunctions and devastating complications. An interesting scientific field has recently been uncovered, which might decode the oxidative or antioxidant, and the apoptotic (caspases) or antiapoptotic processes (survivin protein) during sepsis, and might bring to light attractive therapeutic interventions for septic intensive care unit (ICU) patients.

Methods: This prospective observational study was performed in a sample of critically ill adult (n=145) and pediatric patients (n=67) with sepsis (S), compared to patients with non-infectious inflammation (T) (n=112 and 116 for adult and pediatric patients respectively) and to healthy controls (H) (n=89 and 38 for adults and children respectively), which were used as the two control groups. The transcriptional expression of survivin, was quantified through real-time quantitative polymerase chain reaction for the different survivin splice variants (WT, 2B, 3B and ΔEx3). The enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA) was used to quantify the apoptotic tendency based on caspases-3, -8, -9, Bax (Bcl-2-associated X protein) and Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI), along with the antiapoptotic tendency based on XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) and survivin protein in patient serum samples. Photometric analyses of total products of lipid peroxidation, and of the enzymatic reaction with a predefined oxidative substance were used for total oxidative stress (TOS) and for total antioxidant capacity (TAC) quantification respectively.

Results: The ratio of total oxidative stress over total antioxidant capacity (TOS/TAC) was significantly elevated in septic patients (S), compared to non-infectious critical illness (T) and to healthy controls (H) ($p<0.001$). With regard to the apoptotic tendency of adult septic patients, the upregulation of the induced by the endogenous apoptotic pathway caspase-9 ($p=0.014$), and of the executioner caspase-3 ($p=0.020$), along with downregulation of Bax protein ($p=0.040$) was recorded for the septic group, compared to the control groups. The enzymatic serum levels of the antiapoptotic survivin protein were highly expressed in sepsis ($p=0.001$), compared to non-infectious critically-ill patients and to healthy controls, whereas an upregulation of the antiapoptotic XIAP was also recorded for the septic group ($p=0.084$). As far as the transcriptional behavior of survivin is concerned, survivin's isoforms -2B and -ΔEx3 were significantly higher in sepsis, compared to the control groups ($p<0.001$ for adult septic patients). With regard to septic children, upregulation of survivin protein ($p=0.022$), along with isoform survivin-2B ($p=0.037$) and caspase-9 ($p=0.017$) were recorded in sepsis, compared with the two control groups.

Receiver operating characteristic (ROC) analysis revealed that TOS/TAC ratio was an independent prognostic factor of developing sepsis (area under ROC curve-AUROC=0.977, 95% CI= 0.953-1, $p<0.001$). In predicting mortality, TOS/TAC ratio also achieved the best AUROC=0.787 (95% CI=0.695-0.878, $p<0.001$).

Conclusions: The upregulation of oxidative stress and repressed antioxidant capacity, accompanied by the overexpression of the apoptotic caspases -3 and -9, and of the antiapoptotic XIAP and survivin protein, along with the transcriptional upregulation of survivin's isoforms, seem to characterize the

developing process of sepsis. Certain oxidative, apoptotic and antiapoptotic pathways might represent attractive targets for future research in the clarification of sepsis pathophysiology.

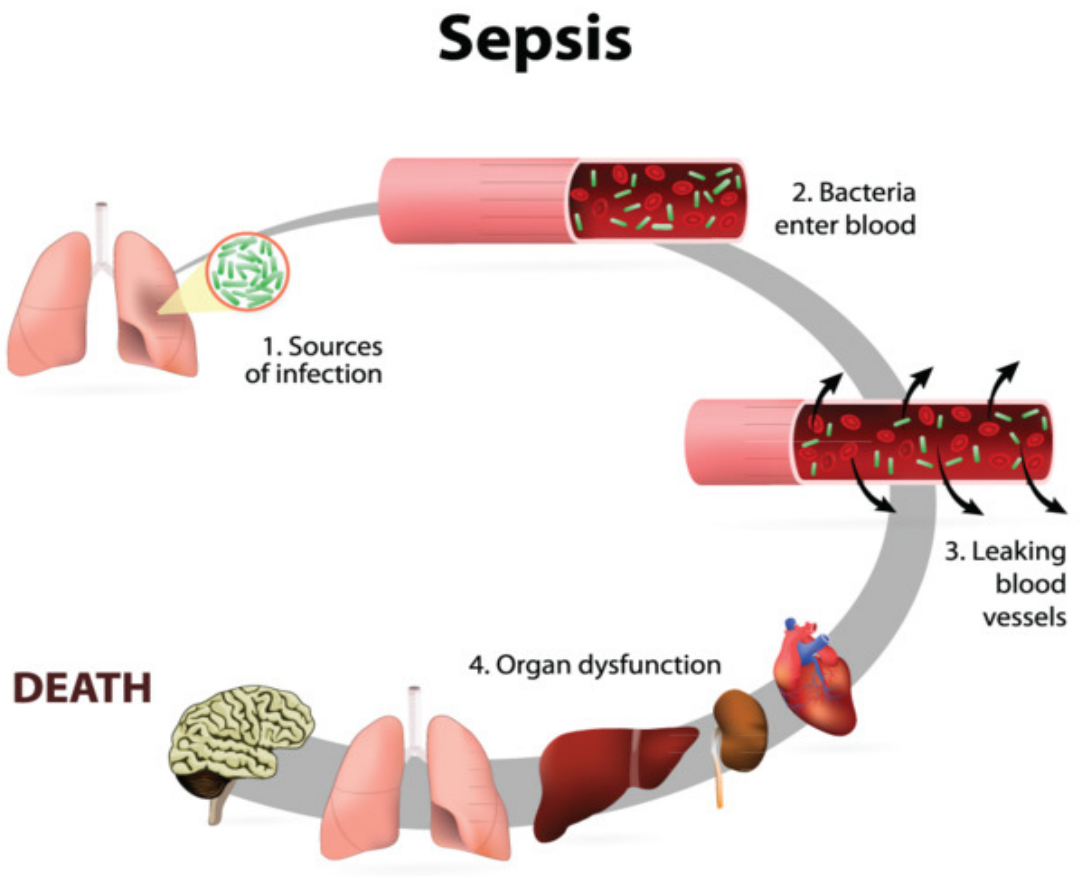
Key words: Sepsis, oxidative stress, antiapoptotic proteins, apoptosis, caspases, survivin.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Από τη σήψη έως το τραύμα, η βαριά νόσος χαρακτηρίζεται, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, από διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης. Υπάρχουν πλέον σαφείς αναφορές που αποδεικνύουν ότι η ετερογένεια κλινικών εκδηλώσεων των βαρέως πασχόντων δεν αποδίδεται μόνο στους λοιμογόνους παράγοντες, αλλά και στην εξατομικευμένη ανοσιακή απάντηση που ενεργοποιείται στον εκάστοτε ξενιστή, όπως και σε σημαντικές διαφοροποιήσεις σε μονοπάτια πήξης, ανοσοκαταστολής ή οργανικής δυσλειτουργίας (1). Οι πρώτες αναφορές του ελληνικού όρου ¨σήψη¨, με την έννοια της αποσύνθεσης, πιθανότατα εκτείνονται 2700 χρόνια πριν, σε ποιήματα του Ομήρου, ενώ μεταγενέστερα χρησιμοποιήθηκε σε έργα του Ιπποκράτη και του Γαληνού. Η επίσημη προσέγγιση αυτής της κλινικής οντότητας δεν κατέστη δυνατή, παρά μόνο μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990, από μια ομάδα ειδικών που διατύπωσε τις πρώτες συμφωνίες και ορισμούς (2). Η σήψη, που αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας μελέτης, εξακολουθεί πάντα να αποτελεί ένα επίκαιρο δημόσιο πρόβλημα υγείας και σημαντική αιτία εκατοντάδων θανάτων ετησίως, ενώ τα καταγεγραμμένα ποσοστά θνητότητας αγγίζουν το 25-30% για τη σήψη και το 40-50% για τις περιπτώσεις σηπτικής καταπληξίας (3). Αυτή η απειλητική για τη ζωή κλινική οντότητα φαίνεται ότι οφείλεται σε μη φυσιολογική, είτε υπερβολική και ανεξέλεγκτη, είτε σε ελλιπή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, ενάντια σε ένα πλήθος λοιμωδών παραγόντων, συνήθως με δραματικές επιπλοκές και ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (**Εικόνα 1**) (4). Επομένως, με βάση τα σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα, οι γνώσεις μας σχετικά με την ανοσιακή απάντηση και την ανοσοπαθοφυσιολογία στη σήψη έχουν βελτιωθεί σημαντικά, οδηγώντας στον σύγχρονο ορισμό, που καταλήγει στο ότι η σήψη οδηγεί σε πολυοργανική ανεπάρκεια, μη οφειλόμενη άμεσα στον λοιμογόνο παράγοντα, αλλά σε μία αποδιοργανωμένη και δυσλειτουργική ανοσολογική απάντηση, που μπορεί να επιμένει ακόμα και μετά τον έλεγχο της αρχικής λοίμωξης. Εν προκειμένω, ο όρος ¨δυσλειτουργική¨ αντανακλά τις αντιδιαμετρικές και διφορούμενες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στους σηπτικούς ξενιστές. Έτσι, η αντιφλεγμονώδης ανοσιακή απάντηση στη σήψη εξελίσσεται σε μια έντονα δυναμική κατάσταση, αντιπροσωπεύοντας μια κλινικά σημαντική μορφή επίκτητης ανοσοκαταστολής (5,6).

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν, το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχει μετατοπιστεί προς την αποκρυπτογράφηση και ερμηνεία των πολύπλοκων παθοβιολογικών διεργασιών, που εκτυλίσσονται κατά τη διάρκεια της σήψης, σε μια προσπάθεια να ανευρεθούν ελκυστικά μόρια, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους για το μέλλον.



Εικόνα 1. Η σηπτική διαδικασία (Πηγή: Lancet Infect Dis– 2013).

Η σηπτική κατάσταση αποτελεί μια δυναμική διαδικασία, καθώς εμπεριέχει τόσο φλεγμονώδη, όσο και αντιφλεγμονώδη στοιχεία. Έτσι, χαρακτηρίζεται από μια αρχική κατακλυσμιαία φλεγμονή, που μπορεί να κορυφώνεται με την ανάπτυξη ανοσοκαταστολής και αδυναμία επαναφοράς ομοιόστασης του ανοσιακού μηχανισμού (7,8). Η ισορροπία επέρχεται με τη συμβολή στοιχείων της φυσικής, αλλά και της επίκτητης ανοσίας. Τα ανωτέρω εξελικτικά στάδια συνιστούν δύο διακριτά σύνδρομα κατά τη σηπτική διαδικασία: 1) το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (systemic inflammatory response syndrome-SIRS) και 2) το σύνδρομο αντιρροπιστικής αντιφλεγμονώδους απάντησης (compensatory anti-inflammatory response syndrome- CARS). Οι αποκρίσεις SIRS και CARS πιθανώς παροδικά να συνυπάρχουν και το μέγεθος της ενεργοποίησής τους θα μπορούσε να καθορίζει την έκβαση των βαρέως πασχόντων ασθενών, οδηγώντας σε ένα μικτό σύνδρομο, που αναφέρεται σήμερα ως μικτό σύνδρομο ανταγωνιστών (Mixed Antagonist Response Syndrome- MARS) (9). Πρόσφατες μελέτες επίσης, υποδηλώνουν ότι η ανοσοκαταστολή στη σήψη πιθανώς να σχετίζεται με την υπέρμετρη ενεργοποίηση αποπτωτικών, ή και την απορρύθμιση αντιαποπτωτικών μονοπατιών (10–13).

Μια επαρκής ανοσολογική απόκριση είναι κατά συνέπεια κρίσιμη για την αντιμετώπιση της σήψης, ενώ παρά τις σημαντικές εξελίξεις στην εντατική θεραπεία, δεν υπάρχει ακόμα

αποτελεσματική αιτιολογική θεραπεία για τους σηπτικούς ασθενείς. Επομένως, προβάλλει επιτακτική η ανάγκη να αποκρυπτογραφηθούν τα μοριακά μονοπάτια που εκτυλίσσονται κατά την ανοσοπαθολογία της σήψης, με στόχο την ανάδειξη εξατομικευμένων θεραπευτικών επιλογών για τους σηπτικούς ασθενείς (14–16). Προσπάθειες ελέγχου της καταιγίδας των φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων αναστολέων του TNF (tumor necrosis factor) ή αντισωμάτων έναντι ιντερλευκινών, απέτυχαν στις κλινικές δοκιμές, καθώς τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια δεν είναι πλήρως κατανοητά ακόμα (17,18). Έτσι, αφού στην ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας εμπλέκεται μια παθολογική αποπτωτική διαδικασία, οι μελλοντικές στρατηγικές στη σήψη πιθανώς θα βασίζονται σε μελέτες ενίσχυσης της κυτταρικής επιβίωσης (19,20), όπως σε μια πρόσφατη προσπάθεια, όπου η αναστολή μιας ειδικής πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα Τ-λεμφοκύτταρα (programmed cell death protein-1/programmed death ligand (PD-1/PD-L) pathway), έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα αναδιοργάνωσης της ανοσολογικής ακεραιότητας σε περίοδο παρακολούθησης 28 ημερών (21). Η σύγχρονη έρευνα, τέλος, εστιάζει στην ανεύρεση θεραπειών που ανατρέπουν τις περιόδους ανοσοπαράλυσης στη σήψη, η οποία αποδίδεται κυρίως στην ενεργοποίηση της απόπτωσης των λεμφικών οργάνων και των παρεγχυματικών ιστών (22).

Σήψη και σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης

➢ Αναδρομή ορισμών

Οι πρωταρχικοί ορισμοί της σήψης αναπτύχθηκαν σε συνέδριο ομοφωνίας του 1991, με μετέπειτα επικαιροποίηση το 2001, οπότε επεκτάθηκε η λίστα σημείων και συμπτωμάτων για την έγκαιρη αναγνώριση των ασθενών με σήψη. Στους πρώτους ορισμούς περιελήφθησαν το σύνδρομο SIRS (πυρετός ή υποθερμία, ταχυκαρδία, ταχύπνοια, λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία), η σοβαρή σήψη (σήψη και πολυοργανική δυσλειτουργία) και η σηπτική καταπληξία (σήψη και ανθεκτική υπόταση παρά την αναζωογόνηση με χορήγηση υγρών). Μια διεθνής ομάδα με 19 συμμετέχοντες ειδικούς από την Society of Critical Care Medicine (SCCM) και την European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), κατέληξε τελικά στην επαναδιατύπωση των τελευταίων διεθνών ορισμών της σήψης (Sepsis- 3 definitions- Surviving sepsis campaign) το 2016 (23), αποφεύγοντας να συμπεριληφθούν τα κριτήρια SIRS στη διάγνωση σήψης και εγκαταλείποντας την απόλυτη συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένου λοιμώδους αιτίου και φλεγμονής (24). Έτσι, η σήψη πλέον ορίζεται ως η απειλητική για τη ζωή πολυοργανική δυσλειτουργία, λόγω μη φυσιολογικής απόκρισης σε λοιμώδεις παράγοντες. Τα κλινικά κριτήρια σήψης περιλαμβάνουν ύποπτη ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη και οξεία αύξηση τουλάχιστον κατά δύο μονάδες του Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, οργανωμένου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να κατευθύνει προς την έγκαιρη διάγνωση της ανάπτυξης πολυοργανικής ανεπάρκειας (25,26). Στις τελευταίες οδηγίες του Sepsis-3 για τη σήψη, επισημαίνεται η πολύ μεγάλη σημασία της κατευθυνόμενης θεραπείας με βάση την έγκαιρη επίτευξη συγκεκριμένων στόχων (early goal-directed therapy- EGDT) (23,24), ενώ πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν χαμηλότερα ποσοστά θνητότητας για τους σηπτικούς ασθενείς στους οποίους επιτεύχθηκαν έγκαιρα αυτοί οι στόχοι (sepsis bundles) (27).

Όσον αφορά τους παιδιατρικούς ασθενείς, η σήψη στα παιδιά έως πρόσφατα οριζόταν ως εξής: 1) η ύπαρξη τουλάχιστον 2 κριτηρίων SIRS, 2) δευτεροπαθώς από κάποιο ταυτοποιημένο λοιμογόνο παράγοντα,, είτε και με μόνη την κλινική ένδειξη λοίμωξης μη ταυτοποιήσιμης με μικροβιολογικές τεχνικές, και 3) καρδιαγγειακή δυσλειτουργία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή πολυοργανικής δυσλειτουργίας με συμμετοχή τουλάχιστον 2 συστημάτων, στην περίπτωση μη καρδιαγγειακής οργανικής δυσλειτουργίας. Ωστόσο, σε μια πρόσφατη προσπάθεια, οι οδηγίες του Surviving Sepsis Campaign για την αντιμετώπιση της παιδιατρικής σηπτικής κατάστασης επικαιροποιήθηκαν, με στόχο την εναρμόνισή τους με τις αντίστοιχες οδηγίες των ενηλίκων (28), ενώ και το SOFA score έχει προσαρμοστεί στα κλινικά δεδομένα των παιδιατρικών ασθενών (29).

Η σηπτική καταπληξία (septic shock) αποτελεί υποκατηγορία σήψης, κατά την οποία οι ανωμαλίες σε επίπεδο κυκλοφορίας ή κυτταρικού μεταβολισμού είναι τόσο σημαντικές ώστε να αυξάνουν κατακόρυφα τον κίνδυνο θνητότητας. Η σηπτική καταπληξία ορίζεται ως η σοβαρή λοίμωξη που οδηγεί σε καρδιαγγειακή δυσλειτουργία. Ως εκ τούτου, χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη κλινικών κριτηρίων σήψης σε συνδυασμό με την ανάγκη χορήγησης αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων ώστε να

μπορεί να διατηρείται η μέση αρτηριακή πίεση (ΜΑΠ) > 65mmHg, καθώς και με το αυξημένο γαλακτικό οξύ στον ορό (Lactate>2mmol/L ή >18mg/dl), παρά την επαρκή χορήγηση υγρών αναζωογόνησης. Αντίστοιχα, η πολυοργανική ανεπάρκεια που αποδίδεται στη σήψη (sepsis-associated organ dysfunction) ορίζεται ως η σοβαρή λοίμωξη που οδηγεί σε καρδιαγγειακή και/ή μη καρδιαγγειακή οργανική δυσλειτουργία. Φαίνεται ότι η γρήγορη επαναφορά του γαλακτικού οξέος σε φυσιολογικά επίπεδα, εντός 2-4 ωρών μετά την αναζωογόνηση, συσχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης οργανικής δυσλειτουργίας (Relative Risk 0.47). Τα ποσοστά θνητότητας που αποδίδονται στις ηπιότερες μορφές σήψης κυμαίνονται από 4-10%, ενώ αντίθετα οι σοβαρότερες μορφές σήψης με σηπτική καταπληξία ή πολυοργανική ανεπάρκεια εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά θνητότητας (40-50%) (28).

Σε μία αναδρομική μελέτη στην Αυστραλία, που συμπεριέλαβε 109,663 ασθενείς με θετικά κριτήρια σήψης, αναφέρθηκε ότι το 87,9% των ασθενών παρουσίαζαν 2 ή περισσότερα θετικά κριτήρια για SIRS, αλλά το 12% είχαν αρνητικά κριτήρια. Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν ότι χρησιμοποιώντας τα κριτήρια SIRS μόνο, θα μπορούσε να χαθεί η διάγνωση σοβαρής σήψης σε μία περίπτωση ανά 8 ασθενείς, επιβεβαιώνοντας τη χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα των κριτηρίων SIRS για τη σοβαρή σήψη (30). Σε πιο πρόσφατες αναλύσεις που συνέκριναν τα κριτήρια SIRS με τη χρήση των SOFA score (**Εικόνα 2**) και quick SOFA (qSOFA) score (0-3 βαθμοί για κάθε παράμετρο: συστολική υπόταση <100mmHg, ταχύπνοια >22/min ή αλλαγή του επιπέδου συνείδησης), οι ερευνητές κατέδειξαν τη μεγαλύτερη προγνωστική εγκυρότητα με τη χρήση του πλήρους SOFA score σε ασθενείς της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (area under the receiver operating characteristic curve- AUROC 0,74), σε σύγκριση με το qSOFA (AUROC 0,66) και το SIRS (AUROC 0,64), σε αντίθεση με τους ασθενείς στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ), όπου το qSOFA επέδειξε καλύτερη προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών (AUROC 0,81) (31).

Σε πρόσφατη μελέτη των Matics et al, οι παράμετροι του παιδιατρικού SOFA score (pSOFA) προσαρμόστηκαν στις φυσιολογικές τιμές ανά ηλικία, με στόχο να αξιολογηθεί η επίδοση των ορισμών του Sepsis-3 στους παιδιατρικούς ασθενείς, δίνοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την έγκαιρη διάγνωση σήψης, αλλά και την αναγνώριση του κινδύνου θνητότητας στα βαρέως πάσχοντα παιδιά (26). Επίσης, σε πρόσφατη ανασκόπηση, αναδείχθηκαν συγκεκριμένοι κλινικοί παράγοντες, όπως η υποθρεψία, τα νεοπλάσματα, η υπόταση, η χρήση αγγειοδραστικών φαρμάκων, ο μηχανικός αερισμός, οι χαμηλές τιμές στην Κλίμακα Κώματος Γλασκώβης (Glasgow Coma Scale-GCS), ως ανεξάρτητοι παράγοντες που σχετίζονταν με τη θνητότητα στην παιδιατρική σήψη. Ανάμεσα στους εργαστηριακούς δείκτες, σημαντικές διαφορές για τους ασθενείς που δεν επέζησαν σημειώθηκαν για το έλλειμμα βάσης (Base Excess- BE), το pH, το γαλακτικό οξύ, το κάλιο, την προκαλσιτονίνη και για δείκτες ηπατικής δυσλειτουργίας, όπως η πυροσταφυλική τρανσαμινάση (ALT). Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η χολερυθρίνη, ως ο μοναδικός δείκτης ηπατικής δυσλειτουργίας που περιλαμβάνεται στο SOFA score, δεν συσχετίστηκε με θνητότητα. Αντίθετα, δείκτες όπως το γαλακτικό, η οξέωση και το BE, επιβεβαιώθηκαν ως προγνωστικοί παράγοντες, παρότι δεν συμπεριλαμβάνονται στο SOFA score (32).

Table 1. Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score

	Score[a]				
Variables	0	1	2	3	4
Respiratory					
Pa_{O_2}:Fi_{O_2}[b] or Sp_{O_2}:Fi_{O_2}[c]	≥400	300-399	200-299	100-199 With respiratory support	<100 With respiratory support
	≥292	264-291	221-264	148-220 With respiratory support	<148 With respiratory support
Coagulation					
Platelet count, $\times 10^3/\mu L$	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Hepatic					
Bilirubin, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular					
MAP by age group or vasoactive infusion, mm Hg or μg/kg/min[d]					
<1 mo	≥46	<46	Dopamine hydrochloride ≤5 or dobutamine hydrochloride (any)	Dopamine hydrochloride >5 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine bitartrate ≤0.1	Dopamine hydrochloride >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine bitartrate >0.1
1-11 mo	≥55	<55			
12-23 mo	≥60	<60			
24-59 mo	≥62	<62			
60-143 mo	≥65	<65			
144-216 mo	≥67	<67			
>216 mo[e]	≥70	<70			
Neurologic					
Glasgow Coma Score[f]	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine by age group, mg/dL					
<1 mo	<0.8	0.8-0.9	1.0-1.1	1.2-1.5	≥1.6
1-11 mo	<0.3	0.3-0.4	0.5-0.7	0.8-1.1	≥1.2
12-23 mo	<0.4	0.4-0.5	0.6-1.0	1.1-1.4	≥1.5
24-59 mo	<0.6	0.6-0.8	0.9-1.5	1.6-2.2	≥2.3
60-143 mo	<0.7	0.7-1.0	1.1-1.7	1.8-2.5	≥2.6
144-216 mo	<1.0	1.0-1.6	1.7-2.8	2.9-4.1	≥4.2
>216 mo[e]	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	≥5

Εικόνα 2. Παιδιατρικό SOFA score (Πηγή: JAMA, Matics et al., 2017).

➢ Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS)

Ο όρος του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) αντιπροσωπεύει μια κατάσταση σχετικής φλεγμονώδους/ανοσολογικής ενεργοποίησης στον εκάστοτε ασθενή, ενώ ο ορισμός του SIRS απαιτεί την ύπαρξη των 2 τουλάχιστον από τα ακόλουθα 4 κριτήρια (33):

1) **Πυρετός** (κεντρική θερμοκρασία από το ορθό ή από κεντρικό καθετήρα >38,5^{o}Cή <36^{o}C).
2) **Ταχυκαρδία** (μέση καρδιακή συχνότητα > 2 τυπικές αποκλίσεις από το φυσιολογικό για την ηλικία, απουσία εξωτερικών ή επώδυνων ερεθισμάτων ή χρόνιας χορήγησης φαρμάκων. Για τα βρέφη κάτω του ενός έτους αντίθετα, βραδυκαρδία, οριζόμενη ως μια μέση καρδιακή συχνότητα <10^{η} εκατοστιαία θέση για την ηλικία, απουσία βαγοτονικών ερεθισμάτων ή φαρμάκων).
3) **Ταχύπνοια** (μέση αναπνευστική συχνότητα >90^{η} εκατοστιαία θέση για την ηλικία, ή ανάγκη μηχανικού αερισμού για μια οξεία κατάσταση, μη σχετιζόμενη με νευρομυικά νοσήματα ή χορήγηση γενικής αναισθησίας).
4) **Λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία** (αναλόγως των φυσιολογικών τιμών για την ηλικία και μη δευτερογενών από χορήγηση χημειοθεραπείας) ή αύξηση άωρων μορφών ουδετεροφίλων>10%.

Έτσι, ασθενείς με ποικίλες κλινικές καταστάσεις, όπως η σήψη, η παγκρεατίτιδα, τα εγκαύματα ή οι καταστάσεις υπερμεταβολισμού μετά από μείζονες τραυματισμούς ή χειρουργεία, θα μπορούσαν να πληρούν τα κριτήρια για SIRS.

➢ Σήψη- Επιδημιολογία

Το 25% των θανάτων παγκοσμίως, σε ενήλικες και παιδιά, οφείλονται στις λοιμώξεις, τονίζοντας τη σημασία και το παγκόσμιο φορτίο της σήψης ως νοσολογικής οντότητας. Ωστόσο, οι κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων μπορεί να ποικίλουν από ελάχιστα συμπτώματα έως και την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (32). Σύμφωνα με μεγάλη επιδημιολογική μελέτη σε 7000 παιδιατρικούς ασθενείς, η επίπτωση της σοβαρής σήψης ανέρχεται στο 8,2% των εισαγωγών στις παιδιατρικές Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας (ΜΕΘΠ) των ανεπτυγμένων χωρών, εύρημα συμβατό με την αντίστοιχη επίπτωση των ενηλίκων (28). Πολυοργανική δυσλειτουργία εμφάνιζε το 67% των νέων περιπτώσεων σήψης κατά την εισαγωγή τους, ενώ στο 30% των περιπτώσεων η πολυοργανική ανεπάρκεια αναπτύχθηκε κατά τη μετέπειτα νοσηλεία τους. Επίσης, η θνητότητα για τους ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια, έχει συσχετιστεί με τις περιπτώσεις SIRS (4%), σήψη (22%), σοβαρή σήψη (25%) και σηπτική καταπληξία (52%), σύμφωνα με τη μελέτη των Proulx et al (34).

Νεότερες μελέτες αναφέρουν συνολική αύξηση των περιπτώσεων σήψης, αλλά μείωση της θνητότητας της σηπτικής καταπληξίας στον παιδιατρικό πληθυσμό, σε περίπου 10% για τις

ανεπτυγμένες χώρες, με την αυστηρή τήρηση πρωτοκόλλων έγκαιρης αναγνώρισης και θεραπείας της σήψης (35).

Η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη αποτελεί μια θανατηφόρα επιπλοκή που ανέρχεται στο 35% των σοβαρών περιπτώσεων σήψης, με υπέρμετρη ενεργοποίηση ενδοφλέβιων μονοπατιών πήξης, εξάντληση αντιθρομβωτικών παραγόντων και καταστολή της ινωδόλυσης (36).

➢ Παθογένεια και παθοφυσιολογία στη σήψη

Η πολυπλοκότητα της παθοφυσιολογίας της σήψης γίνεται έκδηλη από τη συμμετοχή τόσο ανοσολογικών όσο και μη-ανοσολογικών διαμεσολαβητών κατά την εξέλιξη της σηπτικής διαδικασίας. Ως πρώτης γραμμής άμυνα του οργανισμού, τα ουδετερόφιλα μπορεί να αποκτούν αντικρουόμενες δράσεις κατά τη σηπτική διαδικασία, με κεντρικό ρόλο τόσο κατά τον έλεγχο της φλεγμονώδους παθοφυσιολογίας της σήψης, όσο και στην ανοσολογική απορρύθμιση ή ιστική καταστροφή, που επισυμβαίνει στην περίπτωση μιας ανεξέλεγκτης φλεγμονώδους κατάστασης. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 50-70% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αίμα, ενώ ένας ενήλικος οργανισμός παράγει περίπου 100 δισεκατομμύρια ουδετερόφιλα καθημερινά. Με την κινητοποίησή τους στην κυκλοφορία, τα ουδετερόφιλα έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, περίπου 18 ωρών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ουδετερόφιλα θανατώνονται μέσω ελεγχόμενων και προγραμματισμένων διαδικασιών απόπτωσης και ακολουθεί η φαγοκυττάρωσή τους από μακροφάγα και η απελευθέρωση του αντιφλεγμονώδους παράγοντα TGF-β1 (transforming growth factor-β1), ώστε να μπορέσουν να περιοριστούν οι φλεγμονώδεις διαδικασίες. Αντίθετα, σε περίπτωση σοβαρής λοίμωξης φαίνεται ότι ενεργοποιούνται ποικίλες φλεγμονώδεις και χαοτικές μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η πυρόπτωση, η νεκρόπτωση ή η αυτοφαγία, που παρατείνουν τον φλεγμονώδη καταρράκτη. Επιπρόσθετα, οι μελέτες δείχνουν ότι κατά τη σηπτική εξέλιξη η αυτόματη απόπτωση ουδετεροφίλων αναστέλλεται και αυξάνεται η επιβίωση τους, που μπορεί να αποβεί επιβλαβής για τον οργανισμό, με ταυτόχρονη ανάπτυξη αντοχής για τον παθογόνο παράγοντα. Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, οι ανωτέρω διαδικασίες αναστολής του ελέγχου των ουδετεροφίλων πιθανώς να οφείλονται σε ποικίλα παθολογικά ερεθίσματα ή αλλαγές στο διακυττάριο περιβάλλον, που επάγουν τις κατακλυσμιαίες φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Επομένως, ένας υγιής οργανισμός είναι απαραίτητο να παρέχει ένα σταθερό περιβάλλον, με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, χωρίς υποξία, υψηλές θερμοκρασίες ή μηχανικό στρες, ώστε να μπορεί να εξασφαλίζεται η ισορροπία του σταθερού αριθμό παραγωγής και κάθαρσης ουδετεροφίλων, όπως και η ελεγχόμενη κυτταροτοξικότητά τους. Έτσι, στα πρωταρχικά παθοφυσιολογικά γεγονότα στη σήψη φαίνεται να περιλαμβάνεται η απορρύθμιση των διαδικασιών θανάτωσης ουδετεροφίλων και η αποδιοργάνωση της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού, που μπορεί να αποβαίνει κρίσιμη και να οδηγεί σε οργανική ανεπάρκεια και σε ανοσοκαταστολή (37).

Το έναυσμα για την εκκίνηση της φλεγμονώδους αντίδρασης στη σήψη αποτελεί η αναγνώριση παθογόνων, μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αναγνώρισης (pattern recognition receptors-PRRs)

και την ενεργοποίηση κυττάρων της φυσικής ανοσίας, που συνίσταται κυρίως στη δράση των μακροφάγων, των μονοκυττάρων, των ουδετεροφίλων και των κυττάρων φυσικών-φονέων (Natural Killers/ NK- κυττάρων). Παραδείγματα PRRs αποτελούν οι toll-like receptors (TLRs), οι C-type lectin receptors (dectin 1 and 2), οι NOD-like receptors (nucleotide-binding oligomerization domain), και οι RIG-1 like receptors (retinoic acid inducible gene 1). Οι πιο ευρέως μελετημένοι PRRs είναι οι υποδοχείς TLRs, που συστρατεύονται στην ειδική αναγνώριση PAMPs. Για παράδειγμα ο TLR-4 προσδένεται σε λιποπολυσακχαρίτες, ενώ ο TLR-2 στο λιποτειχοικό οξύ (38). Επιπρόσθετα, κάποιοι άλλοι υποδοχείς, όπως οι NOD-like receptor proteins, μπορεί να συστρατεύονται σε μεγαλύτερα σύμπλοκα πρωτεϊνών, που ονομάζονται φλεγμονοσώματα, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή κρίσιμων κυτταροκινών, όπως η IL-1β και η IL-18, ή ειδικών κασπασών, που οδηγούν τις διεργασίες για την προγραμματισμένη κυτταρική απόπτωση.

Η διαδικασία επισυμβαίνει με την πρόσδεση αυτών των υποδοχέων είτε σε συγκεκριμένες μοριακές αλληλουχίες παθογόνων (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), είτε σε συγκεκριμένες ενδογενείς μοριακές αλληλουχίες, που σχετίζονται με ιστική βλάβη (damage-associated molecular patterns- DAMPs). Παραδείγματα PAMPs αποτελούν οι βακτηριακές ενδοτοξίνες, λιποπολυκχαρίτες (lipopolysaccharide-LPS) ή το λιποτειχοικό οξύ από το κυτταρικό περίβλημα gram-αρνητικών και gram-θετικών μικροβίων αντίστοιχα, β-γλυκάνες ή μαννάνες από το τοίχωμα μυκήτων, διπλές-έλικες RNA από ιούς, ή μη μεθυλιωμένο DNA, μοναδικό σε βακτηριακά γονιδιώματα. Αντίθετα, παραδείγματα DAMPs αποτελούν ενδοκυττάρια υλικά ή μόρια όπως ATP, μιτοχονδριακό DNA, γλυκοπρωτεΐνες ή λιποπρωτεΐνες του ξενιστή, που απελευθερώνονται από αποπτωτικά ή τραυματισμένα κύτταρα του πάσχοντα. Η αναγνώριση DAMPs έχει περιγραφεί σε περιπτώσεις τραύματος, υποξίας, ισχαιμίας, ή έκθεσης σε τοξικές ουσίες. Δεδομένου του ότι οι PRRs αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες PAMPs και DAMPs εξηγεί τις κοινές κλινικές εκδηλώσεις των βαρέως πασχόντων ασθενών, ανεξάρτητα από τους λοιμώδεις παράγοντες που πυροδοτούν τα σηπτικά μονοπάτια (2,36).

Με έναυσμα τις ανωτέρω αντιδράσεις, ειδικά αντιγονικά μόρια του εκάστοτε παθογόνου φαγοκυτταρώνονται, ώστε να καταστεί δυνατή η παρουσίασή τους στα ανοσοκύτταρα της επίκτητης ανοσίας. Σε αυτή τη διαδικασία απαραίτητη είναι η πρόσδεσή τους σε μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex-MHC), όπως το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο (human leukocyte antigen/ HLA-DR). Έτσι καθοδηγείται η ενεργοποίηση ειδικών ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα σημαντικότερα εκ των οποίων οδηγούν στη διέγερση του NF-κΒ και των ιντερφερονών. Χαρακτηριστική είναι η συσσώρευση αποπτωτικού DNA (μικροβιακού ή του ξενιστή) σε λυσοσωμιακά διαμερίσματα, τα οποία διεγείρουν την διέγερση του κυτταροπλασματικού μονοπατιού STING-IRF3-NF-κΒ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται πολύπλοκες φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις, μέσω διέγερσης φαγοκυττάρων και έκκρισης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α, IL-1β και IL-6. Στον αντίποδα, οι ιντερφερόνες ασκούν από την πλευρά τους ποικίλες επιδράσεις στους μεσολαβητές της φυσικής ανοσίας, είτε διεγείροντας είτε αναστέλλοντας φλεγμονώδη μονοπάτια (39). Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι πολλαπλά είδη ελεύθερου DNA στο πλάσμα του ξενιστή (cell-free DNA/ cfDNA) είναι σημαντικά

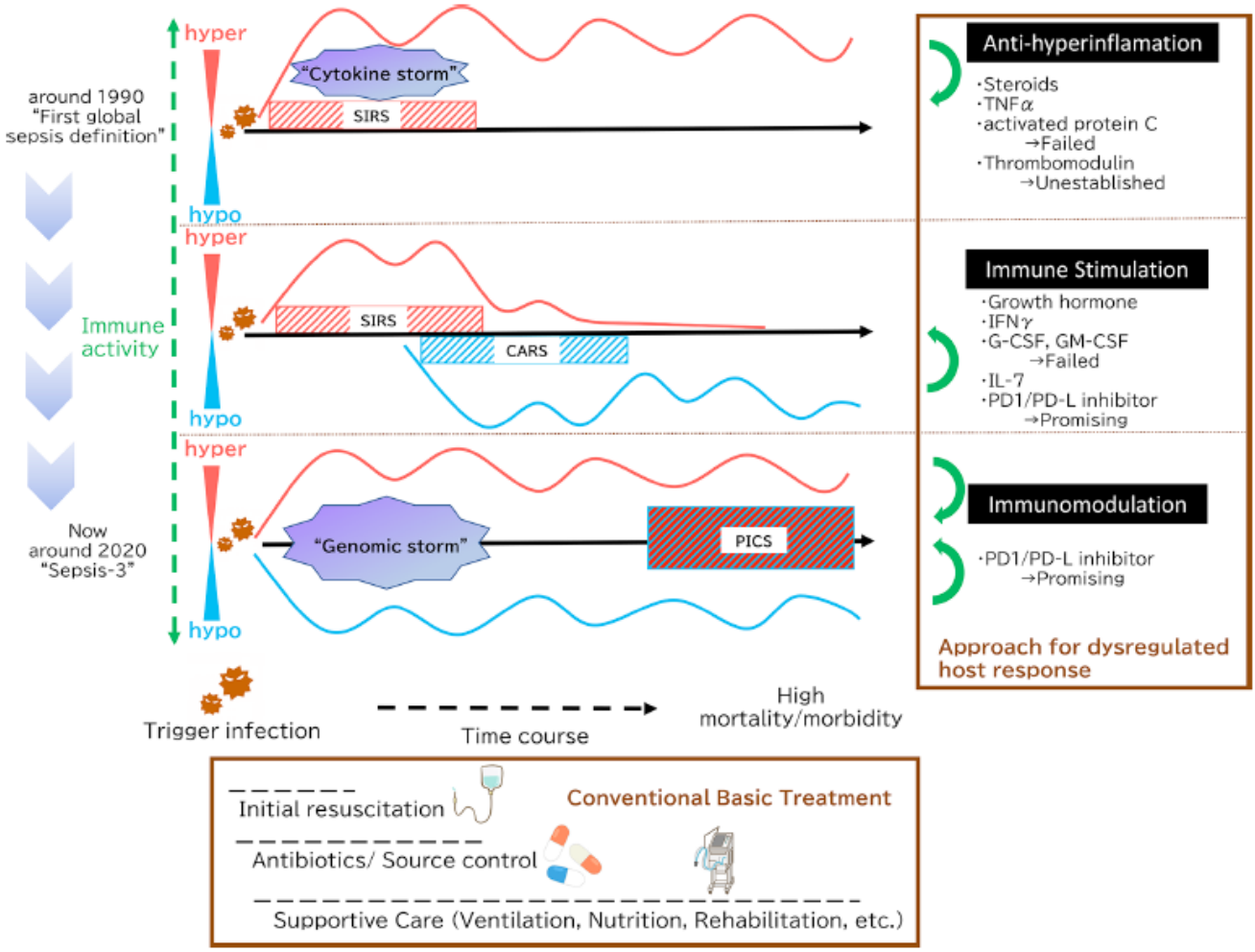
αυξημένα στη σήψη, ενώ αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο σηπτικής καταπληξίας και θνητότητας (36).

Η φλεγμονώδης καταιγίδα κυτταροκινών προκαλεί ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό λευκοκυττάρων, ενεργοποίηση του συμπληρώματος, αύξηση της έκφρασης μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης ή χημειοκινών, παραγωγή του ιστικού παράγοντα από το τραυματισμένο ενδοθήλιο ή τα φλεγμονώδη κύτταρα, καθώς και ηπατικών πρωτεϊνών οξείας φάσης (CRP, αμυλοειδές). Στόχος είναι να τεθούν υπό έλεγχο τα εισερχόμενα μικρόβια σε τοπικό επίπεδο, να καταστραφούν οι προσβεβλημένοι ιστοί και να αποκατασταθούν οι βλάβες. Ωστόσο, σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίησή τους, όπως σε σηπτικές καταστάσεις, η υπέρμετρη έκκριση κυτταροκινών οδηγεί σε παράπλευρες απώλειες, με βλάβες στα κύτταρα του ίδιου του ξενιστή. Στη σήψη, εν προκειμένω, διάφορα φλεγμονώδη και ομοιοστατικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ενώ παράλληλα υπάρχει και απορρύθμιση πηκτικών μηχανισμών σε ένα ευρύ φάσμα, που μπορεί να ποικίλλει από την εμφάνιση ήπιας θρομβοπενίας έως διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Επίσης, σε ασθενείς με σοβαρή συστηματική φλεγμονή μπορεί να υπάρχουν μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών C και S, αντιθρομβίνης και θρομβομοδουλίνης, που θα μπορούσαν να ελέγξουν την υπέρμετρη ενεργοποίηση πηκτικών παραγόντων, ενισχύοντας την ινωδόλυση, αλλά και να ενισχύουν παράλληλα και αντιφλεγμονώδη μονοπάτια, με δυνατότητα αναστολής βασικών φλεγμονωδών παραγόντων (TNF-α, IL-1β και IL-6) (2,40).

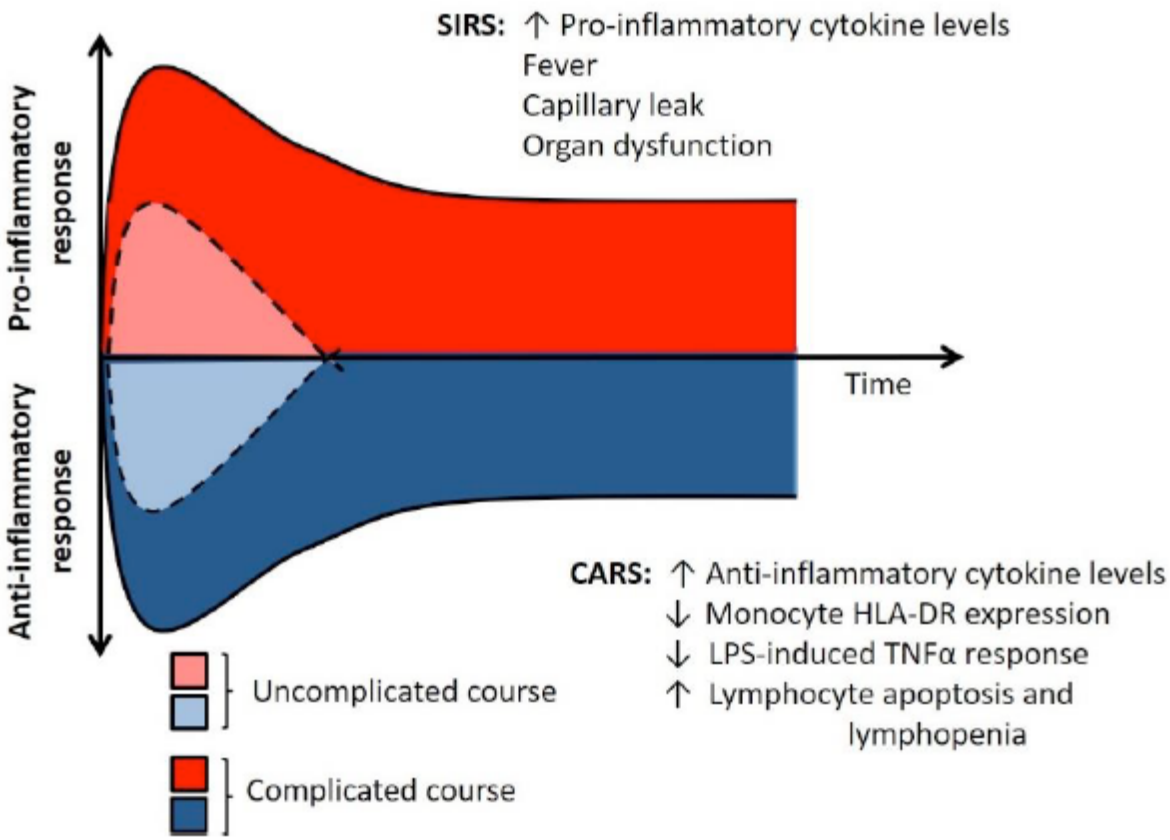
Οι ανωτέρω μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αποστολή σημάτων στον πυρήνα των κυττάρων, την εναλλακτική ενεργοποίηση γονιδίων και τη μεταφραστική διαφοροποίηση, μέσω παραγωγής ειδικών πρωτεϊνών-αγγελιοφόρων, για την εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης (41). Πολλές τελευταίες μελέτες τονίζουν τη γενετική επίδραση στην επιρρέπεια σοβαρής νόσησης από λοιμώδεις παράγοντες. Γονιδιακοί πολυμορφισμοί για τον TLR-4 επί παραδείγματι, έχουν περιγραφεί σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρές λοιμώξεις από gram-αρνητικούς οργανισμούς (42).

Σε συνέχεια των ανωτέρω διεργασιών, και δεδομένης της σύγχρονης έγκαιρης διάγνωσης και βελτιωμένης θεραπευτικής προσέγγισης, πολλές περιπτώσεις σηπτικών ασθενών καταφέρνουν να επιβιώνουν μετά την εισαγωγή τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, αναπτύσσοντας όμως μια χρόνια βαριά καταβολική κατάσταση, με πτωχή θρέψη, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και ελεγχόμενη δυσλειτουργία οργάνων, που αποδίδεται σήμερα με τον όρο ¨επίμονη φλεγμονή, ανοσοκαταστολή και σύνδρομο καταβολισμού¨ (persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome- PICS). Η επίμονη, χαμηλού βαθμού φλεγμονή μπορεί να παραμένει στους ασθενείς με σήψη, μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο και μπορεί να επάγει μια επίμονη ανοσοκαταστολή, με επίδραση σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς της φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Επίσης, συνδέεται με μακροχρόνιες καταβολικές διεργασίες και υποθρεψία, όπως αυτές παρατηρούνται και σε άλλα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα. Το PICS, όπως είναι αναμενόμενο, συσχετίζεται με ανεπαρκή επούλωση τραυμάτων, αυξημένο κίνδυνο επακόλουθων ευκαιριακών και ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως και με αυξημένο κίνδυνο για δυσμενή έκβαση μετά την αρχική αποθεραπεία του σηπτικού ασθενούς (7,43,44).

Πολλές κλινικές μελέτες εστιάζουν στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εξέλιξη της σήψης. Η πρώτη υπόθεση αποδίδει την ανάπτυξη σήψης στην υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση φλεγμονώδους απόκρισης, συμβατή με την ιδέα του SIRS και υποστηριζόμενη από πειραματικά και κλινικά δεδομένα. Ωστόσο, μεγάλες μελέτες, που προσπάθησαν στο παρελθόν να αναστείλουν ποικίλα μονοπάτια της φλεγμονώδους απόκρισης, απέτυχαν να ελέγξουν τη σήψη. Σε μια εναλλακτική υπόθεση η σήψη δεν είναι ευθέως το αποτέλεσμα της υπερφλεγμονής, αλλά περισσότερο, μια πιο άμεση εκδήλωση αποτυχημένων αντιφλεγμονωδών αντιδράσεων. Έτσι, σύμφωνα με αυτή τη θεωρία υπάρχει άμεση ανεπάρκεια του αντιρροπιστικού αντιφλεγμονώδους συνδρόμου απόκρισης (compensatory anti-inflammatory response syndrome- CARS). Η επόμενη πιθανή παθοφυσιολογική πρόταση, αυτής της ανάπτυξης ανοσοπαράλυσης, δηλαδή της σοβαρότερης μορφής CARS, υποθέτει ότι η σήψη αποτελεί μια μορφή επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (φυσικής και επίκτητης), οδηγώντας στην ανεπάρκεια ελέγχου των παθογόνων εισβολών (**Εικόνα 3α**) (8,45,46). Έτσι, τα τελευταία χρόνια επικρατέστερη θεωρείται η θεωρία μιας δυναμικής ανοσιακής απόκρισης στη σήψη, όπου συνυπάρχουν φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις, ενώ στην περίπτωση της υπέρμετρης ενεργοποίησης της μίας ή και των δύο αυτών αντιδιαμετρικών δυνάμεων ο ασθενής θα οδηγηθεί στην ανάπτυξη σοβαρών κλινικών επιπλοκών (6)(**Εικόνα 3β**).



Εικόνα 3α. Φαινότυποι υπερφλεγμονής ή ανοσοπαράλυσης στη σήψη (Πηγή: Frontiers in Immunology, Nakamori et al., 2021).



Εικόνα 3β. Αντιδιαμετρικές φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις δυνάμεις στη σήψη (Πηγή: Pathogens, Bline et al., 2021).

➢ Υπερφλεγμονή και ανοσοκαταστολή στη σήψη

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχουν διεγείρει τα επιστημονικά δεδομένα, που ενισχύουν την άποψη ότι η αρχική υπερφλεγμονώδης σηπτική απάντηση συχνά συνυπάρχει εξαρχής με αντιφλεγμονώδεις καταιγίδες κυτταροκινών. Η λεπτή ισορροπία ανάμεσα σε αυτές τις αντιδιαμετρικές διαδικασίες καθορίζει εάν θα υπερισχύσει η κλινική εικόνα της υπερφλεγμονής ή μια παρατεταμένη κατάσταση ανοσοκαταστολής, κατά την οποία παρατηρείται μείωση του αριθμού των Τ-λεμφοκυττάρων (βοηθητικών και κυτταροτοξικών), ως αποτέλεσμα απόπτωσης και μειωμένης απόκρισης σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Φαίνεται ότι όσο πιο σοβαρή είναι η κατάσταση του σηπτικού ασθενούς, τόσο περισσότερη θα είναι και η έκφραση γονιδίων απόπτωσης και ανοσοκαταστολής (47). Επίσης, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μειωμένη παραγωγή κρίσιμων κυτταροκινών, όπως η IL-6 και ο TNF-α, ενώ τα ουδετερόφιλα εκφράζουν λιγότερους υποδοχείς χημειοκινών, με αποτέλεσμα μειωμένη απόκριση στην IL-8 (48). Πρόκειται για τη φάση, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι ικανό να ενορχηστρώσει μια αποτελεσματική ανοσολογική απάντηση στον λοιμογόνο παράγοντα. Τελευταίες ερευνητικές προτάσεις ενισχύουν τη σκοπιά της σήψης, που είναι απόλυτα συνυφασμένη με το σύνδρομο PICS, καθώς η

υπερφλεγμονή και η ανοσοπαράλυση φαίνεται να συνυπάρχουν από τα αρχικά και έως τα τελευταία στάδια των παθολογικών σηπτικών διεργασιών (39,49). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα αυτών των παθοφυσιολογικών μηχανισμών αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ποικίλοι φαρμακευτικοί αναστολείς φλεγμονωδών ή αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, που έχουν δοκιμαστεί τελευταία σε ερευνητικό επίπεδο, δεν έχουν επιφέρει τα προσδοκώμενα θετικά αποτελέσματα σε σχέση με την επιβίωση των σηπτικών ασθενών. Όπως συμβαίνει συχνά στη νοσολογία, πολλαπλές βιβλιογραφικές αναφορές χαρακτηρίζουν πλέον την ανοσοπαράλυση ως μια ετερογενή κατάσταση, καθώς η ένταση και η φύση των ενοχοποιούμενων ανοσιακών ελλειμμάτων διαφέρουν σημαντικά τόσο μεταξύ των ασθενών, όσο και στον ίδιο ασθενή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Αυτή είναι και η αιτία που επιβάλλει την εξατομικευμένη προσέγγιση σε αυτούς τους ασθενείς, καθώς δεν θα μπορούσαν να είναι συγκρίσιμοι και να λάβουν την ίδια θεραπεία διαφορετικοί ξενιστές με κοινά μεν κλινικά χαρακτηριστικά, αλλά χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν οι ξεχωριστές παθοφυσιολογικές διεργασίες ανάμεσά τους (5).

Οι λειτουργικές αλλαγές που συνιστούν την ανοσοπαράλυση στη σήψη, γνωστές και ως ανοχή στις ενδοτοξίνες (endotoxin tolerance), συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας ή δευτερογενών λοιμώξεων από ευκαιριακά παθογόνα, όπως μύκητες, βακτήρια, ή από λανθάνοντες ιογενείς παράγοντες όπως ο απλός έρπης, ο ιός Ebstein-Barr ή ο κυτταρομεγαλοιός. Δύο από τα πιο αποδεκτά σήματα κατατεθέντα για τον χαρακτηρισμό της ανοσοπαράλυσης, όσον αφορά τη φυσική ανοσία, είναι: α) η απενεργοποίηση των δύο κλασικών τύπων αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων, δηλαδή των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, μέσω της μειωμένης ικανότητας παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως η TNFα ή η IFNγ, και όχι τόσο η αντιφλεγμονώδης IL-10), και β) η μειωμένη έκφραση του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου DR (HLA-DR) στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων (6). Το αντίστοιχο πρότυπο ανοσοπαράλυσης από τη σκοπιά της επίκτητης ανοσίας είναι η απόπτωση ή εξάντληση των λεμφοκυττάρων, καθώς φαίνεται ότι η πρώιμη λεμφοπενία αποτελεί προγνωστικό παράγοντα σχετιζόμενο με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας (5,50). Μία ακόμα μορφή ανοσοκαταστολής, που περιγράφεται στη βιβλιογραφία, προέρχεται από την ανικανότητα της επίκτητης ανοσίας να αντιδράσει στα διάφορα λοιμογόνα, καρκινικά ή αυτοάνοσα ερεθίσματα, ως αποτέλεσμα επίμονης έκθεσης και χρονίζουσας συνεχιζόμενης υπερδιέγερσης από αντιγονικά και φλεγμονώδη σήματα, η οποία θα οδηγήσει τελικά στην αναπόφευκτη σταδιακή εξάντληση των λεμφοκυττάρων. Ένας από τους υπεύθυνους μηχανισμούς σε αυτή τη διεργασία είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού PD, με την έκφραση του μορίου PD-1 στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων και, αντίστοιχα, του υποδοχέα του (PD-L1) στα σπληνικά κύτταρα, πνευμονοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία λειτουργούν ως σημείο ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος και οδηγούν στην εξάντληση της αποτελεσματικής δράσης των ανοσοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, αρχικά χάνουν την ικανότητα παραγωγής της IL-2 και της ικανότητάς τους για πολλαπλασιασμό, και μεταγενέστερα οδηγούνται στην απώλεια της ικανότητας παραγωγής IFN-γ, TNF και χημειοκινών (39). Αντίστοιχα με το PD μονοπάτι, η αυξημένη έκφραση ανασταλτικών βιομορίων των λεμφοκυττάρων, όπως ο B και T ανασταλτικός παράγοντας (BTLA) κή η κυτταροτοξική πρωτεΐνη των Τ-λεμφοκυττάρων (CTLA-4), φαίνεται ότι χαρακτηρίζει τη σήψη. Τελικό αποτέλεσμα είναι η στροφή προς την παραγωγή

ρυθμιστικών Τ-κυττάρων (Tregs), τα οποία φαίνεται να είναι λιγότερο επιρρεπή σε απόπτωση, συγκριτικά με τα εκτελεστικά λεμφοκύτταρα. Μέσω αυτής της ανεργίας των Τ-λεμφοκυττάρων, που χαρακτηρίζει την ανοσοπαράλυση, το ανοσοποιητικό σύστημα δεν καταφέρνει να σχηματοποιήσει μια επαρκή ανοσολογική απάντηση σε μικροβιακούς ή καρκινικούς εισβολείς.

➢ Διαταραχές Μικροκυκλοφορίας στη σήψη

Παρά το ότι ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της πολυοργανικής ανεπάρκειας κατά τη σηπτική διαδικασία είναι πολυπαραγοντικός, ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η ανεπάρκεια της μικροκυκλοφορίας, σε επίπεδο αντιστάσεων στο αρτηριακό και φλεβικό δίκτυο. Η μικροκυκλοφορία αποτελεί ένα λειτουργικά ενεργό σύστημα αλληλεπιδράσεων με τα κυκλοφορούντα και τα εντοπιζόμενα στους περιφερικούς ιστούς λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα και εξωκυττάριους διαμεσολαβητές, ικανούς να ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο. Η σήψη συσχετίζεται ιδιαίτερα με: 1) μικροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που οδηγεί σε βλάβη του ενδοθηλιακού φραγμού και ως εκ τούτου σε ιστικό οίδημα και ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση, 2) αγγειοκινητική δυσλειτουργία, που οδηγεί σε αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις και απώλεια περιφερικών αντιστάσεων, καθώς και 3) διαταραχή μεταφοράς και χρησιμοποίησης οξυγόνου από τους ιστούς (51).

Οι λιποπολυκχαρίτες (Lipopolysaccharide- LPS), ένα σημαντικό παραπροϊόν των παθογόνων, αναγνωρίζεται από ειδικά μόρια όπως οι toll-like υποδοχείς (TLRs) των κυττάρων της φυσικής ανοσίας, οδηγώντας σε ενδοκυττάρια σηματοδότηση και παραγωγή καταιγίδας κυτταροκινών και χημειοκινών. Η σηπτική καταπληξία, επίσης, εκδηλώνεται με διαφυγή υγρών από τον ενδοαγγειακό στον εξωκυττάριο χώρο, ως απόρροια της βλάβης του ενδοθηλιακού φραγμού και της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, με απώλεια κυκλοφορούντος όγκου αίματος, και τελική συνέπεια τη δραματική μείωση της καρδιακής παροχής, επιβάρυνση της καρδιακής λειτουργικότητας και απειλητικό για τη ζωή οίδημα στους πνεύμονες, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο των σηπτικών ασθενών. Πολλοί φλεγμονώδεις αγωνιστές μεσολαβούν στην ενδοθηλιακή υπερδιαπερατότητα, μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών εξαρτώμενων από ασβέστιο, διάσπαση του κυτταροσκελετού και διαχωρισμό των στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (52). Μελέτες σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας εντέρου υποδεικνύουν περιφερικά ελλείμματα αιματικής διανομής, που θα μπορούσαν να δικαιολογούν την ιστική υποξία και την περιορισμένη απόδοση οξυγόνου στους ιστούς, και που γρήγορα θα οδηγούσαν σε πολυοργανική ανεπάρκεια στις σοβαρές περιπτώσεις σήψης, παρά την έγκαιρη και επαρκή ανάνηψη με υγρά (53).

Το νιτρικό οξείδιο (NO), το κύριο μόριο επιτέλεσης της ενδοθηλιακά καθοδηγούμενης χάλασης των αιμοφόρων αγγείων, θεωρείται πλέον ο βασικός μεσολαβητής της σηπτικής καταπληξίας (54). Παράγεται από το ένζυμο της συνθάσης του NO (NOS), που μετατρέπει την αργινίνη και το οξυγόνο σε NO και κιτρουλίνη. Η ανθρώπινη NOS ανευρίσκεται σε τρεις ισομορφές (NOS 1,2 και 3), που εκκρίνονται ως απάντηση σε ένα πλήθος φλεγμονωδών σημάτων (πχ LPS, TNF-α και IL-1β). Εκτός

από την αγγειοδιαστολή, το NO καταστέλλει επίσης τη μυοκαρδιακή λειτουργία και συμμετέχει στον σχηματισμό ισχυρών οξειδωτικών βιομορίων όπως ο περοξυνιτρίτης, ενώ επίσης, επηρεάζει αρνητικά τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων. Ωστόσο, πρώιμες μελέτες αναστολής της NOS απέτυχαν να επιτύχουν αποτελεσματικότητα στην αναστροφή της σηπτικής διαδικασίας (55,56). Άλλες μελέτες προσδίδουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες στο NO, μέσω ενδείξεων προώθησης της αυτοφαγίας, και περιορισμού της ενεργοποίησης φλεγμονοσωμάτων.

Τέλος, είναι καλά τεκμηριωμένο τα τελευταία χρόνια ότι η φλεγμονώδης ανοσολογική διαδικασία είναι στενά συνδεδεμένη και αλληλεπιδρά με τα μονοπάτια της πηκτικότητας, οδηγώντας σε διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μικροαγγειακές θρομβώσεις (57). Μέσω της ονομαζόμενης ανοσοθρόμβωσης (immunothrombosis), η οποία μελετάται ευρέως πλέον στη σήψη, υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (όπως τα λευκοκύτταρα) και του αγγειακού ενδοθηλίου, μέσω απελευθερούμενων κυτταροκινών, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης και των αιμοπεταλίων, αλλά και την αναστολή των αντιπηκτικών μηχανισμών (58). Επιπρόσθετα, μετά την ενεργοποίησή τους, τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν τις λεγόμενες εξωκυττάριες παγίδες των ουδετεροφίλων (neutrophil extracellular traps/ NETs), που οδηγούν όχι μόνο στην ανάπτυξη σοβαρής ουδετεροπενίας, αλλά και στη δημιουργία μιας υπερπηκτικής κατάστασης, μέσω αναστολής της ινωδολυτικής δραστηριότητας ή μέσω παγίδευσης αιμοπεταλίων. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις κυκλοφορούντων NETs σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (DIC) (6). Ο σχηματισμός θρόμβου, σε πρώτη φάση, φαίνεται να αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό, που στόχο έχει να αποτρέψει τη διάδοση της λοίμωξης από τοπικό σε συστηματικό επίπεδο. Ωστόσο, η υπερδιέγερση των πηκτικών μηχανισμών και η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, υπερενεργοποιούν και στρατολογούν με τη σειρά τους ανοσολογικούς και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές (39). Μειωμένα επίπεδα ενδογενών αντιπηκτικών μορίων, όπως η αντιθρομβίνη III, και οι πρωτεΐνες S και C, ανευρίσκονται συστηματικά στη σηπτική καταπληξία, ενώ η δυσλειτουργία της αντιθρομβωτικής πρωτεΐνης ADAMTS-13, οδηγεί στο σύνδρομο της πολυοργανικής ανεπάρκειας που σχετίζεται με θρομβοπενία (thrombopenia-associated multiple organ failure- TAMOF (59). Η ηπαρίνη χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της DIC, όχι μόνο λόγω της αντιθρομβωτικής της δράσης, αλλά και λόγω των σημαντικών αντιφλεγμονωδών της δράσεων, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της λειτουργίας των ουδετεροφίλων (6).

➢ Ιστική Υποξία

Η ιστική υποαιμάτωση στη σήψη είναι το αποτέλεσμα καρδιαγγειακής δυσλειτουργίας. Η επίπτωση της σηπτικής καρδιομυοπάθειας σύμφωνα με μια ποικιλία μελετών κυμαίνεται από 20 έως 60%, ενώ φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένη με τη δράση διαφόρων κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων ο TNFα και η IL-1β, οι οποίες προκαλούν διαταραχή της ομαλής μιτοχονδριακής λειτουργίας των καρδιακών μυϊκών ινών. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, σε συνδυασμό με την

αυξημένη παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) από την υπερφλεγμονώδη κατάσταση και την πτώση των επιπέδων ATP, έχουν σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σε αναερόβια γλυκόλυση, παραγωγή γαλακτικού οξέος και ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών σημάτων σε κυτταρικό επίπεδο. Χαρακτηριστικά κλινικά ευρήματα είναι το χαμηλό κλάσμα εξώθησης, που συνοδεύεται από φυσιολογικές ή χαμηλές πιέσεις πλήρωσης της αριστερής κοιλίας της καρδιάς, καθώς και η αυξημένη ευενδοτότητα της αριστερής κοιλίας, η συστολική και διαστολική δυσλειτουργία, ή ο αυξημένος τελο-διαστολικός και τελο-συστολικός όγκος στη σηπτική μυοκαρδιοπάθεια, ευρήματα που τη διαχωρίζουν αρχικά από την πρωτογενή καρδιογενή καταπληξία (60,61).

➢ Πολυοργανική Δυσλειτουργία

Το αποτέλεσμα των προαναφερθέντων παθοφυσιολογικών μεταβολών και της εξοίδησης του διαμέσου χώρου ή του υποδόριου ιστού, είναι οι βλάβες σε διάφορα όργανα του σώματος. Στους πνεύμονες, υπάρχει αποδιοργάνωση του αρτηριο-κυψελιδικού φραγμού, συσσώρευση εξιδρωματικού υγρού στους διάμεσους πνευμονικούς χώρους και στις κυψελίδες, οδηγώντας στην σταδιακή ανάπτυξη συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Σε επίπεδο νεφρικής λειτουργίας, ο συνδυασμός μειωμένης νεφρικής αιματικής ροής και οξείας σωληναριακής νέκρωσης οδηγούν σε οξεία νεφρική βλάβη, ενώ στο ήπαρ προκαλείται καταστολή της κάθαρσης χολερυθρίνης και ανάπτυξη χολόστασης. Στο γαστρεντερικό σύστημα, η αυξημένη διαπερατότητα του βλεννογόνου οδηγεί σε βακτηριακή διαμετάθεση (bacterial translocation) και αυτοκαταστροφή του εντέρου από ενδοαυλικά ένζυμα. Σε νευρολογικό επίπεδο αναπτύσσεται το φάσμα εκδηλώσεων της σηπτικής εγκεφαλοπάθειας, που περιλαμβάνει διαταραχή του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού, διαφυγή τοξινών, φλεγμονωδών κυττάρων και κυτταροκινών. Ακολουθούν η ανάπτυξη εγκεφαλικού οιδήματος, διαταραχή νευροδιαβιβαστικών σημάτων, ανάπτυξη οξειδωτικού στρες και καταστροφή της λευκής ουσίας. Επιπλέον, λόγω καταβολικών διαδικασιών, υπάρχει γρήγορη και σημαντική αποδόμηση μυϊκών ομάδων, σε μια προσπάθεια να παραχθούν αμινοξέα για γλυκονεογένεση, που θα αποτελέσουν καύσιμα για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος, η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Σχετική επινεφριδιακή ανεπάρκεια, γνωστή ως ανεπάρκεια κορτικοστεροειδών της βαριάς νόσου, εμφανίζεται στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Τα κορτικοστεροειδή έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τη γρήγορη ανάταξη της καταπληξίας, με αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση της θνητότητας. Φαίνεται να επιδρούν τόσο στη φυσική όσο και στην επίκτητη ανοσία, αναστέλλοντας την ωρίμανση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τόσο των λεμφοειδών όσο και των μυελοειδών λευκοκυττάρων. Με την πρόσδεσή τους στους ειδικούς υποδοχείς τους (glucocorticoid receptors-GR) αναστέλλουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, μέσω δέσμευσης του NF-κB στο κυτταρόπλασμα. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αρχικά το πλεονέκτημα της αύξησης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και της απενεργοποίησης των καταβολικών διεργασιών (39).

➢ Το μέλλον στη διαγνωστική ακριβείας σε σχέση με τη σήψη

Δεδομένου του ότι γίνεται όλο και πιο σαφής τα τελευταία χρόνια η γενετική επίδραση στην επιρρέπεια για σοβαρή νόσηση από λοιμώδεις ή μη λοιμώδεις παράγοντες, πολλά υποσχόμενη διαγνωστική τεχνολογία για το μέλλον φαίνεται ότι θα αποτελούν οι λεγόμενες τεχνικές “omics”, που βασιζόμενες σε διαγνωστικές δοκιμασίες σε επίπεδο γενετικό (DNA, genomics), μεταφραστικό (RNA, transcriptomics), επιγενετικό (epigenomics), ή μεταβολικό (metabolomics), θα ενισχύσουν σημαντικά τις ερευνητικές δυνατότητες για χαρακτηρισμό των επιμέρους υποτύπων της σήψης και θα οδηγήσουν σε εξατομικευμένες και στοχευμένες θεραπευτικές πρακτικές (5). Πολλαπλές μελέτες σε μεταφραστικό επίπεδο έχουν δείξει ότι η καταστολή έκφρασης mRNA για γονίδια που κωδικοποιούν τη σηματοδότηση λεμφοκυττάρων και υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας ή πολυοργανικής ανεπάρκειας. Ως επέκταση αυτού, έχει προταθεί ότι η απόκριση ενός σηπτικού οργανισμού στις προτεινόμενες έως τώρα θεραπείες θα μπορούσε να ποικίλλει ανάλογα με το λειτουργικό προφίλ του οργανισμού σε επίπεδο γενετικό ή μεταφραστικό. Για παράδειγμα, υπάρχουν δεδομένα που καταδεικνύουν ότι η θεραπεία με υδροκορτιζόνη σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο πολυοργανικής ανεπάρκειας σε ασθενείς με μειωμένη υποκινούμενη από τον TNFα απόκριση (6).

Έτσι, το μέλλον της θεραπείας της σήψης επαφίεται στην ανάπτυξη ειδικών ανοσοτροποιητικών φαρμάκων, ενώ κρίσιμη θα είναι η εξασφάλιση ότι το σωστό φάρμακο θα χορηγείται στη σωστή στιγμή και στον σωστό ασθενή, με κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει των ξεχωριστών ανοσολογικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους. Για παράδειγμα, αξιολογείται τελευταία η αποτελεσματικότητα παραγόντων όπως ο GM-CSF στην ανοσοπαράλυση στη σήψη (62–64), η ανασυνδυασμένη IL-7 ή η θεραπεία με anti-PD-L1 σε σηπτικούς ασθενείς με λεμφοπενία.

Μορφές ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου

Από τις νεότερες βιβλιογραφικές αναφορές γίνεται ολοένα και πιο έκδηλο ότι, κατά τη διάρκεια μιας σηπτικής διαδικασίας, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι απαραίτητο να θυσιαστούν ("immune cell self-sacrifice"), μέσω της ενεργοποίησης ποικίλων μορφών κυτταρικού θανάτου, με στόχο να προστατέψουν τον οργανισμό και να θανατώσουν τους παθογόνους εισβολείς (65). Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί θεμελιώδες βιολογικό φαινόμενο, που είναι απαραίτητο για την επιβίωση και την ανάπτυξη του οργανισμού, ενώ, νεότερα επιστημονικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι συνεισφέρει και στην ανοσολογική απόκριση ενάντια σε λοιμογόνους παράγοντες. Γενικότερα, στόχος της ενεργοποίησης των αποπτωτικών μηχανισμών είναι η απαλλαγή από κύτταρα που κουβαλούν κατεστραμμένο DNA, ενώ αυτή η διαδικασία ελέγχεται στενά για να προστατευθούν οι σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Υπό αυτό το πρίσμα, τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι είναι οι κύριοι ρυθμιστές και οι ελεγκτικοί μηχανισμοί των κυττάρων για τη διατήρηση ομοιόστασης (66).

Η απόπτωση αποτελεί τη βασική ανοσολογικά ανενεργή διαδικασία προκαθορισμένου, προγραμματισμένου και "καθαρά" ενορχηστρωμένου κυτταρικού θανάτου, χωρίς την εμπλοκή φλεγμονωδών διεργασιών. Από την άλλη μεριά, η νέκρωση θεωρείται μια ξαφνική και ασυντόνιστη διαδικασία, που παρουσιάζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά σε μοριακό επίπεδο, και τα οποία περιγράφονται ως διασταυρούμενα σε συγκεκριμένες φλεγμονώδεις μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η πυρόπτωση, η νεκρόπτωση ή η NETωση (Neutrophil-Extracellular Traps-NETosis) (67).

Απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί μια στενά ελεγχόμενη διαδικασία σε υγιείς ιστούς και ενεργοποιείται σε περιπτώσεις κυτταρικής βλάβης, από οποιαδήποτε νόσο ή τοξικούς παράγοντες. Οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των αποπτωτικών διαδικασιών περιλαμβάνουν την κυτταρική συρρίκνωση, τη συσσώρευση χρωματίνης, την κατάτμηση πυρηνικών διαμερισμάτων και τον σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι η απόπτωση αποτελεί μια ωφέλιμη διαδικασία στην αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση του οργανισμού. Ωστόσο, αυτός ο προγραμματισμένος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου πιθανώς επιτελεί διαφορετικούς ρόλους στους διάφορους ιστούς, ενώ φαίνεται ότι οι ανεπαρκείς ή οι υπερβολικές αποπτωτικές διεργασίες σχετίζονται με την εμφάνιση οργανικής δυσλειτουργίας. Ενδοκυττάριες πρωτεάσες ασπαρτάσης, εξαρτώμενες από την κυστεΐνη (cysteine-dependent aspartate-specific proteases- caspases) αποτελούν τους κύριους επιτελικούς φορείς της αποπτωτικής σηματοδότησης (68). Η απόπτωση φαίνεται ότι είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός περιφρούρησης της ανοσοαντοχής, που μπορεί να ελέγχει την ωρίμανση ή την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων στον θύμο ή στους περιφερικούς ιστούς αντίστοιχα. Πρόσφατες πειραματικές μελέτες έχουν ανακαλύψει τον πολύ σημαντικό ανοσορρυθμιστικό ρόλο των προερχόμενων από μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα (mesenchymal stem cells- MSCs) εξωκυττάριων αποπτωτικών κυστιδίων (extracellular apoptotic

vesicles-apoVs). Τα πολυδύναμα MSCs σχηματίζουν ένα μεσοκυττάριο υπόστρωμα, που αλληλεπιδρά και αναστρέφει τις δυσλειτουργίες των Τ-λεμφοκυττάρων μακροπρόθεσμα, παρά το γεγονός ότι τα MSCs δεν επιβιώνουν για περισσότερο από μερικές ημέρες. Οι ανοσοτροποποιητικές και ανοσοκατασταλτικές δυνατότητες τέτοιων αποπτωτικών κυστιδίων (exosomes) μελετώνται ευρέως σήμερα σε ποικίλα αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά και σε μοντέλα σήψης. Πιο συγκεκριμένα για τη σήψη, έχει βρεθεί ότι τα προερχόμενα από MSCs apoVs είναι ικανά να μεταφέρουν σημαντικές πρωτεΐνες και μικρο-RNAs, που φαίνεται ότι αναστρέφουν τη σηπτική διαδικασία εξασφαλίζοντας τη μετατροπή της φλεγμονώδους διαδικασίας της ουδετεροφιλικής ΝΕΤωσης σε μη-φλεγμονώδεις και πιο ελεγχόμενες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση. Τα ανωτέρω φαινόμενα φαίνεται ότι σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των apoVs με το ενεργοποιημένο μονοπάτι Fas και με καθοδηγούμενες από ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια διαδικασίες (69,70).

Νεκρόπτωση

Η νεκρόπτωση αποτελεί μια προ-φλεγμονώδη μορφή κυτταρικού θανάτου, με μορφολογικά και παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης, αλλά και απόπτωσης. Επίσης, αποτελεί μια ανεξάρτητη από κασπάσες μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία τείνει να καταστέλλεται με την ενεργοποίηση των κασπασών. Από πολλούς η νεκρόπτωση θεωρείται ως ένας υποστηρικτικός, δεύτερης γραμμής μηχανισμός, που ενεργοποιείται σε περίπτωση αποτυχίας των εξαρτώμενων από την κασπάση-8 διαδικασιών απόπτωσης, ή για την υποστήριξη της πυρόπτωσης (71). Η νεκρόπτωση οδηγεί στη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και τη διαρροή κυτταρικών ουσιών, που επάγουν την ανάπτυξη φλεγμονής. Οι κύριοι εκτελεστικοί φορείς νεκρόπτωσης είναι οι RIPK1 και RIPK3 (receptor-interacting protein serine/threonine-protein kinases), που οδηγούν στην ενεργοποίηση της MLKL (mixed lineage kinase domain-like) και στην απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (72,73). Φαίνεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των διαδικασιών της απόπτωσης και της νεκρόπτωσης, ενώ σε απουσία αποπτωτικών σημάτων, τα κύτταρα εισέρχονται σε εναλλακτικά μονοπάτια και οδηγούνται στις διαδικασίες της νεκρόπτωσης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η νεκρόπτωση επιτελεί κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονωδών διαδικασιών κατά την πορεία λοιμωδών νοσημάτων. Στα διαφορετικά στάδια της σήψης μπορεί να παρατηρείται ενεργοποίηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθορίζοντας την έκβαση. Έτσι, η απόπτωση φαίνεται να προηγείται της νέκρωσης/νεκρόπτωσης, καθώς αν τα αποπτωτικά κύτταρα δεν φαγοκυτταρωθούν γρήγορα, εισέρχονται σε διαδικασίες δευτερογενούς νέκρωσης και διάρρηξης των κυττάρων. Επομένως, οι περιπτώσεις κυτταρικού θανάτου, που δεν μπορούν να εξηγηθούν από τις διαδικασίες της απόπτωσης, πιθανώς να εξηγούνται από τους μηχανισμούς της νεκρόπτωσης (74,75). Σε αντίθεση με την απόπτωση που εξαρτάται από ειδικές κασπάσες, η νεκρόπτωση φαίνεται ότι αποτελεί μια διαδικασία εξαρτώμενη από ειδικές κινάσες (RIPK1 και RIPK3), που λειτουργούν ως μέλη μεγαλύτερων μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων (σύμπλοκα TNFR1-RIPK1-TRADD). Σε αυτό το σημείο η τύχη του κυττάρου θα εξαρτηθεί από το αν θα υπερισχύσει η δράση των αγωνιστών της

απόπτωσης, με κυρίαρχη τη δράση της καασπάσης-8, ή η δράση του RIPK1 για την ενεργοποίηση της νεκρόπτωσης (76). Έτσι, οι μελέτες έχουν δείξει ότι η νεκρόπτωση πυροδοτείται επί αναστολής της καασπάσης-8, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκου των RIPK1 και RIPK3 (νεκρόσωμα), την ενεργοποίηση της κινάσης MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein) και την παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου, οδηγώντας σε φλεγμονή (necroinflammation) και μεγαλύτερο κίνδυνο πολυοργανικής ανεπάρκειας και σηπτικής καταπληξίας (67,77). Η νεκρόπτωση φαίνεται να κυριαρχεί σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως η νόσος Alzheimer's, παρότι σε αυτά τα νοσήματα παρατηρείται διασταυρούμενη ενεργοποίηση ποικίλων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου (78), ενώ σε θεραπευτικό επίπεδο οι ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται στην επαγωγή νεκρόπτωσης με στόχο τον περιορισμό μεταστατικών κακοηθειών (79). Επίσης, αρκετές αναφορές υποστηρίζουν ότι η νεκρόπτωση κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονής, της νεοπλασματικής εκτροπής, ή της ισχαιμικής βλάβης (66).

Πυρόπτωση

Η πιο ευρέως μελετημένη, και στενά συνδεδεμένη με τη σήψη, φλεγμονώδης διαδικασία θανάτωσης κυττάρων είναι η πυρόπτωση, η οποία αποτελεί μορφή μη αποπτωτικού, ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, σχετιζόμενου με την απελευθέρωση ενδοκυττάριων μορίων και φλεγμονωδών κυτταροκινών, που δρουν ως μεσάζοντες στην ενίσχυση της φυσικής ανοσίας ενάντια στους μικροβιακούς εισβολείς. Το φαινόμενο της πυρόπτωσης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1992, με την αναφορά της εμπλοκής της καασπάσης-1, χωρίς τη συμμετοχή της καασπάσης-3, κατά τη θανάτωση επιμολυσμένων από Shigella flexneri μακροφάγων. Στη μελέτη αυτή, τα μακροφάγα κατάφερναν να επιβιώσουν στην περίπτωση αναστολής της έκφρασης του γονιδίου της καασπάσης-1 (80). Φαίνεται ότι οι πυροπτωτικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της σήψης αφορούν περισσότερο τον πληθυσμό των μακροφάγων και λιγότερο των ουδετεροφίλων, ενώ αυτή η αντοχή των ουδετεροφίλων στην πυρόπτωση πιθανώς να εξηγεί την παράταση της ζωής τους και τη συνέχιση των φλεγμονωδών διαδικασιών κατά την ενεργοποίηση της σήψης (37). Ωστόσο, πυροπτωτικές διεργασίες έχουν περιγραφεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (67). Οι κύριες βιολογικές διεργασίες της πυρόπτωσης περιλαμβάνουν τη διάτρηση της μεμβράνης, το κυτταρικό οίδημα, την απελευθέρωση κυτταρικού περιεχομένου και την καταστροφή του πυρηνικού DNA (81). Οι πιο χαρακτηριστικοί διεγέρτες της πυρόπτωσης στον άνθρωπο είναι οι καασπάσες -1, -4, και -5 (82). Ανάμεσά τους, ο πιο ευρέως μελετημένος είναι η προκασπάση-1, η οποία βρίσκεται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα σαν ανενεργό ζυμογόνο, ενώ για την πρωτεολυτική της ενεργοποίηση απαιτείται η συσσώρευση πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων (φλεγμονοσώματα). Τα φλεγμονοσώματα, με τη σειρά τους, αποτελούν ένα συνονθύλευμα συγκεκριμένων μορίων (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, pyrin, ASC, caspases), που φαίνεται ότι κατέχουν παρόμοια δράση με τους TLRs στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς κινητοποιούνται ενδοκυττάρια ως απόκριση σε ποικίλα σήματα κινδύνου (DAMPs/PAMPs) (83). Σημεία ορόσημα στη συνέχεια αποτελεί η διέγερση του NF-κB, και της gasdermin D (GSDMD), με επακόλουθη πρόσδεση στις καρδιολιπίνες και εμφάνιση λυτικών βλαβών στο κυτταρικό περίβλημα. Ενδεικτική είναι η

συσχέτιση της υπερέκφρασης γονιδίων, που σχετίζονται με τον σχηματισμό φλεγμονοσωμάτων σε μη επιβιώσαντες σηπτικούς ασθενείς. Συγκεκριμένα βακτηριακά παθογόνα έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, όπως ο Staphylococcus aureus, οι τοξίνες του οποίου φαίνεται ότι οδηγούν σε μαζική εισροή καλίου στα κύτταρα, δημιουργώντας μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, απελευθέρωση μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και καρδιολιπίνης στο κυτταρόπλασμα και τελικά την επαγωγή του NLRP3 φλεγμονοσώματος, σε συνέργεια με την IL-1β και την κασπάση-1. Αντίθετα, άλλος μηχανισμός που αφορά Gram-αρνητικά παθογόνα, όπως η Escherichia coli, η Salmonella typhimurium και η Legionella pneumophila, φαίνεται ότι κινείται μέσω μηχανισμού μη-κανονικού φλεγμονοσώματος (non-canonical inflammasome) σχετιζόμενου με τις κασπάσες 4/5 (άνθρωπος), οι οποίες αναγνωρίζουν απευθείας το LPS και ενεργοποιούν την GSDMD, ανεξάρτητα από τη δράση της κασπάσης-1. Τελικό αποτέλεσμα αυτών των δύο διαφορετικών μορφών πυρόπτωσης (caspase-1-dependent or caspase-1-independent) είναι η ενεργοποίηση των IL-1β και IL-18 (84). Η σημαντικότητα των φλεγμονωδών κασπασών στην προστασία έναντι πολλαπλών βακτηριακών παθογόνων φανερώνεται από το γεγονός ότι σε πειραματικά μοντέλα απενεργοποίησης των γονιδίων πυροπτωτικών κασπασών, ο ξενιστής εμφάνιζε ιδιαίτερα αυξημένο βακτηριακό φορτίο και υπέκυπτε στη λοίμωξη γρηγορότερα (82). Η ενεργοποιημένη κασπάση-1 από το NLRP3 πυροδοτεί διάφορα ενδοκυττάρια μονοπάτια να αναστείλουν τις αυτοφαγικές διεργασίες και επιτρέπουν τη συσσώρευση δυσλειτουργικών κυττάρων, με τελικό στόχο την ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης και της πυρόπτωσης. Εκτός από τις παραδοσιακά μελετημένες φλεγμονώδεις κασπάσες, φαίνεται ότι και μη φλεγμονώδεις κασπάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν την πυρόπτωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι εκτελεστικές κασπάσες-3/7 ή η κασπάση-8, που μπορούν σε ορισμένες καταστάσεις να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση της GSDMD και στην πυρόπτωση (85,86). Στον αντίποδα, διάφορες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια, φαίνεται να επιτελούν ανασταλτικό ρόλο στην παραγωγή φλεγμονοσωμάτων ή αποπτωσωμάτων. Η ανίχνευση της πυρόπτωσης απαιτεί αναλύσεις έκφρασης (western blot, flow cytometry) της GSDMD, της IL-1β και της κασπάσης-1, ή ανίχνευση σημάτων νέκρωσης κατά την κυτταρομετρία ροής (flow cytometry), μέσω μιας ουσίας (propidium iodide) που εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου σε καταστάσεις κυτταρικής βλάβης (67).

ΠΑΝόπτωση

Πρόσφατες μελέτες σε ζωικά μοντέλα, με αφορμή τις πανδημίες ιογενών λοιμώξεων της γρίπης ή του COVID-19, έχουν σημειώσει την ενεργή συμμετοχή των υπερφλεγμονωδών διαδικασιών της νεκρόπτωσης και της μιτοχονδριακής ανεπάρκειας, αλλά όχι της απόπτωσης ή της πυρόπτωσης, στην πρόκληση μυοκαρδιακής βλάβης από βαριές ιογενείς λοιμώξεις (87). Σε άλλη μελέτη αποκαλύπτεται ο πολύπλοκος ρόλος του μορίου RIPK1, το οποίο φαίνεται να διεγείρει στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και ακολούθως να οδηγεί στις σύνθετες και αλληλεπακαλυπτόμενες παθοφυσιολογικές διεργασίες της πυρόπτωσης, απόπτωσης και νεκρόπτωσης, γεγονός που περιγράφεται ως ΠΑΝόπτωση (PANoptosis) (88). Έτσι, αν και η

αποκάλυψη των διαφορετικών διαμεσολαβητών έχει οδηγήσει στην περιγραφή ξεχωριστών και ανεξάρτητων μορφών κυτταρικού θανάτου, ολοένα και περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές αποδεικνύουν για εκτεταμένη αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ αυτών των ξεχωριστών διαδικασιών. Είναι πιθανό ότι οι εναλλαγές μεταξύ των διαφορετικών αποπτωτικών φαινοτύπων εξαρτώνται από το έναυσμα πυροδότησης του κυτταρικού θανάτου και των μοριακών χαρακτηριστικών του εκάστοτε παθογόνου. Επίσης, επί αποτυχίας ενεργοποίησης ενός μονοπατιού, πιθανώς αναλαμβάνει το αντίστοιχο επόμενο μονοπάτι την εξολόθρευση του εκάστοτε εισβολέα (71). Φαίνεται ότι οι ραγδαίες εξελίξεις στις γνώσεις μας σχετικά με τις διαδικασίες που επισυμβαίνουν κατά τη σηπτική διαδικασία θα αποκαλύπτουν ολοένα και πιο σύνθετες και αλληλεπικαλυπτόμενες δράσεις όλων των εμπλεκόμενων βιομορίων.

Αντίθετα με τη διαδικασία της απόπτωσης, όπου διατηρείται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, οι λυτικές βλάβες και το κυτταρικό οίδημα φαίνεται ότι χαρακτηρίζουν μορφολογικά τις διαδικασίες της πυρόπτωσης και νεκρόπτωσης, μέσω της δράσης της gasdermin και του MLKL. Επίσης, σε αντίθεση με τις λυτικές βλάβες που προκαλούνται από την MLKL και που προκαλούν εκλεκτική διάχυση ιόντων κατά τη νεκρόπτωση, οι λυτικές βλάβες κατά την πυρόπτωση από την GSDMD οδηγούν σε μη εκλεκτική διάχυση ιόντων (36,84). Η νεκρόπτωση και η πυρόπτωση φαίνεται σήμερα ότι δρουν συνεργικά ενισχύοντας φλεγμονώδη σήματα κατά την πορεία της σηπτικής κατάστασης. Εκτός από τα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια (RIPK3 ή GSDMD), οι δύο διαδικασίες διαφέρουν και ως προς τους εκτελεστικούς τους μεσολαβητές. Κατά τη διάρκεια της νεκρόπτωσης παρατηρείται απελευθέρωση DAMPs, όπως η πρωτεΐνη HMGB1 (high mobility group box protein 1), ενώ κατά την πυρόπτωση απελευθερώνονται φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-1β και η IL-18. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή των RIPK3/GSDMD προστατεύει από την ανάπτυξη σηπτικής καταπληξίας, διαταραχών πήξης και πολυοργανικών βλαβών (36).

Αυτοφαγία - μιτοχονδριοφαγία

Η αυτοφαγία και η μιτοχονδριοφαγία αποτελούν διαδικασίες που εξασφαλίζουν τη διατήρηση ομοιόστασης, μέσω μονοπατιών απομάκρυνσης δυσλειτουργικών κυτταροπλασματικών οργανιδίων, εκτελεστικών μεσολαβητών (HMGB1) ή ενεργοποιημένων φλεγμονοσωμάτων. Αυτή η διαδικασία αυτό-κάθαρσης, φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντική για την ανακύκλωση ουσιών και κυτταρικής ενέργειας. Η αυτοφαγία ενεργοποιείται από τη νηστεία, την υποξία, τις τοξικές ρίζες οξυγόνου ή τη μιτοχονδριακή βλάβη. Επίσης, αυτή η μορφή κυτταρικής κάθαρσης προστατεύει από την υπέρμετρη φλεγμονή μέσω είτε απομάκρυνσης των ενισχυτών της φλεγμονής, όπως τα κατεστραμμένα οργανίδια ή οι μικροοργανισμοί, είτε μέσω επικοινωνίας με άλλα κύτταρα και αναστολής των φλεγμονωδών συμπλεγμάτων. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν και αδρανοποιούν τα παθογόνα μέσω σύντηξης των φαγοκυττάρων για τον σχηματισμό αυτοφαγικών λυσοσωμιακών σωματιδίων. Επίσης, η αυτοφαγία ελέγχει την παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου, όπως και την παραγωγή και έκκριση κυτταροκινών, όπως του TNF-α, της IL-1β και της IL-6. Η μη αποδοτική απομάκρυνση κυτταρικών σωματιδίων μέσω της αυτοφαγίας φαίνεται ότι οδηγεί σε υπερφλεγμονώδεις αντιδράσεις μέσω του μονοπατιού διέγερσης γονιδίων

ιντεφερόνης (Stimulator of interferon genes-STING) (36). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το 30% του όγκου των μυοκαρδιακών κυττάρων. Σε περίπτωση ανεπάρκειας των μονοπατιών αυτοφαγίας, τα κύτταρα δεν δύνανται να απομακρύνουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, τα οποία συσσωρεύονται και προκαλούν οξειδωτικό στρες. Παραδείγματα αυτοφαγίας αποτελούν η εγκεφαλική ισχαιμία-υποξαιμία και η ηπατοκυτταρική βλάβη που σχετίζεται με τη νευρογενή ανορεξία. Αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου είναι απόλυτα εξαρτημένη από τη δράση της Na+,K+-ATPάσης, η οποία χρησιμοποιείται σε εργαστηριακό επίπεδο για την ανίχνευση της αυτοφαγίας (89,90). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες, επίσης, υποδεικνύουν ότι οι θρομβογόνες σηπτικές διαδικασίες συσχετίζονται με αυξημένη έκφραση γονιδίων, που ελέγχουν την αυτοφαγία και την παραγωγή NF-κB στα σηπτικά καρδιομυοκύτταρα (91).

NETωση

Τα ουδετερόφιλα, όπως και άλλα κοκκιοκύτταρα, έχουν την ικανότητα να απεκκρίνουν NETs (neutrophil extracellular traps), μέσω μιας φλεγμονώδους διαδικασίας που ονομάζεται NETωση (NETosis) και που πυροδοτεί την πρώτης γραμμής ανοσολογική απόκριση έναντι ποικίλων παθογόνων, όπως βακτήρια, μύκητες ή πρωτόζωα. Οι παγίδες NET αποτελούν μια δικτυωτή δομή, που περιέχει πρωτεΐνες όπως η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) ή η καθεψίνη, αλλά και πυρηνικό περιεχόμενο (χρωματίνη, ιστόνες H1, H2A, H2B, H3, H4), με εξωκυττάρια δράση στην κάθαρση παθογόνων. Ωστόσο, έχουν επίσης συσχετιστεί με υπερφλεγμονώδεις καταστάσεις, ενίσχυση της αυτοανοσίας και αγγειακή θρόμβωση. Θεραπείες έναντι της NETωσης, με την ανάπτυξη αντι-ιστονικών αντισωμάτων ή τη χορήγηση DNAσων φαίνεται ότι θα μπορούσαν να αποτελούν ενδιαφέροντες θεραπευτικούς στόχους για τη σήψη. Έχει προταθεί ότι η ανάπτυξη της NETωσης απαιτεί την ακέραιη λειτουργία της αυτοφαγίας και της παραγωγής υπεροξειδίου (superoxide), ενώ η αναστολή της αυτοφαγίας φαίνεται ότι οδηγεί σε αποπτωτικό θάνατο, παρά σε NETωση (37).

Φερρόπτωση

Ένας άλλος ξεχωριστός τύπος κυτταρικού θανάτου, η φερρόπτωση, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια και αποτελεί τον συνδυασμό της δράσης τοξικών ριζών οξυγόνου (ROS) και των σιδηροεξαρτώμενων διαδικασιών λιποτοξικότητας και κυτταρικής βλάβης. Φαίνεται ότι η φερρόπτωση είναι ανοσολογικά ενεργή διαδικασία με προέχοντα ρόλο στη φλεγμονή, καθώς τα προσβεβλημένα κύτταρα απελευθερώνουν ποικίλους φλεγμονώδεις μεσολαβητές (DAMPs ή alarmins) (92). Κρίσιμη διαδικασία στη φερρόπτωση είναι η πυροδότηση της σιδηροεξαρτώμενης (Fe^{2+}) υπεροξείδωσης λιπιδίων, λόγω ανεπαρκών αποθεμάτων αναγωγικών κυτταρικών μηχανισμών. Η υπερβολική παραγωγή ενδοκυττάριου σιδήρου προκαλεί ανεπανόρθωτη βλάβη σε μεμβρανικά λιπιδικά βιομόρια διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων, μέσω μη ενζυματικών (αντίδραση Fenton) ή ενζυματικών μηχανισμών (λιποξυγενάσες) (92,93). Φαίνεται ότι η φερρόπτωση αποτελεί βιοχημικά, μορφολογικά και γενετικά ξεχωριστή διαδικασία συγκριτικά με

τις υπόλοιπες προαναφερθείσες μορφές ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, και αυτό αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες, όπου η in vitro αναστολή είτε της πυρόπτωσης/νεκρόπτωσης, είτε της αυτοφαγίας ή απόπτωσης οδήγησε σε μερική μόνο υποχώρηση των προκαλούμενων από LPS τοξικών βλαβών σε σηπτικά καρδιομυοκύτταρα (94). Η αυξημένη έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2 ή PTGS2), με σημαντική δράση στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος των λιπιδικών μεμβρανών, αποτελεί έναν αναγνωρισμένο βιοδείκτη φερρόπτωσης. Επίσης, η φερρόπτωση μπορεί να ανιχνευθεί με τον προσδιορισμό των υπεροξειδωμένων λιπιδίων μέσω της κυτταρομετρίας ροής (95). Η φερρόπτωση πιστεύεται σήμερα ότι συνδέεται με διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως η νόσος Parkinson ή το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, ενώ η αντιφλεγμονώδης δράση των αναστολέων φερρόπτωσης μελετάται σήμερα για τη θεραπεία ποικίλων νοσημάτων, μεταξύ των οποίων και οι κακοήθειες (79).

➢ Αποπτωτικοί μηχανισμοί και Σήψη

Παρά το γεγονός ότι η σήψη παραδοσιακά χαρακτηριζόταν από την αυξημένη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, τα νεότερα δεδομένα συνδέουν τη δυσμενή πρόγνωση με τη δυσλειτουργία της φυσικής και επίκτητης ανοσίας, με επακόλουθο τον αυξημένο κίνδυνο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (96). Επόμενο είναι αυτή η επίμονη ανοσοκαταστολή να είναι στενά συνδεδεμένη με την επαγόμενη απόπτωση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Όπως όμως έχει γίνει ήδη κατανοητό, φαίνεται ότι οι διάφορες μορφές κυτταρικού θανάτου, που ενεργοποιούνται κατά τη σηπτική διαδικασία δεν υπηρετούν απαραίτητα την προστασία του οργανισμού ενάντια στον εισβολέα. Έτσι, χαρακτηριστικές της σηπτικής διαδικασίας είναι οι διάφορες φλεγμονώδεις μορφές θανάτωσης λευκοκυττάρων, που έχουν ήδη αναλυθεί (37), αλλά και τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης και οι κατεσταλμένες δράσεις πολλαπλών ανοσοποιητικών κυττάρων όπως τα CD4+ και τα CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (97).

Η απόπτωση εκτελείται μέσω τριών διαφορετικών αλλά αλληλεπικαλυπτόμενων ενδοκυττάριων μονοπατιών: το εξωγενές, το ενδογενές και το επαγόμενο από στρες μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου. Κατά την εκτύλιξη αυτών των μονοπατιών ξεχωρίζει η δράση συγκεκριμένης ομάδας πρωτεασών, των κασπασών, οι οποίες στο ενεργό τους κέντρο φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη και υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα υπό μορφή προενζύμων. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κασπασών είναι ότι με την ενεργοποίησή τους διασπούν τα πολυπεπτιδικά τους υποστρώματα κατατμώντας τα μετά από μια θέση ασπαρτικού οξέος. Οι κατατμήσεις αυτές, που αφορούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού ή του πυρήνα, ως πρωτεΐνες-ρυθμιστές της μεταγραφής ή του κυτταρικού κύκλου, ενδεχομένως εξυπηρετούν γενικότερα το «πακετάρισμα» του κυττάρου και τη διευκόλυνση της φαγοκυττάρωσης που ακολουθεί στη συνέχεια (98). Μεταξύ των εξωκυττάριων ενεργοποιητών της απόπτωσης περιλαμβάνονται ποικίλοι παράγοντες που προσδένονται και ενεργοποιούν συγκεκριμένους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια (Fas ligand, TNF). Από την απέναντι όχθη, στους ενδοκυττάριους ενεργοποιητές της απόπτωσης

περιλαμβάνονται παράγοντες που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις στρες και ελέγχουν τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα (99).

Αποπτωτικές καισπάσες

Οι αποπτωτικές καισπάσες φαίνεται να είναι οι πρωτεΐνες που κατέχουν προεξάρχοντα ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και διατήρηση της ανοσολογικής ακεραιότητας, όπως επίσης και στην ενίσχυση της φλεγμονής και της απόπτωσης σε σηπτικούς οργανισμούς, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης ή αδρανοποίησης ποικίλλων πρωτεϊνικών αποπτωτικών ή αντιαποπτωτικών υποστρωμάτων αντίστοιχα (100). Οι καισπάσες θεωρούνται σήμερα κρίσιμοι ρυθμιστές τόσο των φλεγμονωδών διεργασιών, όσο και των ποικίλων διαδικασιών κυτταρικού θανάτου. Πιο αναλυτικά, ο κύκλος δράσης των καισπασών περιλαμβάνει δύο ξεχωριστά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές.

Εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι

Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω πρόσδεσης ειδικών μεσολαβητών σε υποδοχείς απόπτωσης (death receptors) της οικογένειας των υποδοχέων TNF (tumor necrosis factor receptor – TNF-R family) στην κυτταρική μεμβράνη. Παραδείγματα των TNF-R αποτελούν οι Fas ligands (FasL) και ο TNF-related apoptosis-inducing ligand- TRAIL). Η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην επιστράτευση του προσαρμογέα FADD (Fas-associated death domain) και, ακολούθως, στον σχηματισμό ενός ειδικού μεγαλομοριακού συμπλόκου (death-inducing signaling complex-DISC) στην κυτταροπλασματική ουρά του FasL, από το οποίο αποδεσμεύεται και ενεργοποιείται η καισπάση-8 (66). Η καισπάση-8, με τη σειρά της, είτε ενεργοποιεί απευθείας τις κύριες εκτελεστικές αποπτωτικές καισπάσες (καισπάσες 3, 6 και 7), είτε διεγείρει το ενδογενές μονοπάτι (**Εικόνα 4**). Επίσης, ένας άλλος ρόλος του συμπλόκου FADD-καισπάσης-8 είναι η αναστολή της νεκρόπτωσης μέσω πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Μεσω αυτής της δράσης της, θεωρείται σήμερα ότι η καισπάση-8 είναι ένα κυρίαρχο κεντρικό ελεγκτικό μόριο, που μπορεί να καθορίσει την ισορροπία ανάμεσα στη διάσωση ή τη θανάτωση του κυττάρου, μέσω ενεργοποίησης της απόπτωσης και καταστολής της νεκρόπτωσης. Αυτή η ιδιαίτερη καισπάση έχει, επίσης, βρεθεί ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) φλεγμονοσώματος και, επομένως, της πυρόπτωσης, μέσω του υποδοχέα TLR3 (Toll-like receptor 3). Έτσι, ο κεντρικός ρόλος της φαίνεται να καθορίζει την πλαστικότητα του κυττάρου και η διατήρηση ισορροπίας ανάμεσα στους διαφορετικούς φαινοτύπους κυτταρικού θανάτου (101). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η αναστολή της καισπάσης-8 οδήγησε στην καθοδηγούμενη από την RIPK1 υπερπαραγωγή της ιντερφερόνης τύπου I (type I IFN), διαταραχή της ομοιόστασης και ενίσχυση της ανεπιθύμητης φλεγμονής στις ιογενείς λοιμώξεις, ενώ οι συγγραφείς τονίζουν ότι η αναστολή της καισπάσης-8 θα μπορούσε να αποτελεί πολύ σημαντικό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση ποικίλων λοιμωδών και φλεγμονωδών καταστάσεων (102).

Ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι

Εν αντιθέσει, το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι είναι ανεξάρτητο από τη δράση των υποδοχέων απόπτωσης, και φαίνεται ότι καθοδηγείται από μιτοχονδριακά σήματα. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το μονοπάτι εκτυλίσσεται ως απάντηση σε ποικίλα στρεσογόνα κυτταρικά ερεθίσματα, που οδηγούν σε ανεπανόρθωτες βλάβες της μιτοχονδριακής μεμβράνης και ακολούθως στην απελευθέρωση συγκεκριμένων αποπτωτικών πρωτεϊνών, κυρίως του κυτοχρώματος C (Cyto C- πρωτεΐνη μεταφορέας ηλεκτρονίων) και του Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct Inhibitor of Apoptosis proteins -Binding protein with Low pI), από τον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο προς το κυτταρόπλασμα. Εν συνεχεία, το κυτόχρωμα C δεσμεύεται στην πρωτεΐνη Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), προκαλώντας την αλλαγή της διαμόρφωσής της και τον ολιγομερισμό της. Η δέσμευση της προκασπάσης-9 στα ολιγομερή της Apaf-1, διαμεσολαβούμενη από ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιοχών που καλούνται «περιοχές προσέλκυσης κασπασών», έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου (αποπτώσωμα), και τελικά την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και, εν συνεχεία, των προαναφερθέντων εκτελεστικών αποπτωτικών κασπασών (21,103). Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού οδηγεί στην απώλεια της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω της δράσης αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, όπως οι πρωτεΐνες Bax (Bcl-2--associated X protein) και Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), οι οποίες δρουν ενάντια στην αντιαποπτωτική Bcl-2 πρωτεΐνη (104). Παράλληλα, η ενεργοποίηση των Bax/Bak οδηγεί τα μιτοχόνδρια να απελευθερώσουν ένα δεύτερο μόριο, που ονομάζεται Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase), το οποίο προσδένεται και αναστέλλει τη δράση πολλαπλών πρωτεϊνικών αναστολέων της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis Proteins-IAPs), αποτρέποντας έτσι την ανασταλτική δράση τους έναντι της κασπάσης-9. Έτσι, επιτυγχάνεται η ανεμπόδιστη δράση της κασπάσης-9, ώστε να μπορέσει στη συνέχεια να προχωρήσει στην ενεργοποίηση των κύριων εκτελεστικών κασπασών -3, -6, -7 (105). Επικοινωνία μεταξύ του ενδογενούς και εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού επιτυγχάνεται μέσω της δράσης της πρωτεΐνης Bid (mitochondrial amplification loop), η οποία επάγει το μονοπάτι Bax και την απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια (106).

Εκτελεστικές κασπάσες

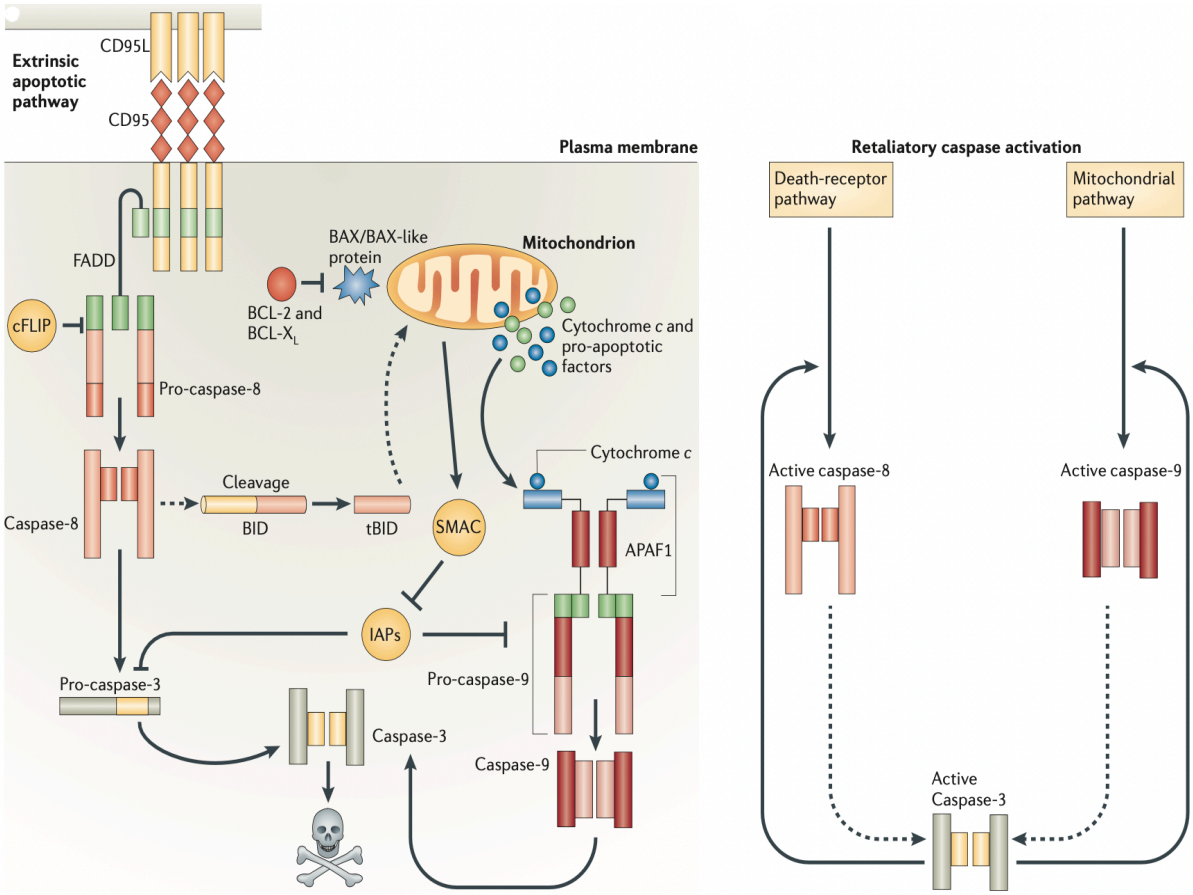
Η κασπάση-3 αποτελεί την κύρια εκτελεστική πρωτεάση εκ των υπολοίπων κασπασών, και καθοδηγεί την απόπτωση μέσω διάσπασης δομικών πρωτεϊνών, καταστροφής του πυρηνικού περιβλήματος και διάρρηξης γενομικού DNA. Χαμηλά επίπεδα κασπάσης 3 είναι απαραίτητα για την κρίσιμη αναπτυξιακή διαδικασία σε ένα πλήθος κυτταρικών σειρών, ενώ η παθολογική ενεργοποίησή της έχει ενοχοποιηθεί ως εμπλεκόμενη στην παθοφυσιολογία των νόσων Huntington, Parkinson και Alzheimer’s, όπως και της πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης (103). Σε ερευνητικό επίπεδο, η αναστολή συγκεκριμένων εκτελεστικών κασπασών και η διάσωση των λεμφοκυττάρων

από τις αποπτωτικές διεργασίες φαίνεται να συσχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης (107). Μέσω άλλων κυτταρικών διεργασιών, οι λοιμώξεις, η υποξία, η νηστεία, ή διάφορες χημικές ουσίες φαίνεται ότι οδηγούν σε παθολογική αναδίπλωση πρωτεϊνών, οδηγώντας έτσι στο επαγόμενο από στρες μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι, στην περίπτωση που οι μηχανισμοί του κυττάρου αποτύχουν να επαναφέρουν την παραγωγή φυσιολογικά αναδιπλούμενων πεπτιδίων ενεργοποιείται αυτομάτως η διαδικασία της απόπτωσης. Σημαντικό γεγονός, που καταδεικνύει την αλληλοεπικάλυψη όλων αυτών των πολύπλοκων μηχανισμών, είναι το ότι στην καταπολέμηση των λοιμώξεων, εκτός από τις ευρέως μελετημένες διαδικασίες της πυρόπτωσης, ενεργοποιείται το μονοπάτι perforin/granzyme που περιέχει μηχανισμούς απόπτωσης. Σε αυτή τη μορφή κυτταρικού θανάτου ένα ένζυμο που παραβιάζει την ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (perforin) και μια ομάδα πρωτεϊνών σερίνης (granzymes) απελευθερώνονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα NK-κύτταρα και επιτίθενται στα επιμολυσμένα κύτταρα. Η granzyme-B συγκεκριμένα ενεργοποιεί τις κασπάσες -9 και -3 και καθοδηγεί την παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου (67).

Αναστολή κασπασών από αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες

Η καταλυτική δράση των κασπασών -3 και -9 φαίνεται ότι αναστέλλεται άμεσα από την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin, γεγονός που αποδίδεται στην αλληλεπίδραση με άλλους αντιαποπτωτικούς αγωνιστές, όπως η πρωτεΐνη XIAP (X-linked IAP) (104). Σε αυτή την αλληλεπίδραση φαίνεται ότι αντιτίθεται η πρωτεΐνη Smac/Diablo, που αποτελεί έναν από τους κύριους ανταγωνιστές των survivin και XIAP.

Είναι πλέον γνωστό ότι τα λευκοκύτταρα είναι ο κύριος πληθυσμός του ανοσοποιητικού, που υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές προς την κατεύθυνση της απόπτωσης στη σήψη. Αν και η πρώιμη φλεγμονώδης ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού θεωρείται βασικό στοιχείο της απάντησης στη σήψη, η ανοσοπαράλυση που επισυμβαίνει στις διάφορες φάσεις (πρώιμες ή όψιμες) κατά την εξέλιξη της σηπτικής διαδικασίας, ίσως καθορίζει την έκβαση των σηπτικών ασθενών. Επίσης, όλο και περισσότερη βιβλιογραφία τονίζει ότι, εκτός από την ιστική νέκρωση, ο βαθμός ενεργοποίησης της απόπτωσης λευκοκυττάρων καθορίζει τη σοβαρότητα της συστηματικής απόκρισης στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Αυτός είναι και ο λόγος στοχοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διερεύνηση της απορρυθμισμένης αποπτωτικής κατεύθυνσης στη σήψη (108,109).



Εικόνα 4. Αποπτωτικά μονοπάτια μέσω της δράσης των κασπασών στη σήψη (Πηγή: Nature Reviews Immunology, Hotchkiss et al., 2006).

Κυτταρικοί πληθυσμοί και απόπτωση

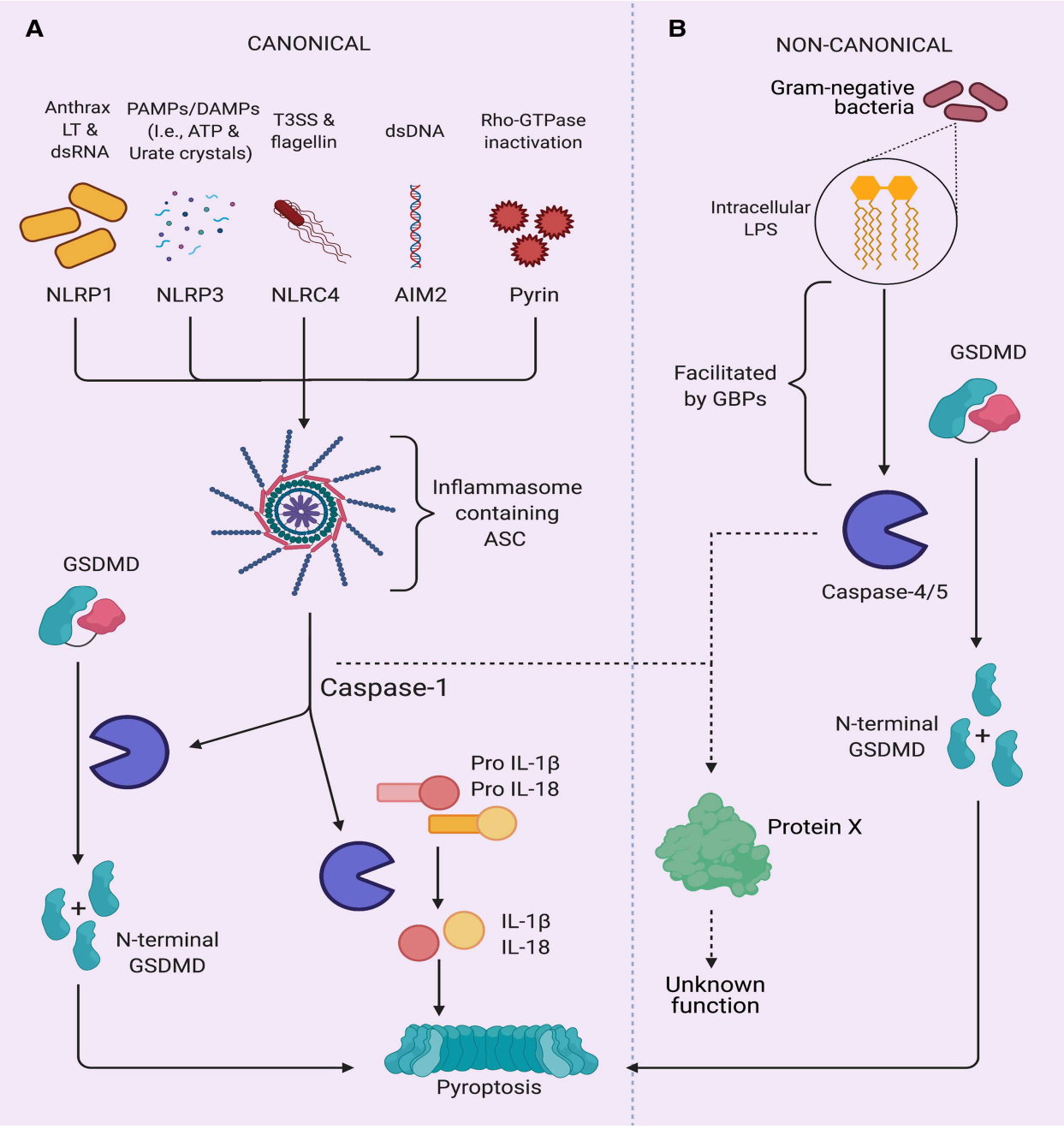
Η απόπτωση χαρακτηρίζεται μορφολογικά από την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, τη συρρίκνωση του κυττάρου, τη συμπύκνωση χρωματίνης και τον κατακερματισμό DNA. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά κύτταρα πριν από τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, ώστε να περιορίσουν έτσι τη φλεγμονώδη απάντηση από την εξωκυττάρια έκκριση κυτταρικού υλικού. Οι Hotchkiss et al έδειξαν για πρώτη φορά ότι και τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια (ενδογενές και εξωγενές) επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, κατέχοντας σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σήψης (110). Οι ανοσολογικοί πληθυσμοί που υφίστανται αποπτωτικές αλλαγές στη σήψη είναι κυρίως τα λεμφοκύτταρα, αλλά και σε μικρότερο βαθμό τα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, δενδριτικά και εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Η απόπτωση των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων φαίνεται ότι καταστέλλεται γρήγορα από διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα, και αυτό έχει συσχετιστεί με την αναστολή της δράσης των κασπασών -3 και -9 (111). Φαίνεται ότι η έγκαιρη και περιορισμένου βαθμού απόπτωση των ουδετεροφίλων είναι γεγονός καίριας σημασίας, καθώς στην περίπτωση ενίσχυσης της φαγοκυττάρωσής τους αυξάνεται ο κίνδυνος σοβαρής σήψης και πολυοργανικής ανεπάρκειας. Αυτό καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα, ο βαθμός σοβαρότητας της απόπτωσης των ουδετεροφίλων είναι αντιστρόφως

ανάλογος της σοβαρότητας της σήψης. Επίσης, η στενά ανάλογη σχέση του βαθμού απόπτωσης των λεμφοκυττάρων με τη σοβαρότητα της σήψης συνδέεται με την ενίσχυση της έκφρασης των πρωτεϊνών της ομάδας Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist) και Bax (Bcl-2-associated X protein). Εν αντιθέσει, άλλοι παρεγχυματικοί κυτταρικοί πληθυσμοί (εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονες, νεφροί, ήπαρ) δεν φαίνεται να υφίστανται αποπτωτικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των αρχικών σηπτικών διεργασιών. Έτσι, τα σύγχρονα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κυτταρική απόπτωση αυτών των παρεγχυματικών πληθυσμών στην περίπτωση πολυοργανικής ανεπάρκειας οφείλεται στην υποάρδευση των ιστών (ανοξική απόπτωση), ή είναι το αποτέλεσμα των κατασταλτικών δράσεων διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών και αποδιοργανωμένων μηχανισμών αυτοφαγίας (112–114).

➢ Φλεγμονώδεις και μη φλεγμονώδεις καστάσες

Βάσει των λειτουργικών τους ιδιοτήτων, οι καστάσες (**c**ysteine-dependent **asp**artate-specific prote**ases**) διαχωρίζονται σε δύο ξεχωριστές υποοικογένειες: τις καστάσες που είναι υπεύθυνες για την ωρίμανση κυτταροκινών (φλεγμονώδεις καστάσες -1, -4 και-5) και τις καστάσες που εμπλέκονται στις προγραμματισμένες αποπτωτικές κυτταρικές διαδικασίες (καστάσες -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, -12 και -14). Οι αποπτωτικές καστάσες υποδιαιρούνται επιπλέον στις ενεργοποιητικές (καστάσες -2/-9 στο ενδογενές και καστάσες -8/-10 στο εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι) και εκτελεστικές καστάσες (-3,-6,-7). Ξεχωριστές ιδιότητες περιγράφονται για τις καστάσες -2 (αποπτωτικές και φλεγμονώδεις ιδιότητες) και -14 (ωρίμανση κερατινοκυττάρων), ενώ η καστάση-12 είναι ανενεργή στον άνθρωπο (115,116).

Οι ανθρώπινες φλεγμονώδεις καστάσες (-1, -4, -5), με τις σημαντικές πρωτεολυτικές τους ιδιότητες, φαίνεται ότι αποτελούν κεντρικούς μεσολαβητές πυρόπτωσης από τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, ενώ δομικά ομοιάζουν με τις καστάσες -8 και -9, που δρουν ως ενεργοποιητές της απόπτωσης. Ωστόσο, η υπέρμετρη ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί με πολλαπλά αυτοφλεγμονώδη, αυτοάνοσα και μεταβολικά νοσήματα. Η καστάση-1 ενεργοποιείται από το λεγόμενο ¨κανονικό¨ φλεγμονόσωμα, που περιέχει ένα κεντρικό πολυπρωτεϊνικό ικρίωμα από ειδικούς μεσολαβητές αναγνώρισης, οργάνωσης και εκτέλεσης της πυρόπτωσης (NLRP1/ NLRP3/ NLRC4/ AIM2/ pyrin), οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών (**Εικόνα 5**). Χαρακτηριστική είναι η παθογένεση της HIV λοίμωξης, κατά την οποία η μεσολαβούμενη από την καστάση-1 πυρόπτωση οδηγεί στην εξάντληση των CD4 T-λεμφοκυττάρων (117). Αντίθετα, οι ανθρώπινες καστάσες-4/-5 φαίνεται ότι αποτελούν το ¨μη-κανονικό¨ φλεγμονόσωμα, με ιδιότητες άμεσης αναγνώρισης και εκτέλεσης της πυρόπτωσης, καθώς ενεργοποιούνται με απευθείας αναγνώριση του LPS και οδηγούν στην ενεργοποίηση της GSDMD ή του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν ότι για την αναγνώριση του LPS σημαντική είναι η επικουρική δράση των πρωτεϊνών GBPs (interferon-inducible guanylate binding proteins) (116,118).



Εικόνα 5. Κανονικό και μη κανονικό φλεγμονόσωμα κατά τις διαδικασίες της πυρόπτωσης (Πηγή: Biochemical Society Transactions, Bateman et al., 2021).

Επίσης, η διαμεσολαβούμενη από την κασπάση-1 διαδικασία της πυρόπτωσης ενεργοποιείται σχεδόν αποκλειστικά σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, ενώ αντίθετα οι κασπάσες -4/5 ενεργοποιούνται σε μυελοειδή ή σε μη μυελοειδή κύτταρα (κερατινοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά ή διάφορα επιθηλιακά κύτταρα), ακόμα και από εναλλακτικούς DAMPs (μόρια ελεύθερης αίμης σε καταστάσεις αιμόλυσης, ή διάφορα λιπίδια). Εν συντομία, η μεγάλη αξία του ¨μη κανονικού¨ φλεγμονοσώματος διαφαίνεται από το ότι συνεισφέρει στην ενεργοποίηση της σηπτικής κατάστασης όταν η αρχική ανοσιακή απάντηση δεν καταφέρνει να εξουδετερώσει

αποτελεσματικά τον λοιμογόνο παράγοντα. Έτσι, πιστεύεται σήμερα ότι αποτελεί σημαντικό προστατευτικό μηχανισμό στην άμυνα έναντι των Gram (-) βακτηρίων, ενώ, όπως αναμένεται, η υπερβολική ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί με διάφορα πνευμονικά (ARDS, άσθμα) ή νευροεκφυλιστικά (πολλαπλή σκλήρυνση, Parkinson) νοσήματα (119–121).

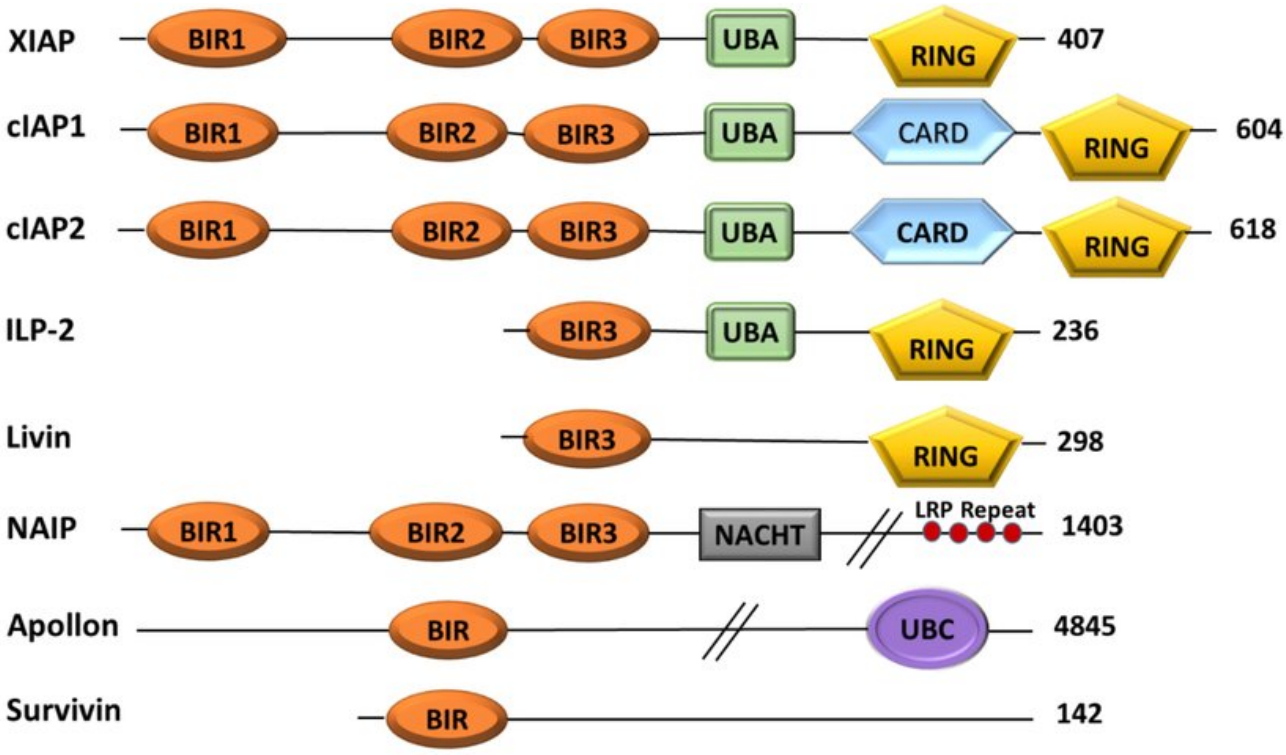
Παρά το ότι παραδοσιακά η αποπτωτική δράση των κασπασών πιστεύεται ότι ελέγχεται από συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitor of Apoptosis proteins/ IAPs, με κύριο εκπρόσωπο την πρωτεΐνη survivin), φαίνεται ότι διάφοροι άλλοι, μη καλά χαρακτηρισμένοι ενδογενείς αναστολείς των φλεγμονωδών κασπασών, όπως η SerpinB1, ή οι πρωτεΐνες CARD-only (COPs) και PYD-only (POPs), δρουν έμμεσα μέσω ελέγχου του σχηματισμού φλεγμονοσώματος (122,123). Η διατήρηση κυτταρικής ομοιόστασης προϋποθέτει μία πολύ ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στη δράση αποπτωτικών (κασπάσες, κυτόχρωμα c, Bax/Bak, Smac/Diablo) και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-2, survivin, XIAP) (124).

Αντιαποπτωτικά μονοπάτια στη σήψη

➢ Αναστολείς της Απόπτωσης

Η οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (Inhibitors of apoptosis-IAPs) αποτελεί ένα σύνολο πρωτεϊνικών μορίων με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Οι πρωτεΐνες IAPs ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε ιούς της ομάδας baculoviruses, όπου μπορούσαν να αναστέλλουν την αμυντική αποπτωτική απόκριση του ξενιστή ενάντια στα επιμολυσμένα κύτταρα, επιτρέποντας τον ιικό πολλαπλασιασμό. Στην πορεία, πολλαπλά κυτταρικά ομόλογα IAP ανακαλύφθηκαν σε ποικίλους οργανισμούς, όπως τα σπονδυλωτά, τα έντομα, ή οι μύκητες. Η συγκεκριμένη οικογένεια απαρτίζεται από 8 δομικά ξεχωριστά, αλλά λειτουργικά συνδεδεμένα πρωτεϊνικά μόρια. Όλα τα μέλη της περιλαμβάνουν ένα έως τρία αντίγραφα μιας στερεοτυπικά σταθερής αναδίπλωσης μέσω δακτυλίου ψευδαργύρου, ή αλλιώς τη χαρακτηριστική επανάληψη της πρωτεϊνικής αλληλουχίας Baculovirus IAP repeat (BIR domain), στην οποία οφείλεται η αντιαποπτωτική τους δράση και η δυνατότητα αναστολής της ενεργοποίησης των κασπασών. Αντιπροσωπευτικοί IAPs αποτελούν οι πρωτεΐνες XIAP (X-linked IAP), cIAPs (cellular IAP), NIAP (neuronal IAP), BRUCE (BIR-ubiquitin conjugating enzyme), καθώς και οι μικρότερες πρωτεΐνες Survivin και Livin (**Εικόνα 6**). Με τη σειρά της, η δράση των IAPs χρειάζεται στενά όρια ελέγχου, καθώς χωρίς ανασταλτικά σήματα οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες θα οδηγούσαν σε ανεξέλεγκτη, δυσλειτουργική παράταση του κυτταρικού κύκλου ζωής. Δεν είναι άλλωστε τυχαίο ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα αποκτούν ενισχυμένους μηχανισμούς επιβίωσης, αύξησης και μεταστατικής ικανότητας, βασιζόμενα στα αυξημένα επίπεδα έκφρασης IAPs, που τους προσδίδουν αντοχή σε διάφορα αντινεοπλασματικά θεραπευτικά σκευάσματα (125). Επομένως, οι σύγχρονες ερευνητικές δοκιμές στοχεύουν, με μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, στην αναστολή αυτών

των δυνητικά ογκογενετικών πρωτεϊνών, σε μια προσπάθεια να επανευαισθητοποιηθούν τα καρκινικά κύτταρα στα αποπτωτικά σήματα των χημειοθεραπευτικών σχημάτων (106,126).

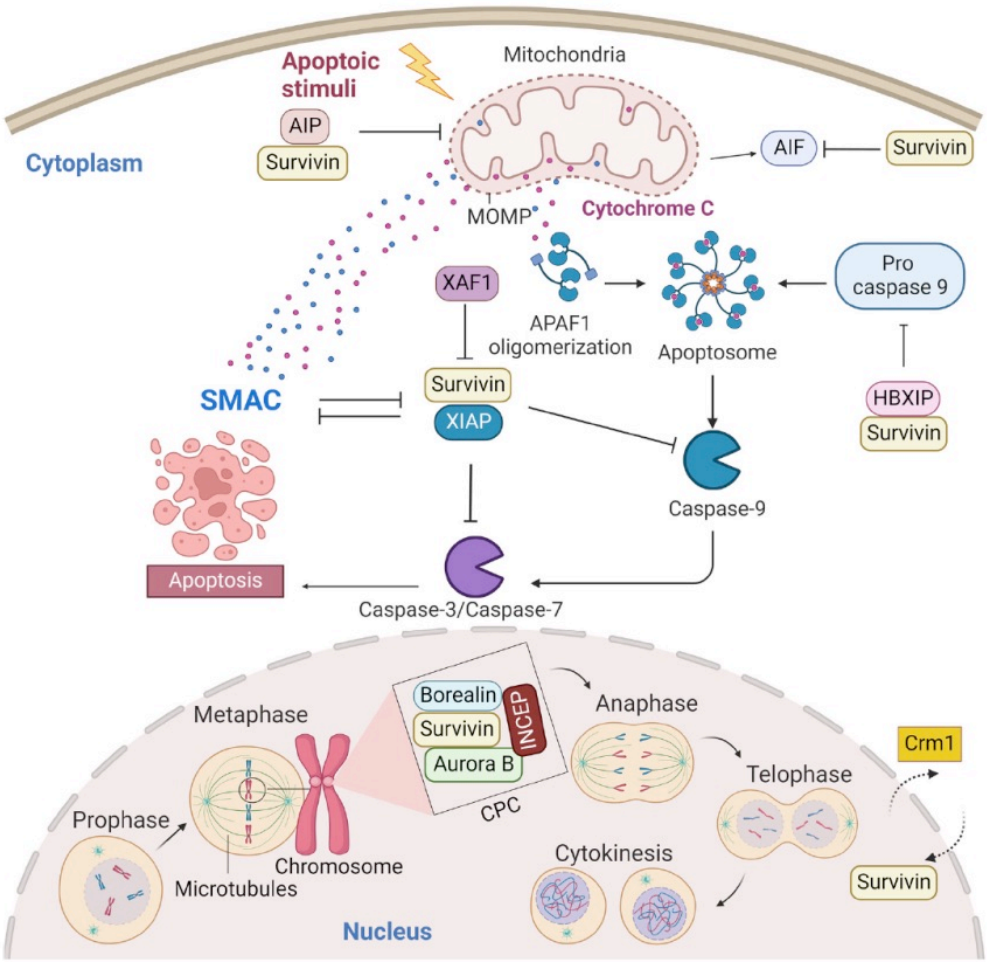


Εικόνα 6. Η οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (IAPs), στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη survivin (Πηγή: Hanifeh M. et al., Apoptosis, 2022).

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι περισσότερες IAPs αναστέλλονται από την πρόσδεση του μορίου Smac/Diablo στις περιοχές BIR, και τελικά οδηγούνται στην αποδόμησή τους από το πρωτεάσωμα. Ξεχωριστά μόρια ανάμεσα στις IAPs είναι οι πρωτεΐνες survivin, livin και BRUCE, με δομική ιδιαιτερότητα οφειλόμενη στην μοναδική BIR περιοχή που περιέχουν, γεγονός που τις καθιστά λιγότερο ευάλωτες στη δράση των Smac αναστολέων. Επίσης, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη survivin ενισχύει την αντιαποπτωτική της αποτελεσματικότητα της δρώντας συνεργικά και δημιουργώντας ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη XIAP (106). Ποικίλα άλλα αντιαποπτωτικά σήματα διαμεσολαβούνται και μέσω της δράσης άλλων βιομορίων, όπως η πρωτεΐνη Akt και ο NF-κB, τα οποία επάγουν την μεταγραφική δραστηριότητα των αντιαποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας Bcl-2 ή των IAPs (99).

➢ Σημαντικότερες IAPs (Survivin, XIAP)

Ιδιαίτερη έμφαση έχει αποδοθεί τελευταία σε έναν σημαντικό εκπρόσωπο των IAPs, την πρωτεΐνη survivin, μια πρωτεΐνη με σημαντικές και σύνθετες ρυθμιστικές δράσεις στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Αντιαποπτωτική δράση της survivin, μέσω πρόσδεσης στην XIAP και αναστολής της κασπάσης-9 και της πρωτεΐνης Smac. Έλεγχος της μιτωτικής διαδικασίας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την πρωτεΐνη survivin, η οποία συνδεόμενη με τις πρωτεΐνες borealin, AuroraB και INCENP, δημιουργεί το σύμπλοκο CPC (chromosomal passenger complex), που είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική μιτωτική διαδικασία. Η survivin οδηγεί το CPC στα κεντρομερίδια κατά την προμετάφαση, αναγνωρίζοντας την ιστόνη -3 στην κεντρομεριδιακή χρωματίνη, εξασφαλίζοντας τη σωστή ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, πριν τον διαχωρισμό τους κατά την ανάφαση (Πηγή: Molecules 2023, Albadari N. et al., 28, 1376).

Η πρωτεΐνη survivin, ο μικρότερος εκπρόσωπος των IAPs (μοριακό βάρος 16.4 KDa, 142 αμινοξέα), περιέχει μια σηματοδοτική BIR περιοχή (αμινοξέα 18-88) στο αμινοτελικό Ν- άκρο, ακολουθούμενο από μία συνδετική περιοχή (αμινοξέα 89-102) και μία εκτεταμένη α- έλικα στο καρβοξυτελικό C-άκρο της. Η περιοχή BIR σταθεροποιείται από έναν δακτύλιο ψευδαργύρου, αποτελούμενου από 4 αμινοξέα (Cys57, Cys60, His77 και Cys84). Η survivin είναι το αποτέλεσμα έκφρασης του γονιδίου BIRC5, το οποίο με εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να παράξει διαφορετικά pre-mRNA για τις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης (ΔEx3, 2B, 3B, 2α) (127), οι λειτουργίες των οποίων αναλύονται παρακάτω. Η survivin αποτελείται από ένα και μοναδικό αντίγραφο της πρωτεϊνικής περιοχής BIR, το οποίο χρησιμεύει για τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης και τις αλληλεπιδράσεις με ρυθμιστικές πρωτεΐνες χρωματίνης. Εκτός από τη μονομερή της μορφή, αυτή η ιδιαίτερη πρωτεΐνη μπορεί να υπάρχει στον οργανισμό και ως ομοδιμερές μόριο, που σχηματίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων οφειλόμενων στη συνδετική και αμινοτελική της περιοχή. Αποτελεί ένα πολυλειτουργικό μόριο, με σημαντική δράση τόσο για τις διαδικασίες μίτωσης, όσο και για τις διαδικασίες αναστολής της απόπτωσης. Τα τελευταία χρόνια η πρωτεΐνη survivin έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς θεωρείται ότι αποτελεί έναν σημαντικό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία των νεοπλασματικών και μεταστατικών νοσημάτων, λόγω της ιδιότητάς της να εκφράζεται κυρίως στους ταχέως πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς και σχεδόν καθόλου στα διαφοροποιημένα φυσιολογικά κύτταρα (128).

Η σημαντικότητα της πρωτεΐνης survivin τονίζεται από την αναγκαιότητά της για την φυσιολογική μίτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ έμβρυα με ομοζυγωτικές μεταλλάξεις αυτής της πρωτεΐνης δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια της κύησης. Η πρωτεΐνη survivin εκφράζεται συνεχώς σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενους πληθυσμούς, όπως οι πρόδρομες μορφές αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ φαίνεται ότι σε ώριμα κύτταρα της φυσικής ή της επίκτητης ανοσίας εκφράζεται μόνο μετά από ειδικά σήματα ενεργοποίησής της. Η survivin ενισχύει την έκφραση συνδιεγερτικών βιομορίων και των μορίων του συστήματος ιστοσυμβατότητας MHC τάξης ΙΙ στα δενδριτικά κύτταρα και επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής των μακροφάγων, ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων, ενώ καταστέλλει τη δράση των NK κυττάρων. Επίσης, εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων, στη διατήρηση των μνημονικών CD4 και CD8 λεμφοκυττάρων, όπως και στην παραγωγή αντισωμάτων. Βάσει των ανωτέρω, γίνεται προφανής η σημασία της δράσης της κατά την ανάπτυξη διαφόρων αυτοφλεγμονωδών διεργασιών (129).

Το αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα της survivin πιθανώς να σχετίζεται με την αναστολή της δράσης διαφόρων αποπτωτικών βιομορίων (FAS ligand, p53, κασπάσες 3,-7,-8, 9), εκ των οποίων, το μονοπάτι αναστολής των κασπασών μελετάται ευρέως στη βιβλιογραφία για τη θεραπεία νεοπλασματικών ή φλεγμονωδών νοσημάτων (130). Το δεύτερο μοντέλο δράσης της survivin βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασής της με την πρωτείνη XIAP, αυξάνοντας τη σταθερότητά της και την αποτελεσματική αναστολή των κασπασών. Ο τρίτος και λιγότερο καλά μελετημένος μηχανισμός δράσης σχετίζεται με το ότι η survivin είναι αρνητικός ρυθμιστής και ανεξάρτητων από κασπάσες αποπτωτικών μονοπατιών, μέσω αναστολής της ενδοπυρηνικής μετακίνησης του παράγοντα AIF (apoptosis-inducing factor) και τον θρυμματισμό DNA (124). Είναι πλέον ξεκάθαρη η πολυπαραγοντική δράση της στον έλεγχο της απόπτωσης, της μίτωσης, αλλά και των πολύπλοκων

αυτοφαγικών κυτταρικών διεργασιών. Φαίνεται ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η survivin είναι παρούσα στα κύτταρα ως διμερές (wild-type survivin), αλλά η μεταλλαγμένη μονομερής της μορφή μάλλον κατέχει πιο αποτελεσματική αντιαποπτωτική δράση, με πιο ισχυρή δυνατότητα πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες XIAP και Smac/Diablo (131). Παρά το γεγονός ότι η δράση των περισσότερων IAPs είναι κυρίως στο κυτταρόπλασμα, η survivin έχει βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, σε εξωσώματα, στην κυτταρική μεμβράνη ή στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ωστόσο, η κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή της εντόπιση φαίνεται να της δίνει τις κύριες αντιαποπτωτικές της ιδιότητες. Αντίθετα, η πυρηνική της εντόπιση φαίνεται να την καθιστά προ-αποπτωτική και να προδιαθέτει σε αντίσταση των νεοπλασματικών κυττάρων στη συμβατική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, αν και αυτό το γεγονός πιθανώς διαφοροποιείται ανάλογα με τη νεοπλασία. Επίσης, φαίνεται ότι κατά την πρόσδεσή της με την XIAP, μέσω της BIR περιοχής, δημιουργείται ένα σταθερό σύμπλοκο ικανό να καταστείλει την κασπάση-9 και να απενεργοποιήσει την απόπτωση in vivo. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί να αδρανοποιείται μέσω της δράσης του παράγοντα XAF1 (XIAP-associated factor 1), ώστε να ενισχύεται η απόπτωση. Επίσης, το σύμπλοκο αυτό αναστέλλει τη δράση του Smac, μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, μετά από διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Έτσι, η survivin προστατεύει το κύτταρο από τη μιτοχονδριακά ελεγχόμενη απόπτωση, μέσω αδρανοποίησης των ανασταλτικών σημάτων της Smac έναντι άλλων IAPs. Εκτός από την αναστολή κασπασών, έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη survivin μπορεί να αναστείλει τις ανεξάρτητες από κασπάσες αποπτωτικές διαδικασίες, μέσω αναστολής της δράσης του κύριου διαμεσολαβητή σε αυτή την περίπτωση, δηλαδή του παράγοντα AIF (apoptosis- inducing factor) (128).

Η γονιδιακή υπερέκφραση της survivin ενεργοποιείται κατεξοχήν σε νεοπλασματικά κύτταρα, όπου συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση και αντίσταση στη θεραπεία (132,133), ενώ ελάχιστοι ενεργά αναπτυσσόμενοι υγιείς ιστοί ενηλίκων ενεργοποιούν τη δράση αυτής της πρωτεΐνης, με κυρίαρχους τους κυτταρικούς πληθυσμούς υγιούς δέρματος (κερατινοκύτταρα, μελανινοκύτταρα, ινοβλάστες) (99). Όσον αφορά τις νεοπλασίες, πολλαπλές σύγχρονες μελέτες εστιάζουν στην απενεργοποίηση της δράσης της πρωτεΐνης survivin χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους θεραπευτικούς παράγοντες (134). Επιπρόσθετα, με δεδομένο ότι η survivin είναι πολύτιμη στη ρύθμιση της απόπτωσης και της διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, όλο και περισσότερες ενδείξεις τονίζουν τη σημασία της στην ανάπτυξη αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων. Βλάβες στον αποπτωτικό μηχανισμό πιθανώς οδηγούν σε αυξημένη επιβίωση λεμφοκυττάρων και στην ανάπτυξη αυτοανοσίας (αυξημένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων) (135,136). Από μια άλλη οπτική στα λοιμώδη νοσήματα, διάφορες μελέτες προτείνουν ότι κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων, η απόπτωση επάγεται μέσω ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού και των κασπασών -3 και -9, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin φαίνεται να αυξάνονται ή να καταστέλλονται ανάλογα με το είδος του ιού που έχει απομονωθεί (137). Επιπλέον, η υπερέκφραση της survivin φαίνεται να αναστέλλει τον ιικό πολλαπλασιασμό (105). Αντίθετα, σε μια μελέτη σε ασθενείς με σοβαρή πνευμονία της κοινότητας, η κατεσταλμένη δράση της πρωτεΐνης survivin συνδέθηκε με αυξημένο κίνδυνο για ανάγκη μηχανικού αερισμού, χρήσης αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων, εισαγωγή στη ΜΕΘ, μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας ή ακόμα και δυσμενή πρόγνωση

(138). Από όλα όσα έχουν ήδη αναφερθεί, φαίνεται ότι η ισορροπία αποπτωτικών/αντιαποπτωτικών μηχανισμών θα μπορούσε να είναι σημαντικά επηρεασμένη στις περιπτώσεις σήψης, συγκριτικά με τις περιπτώσεις ιογενών λοιμώξεων ή στην μετατραυματική φλεγμονή (SIRS), ενώ οι ερευνητές υποθέτουν ότι η αναστολή των αποπτωτικών μονοπατιών, που έχουν ενεργοποιηθεί υπέρ της ανάπτυξης σηπτικής καταπληξίας θα μπορούσαν να προλαμβάνουν την πολυοργανική ανεπάρκεια και να αποτρέπουν την καταστολή της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης (21).

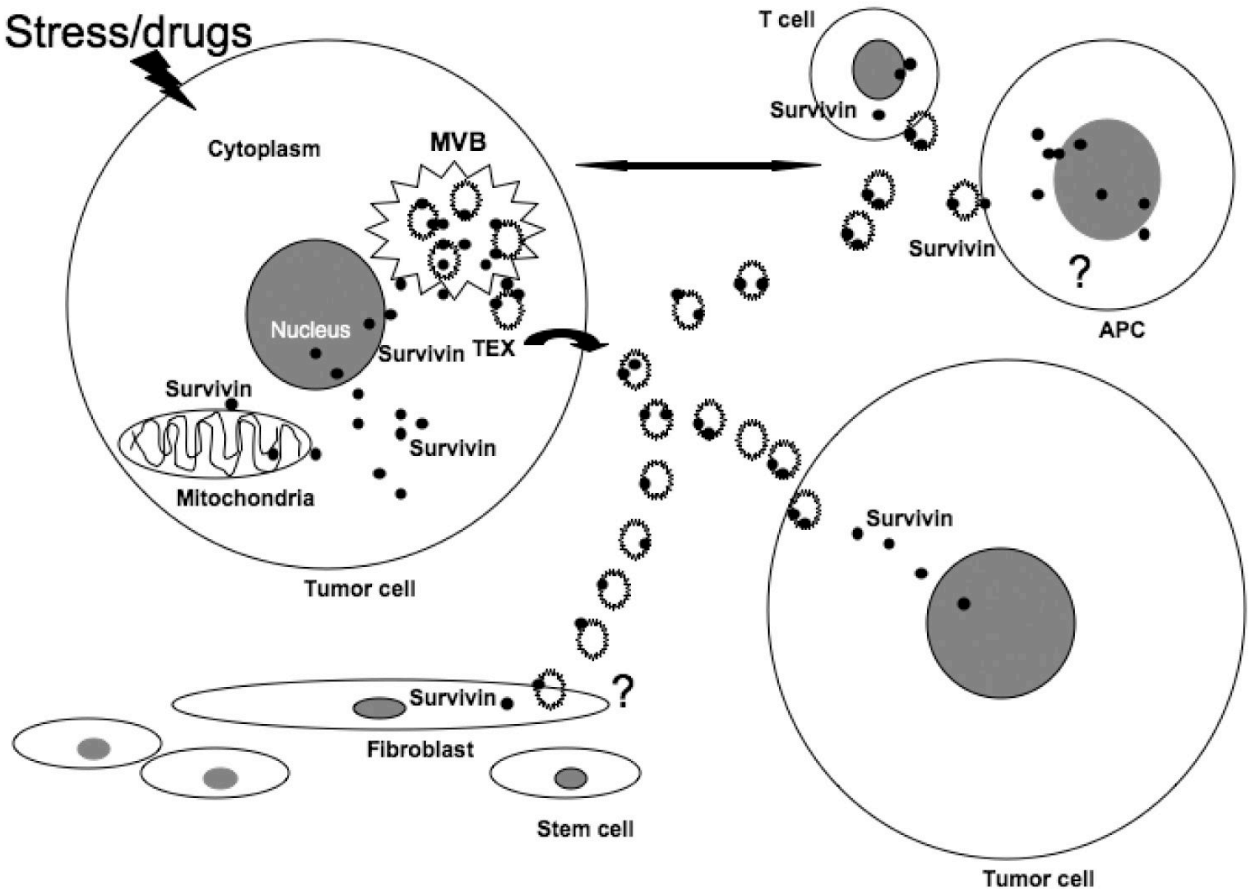
Άλλη μια ενδιαφέρουσα μελέτη συνέδεσε τη σημασία της ακέραιης λειτουργικότητας της πρωτεΐνης survivin στην ενίσχυση της νευρογένεσης μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση, επιβεβαιώνοντας ότι η αναστολή της δράσης της επιδείνωσε τη μνημονική ικανότητα μετά τον τραυματισμό, ενώ οι νευροπροστατευτικές της δράσεις έχουν υποστηριχθεί σε πολλαπλές ερευνητικές εργασίες (139,140). Αντίθετα, τα επίπεδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών survivin, Bcl-xL και του αντιαποπτωτικού διμερούς Bcl-xl/Bak, ανευρέθηκαν σημαντικά μειωμένα σε περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με διπολική διαταραχή (141). Τέλος, νέα πειραματικά δεδομένα, αναδεικνύουν τη δράση της survivin στη μείωση του οξειδωτικού στρες, στον έλεγχο της απόπτωσης και της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, περιορίζοντας την καρδιακή δυσλειτουργία κατά τη σήψη (142).

Εξίσου σημαντικός αντιαποπτωτικός παράγοντας είναι πρωτεΐνη XIAP, η οποία περιέχει 3 BIR περιοχές (BIR1, BIR2, BIR3) και την ονομαζόμενη τελική περιοχή RING (Really Interesting New Gene). Η περιοχή BIR2 είναι υπεύθυνη για την αναστολή των εκτελεστικών κασπασών (-3, -7), ενώ η BIR3 για την αναστολή της κασπάσης-9. Επίσης, η τελική RING περιοχή είναι ικανή για αλληλεπίδραση με άλλες IAPs. Χαρακτηριστικό είναι ότι η πρωτείνη Smac δημιουργεί σύμπλοκο με την XIAP και την απενεργοποιεί, αφήνοντας έτσι ανεμπόδιστη τη δράση των κασπασών και της απόπτωσης. Η αντιαποπτωτική δράση της survivin αποδίδεται, επίσης, στην άμεση συναγωνιστική της δράση με την πρωτεΐνη XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), αλλά και στην έμμεση ανταγωνιστική της δράση έναντι της πρωτεΐνης Smac (143). Η XIAP θεωρείται σήμερα σημαντικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας, μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης της πρωτεΐνης Beclin 1 και επαγωγής σημάτων από τον NF-κB (131).

➢ Ισομορφές της πρωτεΐνης survivin

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη survivin είναι μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 16.5kDa, που περιέχει 142 αμινοξέα. Δομικά, η survivin προσομοιάζει με τις πρωτεΐνες, που περιέχουν την περιοχή BIR, των μυκήτων και του νηματώδους σκώληκα Caenorhabditis Elegans (128). Η βιολογική πολυπλοκότητα της πρωτεΐνης survivin, αναδύεται από την πρόσφατη βιβλιογραφία που αποκαλύπτει τις διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, που καλείται να επιτελέσει και που εξαρτώνται από τη θέση της σε κυτταρικό επίπεδο. Έτσι, η εντόπισή της σε πυρηνικό επίπεδο συνδέεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ σε μιτοχονδριακό επίπεδο προωθείται η αναστολή της απόπτωσης και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αντίθετα, κατά την

κυτταροπλασματική της εντόπιση η survivin χάνει τις κυτταροπροστατευτικές της ιδιότητες, με αποτέλεσμα να επάγονται αποπτωτικά σήματα, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και της αποπτωτικής πρωτεΐνης Smac/Diablo. Τέλος, φαίνεται ότι η εξωκυττάρια δεξαμενή της survivin κρατάει τις αντιαποπτωτικές και υπερπλαστικές της ιδιότητες, μέσω απελευθέρωσης εξωσωμάτων από στρεσογόνα ερεθίσματα, (99,144) (**Εικόνα 8**).

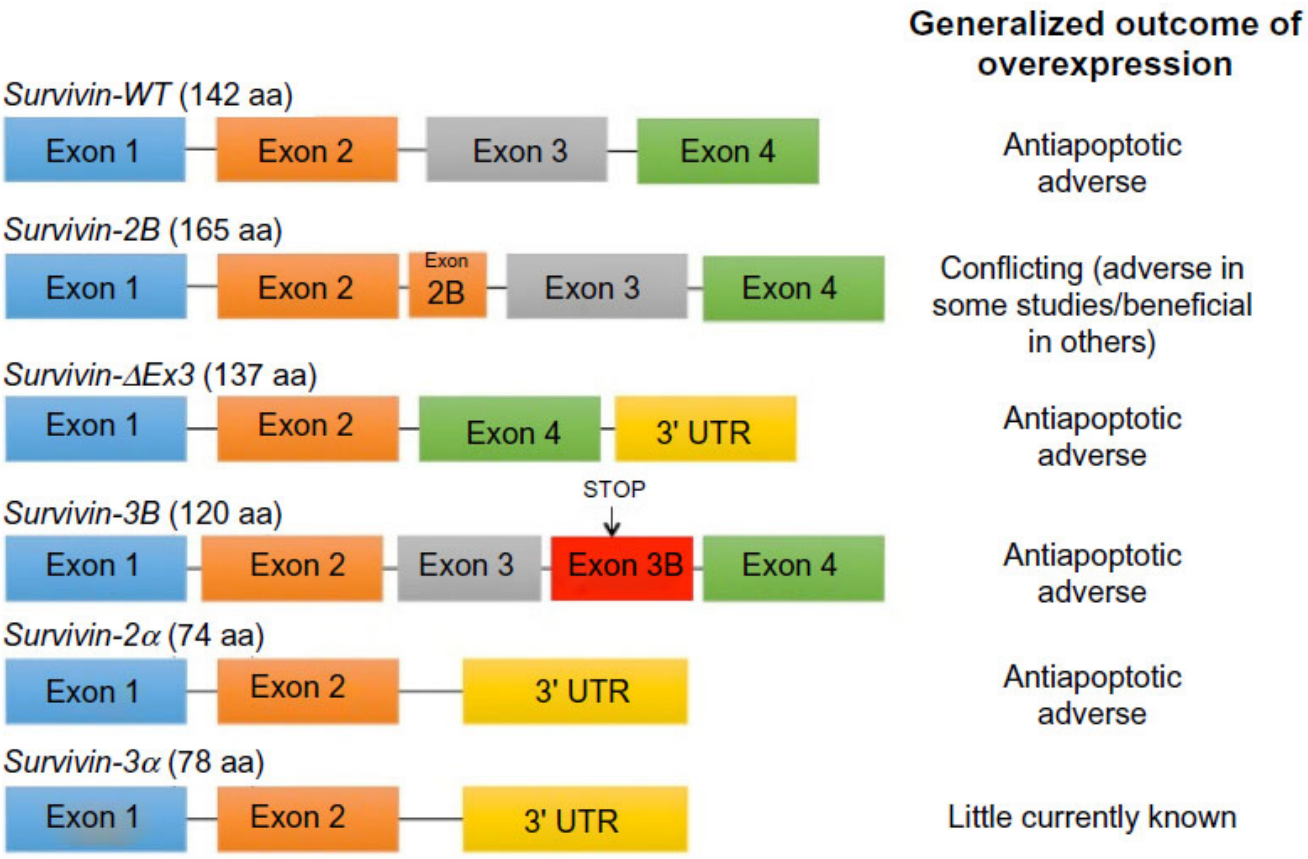


Εικόνα 8. Το δίκτυο δράσης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin (Πηγή: Khan S. et al., Histol. Histopathol., 2015).

Το γονίδιο (BIRC5) της πρωτεΐνης survivin βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q25 και αποτελείται από 4 εξώνια και 3 εσώνια, με 14.796 νουκλεοτίδια. Το γονίδιο και η παραγωγή mRNA για την πρωτεΐνη survivin, μπορεί με εναλλακτικό μάτισμα (splicing) να κωδικοποιήσει την wild type (WT- πλήρες μετάγραφο) ισομορφή της πρωτεΐνης και πέντε επιπλέον ισομορφές (-ΔEx3, -2B, -3B, -2A και -3A), οι οποίες φαίνεται ότι παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση και κυτταρική εντόπιση (145) (**Εικόνα 9**). Η ΔEx3 (ισομορφή χωρίς το εξώνιο-3), εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, παρουσιάζοντας αντιαποπτωτικές ιδιότητες, αντίθετα με την ισομορφή 2B (μετάγραφο στο οποίο διατηρείται τμήμα του ιντρονίου 2) και την 3B (περιέχει ένα νέο εξώνιο 3B που προκύπτει από τμήμα του ιντρονίου 3), οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες των οποίων είναι σημαντικά περιορισμένες. Ειδικότερα, το

μετάγραφο 2B ανευρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και χαρακτηρίζεται κυρίως για τη δράση της ως αποπτωτικό μόριο, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ισομορφές της πρωτεΐνης (146–148). Οι υπόλοιπες ισομορφές είναι ατελώς χαρακτηρισμένες έως του παρόντος (100). Η διερεύνηση αυτών των πολύπλοκων διεργασιών επιχειρείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στους νεοπλασματικούς ασθενείς. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η μορφή -WT αποτελεί το κυρίαρχο μετάγραφο της πρωτεΐνης survivin, με τη -2B να ακολουθεί και τη -ΔEx3 να αποτελεί τη λιγότερο παραγώγιμη μορφή της πρωτεΐνης (149). Από πολλαπλές μελέτες σε διαφορετικά είδη νεοπλασιών, φαίνεται ότι η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης survivin ποικίλλει ανάλογα με την έκφραση των διαφορετικών ισομορφών και την εντόπισή τους σε πυρήνα, κυτταρόπλασμα ή εξωκυτταρίως με τη μορφή εξωσωμάτων (exosomes), ενώ τα επίπεδα των προ και αντιαποπτωτικών ισομορφών της, συσχετίζονται με την πρόγνωση της κακοήθειας. Έτσι, η ενδοπυρηνική εντόπιση ρυθμίζει πιθανότατα τη μιτωτική τάση, η εντόπιση σε επίπεδο μιτοχονδρίων καθορίζει την αντιαποπτωτική της ικανότητα, ενώ η ανεύρεση σε εξωσώματα, σχετίζεται με την αντίσταση στη χημειοθεραπεία (150).

Δεν υπάρχουν επί του παρόντος μελέτες που να καταδεικνύουν τη σημασία της ισορροπίας μεταξύ αποπτωτικών (κασπάσες) και αντιαποπτωτικών (survivin) παραγόντων, αλλά και της σημασίας της έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών της survivin, στην έκβαση των ασθενών με σήψη σε ενήλικες ή παιδιατρικούς ασθενείς. Ωστόσο, σε μια πρόσφατη εργασία, η έκθεση σε LPS και η ανάπτυξη σηπτικής οξείας πνευμονικής βλάβης (acute lung injury- ALI) μέσω αποπτωτικών διεργασιών, φάνηκε να περιορίζεται μετά από χορήγηση ειδικών φαρμακευτικών ουσιών (πχ. στατίνες), οι οποίες ενίσχυσαν την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin (151).



Εικόνα 9. Η κύρια μορφή (WT) και οι κύριες ισομορφές της πρωτεΐνης survivin (Πηγή; Khan S. et al., Biologics: Targets & Therapy, 2015).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Η ερευνητική επικέντρωση της παρούσας μελέτης είναι στην ανάδειξη συγκεκριμένων παθοφυσιολογικών διαφορών σε ασθενείς με σήψη (Σ), σε αντιδιαστολή με δύο ομάδες ελέγχου: α) βαρέως πάσχοντες ασθενείς από μη λοιμώδεις -τραυματικής αιτιολογίας (Τ) καταστάσεις, και β) υγιείς μάρτυρες (Υ).

Κύριος σκοπός της έρευνας είναι να εξετάσει την ενεργοποίηση και δράση καθοριστικών αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών βιομορίων και εάν η αυξημένη έκφρασή τους συνδέεται με τη σήψη ή τη θνητότητα βαρέως πασχόντων ασθενών. Συγκεκριμένα, προσεγγίστηκε η ενεργοποίηση κεντρικών αποπτωτικών πρωτεϊνικών βιοδεικτών (κασπάσες, Bax, Smac/Diablo), αλλά και η ρυθμιστική δράση που μπορεί να κατέχουν σημαντικά αντιαποπτωτικά πρωτεϊνικά μόρια κατά τη σηπτική διαδικασία (πρωτεΐνες XIAP και survivin).

Δευτερεύοντες στόχοι της έρευνας είναι

α) Να προσδιορίσει τη γονιδιακή ενεργοποίηση της σημαντικής αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin, με ποσοτικοποίηση της έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών της στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς.

β) Να διερευνήσει τη συσχέτισή της αποπτωτικής και αντιαποπτωτικής διέγερσης στη σήψη με την οξειδωτική και αντιοξειδωτική ενεργοποίηση στην οξεία φάση του stress .

Η όλη μελέτη θα μπορούσε να συμβάλει στην ενίσχυση της παθοβιολογικής βάσης, ως προς την κατανόηση και αποκρυπτογράφηση των μονοπατιών της σήψης, αλλά και να αποτελέσει εφαλτήριο για καινούριους θεραπευτικούς στόχους.

Μεθοδολογία

Σχεδιασμός Μελέτης

Ο μεθοδολογικός σχεδιασμός της μελέτης στηρίχθηκε στις εθνικές και διεθνείς επιστημονικές οδηγίες, σύμφωνα με τις συστάσεις των τοπικών αρμόδιων ελεγκτικών επιτροπών (Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου- Αρ. Πρωτοκ. 9452/26.06.2016, και από την Επιτροπή Βιοηθικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης- Αρ. Πρωτοκ. 114/11.05.2020). Η συλλογή των δεδομένων διήρκεσε 5 έτη (2017-2022). Ενυπόγραφη φόρμα ενημέρωσης και συγκατάθεσης ελήφθη από τους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών της μελέτης. Η συλλογή ιατρικών και κλινικών δεδομένων έγινε από τους ιατρικούς φακέλους και ήταν ανώνυμη, αλλά καταγράφηκε ο μοναδικός για κάθε ασθενή αριθμός μητρώου για λόγους αντιστοίχισης.

Δείγμα της μελέτης

Στην παρούσα προοπτική μελέτη στρατολογήθηκαν 4 τμήματα Μονάδων Εντατικής Θεραπείας Ενηλίκων και Παίδων και περιλήφθηκαν ενήλικοι και παιδιατρικοί ασθενείς με πρώιμη σήψη/σηπτική καταπληξία ή με μη λοιμώδους αιτιολογίας βαριά νόσο, εντός 24 ωρών από την εισαγωγή τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παίδων. Η ομάδα της σήψης/σηπτικής καταπληξίας συμπεριέλαβε τους ασθενείς με ταυτοποιημένη πηγή λοίμωξης και τιμή του Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score >2, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Sepsis-3 για ενήλικες και τους αντίστοιχους ορισμούς, που έχουν πλέον προσαρμοστεί και για τα παιδιά, ενώ η ανάγκη για αγγειοσυσπαστική υποστήριξη για τη διατήρηση μέσης αρτηριακής πίεσης >65mmHg και τα επίπεδα γαλακτικού >2mmol/L χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ασθενών με σηπτική καταπληξία. Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν σε δείγματα ασθενών με σήψη, συγκριτικά με δείγματα ασθενών με μη λοιμώδους αιτιολογίας βαριά νόσο και δείγματα υγιών μαρτύρων (control group).

Κλινικά χαρακτηριστικά

Βάσει μεθοδολογίας, αποκλείστηκαν ασθενείς με χρόνια νοσήματα, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, κακοήθειες, ανοσοανεπάρκειες και όσοι ελάμβαναν χρόνια ανοσοκατασταλτική θεραπεία (εξαιρείται η υδροκορτιζόνη σε δόση στρες), μεταβολικά νοσήματα και ενδοκρινοπάθειες. Σύμφωνα με τον σχεδιασμό της μελέτης, καταγράφηκαν κλινικά, δημογραφικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά δεδομένα (λευκά αιμοσφαίρια, πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως η CRP, προκαλσιτονίνη, κλπ). Επιπρόσθετα, κατά την εισαγωγή του εκάστοτε ασθενή υπολογίστηκαν τα αποτελέσματα συστημάτων βαθμονόμησης του κινδύνου θνητότητας, που ήταν το Acute Physiology and Chronic Evaluation-II (APACHE-II), το Simplified Acute Physiology Score-III (SAPS III) και το Sequential Organ Failure (SOFA) score για τους ενηλίκους, ενώ αντίστοιχα για τους παιδιατρικούς ασθενείς το Pediatric Risk of Mortality (PRISM) score για τον κίνδυνο θνητότητας και το Pediatric

Logistic Organ Failure Dysfunction (PELOD) score, που εστιάζει περισσότερο στον κίνδυνο σοβαρής οργανικής δυσλειτουργίας. Τέλος, καταγράφηκε η έκβαση της νόσου, με προοπτική παρακολούθηση των ασθενών.

Μέτρα έκβασης

Το πρωτεύον μέτρο έκβασης των ασθενών της παρούσας μελέτης αφορά τη θνητότητα και τη σοβαρότητα της νόσου, όπως αξιολογήθηκαν με τα σταθμισμένα συστήματα βαθμονόμησης της βαρύτητας και αναλύθηκαν ανωτέρω. Η διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ (ICU Length of Stay) και πολλαπλοί δείκτες φλεγμονής καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν, ως προς την αξία τους ως δευτερεύοντα μέτρα αξιολόγησης της έκβασης των ασθενών.

Εργαστηριακές αναλύσεις

➢ 1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

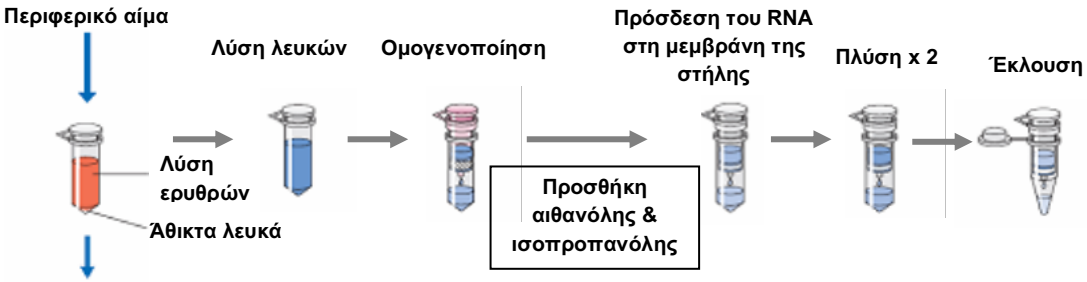
Τα δείγματα αίματος των ενήλικων ή παιδιατρικών ασθενών ελήφθησαν κατά το πρώτο 24ωρο νοσηλείας τους στη ΜΕΘ, αλλά και από τους υγιείς μάρτυρες της μελέτης, κατόπιν συγκατάθεσης των συγγενών ή κηδεμόνων τους. Η πιο συνηθισμένη πηγή DNA στους ανθρώπους είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος. Το ολικό αίμα για την απομόνωση λευκοκυττάρων ελήφθη σε ειδικά φιαλίδια (FG, Tempus Blood RNA Tube, ThermoScientific LSG, UK) εμπλουτισμένα με αντιδραστήρια σταθεροποίησης RNA/DNA (lysis/stabilization reagents), και διατηρήθηκε στη θερμοκρασία των -80 βαθμών Κελσίου (-80^{o}C). Επίσης, έγινε φύλαξη φυγοκεντρημένου ορού στους -20^{o}C για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών βιομορίων της μελέτης.

➢ 2. Ποσοτικοποίηση της μεταγραφικής και μεταφραστικής έκφρασης της πρωτεΐνης survivin

Εφόσον στη βιβλιογραφία δεν έχει ακόμα μελετηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης survivin σε σηπτικούς ασθενείς, αρχικά μελετήθηκε το ενδοκυττάριο δυναμικό της με ποσοτικοποίηση της γενετικής της έκφρασης σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος (απομόνωση mRNA, σύνθεση DNA, real time PCR), ταυτόχρονα με την εξωκυττάρια πρωτεϊνική συγκέντρωσή της (ELISA).

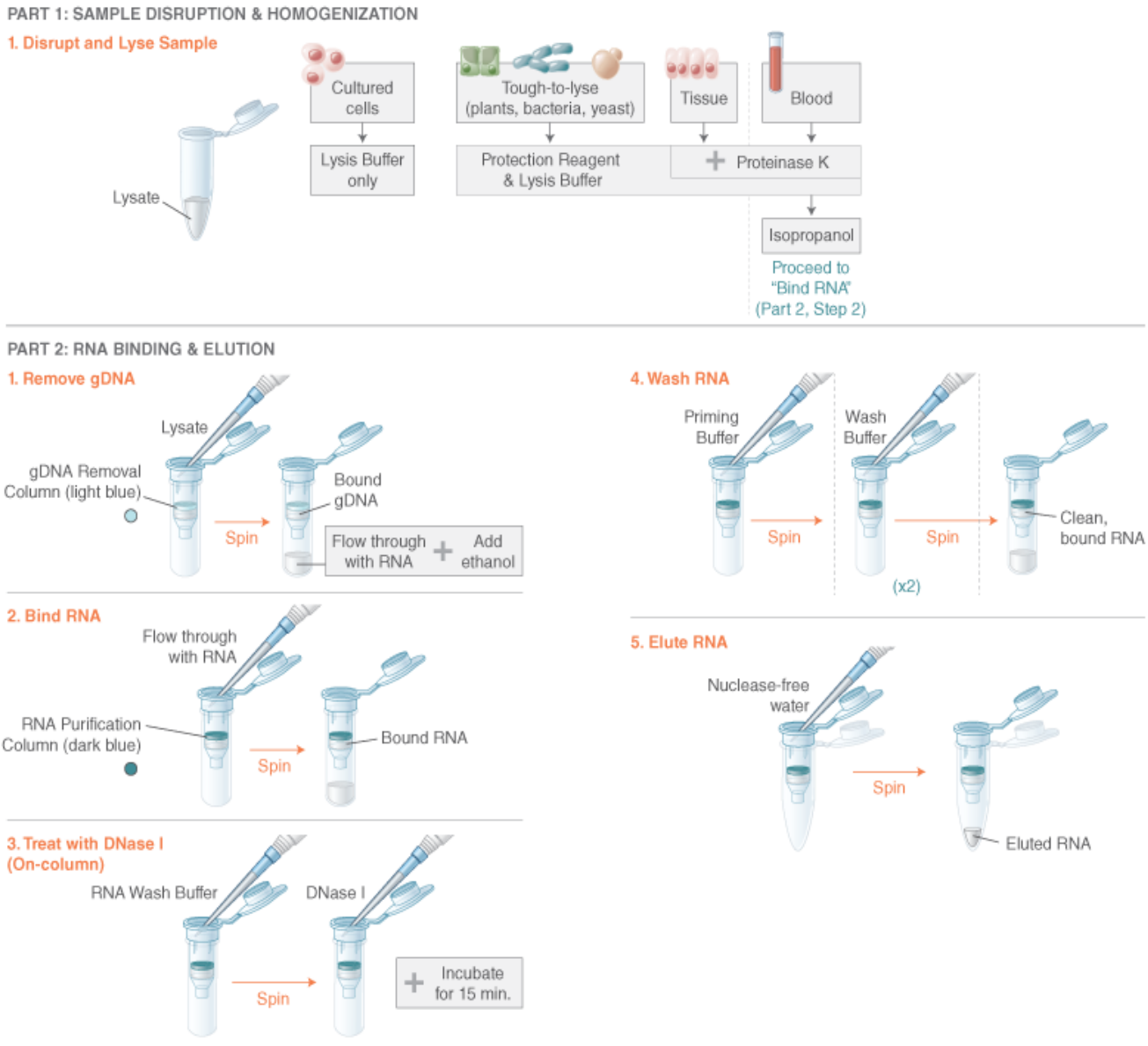
➢ 2.1. Απομόνωση RNA

Για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής έκφρασης της πρωτεΐνης survivin, χρησιμοποιήθηκε δείγμα ολικού αίματος από τον κάθε ασθενή, αρχικά για την απομόνωση mRNA, μέσω μιας διαδικασίας που αντανακλά τον βαθμό έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στόχου. Ο διαχωρισμός των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος και στη συνέχεια η απομόνωση mRNA πραγματοποιήθηκε βάσει των προδιαγραφών του κατασκευαστή του ειδικού εμπορικού εργαλείου (Monarch Total RNA Miniprep Kit, New England Biolabs, UK). Στο πρώτο στάδιο του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol, με παράλληλη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (lysis buffer). Το αντιδραστήριο TRIzol περιέχει ένα μίγμα φαινόλης και θειοκυανιούχου γουανιδίνης, τα οποία σε συνδυασμό με την πρωτεΐνάση Κ αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των νουκλεασών (RNAάσες ή DNAάσες), εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του RNA, ενώ παράλληλα διασπούν τις κυτταρικές μεμβράνες και μετουσιώνουν τα πρωτεϊνικά μόρια και λοιπά ενδοκυττάρια συστατικά του κυττάρου. Στο τέλος αυτού του σταδίου το δείγμα ομογενοποιείται (homogenization) με την προσθήκη χλωροφορμίου, και στη συνέχεια φυγοκεντρείται, με στόχο να γίνει ο αποτελεσματικός διαχωρισμός του σε τρεις φάσεις: το RNA (ανώτερη υδατική φάση), το DNA (μεσοφάση), και τις πρωτεΐνες/λιπίδια (κατώτερη οργανική φάση- μετουσίωση πρωτεϊνών από τη φαινόλη). Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη αιθανόλης και ισοπροπανόλης, που χρησιμοποιούνται για την καθίζηση DNA και πρωτεϊνών αντίστοιχα **(Εικόνα 10)**. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη είναι ένας πολικός διαλύτης με μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από τα μόρια νερού (H2O), που δρα ως παράγοντας αφυδάτωσης των νουκλεινικικών οξέων, με τελικό αποτέλεσμα να πλησιάζουν, να ενώνονται μεταξύ τους και να σχηματίζουν μεγαλομοριακά συμπλέγματα λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, που κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση.



Εικόνα 10. Αδρή αναπαράσταση της διαδικασίας απομόνωσης RNA.

Από το εναπομένον λύμα (lysate) διαχωρίζεται στη συνεχεία το RNA, με τη χρήση προκατασκευασμένων μικροστηλών (microcolumns) και ειδικών DNAασών διαχωρισμού gDNA, καθώς και με την πλύση με ειδικά διαλύματα (wash buffers). Μέσω της τελικής διαδικασίας της έκλουσης RNA γίνεται η τελική απομόνωση mRNA, που μπορεί τώρα να διατηρηθεί στους -80°C **(Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας απομόνωσης RNA με το εμπορικό kit Monarch Total RNA MiniPrep της εταιρείας New England Biolabs.

➢ 2.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του RNA

Ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση σε φάσμα φωτός 260-280nm

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο, με μέτρηση της απορρόφησης σε φάσμα φωτός UV με μήκος κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Για ορισμένο μήκος κύματος και μήκος διαδρομής, η απορρόφηση εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας. Σε μήκος 260nm ελέγχεται η περιεκτικότητα σε νουκλεϊνικά οξέα του μονόκλωνου RNA και σε μήκος κύματος 280nm ελέγχονται οι τυχούσες προσμίξεις σε πρωτεΐνες. Ο νόμος των Beer-Lambert δίνει τη σχέση απορρόφησης –συγκέντρωσης:

$$A_\lambda = -\log_{10}\frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda \cdot \ell \cdot C$$

- I / I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας προς την ένταση της ακτινοβολίας που διαπερνά το διάλυμα
- Α είναι η απορρόφηση ή οπτική πυκνότητα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος λ (χωρίς μονάδα).
- ε είναι η μοριακή απορροφηση ή μοριακός συντελεστής αποσβέσεως, με μονάδα μέτρησης L•mol−1•cm−1. Εξαρτάται από το μήκος κύματος, τη χημική σύσταση και τη θερμοκρασία, ορίζεται αυτόματα από το μηχάνημα.
- ℓ είναι το μήκος της διαδρομής της οπτικής δέσμης μέσα στο διάλυμα, αντιστοιχεί στο πλάτος της cuve (σε 1cm).
- C είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα (σε mol x L−1).

Η μια μονάδα απορρόφησης (OD) στα 260nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση (C) RNA 40ng/μl σε ουδέτερο pH. Η διάλυση του δείγματος προς φωτομέτρηση είναι 1:70 (1μl δείγματος RNA + 69μl DEPC-ddH2O), όπως ορίζεται ως το κατώτερο όριο σωστής μέτρησης από τον κατασκευαστή. Η καθαρότητα του RNA χαρακτηρίζεται από το λόγο της απορρόφησης των νουκλεϊνικών οξέων στα 260nm ως προς αυτήν των πρωτεϊνών στα 280nm (A260/A280). Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση και καθαρότητα της τάξης του 167ng/μl και A260/A280=1,78 κατά μέσο όρο τιμών αντίστοιχα.

Ποιοτική ανάλυση RNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

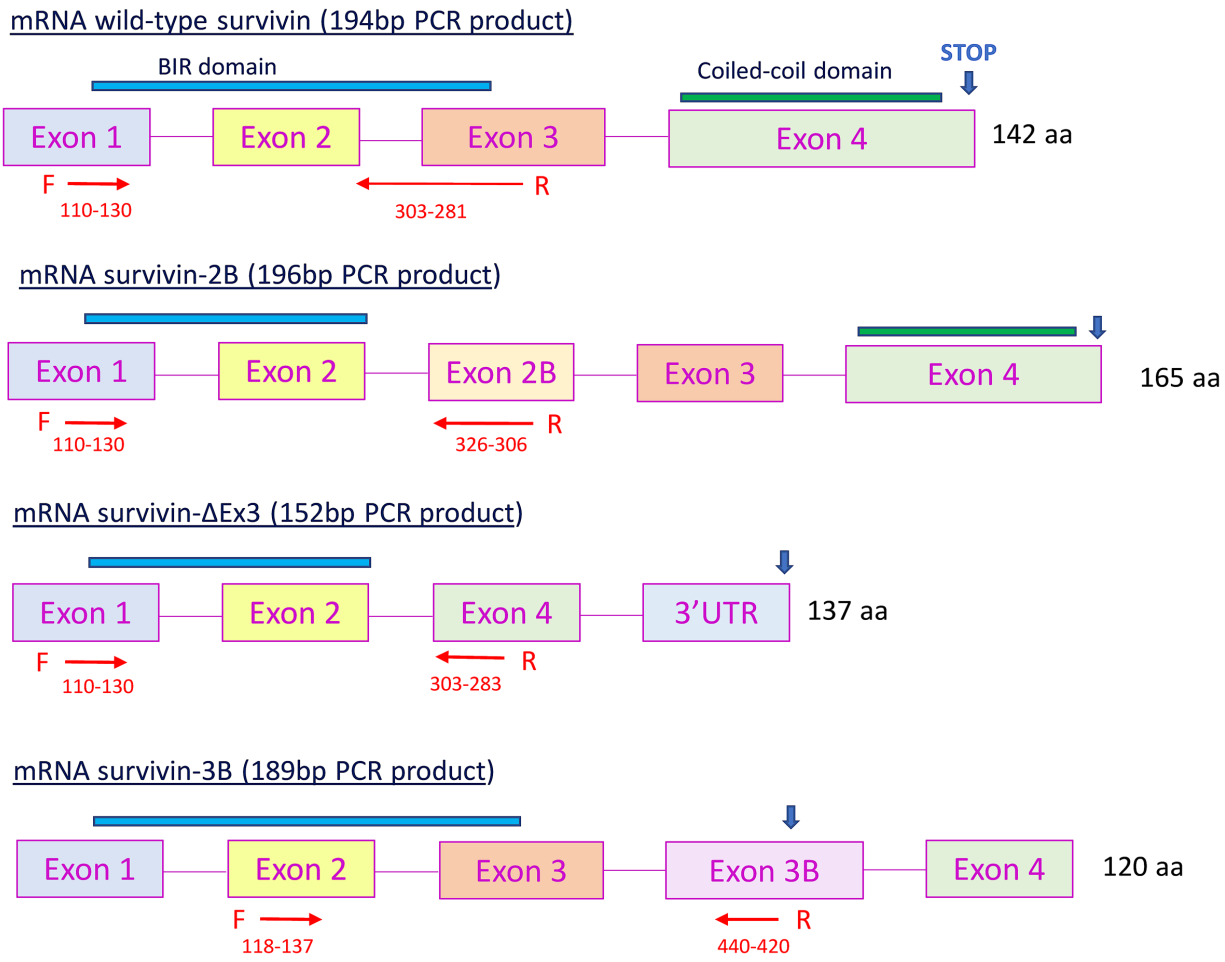
Η ποιοτική ανάλυση του RNA γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 2% και ο διαχωρισμός του επιτυγχάνεται με βάση το μέγεθός του, ενώ η ακεραιότητα και το μέγεθος αποσταθεροποίησής του ελέγχεται με χρώση βρωμιούχου αιθίδιου (EtBr) (10mg/ml). Το EtBr δεσμεύεται στις βάσεις των νουκλεϊνικών οξέων και εκπέμπει σε μήκος κύματος εκπομπής 600nm και με μήκος κύματος διέγερσης 525nm σε διάλυμα TrisBorate EDTA (TBE) συγκέντρωσης 10mM και pH=8. Το μεταγραφικό RNA (mRNA) και τα δύο μεγέθη ριβοσωμικών RNA (rRNA) (28S/18S, 2/1) παρουσιάζονται σαν τρεις ξεχωριστές άσπρες φωτεινές ζώνες σε μαύρο φόντο σε λάμπα UV.

➢ 2.3 Σύνθεση cDNA

Σε αυτό το κομμάτι της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε σύνθεση δίκλωνου συμπληρωματικού DNA (complementary- cDNA), με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (real-time quantitative polymerase chain reaction- RT-qPCR). Η μετατροπή του μονόκλωνου mRNA σε δίκλωνο cDNA γίνεται με την τεχνική της RT-qPCR και τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (RT-reverse transcriptase), η οποία προέρχεται εν προκειμένω από τον ιό Moloney από λευχαιμικά κύτταρα μυός (Moloney murine leukemia virus- MMLV). Ακολουθεί η μεταγραφή του mRNA σε cDNA. Αρχικά συντίθεται η μια μόνο αλυσίδα του DNA, που είναι συμπληρωματική με την αρχική αλυσίδα του mRNA. Έπειτα, η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA, σχηματίζοντας τελικά ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA που δεν περιλαμβάνει εσώνια, παρά μόνο εξώνια. Σε κάθε δείγμα ασθενούς, συντίθεται cDNA από 1μg ποιοτικά ελεγμένου RNA. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής, σε δύο στάδια, μέσω της χρήσης ολιγονουκλεοτιδίων δεοξυθυμίνης -oligo (dT) (συμπληρωματικών για τις polyA+ ουρές των μορίων mRNA), σε συνδυασμό με τυχαίους εκκινητές (random primers). Πιο αναλυτικά, τα σφαιρίδια oligo (dT) αναμίχθηκαν με μίγμα ολικού RNA, και τα μόρια που έφεραν ουρά με πολλαπλά μόρια αδενοσίνης {poly(A) ουρά}, αντιπροσωπεύοντας τον πληθυσμό mRNA, υβριδοποιήθηκαν και δεσμεύθηκαν, γεγονός που επέτρεψε την απομάκρυνση των υπολοίπων πληθυσμών RNA. Επίσης, οι τυχαίοι εκκινητές του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ήταν εκκινητές εξανουκλεοτιδίων (random hexamer primers), βάσει των προδιαγραφών του κατασκευαστή (iScript cDNA Synthesis kit, Biorad, UK). Συμπληρωματικά, στην παρούσα μελέτη σχεδιάστηκαν νέοι πρόσθιοι (forward) και ανάστροφοι (reverse) εκκινητές, ειδικοί για κάθε ξεχωριστή ισομορφή της survivin (survivin-WT, 2B, ΔEx3, 3B), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1** και στην ακόλουθη **Εικόνα 12**.

Πίνακας 1. Πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την κάθε ξεχωριστή ισομορφή της πρωτεΐνης survivin και το γονίδιο αναφοράς (β-actin)

Transcripts	Locus	Amplicon	Forward primer	Reverse primer
Survivin- WT	NM_001168	194bp	5′-GACCACCGCATCTCTACATTC-3′	5′-TGCTTTTTATGTTCCTCTATGGG-3′
Survivin -2B	NM_001012271	196bp	5′-GACCACCGCATCTCTACATTC-3′	5′-AAGTGCTGGTATTACAGGCGT-3′
Survivin -ΔEx3	NM_001012270	152bp	5′-GACCACCGCATCTCTACATTC-3′	5′-ATTGTTGGTTTCCTTTGCATG-3′
Survivin -3B	AB154416	189bp	5′-GAGGCTGGCTTCATCCACTG-3′	5′-GCTCTCTCAATTTTGTTCTTG-3′
β-actin	NM_001101	171bp	5′-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3′	5′- CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3′



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της ακριβούς γονιδιακής τοποθεσίας των πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη, με στόχο την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης της κάθε ξεχωριστής ισομορφής της πρωτεΐνης survivin. WT= wild-type, bp=base pairs, F= πρόσθιοι εκκινητές, R= ανάστροφοι εκκινητές για κάθε μετάγραφο της survivin.

➢ 2.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Αρχή της μεθόδου

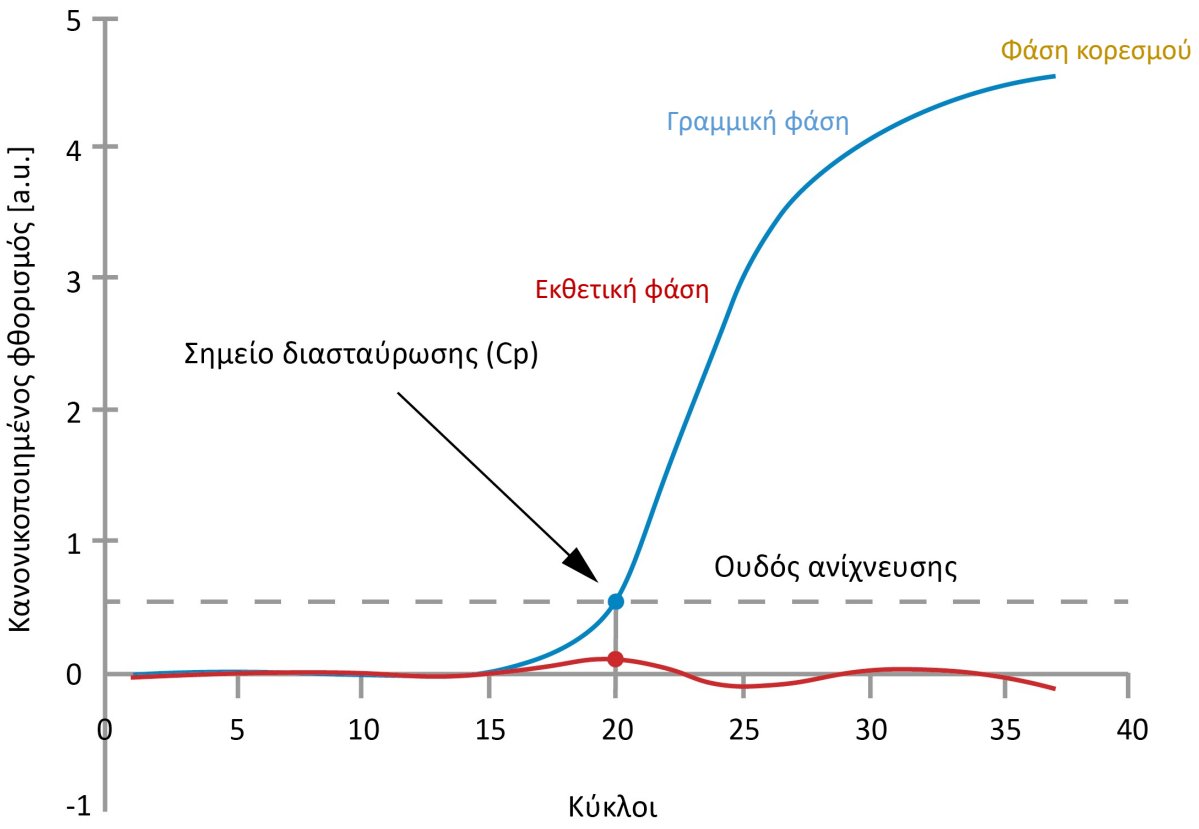
Η Real-Time PCR αποτελεί μια ευαίσθητη και ακριβή μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της αρχικής συγκέντρωσης του υπό εξέταση γονιδιακού προϊόντος. Η τεχνική της qRT-PCR βασίζεται στη χρήση ειδικών (SYBR Green I) ή μη ειδικών (ιχνηθέτες τύπου Taqman) φθοριζουσών χρωστικών, και στην αναλογική συσχέτιση της έντασης του φθορισμού με την αρχική συγκέντρωση των πολλαπλασιαζόμενων μορίων DNA του δείγματος (152).

Η διαδικασία της RT-PCR χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις: α) την αρχική γραμμική φάση, β) πρώιμη εκθετική (exponential) φάση, γ) γραμμική εκθετική φάση (log phase) και δ) τη φάση plateau (εικόνα 13). Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από τη χρονική στιγμή κατά την οποία το προϊόν του πολλαπλασιασμού ανιχνεύεται για πρώτη φορά, που συμβαίνει κατά τη δεύτερη φάση. Η χρονική στιγμή κατά την οποία ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline) αποδίδεται ως σημείο διασταύρωσης Cp Crossing Point). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της PCR βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο νωρίτερα λαμβάνεται σήμα φθορισμού και άρα τόσο μικρότερη είναι η τιμή του Cp **(Εικόνα 13)**. Το σήμα του φθορισμού ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα ενός θερμικού κυκλοποιητή και η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του προϊόντος σε κάθε κύκλο.

Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται με ποικίλους τρόπους, όπως: 1) με τη βοήθεια μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης, δηλαδή χρωστικών που προσδένονται στο DNA και αλληλεπιδρούν με ειδικούς εκκινητές (dsDNA dye, SYBR-Green I), είτε 2) με ειδικά συστήματα ανίχνευσης, που περιλαμβάνουν ανιχνευτές που εκπέμπουν φθορισμό με την υδρόλυσή τους από τη δράση της Taq πολυμεράσης ως 5’ εξωνουκλεάσης (Hydrolysis probes, Taqman probes), με αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα ανίχνευσης της υπό εξέταση αλληλουχίας, και 3) ειδικότερα συστήματα, που βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας μεταξύ μορίων χρωστικών (Hybridization probes, FRET probes). Με τη μέθοδο αυτή κατασκευάζεται μια λογαριθμική καμπύλη για κάθε δείγμα (συνάρτηση του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων μορίων προς τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης), με μια φάση υπόβαθρου (background phase), μια λογαριθμική φάση (log phase) και μια φάση κορεσμού (end-point).

Για την αντίδραση είναι απαραίτητη η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων, που περιέχουν ιόντα Mg+2, που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Η ιδανική συγκέντρωση Mg+2 βελτιστοποιεί την ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA και την πιστότητα της

λειτουργικότητας της DNA πολυμεράσης. Επίσης, απαραίτητη είναι η προσθήκη δομικών μορίων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων.



Εικόνα 13. Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού (plateau). Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Cp, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

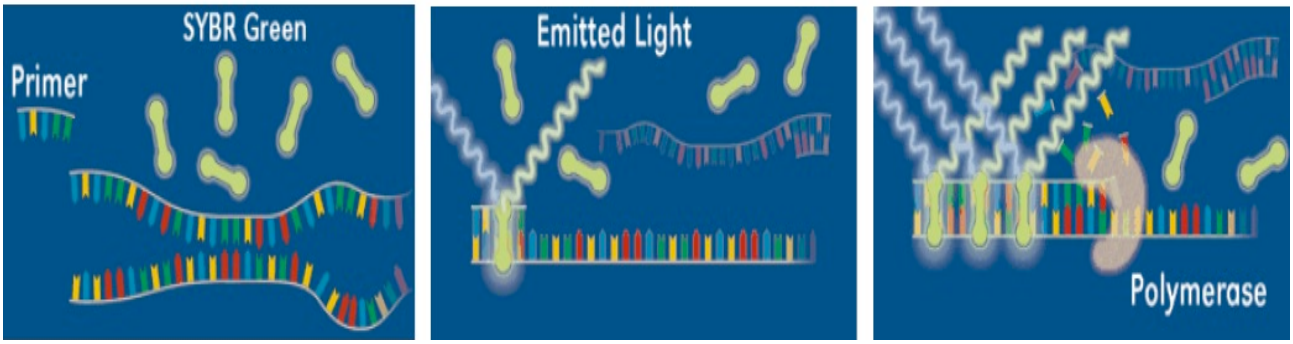
Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικοί τρόποι ποσοτικοποίησης, η απόλυτη και η σχετική. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται βάσει μιας πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται με τη χρήση ενός γονιδίου αναφοράς, από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων (συγκέντρωση) του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί. Το γονίδιο αναφοράς έχει σταθερή έκφραση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και χρησιμοποιείται για να εξομαλύνει τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα, είτε λόγω αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA, είτε λόγω μικροδιαφορών στο πιπεττάρισμα κατά την αρχική προετοιμασία των δειγμάτων. Ο αριθμός των αντιγράφων στα αποτελέσματα του εκάστοτε δείγματος εκφράζεται ως κλάσμα των μετρηθέντων αντιγράφων του γονιδίου στόχου, προς τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. Αντίθετα, στη σχετική

ποσοτικοποίηση συγκρίνονται τα Cp του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράζουν αδρά πόσες φορές είναι υψηλότερη ή χαμηλότερη η έκφραση του γονιδίου στο εκάστοτε δείγμα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε απόλυτη ποσοτικοποίηση, ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη-β (ACTβ).

Φθορίζουσες χρωστικές

Μη ειδικές χρωστικές

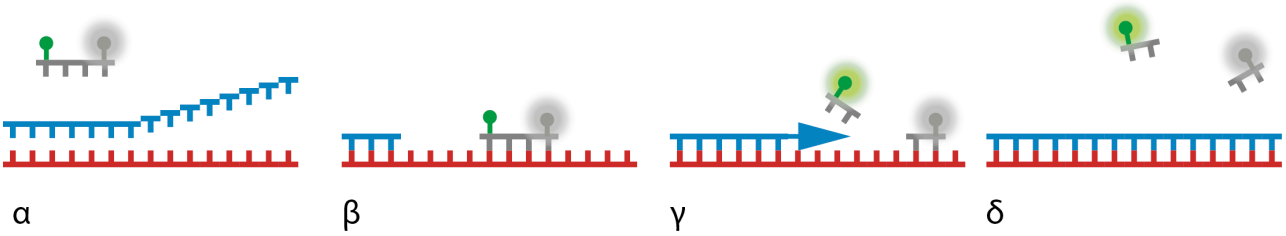
Η μη ειδική χρωστική SYBR Green I βρίσκεται αρχικά ελεύθερη στο διάλυμα και δεσμεύεται στη φάση του υβριδισμού σε κάθε διπλή έλικα δίκλωνου μορίου DNA. Αποτέλεσμα της πρόσδεσής της είναι να εκπέμπει φθορίζον σήμα σε ένα καθορισμένο μήκος κύματος **(Εικόνα 14)**. Η διέγερση και η μέγιστη εκπομπή σήματος του SYBR-Green I γίνεται στα 494nm και στα 521nm αντίστοιχα (Biorad, CFX96). Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται στο στάδιο της επιμήκυνσης των προϊόντων σε κάθε κύκλο αλυσιδωτής αντίδρασης σε αληθινό χρόνο. Η ένταση του σήματος αυξάνεται καθώς αυξάνονται οι κύκλοι, λόγω της συσσώρευσης των προϊόντων PCR. Η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I είναι εύχρηστη, επιτρέποντας την ανάλυση πολλών διαφορετικών μορίων στόχων, χωρίς την ανάγκη σχεδιασμού ειδικών ανιχνευτών (Taqman Probes). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR - Green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε δίκλωνης αλληλουχίας, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή. Παρ' όλα αυτά, μη ειδικά PCR προϊόντα και διμερή των εκκινητών μπορούν να συμβάλουν στο φθορίζον σήμα. Γι' αυτό τον λόγο απαιτείται πολύ ακριβής και υψηλής ειδικότητας σχεδιασμός των PCR αντιδράσεων και ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve) των αντιδράσεων.



Εικόνα 14. Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR Green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο cDNA, σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Ειδικές χρωστικές

Οι ειδικές χρωστικές δεν είναι ελεύθερες στο διάλυμα, αλλά συνδεδεμένες με μικρά μόρια DNA, με στόχο να υβριδοποιηθούν ανάμεσα στους εκκινητές του γονιδίου στόχου κατά το στάδιο του υβριδισμού. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωστικές είναι οι ιχνηθέτες τύπου Taqman, που φέρουν ένα φθοριοφόρο μόριο στο 5’ άκρο τους και ένα μόριο καταστολής φθορισμού στο 3’ άκρο τους. Υδρόλυση του ιχνηθέτη Taqman μέσω της δράσης της Taq πολυμεράσης διαχωρίζει το φθοριοφόρο από τον καταστολέα, με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού **(Εικόνα 15**). Οι ειδικές χρωστικές έχουν υψηλό κόστος αγοράς και δυσκολία στον σχεδιασμό του κατάλληλου ιχνηθέτη, ωστόσο πλεονεκτούν στο ότι τα διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα δεν μετέχουν στην γονιδιακή ποσοτικοποίηση, καθώς ο ιχνηθέτης δεν υβριδίζεται πάνω τους.



Εικόνα 15. Περιγραφή της λειτουργίας των ειδικών χρωστικών (ιχνηθέτες τύπου Taqman), οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε μικρά μόρια DNA, ενώ κατά τον υβριδισμό τους η Taq πολυμεράση διασπά τον ιχνηθέτη διαχωρίζοντας το φθοριοφόρο τμήμα τους από τον καταστολέα φθορισμού, με αποτέλεσμα την ανίχνευση φθορίζοντος σήματος.

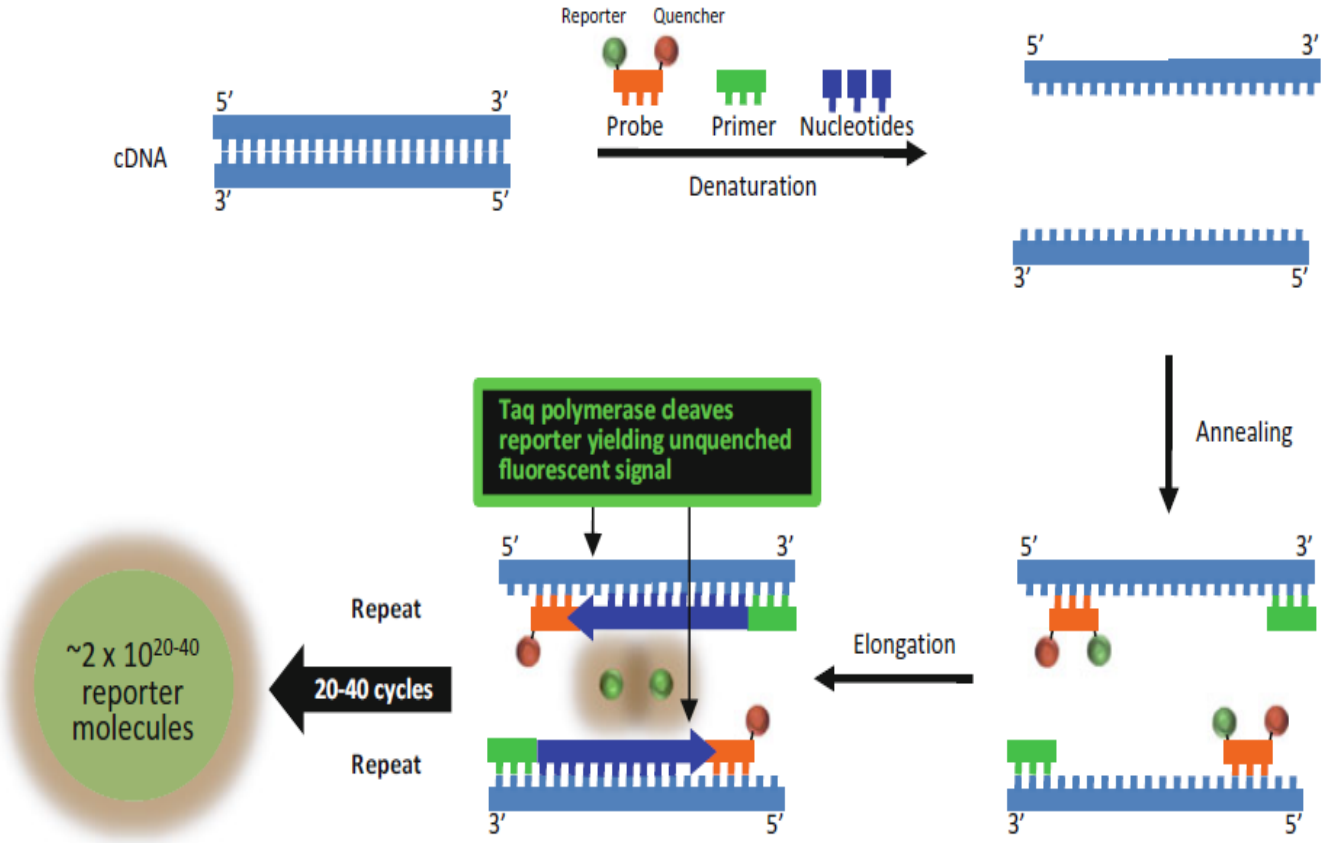
➢ 2.5. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο

Η Real-Time PCR εφαρμόζεται μέσω του ένζυμου hos start Taq πολυμεράση που είναι μια πρωτεΐνη των 94kDa, με 5'-3' δραστηριότητα πολυμερισμού, η οποία είναι αποτελεσματική στους 70°C έως 80°C. Είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτική και ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 100 κύκλοι. Η αντίδραση συνολικά περιλαμβάνει περίπου 35- 40 κύκλους με επαναλαμβανόμενα στάδια της PCR με τα εξής βήματα **(Εικόνα 16)**:

- 1) Αρχική αποδιάταξη (denaturation) του cDNA και ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης σε έναν κύκλο. Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95^{o}C. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλωνα μόρια DNA αποδιατάσσονται, και έτσι παράγονται μονόκλωνες αλυσίδες, που θα αποτελέσουν εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση.
- 2) Υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στο εκμαγείο cDNA (φάση α). Σε αυτή τη φάση η θερμοκρασία μειώνεται, ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η

θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ειδικότητα της qPCR βάσει των εκάστοτε εκκινητών. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που θα χρειαστούν ποικίλουν επίσης ανάλογα με τις γονιδιακές αλληλουχίες στόχους που θα ενισχυθούν. Έτσι, η θερμοκρασία υβριδισμού- τήξης (Tm) εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC.

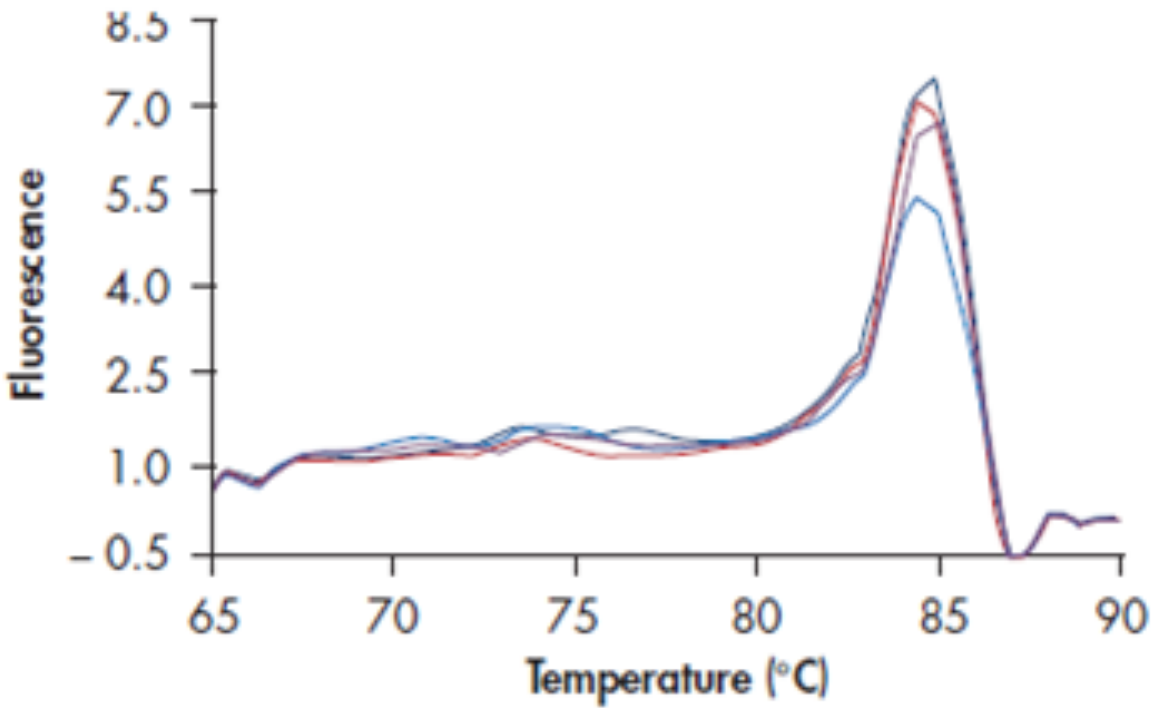
- 3) Επιμήκυνση (elongation) των αλυσίδων του DNA (φάση β) για 40 κύκλους. Η συλλογή δεδομένων (μέτρηση φθορισμού) γίνεται στη φάση β κάθε κύκλου. Σε αυτό το βήμα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την θερμοσταθερή iTaq πολυμεράση, ώστε να επιτελεστεί η επιμήκυνση των συμπληρωματικών DNA αλυσίδων. Ο χρόνος διατήρησης αυτής της θερμοκρασίας ποικίλλει ανάλογα με το μήκος του γονιδιακού στόχου.
- 4) Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε μικρά τμήματα δίκλωνου DNA να αποχωρίζονται σε κάθε κύκλο και να αποτελούν τα εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA. Συνήθως, επαναλαμβάνονται 35-40 κύκλοι αποδιάταξης, υβριδισμού εκκινητών και επιμήκυνσης. Στον τελικό κύκλο δίνεται λίγο μεγαλύτερος χρόνος για την ολοκλήρωση της επέκτασης όλων των γονιδιακών προϊόντων.



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας qPCR.

Ποιοτική ανάλυση και ειδικότητα της PCR

Εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της qPCR, ακολουθεί και ποιοτική ανάλυση για την "καθαρότητα" των αποτελεσμάτων, με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης (melting curve). Πιο συγκεκριμένα, για κάθε πολλαπλασιαζόμενη περιοχή (amplicon) σχεδιάζεται η καμπύλη τήξης της, στους 2°C έως 4°C κάτω από το σημείο τήξης (Tm) του προϊόντος PCR. Ακολουθεί ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve), συλλέγοντας δεδομένα φθορισμού καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία από τους 60°C στους 95°C για έναν κύκλο. Κατά αυτόν τον τρόπο ελέγχεται η ειδικότητα της αντίδρασης, εφόσον ο φθορισμός πρέπει να προέρχεται από το προϊόν και δεν πρέπει να ανιχνεύονται μη ειδικά προϊόντα, όπως για παράδειγμα διμερή των εκκινητών (primer dimers) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve) και ειδικότητα της αντίδρασης συγκριτικά με το γονίδιο αναφοράς (ACTβ), με τη μέγιστη απόδοση φθορισμού στους 85°C.

Ανάλυση τεχνικής qPCR στην παρούσα μελέτη

Η Real-Time PCR στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε με τη χρήση SYBR Green I και του ένζυμου hos start iTaq πολυμεράση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του iTaq SYBR Green Universal Supermix (BioRad, 1725122, Hercules, CA, USA) και συνολικά περιλάμβανε 40 κύκλους με επαναλαμβανόμενα στάδια της PCR.

-Αντιδραστήρια και υλικά (ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR)

- Χρωστική SYBR Green I
- Hos-start iTaq DNA πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PCR Buffer) και διάλυμα $MgCl_2$ (11mM)
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (0,5μl) με συγκέντρωση 20pmol/μl
- Δείγμα cDNA με την αλληλουχία-στόχο (2 μl)
- Nuclease-free H_2O (dsH_2O) με στόχο έναν τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl

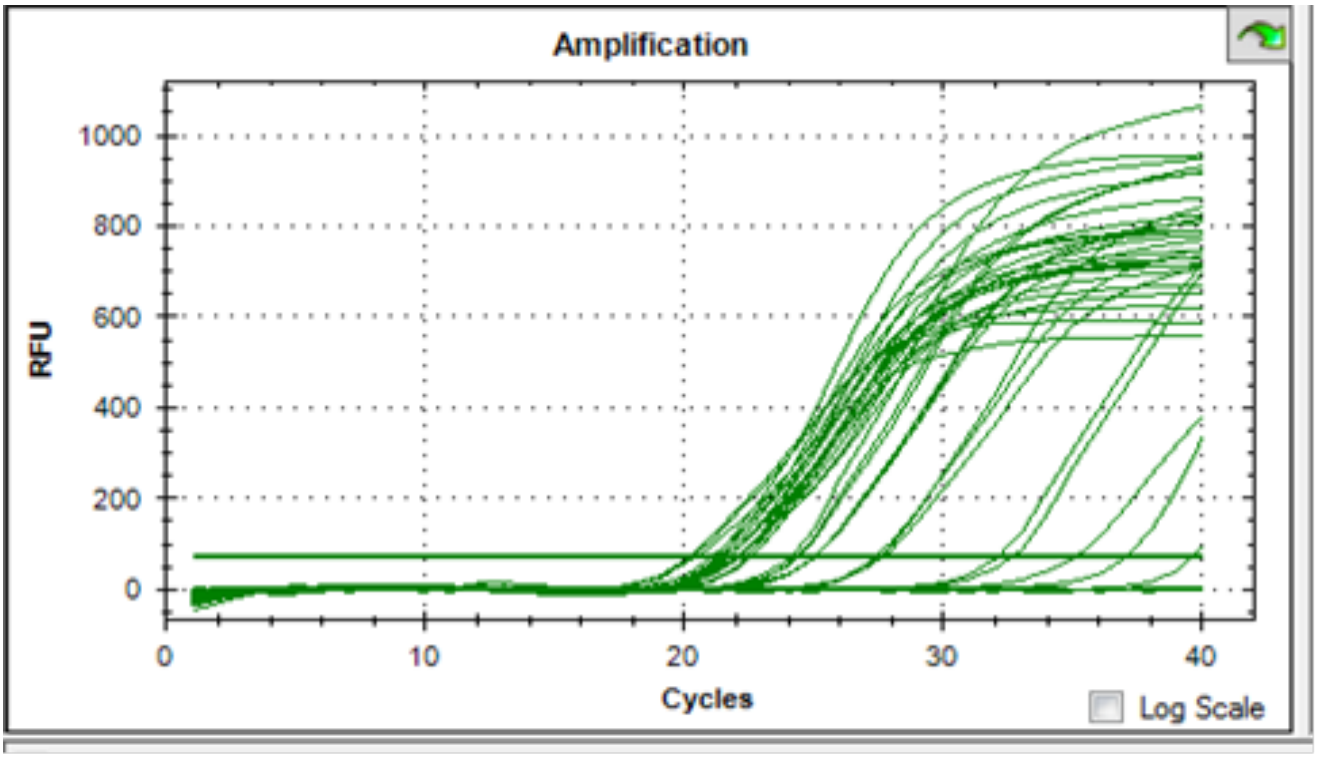
Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές (probes) για τις ισομορφές της survivin (survivin-WT, 2B, ΔEx3, 3B) και για το γονίδιο αναφοράς της ACTB (149), ενώ στον ακόλουθο **Πίνακα 2** αναγράφονται οι συνθήκες της αντίδρασης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (iTaq SYBR Green Universal Supermix, BioRad, 1725122, Hercules, CA, USA).

Πίνακας 2. Συνθήκες αντίδρασης qRT-PCR για το γονίδιο της SURVIVIN και της ACTβ.

Cycles		°C	Time	Acquisition	Rate
40 Cycles	Denaturation	95	30 sec	None	0,5c/sec
	Denaturation	95	5 sec	None	0,5c/sec
	Hybridization	60	30 sec	Single	0,5c/sec
	Elongation	60	30 sec	None	0,5c/sec
	Melting	65-95	5 sec	Continuous	0,5c/sec
	Cooling	40	5 sec	None	

Οι μετρήσεις διεξήχθησαν εις διπλούν για το κάθε γονίδιο και το κάθε δείγμα ξεχωριστά και όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal Cycler) σε αληθινό χρόνο

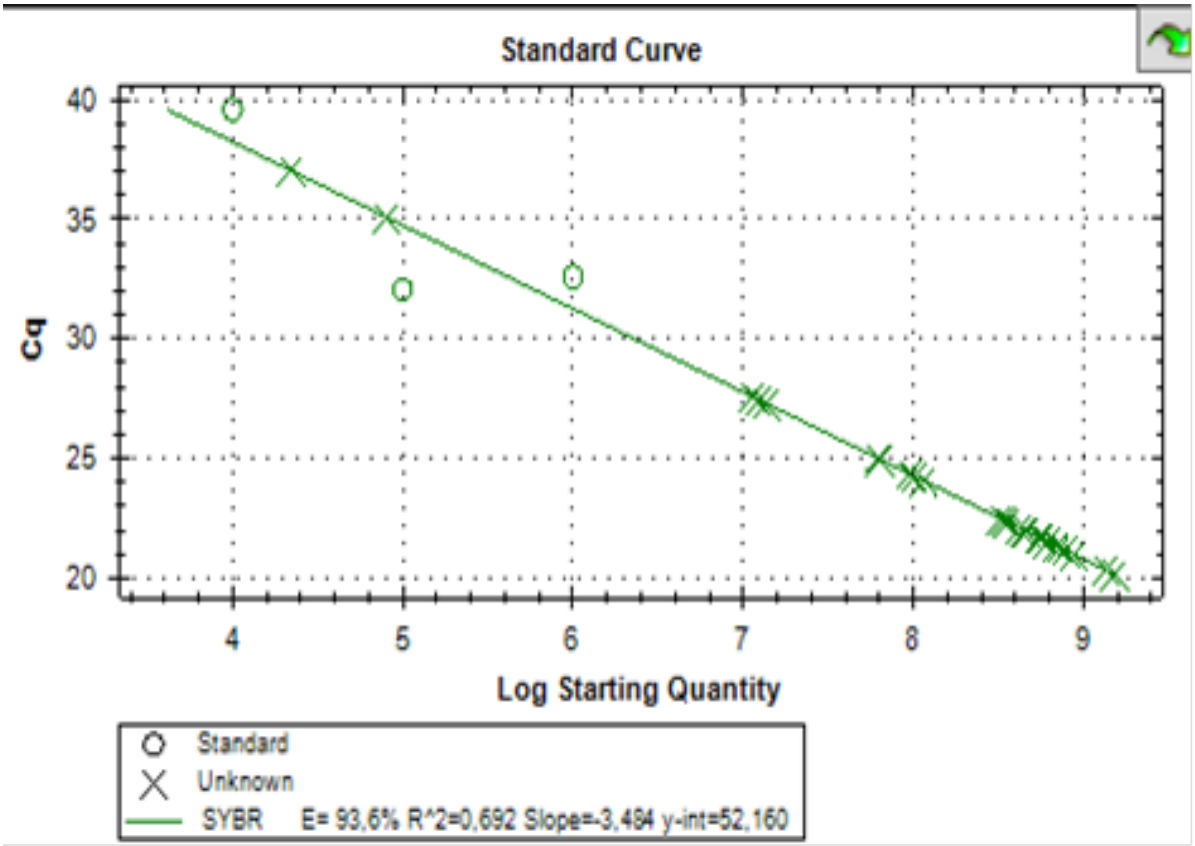
(Biorad CFX96, USA) **(Εικόνα 18)**. Η συσκευή αυτή φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.



Εικόνα 18. Καμπύλες αποδιάταξης μορίων cDNA για τα δείγματα μιας αντίδρασης qPCR.

Ποσοτικοποίηση cDNA

Η ποσοτικοποίηση ανάμεσα σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα έγινε με την μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης με εξωτερική καμπύλη αναφοράς (external standards) **(Εικόνα 19)**. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην άμεση σύγκριση του λόγου του αριθμού μεταγράφων του γονιδίου στόχου survivin σε κάθε δείγμα, με τον αντίστοιχο αριθμό του γονιδίου αναφοράς, δηλαδή της ακτίνης-Β (ACTβ). Η καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε με βάση τον απόλυτο αριθμό μεταγράφων ανά μl της ACTβ στην κυτταρική σειρά K562 λευχαιμικών κυττάρων μυός. Ο αριθμός των κύκλων (fractional cycle number) εκφράζει το σήμα φθορισμού πάνω από το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης (threshold).



Εικόνα 19. Καμπύλη αναφοράς της ακτίνης-β (ACTβ).

Ο λόγος των τιμών των επιπέδων έκφρασης των mRNA των φυσιολογικών δειγμάτων αναλύθηκε και συγκρίθηκε με τα δείγματα των ασθενών με σήψη και SIRS.

- Επιβεβαιώθηκε ότι όλες οι αντιδράσεις PCR, του γονιδίου στόχου της survivin, καθώς και του γονιδίου αναφοράς της ACTβ σε αυτή την μελέτη, είχαν την ίδια αποδοτικότητα (efficiencies).
- Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς 10-φορών (10-fold) διαδοχικών διαλύσεων όλων των διαθέσιμων cDNAs.
- Η αποδοτικότητα της κάθε qRT-PCR υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης αναφοράς (slope). Οι απόλυτες τιμές που βρέθηκαν ήταν παρόμοιες (<3,3).
- E = 10(–1/S) – 1, όπου:

E: αποδοτικότητα

S: κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Εάν S= –3.322, τότε η αποδοτικότητα της PCR είναι 1, ή 100%.

- Επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση της ACTβ δε μεταβάλλεται σημαντικά ανάμεσα στα δείγματα.
- Όλα τα δείγματα cDNA συντέθηκαν από την ίδια αρχική ποσότητα mRNA (1μg) και διαλύθηκαν στον ίδιο όγκο, έτσι ώστε τα αποτελέσματα της μελέτης να είναι συγκρίσιμα.

- Το γονίδιο στόχος ανάχθηκε στην καμπύλη αναφοράς και προσδιορίστηκε ως ng/μl.Η συγκέντρωση των διαφόρων ισομορφών της survivin εκφράζεται ως ο λόγος έκφρασης τους ως προς το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης-Β (100,149). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην άμεση σύγκριση του λόγου του αριθμού μεταγράφων του γονιδίου στόχου της survivin με τον αντίστοιχο αριθμό του γονιδίου αναφοράς της ACTβ σε κάθε δείγμα. Η καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε με βάση τον απόλυτο αριθμό μεταγράφων ανά μl της ACTβ στην κυτταρική σειρά K562. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με διαδοχικές διαλύσεις cDNA της κυτταρικής σειράς K562, με βάση την έκφραση της ACTβ (100,149).
- Οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού PCR: *95 °C για 30s αποδιάταξης , 60 °C για* υβριδοποίηση των εκκινητών *10 s, and 60 °C για 30s* για επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

➢ 2.6. Πρωτεομική Ανάλυση

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης

Με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA) ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα της μεταγραφικής έκφρασης των πρωτεϊνικών βιομορίων της μελέτης (XIAP, survivin, κασπάσες, Bax, Smac/Diablo) στον ορό των ασθενών, αφού προηγουμένως είχαν φωτομετρηθεί στο μήκος κύματος εκπομπής χρωμοφόρου (Avidin-Horseradish Peroxidase, HRP) στα 450nm.

Συνοπτικά, αυτή η μεθοδολογική διαδικασία έχει ως εξής:

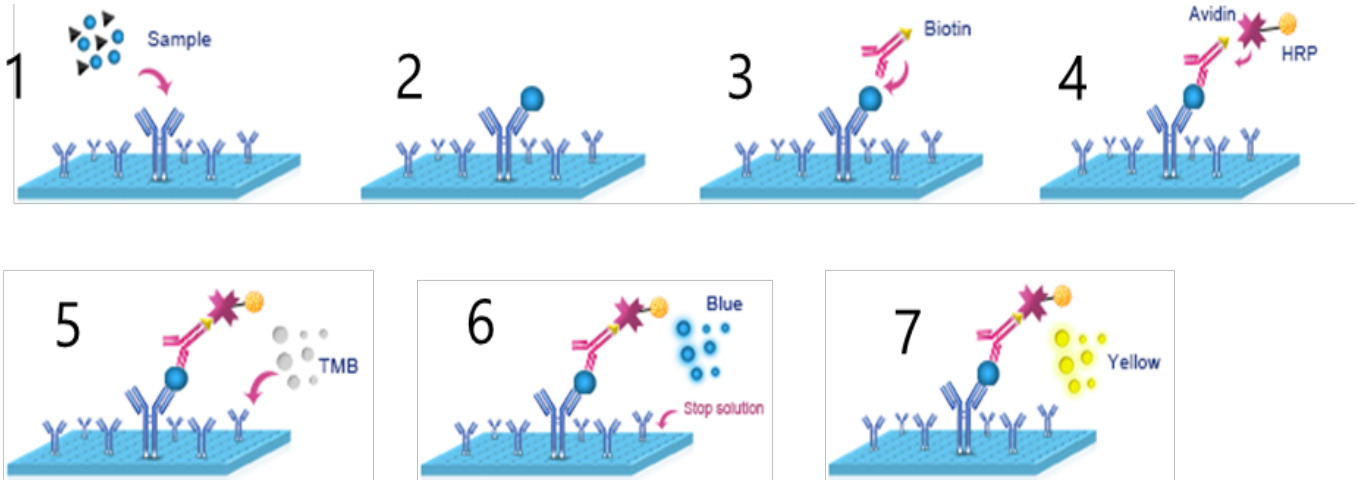
1) Αρχικά, ειδικό αντίσωμα έναντι της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου βρίσκεται προσκολλημένο σε πλάκα 96 θέσεων.
2) Προστίθεται ο ορός και στη συνέχεια ενσωματώνεται το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι της εκάστοτε πρωτεΐνης- στόχου.
3) Γίνεται φωτομέτρηση και ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης.

Υπάρχουν διαφορετικά πρωτόκολλα ποσοτικής προσέγγισης των πρωτεϊνικών στόχων (άμεση, έμμεση, sandwich ή ανταγωνιστική ELISA). Κατά την άμεση ELISA γίνεται απευθείας πρόσδεση του συζευγμένου αντισώματος ανίχνευσης στο αντιγόνο. Κατά την έμμεση ELISA γίνεται πρόσδεση ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο και ακολούθως προσθήκη συζευγμένου αντισώματος ανίχνευσης με έμμεση δέσμευση στο σύμπλοκο. Στην Sandwich ELISA γίνεται πρόσδεση ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο και ακολούθως πρόσδεση δεύτερου αντισώματος ανίχνευσης στο αντιγόνο. Τέλος, στην ανταγωνιστική ELISA γίνεται προσθήκη μείγματος διαλυτού αντιγόνου-αντισώματος σε ακινητοποιημένο αντιγόνο και προσθήκη δεύτερου συζευγμένου αντισώματος ανίχνευσης.

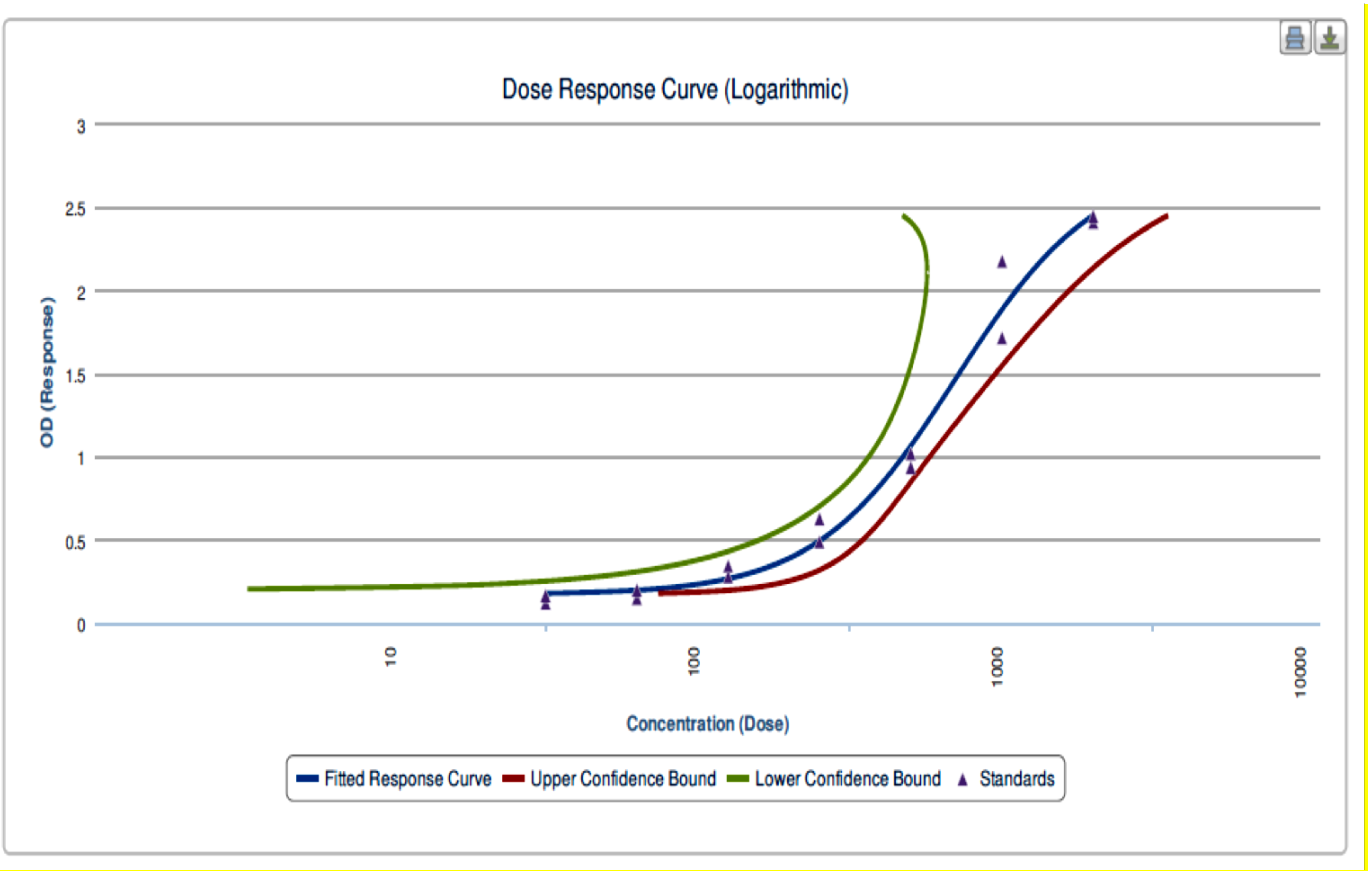
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών βιομορίων στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγμα ορού των συμμετεχόντων, με τη μέθοδο sandwich ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA), με συσκευασίες του εμπορίου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (E-EL-H1584 για την πρωτεΐνη survivin, E-EL-H0017 για την κασπάση-3, E-EL-H0663 για την κασπάση-9, E-EL-H0562 για την πρωτεΐνη Bax- όλα σκευάσματα της εταιρείας Elabscience Biotechnology, Inc., Houston, TX 77079, USA. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το EHXIAP για την XIAP, και το EHDIABLO ELISA kit για την πρωτεΐνη Smac/Diablo, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA USA 02451). Ειδικότερα, ορός του κάθε δείγματος προστίθεται σε ειδικά βοθρία, προ-επικαλυμμένα με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για τα αποπτωτικά και αντιαποπτωτικά βιομόρια της μελέτης. Εν συνεχεία, ειδικό βιοτινυλιωμένο αντίσωμα και υπεροξειδάση του χρένου (Avidin-Horseradish Peroxidase- HRP) προστίθεται στα βοθρία, για επώαση υπό ανάδευση. Ακολουθεί πλύση για την απομάκρυνση οποιουδήποτε μη ειδικά συνδεδεμένου αντιδραστηρίου και προστίθεται το διάλυμα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μπλε χρώματος. Με την προσθήκη διαλύματος διακοπής αντίδρασης (stop solution) αναπτύσσεται κίτρινο χρώμα στα βοθρία, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της εκάστοτε πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα **(Εικόνα 20)**. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε στα 450nm, σε φωτόμετρο ειδικό για μικροπλάκα. Οι ευαισθησίες των ανιχνεύσεων ήταν 18,75pg/mL για την πρωτεΐνη survivin, 0,19ng/ml για την κασπάση 3 και 0,94ng/ml για την κασπάση 9. Η οπτική πυκνότητα του κάθε δείγματος οδήγησε στην ποσοτικοποίηση της κάθε πρωτεΐνης, με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (standard curve) του κατασκευαστή.

Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο του κατασκευαστή έχει ως εξής:

Αρχικά, προκειμένου να σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης του μορίου (εικόνα 17), προστέθηκαν στην πλάκα γνωστές συγκεντρώσεις της εκάστοτε πρωτεΐνης. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (σε pg/ml): 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 και 2000 εις διπλούν. Εν συνεχεία, προστέθηκε στα υπόλοιπα πηγάδια της πλάκας ορός (100 μl ανά πηγάδι) και η πλάκα επωάσθηκε για 90 λεπτά στους 37^{o}C. Κατόπιν, το υγρό απορρίφθηκε και προστέθηκε το διάλυμα με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (100μl ανά πηγάδι) με σύγχρονη ανάδευση. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37^{o}C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το διάλυμα, και έγινε πλύση της πλάκας τρεις φορές. Προστέθηκε το διάλυμα του συνδεδεμένου με ένζυμο αντισώματος (Avidin-Horseradish Peroxidase, HRP- 100μl ανά πηγάδι) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37^{o}C. Κατόπιν το υγρό αφαιρέθηκε και έγινε πλύση της πλάκας πέντε φορές. Προστέθηκε το διάλυμα με το υπόστρωμα (90μl σε κάθε πηγάδι) και έγινε επώαση για 15 λεπτά στους 37^{o}C στο σκοτάδι. Στο τέλος με προσθήκη 5% φωσφορικού οξέος σταμάτησε η αντίδραση και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm **(Εικόνα 21)**.



Εικόνα 20. Τα στάδια της μεθόδου ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) τύπου sandwich.



Εικόνα 21. Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης survivin με τη μέθοδο ELISA.

➢ 3. Ποσοτικός προσδιορισμός οξειδωτικού στρες

Για τις αναλύσεις προσδιορισμού της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού, δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς μάρτυρες ή και αρτηριακού δείγματος αίματος από τους βαρέως πάσχοντες ασθενείς ελήφθησαν κατά τις πρώτες ώρες μετά την εισαγωγή αυτών στη ΜΕΘ και φυγοκεντρήθηκαν άμεσα στις 3000rpm για 10min. Εν συνεχεία, ο ορός φυλάχθηκε στους -20^{o}C έως την πραγματοποίηση των αναλύσεων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η ποσοτικοποίηση των ολικών προϊόντων υπεροξείδωσης λιπιδίων (total lipid peroxides) χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος προσδιορισμού της συνολικής οξειδωτικής κατάστασης (TOS) του οργανισμού. Η εν λόγω διαδικασία βασίστηκε στην αντίδραση της ενζυμικής υπεροξειδάσης με τα υπεροξείδια του δείγματος ορού, μέσω της χρήσης της τετραμεθυλβενζιδίνης (tetramethyl-benzidine- TMB) ως χρωμογόνο υπόστρωμα, και εν συνεχεία, με την προσθήκη διαλύματος διακοπής της αντίδρασης, η απορρόφηση του υποστρώματος μετρήθηκε σε μήκος κύματος 450nm σε ειδικό φωτόμετρο, βάσει των οδηγιών του ειδικού εμπορικού σκευάσματος (PerOx kit, Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany). Η ακρίβεια και επαναληψιμότητα του συγκεκριμένου σκευάσματος ορίζεται από τον κατασκευαστή σε 3,1% για μετρήσεις την ίδια πλάκα (intra-assay CV) ή 5.1% για διαφορετικές πλάκες (inter-assay CV), ενώ το όριο ανίχνευσης είναι τα 7mmol/L.

Η ποσοτικοποίηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού (TAC) προσδιορίστηκε μέσω του αντίστοιχου εμπορικού σκευάσματος (ImAnOx kit, Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany). Η εν λόγω διαδικασία εδώ αντανακλά το σύνολο των αντιοξειδωτικών συστατικών του ορού, μέσω ενζυματικής αντίδρασης αυτών με μία προκαθορισμένη ποσότητα εξωγενώς προστιθέμενης οξειδωτικής ουσίας, και εν προκειμένω του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Η δυνατότητα των υπαρχόντων αντιοξειδωτικών βιομορίων του δείγματος να αδρανοποιούν την ανάλογη ποσότητα του παρεχόμενου H2O2, οδηγεί τη μετατροπή της τετραμεθυλβενζιδίνης σε ένα χρωμογόνο προϊόν, που μπορεί στη συνέχεια να φωτομετρηθεί σε μήκος κύματος 450nm. Η ακρίβεια και επαναληψιμότητα του συγκεκριμένου σκευάσματος ορίζεται από τον κατασκευαστή στα 1.6% και 2.0% (intra-assay CV και inter-assay CV αντίστοιχα), ενώ το όριο ανίχνευσης είναι τα 130mmol/L.

Δεδομένου του ότι οι ενεργές ρίζες οξυγόνου μεταβολίζονται ταχέως in vivo, η αξιολόγησή τους αποτελεί μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει μια ευρέως αποδεκτή τεχνική για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης ενός οργανισμού, ποικίλες έμμεσες μέθοδοι χρησιμοποιούνται έως του παρόντος, κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο. Άλλες μελέτες έχουν προσδιορίσει την μη-πρωτεϊνική TAC (ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, βιταμίνη C, πολυφαινόλες), αλλά όχι την πρωτεϊνική TAC, που αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό συστατικό του ορού, ή σε άλλες μελέτες έχουν καταμετρηθεί μεμονωμένα συστατικά της αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC, όπως η ABTS (2,20-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate). Η συνεισφορά του ουρικού οξέος ορού στην ολική αντιοξειδωτική παγίδευση τοξικών ριζών οξυγόνου TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) είναι μεγαλύτερη από 50%, επηρεάζοντας σημαντικά τα

επίπεδα της TAC. Αντίστοιχα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να εκτιμηθεί μέσω του TOS ή με τον προσδιορισμό των οξειδωτικών παραπροϊόντων λιπιδίων ή πρωτεϊνών. Η μέθοδος TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance method), που έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης δεν μετράει ειδικά την μαλονδαλδεΰδη ή την υπεροξείδωση των λιπιδίων, ενώ η παρουσία και άλλων αλδεϋδών μπορεί να συγχέει τα αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων δεν είναι ειδική για τη σήψη και μπορεί να αποδίδεται και σε άλλες καταστάσεις, όπως οι διαιτητικές συνήθειες ή καθημερινές συμπεριφορές του ασθενή, με αποτέλεσμα να μην κατέχει ικανοποιητική προβλεπτική χρησιμότητα. Έτσι, οι μελέτες που βασίστηκαν σε αυτή τη μέθοδο, ανέφεραν μέτρια ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς δεν συμπεριέλαβαν ταυτόχρονα ασθενείς και υγιείς, και δεν καταμέτρησαν ταυτόχρονα την οξειδωτική και την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, δεδομένων των σύνθετων αλληλεπιδράσεων σε αυτές τις διαδικασίες. Στην παρούσα μελέτη, επίσης καταμετρήθηκε και ο ψευδάργυρος ορού (Zn), ως πρόσθετος δείκτης οξειδωτικού στρες, μέσω φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης (atomic absorption spectrometry) (Perkin Elmer Analyst 800 Atomic Absorption Spectrometer, 940Winter St,Waltham, MA 02451, USA).

Στατιστική Μεθοδολογία

Το στατιστικό εργαλείο G*Power statistical power calculator (Heinrich Heine Universität, Dusseldorf, Germany) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό ενός επαρκούς δείγματος ασθενών {Statistical test ANOVA (F-test): Fixed effects special, main effects and interactions, power =0.80, alpha=0.05, effect size medium (f=0.25). Το υπολογιζόμενο ελάχιστο αποδεκτό δείγμα για τη μελέτη ήταν 200 ασθενείς για όλες τις ομάδες (critical F=2.42, non-centrality parameter λ=12.5, denominator df=195}.

Τα περιγραφικά στατιστικά των βιοδεικτών ορού παρουσιάζονται για τις τρεις ομάδες της μελέτης (σήψη, μη-λοιμώδης βαριά νόσος και υγιείς μάρτυρες). Οι κατηγορικές μεταβλητές περιγράφονται σε απόλυτες τιμές και ως συχνότητες. Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται με τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση (στις περιπτώσεις που οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή), ή με τη διάμεσο τιμή και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (στις περιπτώσεις μη πλήρωσης των προϋποθέσεων κανονικής κατανομής). Το τεστ Shapiro-Wilk χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της προσαρμογής των μεταβλητών στην κανονική κατανομή. Το στατιστικό μέτρο Levene's test (homogeneity of group variances) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ισότητας των διακυμάνσεων των μεταβλητών (ομοσκεδαστικότα). Η σύγκριση ποσοστιαίων αναλογιών κατηγορικών διμεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία chi-square (x^2), ενώ η συνάφεια αριθμητικών συνεχών διμεταβλητών προσδιορίστηκε με τους δείκτες Pearson και Spearman, σε παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμασίες αντίστοιχα. Η ανάλυση ANOVA, με τη διόρθωση Tukey's και Games-Howell post hoc tests, χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή παραμετρικών συγκρίσεων μεταξύ των

ομάδων. Αντίστοιχα, στην περίπτωση που επιλέχθηκαν μη-παραμετρικές δοκιμασίες, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Mann-Whitney U-test για την μη-παραμετρική σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων, ή η ανάλυση Kruskal-Wallis με το Dunn's post hoc pairwise test για πολλαπλές συγκρίσεις, σε περίπτωση μεταβλητών με περισσότερες από 3 υποομάδες.

Μοντέλα πολυπαραγοντικής γραμμικής παλινδρόμησης (backward method) εξέτασαν εάν οι υπό μελέτη μεταβλητές σχετίζονταν ανεξάρτητα με την οξειδωτική κατάσταση (TOS, TAC) των ασθενών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μονοπαραγοντικά μοντέλα για να ελέγξουν όλες τις κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, που σχετίζονταν με τους δείκτες οξειδωτικού στρες, και, εν συνεχεία, όλες οι μεταβλητές που επέδειξαν συσχετίσεις της τάξεως $p<0.1$ συμπεριλήφθηκαν σε πολυπαραγοντικό μοντέλο παλινδρόμησης. Επίσης, μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης (backward method) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάδειξη των ανεξάρτητων μεταβλητών διαγνωστικής διάκρισης της σήψης και της θνητότητας στη σήψη.

Για την αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των μεταβλητών στην πρόβλεψη της σηπτικής κατάστασης ή της θνητότητας στη σήψη, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση υπολογισμού του εμβαδού κάτω από την καμπύλη ROC (area under receiver operating characteristic curve- AUROC), για τις μεταβλητές που διέφεραν σημαντικά μεταξύ σηπτικών ή μη-σηπτικών ασθενών. Το βέλτιστο κατώφλι τιμών με την καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα για τον λόγο TOS/TAC υπολογίστηκε μέσω του δείκτη Youden (Youden index- J) και επιβεβαιώθηκε μέσω των αναγνωρισμένων κριτηρίων του Closest to (0,1) Criteria (ER) (153). Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ 2 εμβαδών AUROC αξιολογήθηκαν μέσω του εργαλείου z-test.

Σε όλες τις αναλύσεις, στατιστικά σημαντική ορίστηκε η τιμή του p (p-value) μικρότερη του 0,05. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (version 26, SPSS, Chicago, IL, USA).

Αποτελέσματα

Περιγραφική Στατιστική Ανάλυση

- Δημογραφικά Χαρακτηριστικά Ασθενών

Ένας συνολικός αριθμός 328 βαρέως πασχόντων ενήλικων ασθενών εξετάσθηκαν σε πρώτη φάση, ωστόσο οι 71 από αυτούς τους ασθενείς αποκλείστηκαν, λόγω μη εκπλήρωσης των κριτηρίων συμμετοχής στην παρούσα μελέτη. Έτσι, ο ενήλικος πληθυσμός της παρούσας μελέτης, συμπεριέλαβε 145 ενήλικες ασθενείς με σήψη/σηπτική καταπληξία {85 άνδρες (59%) και 60 γυναίκες (41%}, 112 ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (Τ) (80% άνδρες) και 89 υγιείς μάρτυρες (56% άνδρες). Δεν καταγράφηκαν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες σε σχέση με τις βασικές κατηγορίες συννοσηροτήτων (παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, αλλεργίες, χρόνια νοσήματα). Κοινοί εργαστηριακοί βιοδείκτες, ενδεικτικοί συστηματικής φλεγμονής (CRP και προκαλσιτονίνη) ή στρες (γλυκόζη) ανευρέθηκαν σημαντικά αυξημένοι στην ομάδα της σήψης. Στον **Πίνακα 3** αναγράφονται τα δημογραφικά και τα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία για τον ενήλικο πληθυσμό της μελέτης.

Αντίστοιχα, στον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης συμπεριλήφθηκαν 221 παιδιά (n=67 για τα σηπτικά παιδιά, n=116 για τα παιδιά με μη λοιμώδη βαριά νόσο και n=38 για τους παιδιατρικούς υγιείς μάρτυρες). Όπως φαίνεται από τα δημογραφικά στοιχεία του **Πίνακα 4**, που αναφέρεται στον παιδιατρικό πληθυσμό, τα αγόρια του δείγματος ήταν 146 (66.1%) και τα κορίτσια 75 (33.9%). Η μέση τιμή της ηλικίας των παιδιών που έλαβαν μέρος στη μελέτη ήταν 8.8 έτη με τυπική απόκλιση 6.5 έτη. Στην ομάδα των σηπτικών παιδιών, καταγράφηκε υπεροχή των θηλέων (61.2%), ενώ στην ομάδα της μη λοιμώδους φλεγμονής υπήρχε ποσοστιαία υπεροχή των αρρένων βαρέως πασχόντων (80.2%) στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 3. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα του ενήλικου πληθυσμού της μελέτης

	Μάρτυρες (Υ)	Μη λοιμώδης βαριά νόσος (Τ)	Σήψη (Σ)	
	N=89	N=112	N=145	p-value #
Ηλικία, έτη, mean ± SD	40.3 ± 14.4**	40.8 ±15.7*	62.2 ± 15.6	**0,001**
Φύλο, Α/Γ (%)	39/50 (44/56)	23/89 (20/80)	60/85 (41/59)	0,478
ICU LOS, days, mean ± SD		21 ± 20.8	25 ± 21.9	0,636
Θνητότητα ΜΕΘ, n (%)		9 (8)	42 (30) †	**0,001**
APACHE score, mean ± SD		15 ±5.6	22.4 ±8.1 †	**0,001**
SOFA score, mean ± SD		8.3 ± 2.7	10 ± 3 †	**0,001**
SAPS score, mean ± SD		48.8 ± 9.9	71.5 ± 13.3 †	**0,001**
WBC x10^3, mean ± SD		12.7 (9.5–16.7)	13.9 (8.6–20)	0,037
Lactate, mg/dl, median (IQR)		4.3 (2–13)	4.7 (1.9–23)	**0,013**
CRP, mean ± SD		9.9 (4.1–37.4)	25.6 (13–89) †	**0,001**
Glucose (mg/dL), median (IQR)		147 (129–189)	195 (134–267) †	**0,003**
Albumin (mg/dL), median (IQR)		3.1 (2.7–3.5)	2.6 (2.3–2.9) †	**0,001**
Urea (mg/dL), median (IQR)		28 (20–39)	83 (48.2–133) †	**0,001**
Creatinine (mg/dL), median (IQR)		0.81 (0.7–1.1)	1.72 (1.1–2.9) †	**0,001**
Procalcitonin (ng/mL), median (IQR)		0.77 (0.44–1.82)	5 (1.14–28.8) †	**0,011**

Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (ANOVA, Kruskal–Wallis, x^2 test, ανάλογα με το είδος των συγκρινόμενων μεταβλητών): Διαφορές Post hoc: *control-SIRS, **control-sepsis, †SIRS-sepsis. SIRS systematic inflammatory response syndrome, IQR interquartile ratio, ICU intensive care unit, LOS length of stay, WBC white blood cells, CRP C-reactive protein, IL Interleukin, SD standard deviation. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 95% ($p<0.05$).

Πίνακας 4. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα του παιδιατρικού πληθυσμού της μελέτης.

	Μάρτυρες (Υ)	Μη λοιμώδης βαριά νόσος (Τ)	Σήψη (Σ)	
Μεταβλητή	**N=38**	**N=116**	**N=67**	**p-value #**
Ηλικία, έτη, mean (SD)	9.1 (3.77)	9.12 (4.84)	6.8 (5.52) †, **	**0,008**
Φύλο, Α/Γ (%)	27/11 (71.1/28.9)	93/23 (80.2/19.8) †	26/41 (38.8/61.2), *	**0,001**
ICU LOS, days, median (IQR)		9 (6-13)	22 (10-68) †	**0,001**
Θνητότητα ΜΕΘ, n (%)		6 (5,9)	15 (19) †	**0,001**
PRISM score, median (IQR)		10 (7-16)	18 (8-25) †	**0,001**
PELOD score, median (IQR)		2 (1-13)	21 (2-51) †	**0,001**
WBC,x10³, mean ± SD		10,95 ± 5	15,4 ± 9,9 †	**0,004**
Lactate, mg/dl, median (IQR)		5,2 (2,3-8,1)	16,2 (8,5-39,6) †	**0,001**
CRP, median (IQR)		2,6 (0,67-10)	9,5 (3,7-18,1) †	**0,001**
Glucose (mg/dL), mean ± SD		135 ± 47	123 ± 29,3	0,388
Albumin (mg/dL), median (IQR)		3,3 (3–3,6)	2,5 (2,8–3,1) †	**0,001**
Urea (mg/dL), median (IQR)		22 (18-28))	20 (12,5-38,5)	0,463
Creatinine (mg/dL), median (IQR)		0,5 (0.42–0,7)	0,4 (0,4-0,5) †	**0,001**

Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (ANOVA, Kruskal–Wallis, x2 test, ανάλογα με το είδος των συγκρινόμενων μεταβλητών): Διαφορές Post hoc: *control-SIRS, **control-sepsis, †SIRS-sepsis. SIRS systematic inflammatory response syndrome, IQR interquartile ratio, ICU intensive care unit, LOS length of stay, WBC white blood cells, CRP C-reacting protein, IL Interleukin, SD standard deviation. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 95% (p<0.05).

Στατιστικά αποτελέσματα

- Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες

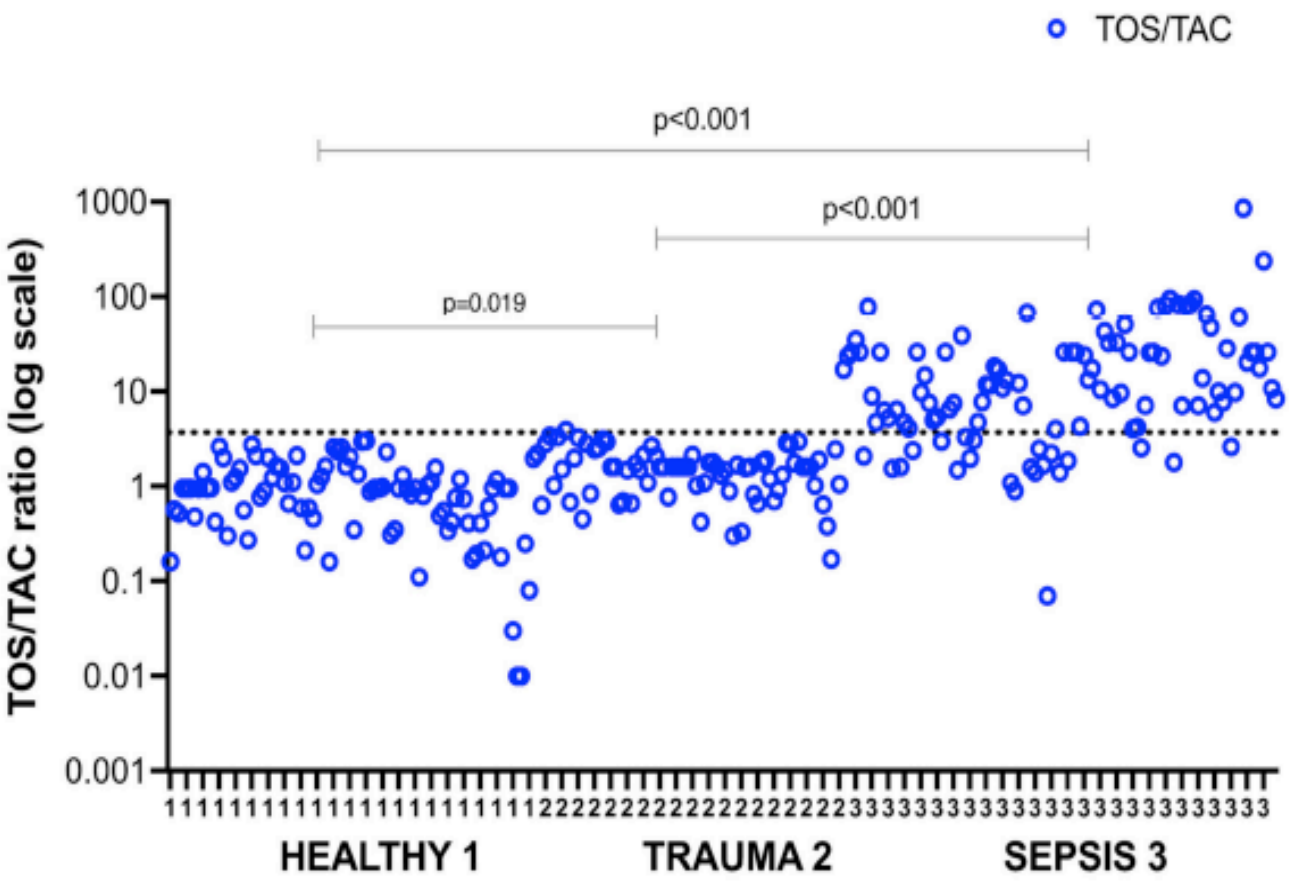
Οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες του ενήλικου πληθυσμού, αναφορικά με τα βιομόρια που μετρήθηκαν στη μελέτη, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**. Ο λόγος της οξειδωτικής κατάστασης ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα (TOS/TAC) ανευρέθηκε αυξημένος στην ομάδα της σήψης, (p<0.001) **(Εικόνα 22)**. Έτσι, ο δείκτης οξειδωτικού στρες (TOS) ήταν αυξημένος στους σηπτικούς ασθενείς (Σ), συγκριτικά με τους ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (Τ) και την ομάδα ελέγχου (Υ) (διάμεση τιμή/median= 1222 μmol/L με ενδοτεταρτημοριακό εύρος/IQR= 493-2022μmol/L για την ομάδα της σήψης, συγκριτικά με τη διάμεση τιμή της ομάδας της μη λοιμώδους φλεγμονής (Τ) (median= 315- IQR= 175-510μmol/L) και της ομάδας ελέγχου (median= 206, IQR= 99-340μmol/L) **(Εικόνα 23Α)**. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (TAC) ανευρέθηκε μειωμένη για την ομάδα της σήψης (median= 162.3, IQR= 72-200.6μmol/L), συγκριτικά με την ομάδα Τ (median= 207, IQR= 175.7-270.1μmol/L) και την ομάδα των υγιών μαρτύρων (median= 219, IQR= 188.6-320μmol/L) **(Εικόνα 23Β)**. Αναφορικά με την αποπτωτική κατάσταση των ενήλικων ασθενών, καταγράφηκε ταυτόχρονη τάση μεταγραφικής υπερέκφρασης τόσο της επαγόμενης από το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάσης-9 (p= 0.047), όσο και της εκτελεστικής κασπάσης-3 στη σηπτική ομάδα (p< 0.021), συγκριτικά με τις ομάδες Τ και Υ **(Εικόνα 24Α,Β)**. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία, δεν φάνηκε να υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση των επιπέδων της κασπάσης-8, της πρωτεΐνης που εκφράζει το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ανάμεσα στις ομάδες υγιών ή ασθενών. Αντίθετα, η αποπτωτική Bax πρωτεΐνη ανευρέθηκε σημαντικά μειωμένη στους ενήλικες σηπτικούς ασθενείς (p= 0.04), συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της αποπτωτικής Smac/Diablo δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες.

Στο αντιαποπτωτικό σκέλος της μελέτης, τα επίπεδα ορού για την πρωτεΐνη survivin ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στην ομάδα της σήψης, εν συγκρίσει με τις ομάδες ελέγχου (Τ και Υ) (p<0.027- **Εικόνα 24C**). Σε σχέση με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης survivin, οι ισομορφές -2Β, -ΔEx3 και -WT ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένες (p<0.001), ενώ αντίθετα η ισομορφή -3Β ανευρέθηκε σημαντικά μειωμένη (p= 0.025) στους ενήλικες σηπτικούς ασθενείς συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (Τ και Υ) **(Εικόνα 25)**. Αναφορικά με τον άλλον αντιαποπτωτικό συμπαράγοντα (XIAP), στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε η αυξητική τάση της αντιαποπτωτικής XIAP στη σηπτική ομάδα, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες, χωρίς όμως αυτή η τάση να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα (**Εικόνα 26**).

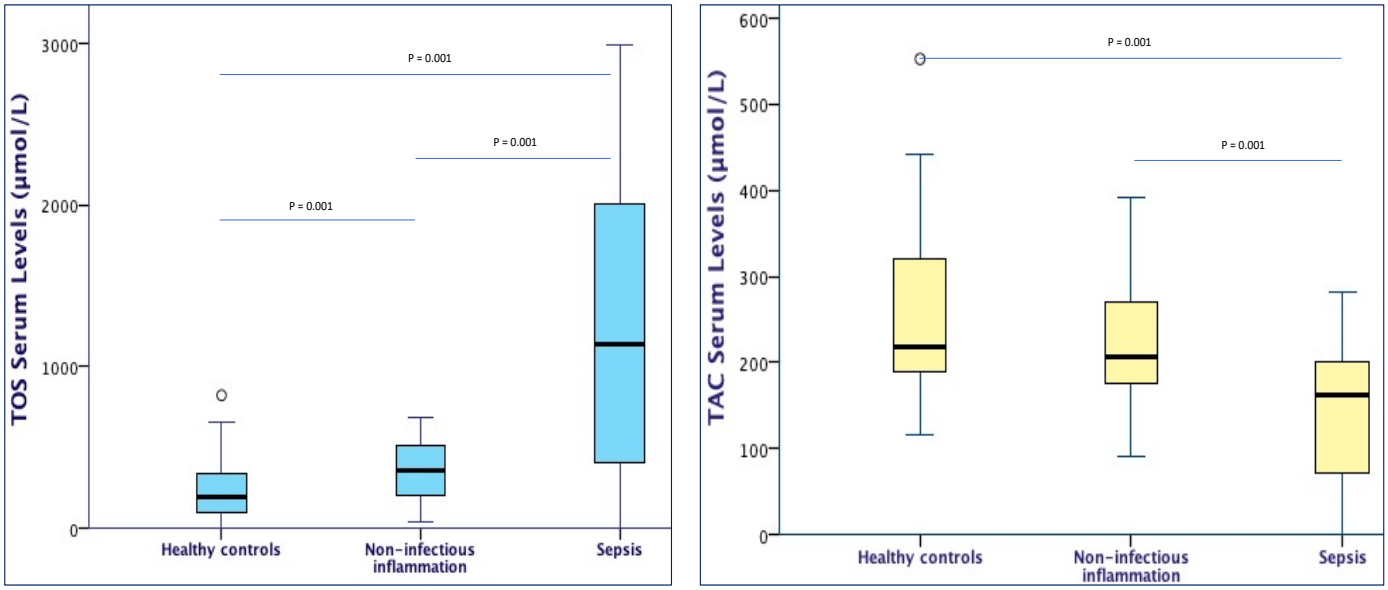
Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά βιομόρια που αντιπροσωπεύουν οξειδωτικό στρες, φυσική ανοσία και αποπτωτικά ή αντιαποπτωτικά μονοπάτια στον ενήλικο πληθυσμό της μελέτης.

	Υγιείς Μάρτυρες median (IQR)	Μη λοιμώδης Φλεγμονή Median (IQR)	Σήψη Median (IQR)	
Μεταβλητή	**N=89**	**N=112**	**N=145**	**p-value #**
Λόγος TOS/TAC	0.82 (0.40–1.40) **	1.49 (0.81–2.20) *	8.90 (4.05–24.9) †	**0.001**
TOS (mol/L)	206 (99–340) **	315.6 (175–510) *	1222 (493–2022) †	**0.001**
TAC (mol/L)	219 (188.6–320) **	207 (175.7–270.1)	162.3 (72–200.6) †	**0.001**
IL-6 (pg/mL)	1.65 (1.18–6.18) **	77.2 (24–200.5) *	120.4(44–498) †,**	**0.001**
IL-8 (pg/mL)	53.5 (27.3–141.2) **	50.5 (27-102.7)	114.2 (57–209) †,**	**0.016**
IL-10 (pg/mL)	1.07 (0.01–5.1) **	3.58 (0.01–11.2) *	14.3 (4.25–38.4) †,**	**0,001**
IL-17 (pg/mL)	0.2 (0.2–18)	0.2 (0.2–6.05)	1.49 (0.2–7.25)	0,593
Ψευδάργυρος -Zn (g/dl)	80 (72–93) **	49.5 (35–56.2)	49.5 (37–60.7) **	**0,001**
Survivin protein (pg/mL)	108 (28.6–180) **	140 (99.9–228) *	179 (125–420) †,**	**0,001**
Caspase-3 (ng/mL)	17.3 (9.9–44.4)	11.3 (2.6–37.6)	49.8 (9.3–90) †	**0,020**
Caspase-9 (ng/mL)	91.8 (80.7–105) **	92.7 (86–119)	112 (95.3–146) †,**	**0,014**
Caspase 8 (ng/ml)	8.55 (6.73-8.6)	8.98 (6.63-9.73)	7.27 (5.64-9.71)	0.431
Bax protein (ng/ml)	4.77 (4.15-10.14)	10.88 (8.3-13.1) *	3.72 (2.94-4.65) †	**0.040**
Smac/Diablo (ng/ml)	0.29 (0.18-5.9)	0.29 (0.13-6.4)	0.46 (0.2-5.7)	0.494
XIAP (ng/ml)	10.2 (4.1-80.3)	0.36 (0.13-0.5)	29.73 (0.5-160.6)	0.084
Survivin-WT ισομορφή (copies/μL)	0.005 (0.001–0.015) **	0.006 (0.001–0.019)	0.046 (0.005–0.2) †,**	**0,001**
Survivin-2B ισομορφή (copies/μL)	5.7 (2.4–11.3) **	10.9 (6.7–18.2) *	20.6 9.2–35.4) †,**	**0,001**
Survivin-ΔEx3 ισομορφή (copies/μL)	0.005 (0.003–0.016) **	0.011 (0.003–0.034)	0.08 (0.01–0.36) †,**	**0,001**
Survivin-3B ισομορφή (copies/μL)	0.1 (0.01–0.25)	0.26 (0.03–0.57) *	0.11 (0.02–0.27) †	**0,025**

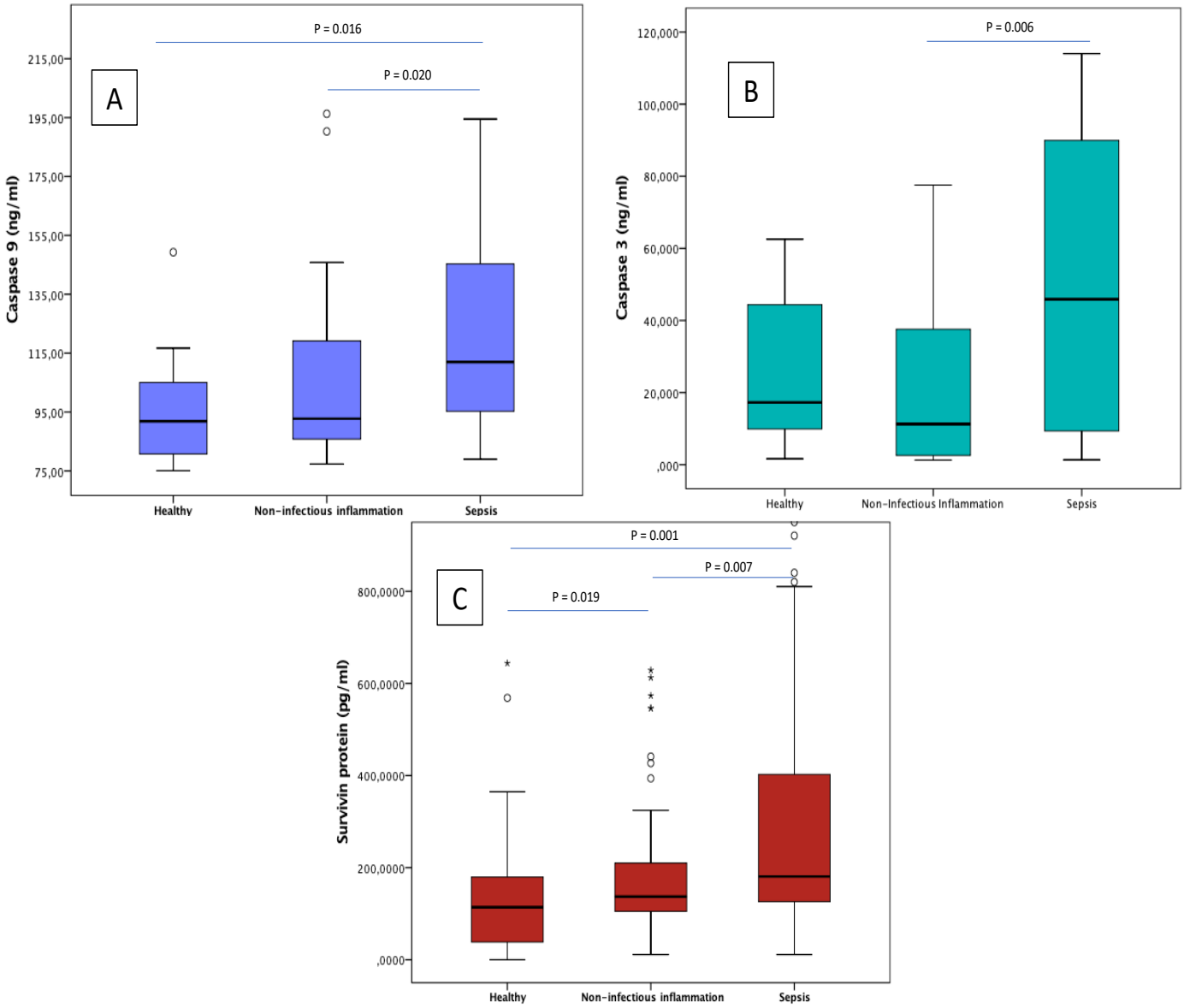
Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (ANOVA, Kruskal–Wallis, x2 test, ανάλογα με το είδος των συγκρινόμενων μεταβλητών): Διαφορές Post hoc: *control-SIRS, **control-sepsis, †SIRS-sepsis. TOS = Total Oxidative Stress, TAC = Total antioxidant capacity, IQR = Interquartile Range, IL = Interleukin. Bax= Bcl-2-associated X-protein, XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein, Smac/Diablo= Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with Low pI



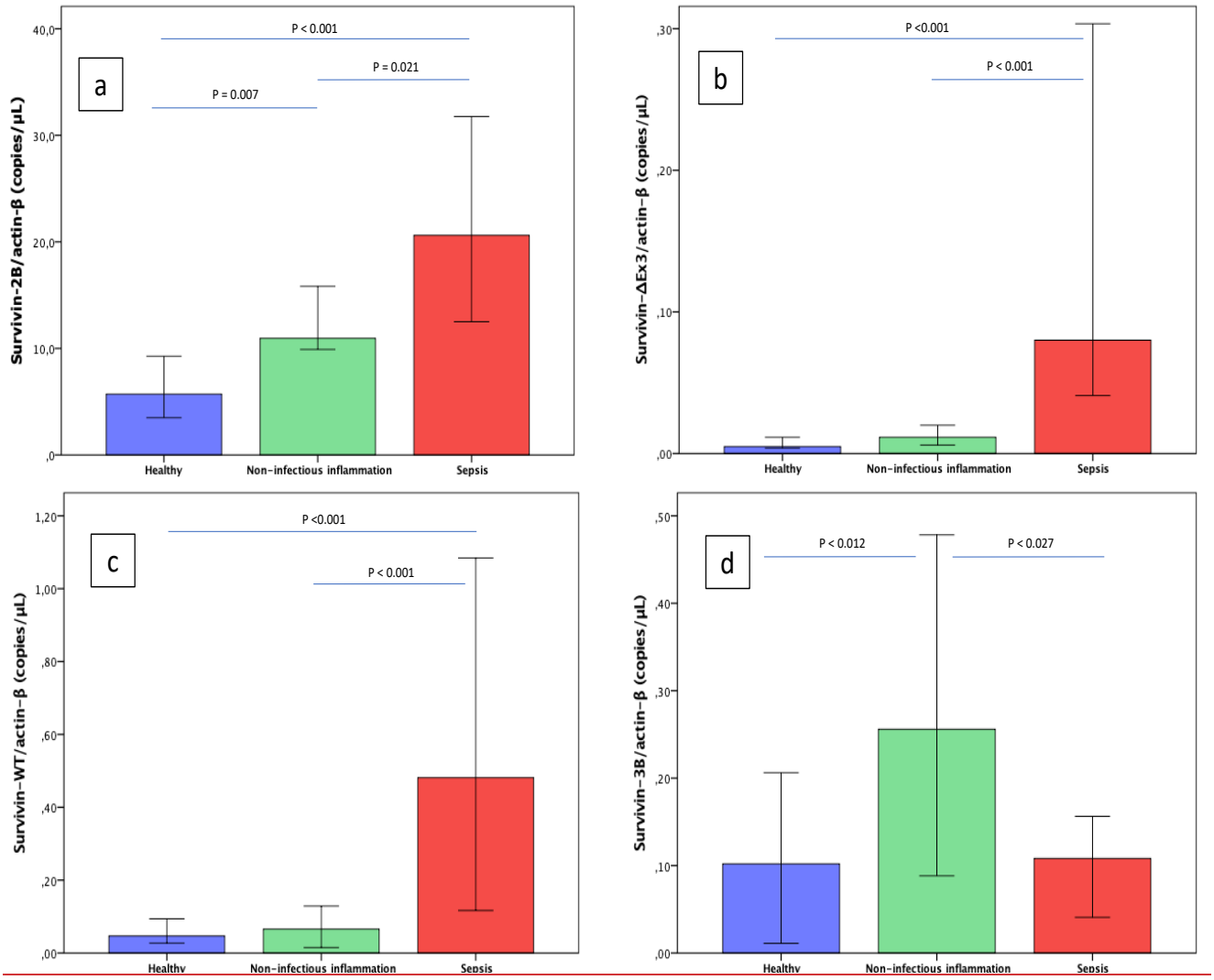
Εικόνα 22. Καταγραφές από μεμονωμένες τιμές του λόγου TOS/TAC (μπλε κουκίδες) για τους σηπτικούς ενήλικες ασθενείς (λογαριθμική κλίμακα) σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (trauma) και υγιείς μάρτυρες (healthy). Η διακεκομμένη μαύρη γραμμή παρουσιάζει το κατώφλι του λόγου TOS/TAC, όπως προσδιορίστηκε από τον δείκτη Youden στην ανάλυση ROC. Οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές post hoc διαφορές ανάμεσα στις ομάδες.



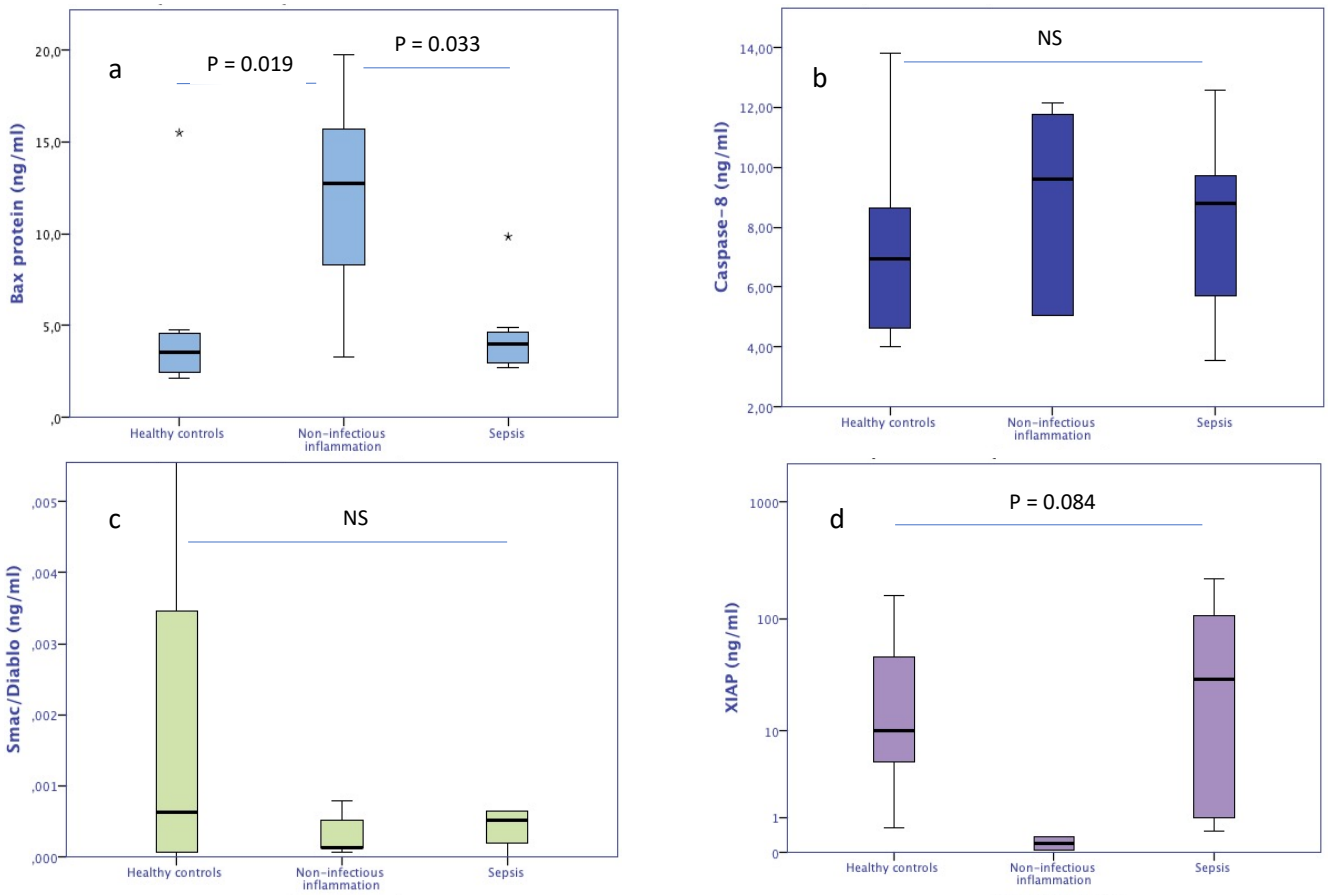
Εικόνα 23. Θηκογράμματα (boxplots) με τις διάμεσες τιμές ολικού οξειδωτικού στρες (TOS) και ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης (TAC) ορού από σηπτικούς ενήλικους ασθενείς (sepsis), σε σύγκριση με ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (trauma/surgery) και υγιείς μάρτυρες (healthy controls). Οι μαύρες γραμμές στα θηκογράμματα δείχνουν τη διάμεσο τιμή για κάθε ομάδα, ενώ το κατώτερο μέρος του θηκογράμματος την 25^{η} ΕΘ και το ανώτερο την 75^{η} ΕΘ. Οι μπάρες σε σχήμα Τ (whiskers) και οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν την ελάχιστη και μέγιστη τιμή, ενώ οι συνδετικές γραμμές καταδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (post hoc αναλύσεις με το εργαλείο Dunn's pairwise test, με διορθώσεις Bonferroni).



Εικόνα 24. Θηκογράμματα (boxplots) με τις διάμεσες τιμές στον ορό ενήλικων σηπτικών ασθενών, σε σύγκριση με ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (non-infectious inflammation) και υγιείς μάρτυρες (healthy controls), για τις πρωτεΐνες Α) αποπτωτική καση-9, Β) εκτελεστική αποπτωτική καση-3 και C) αντιαποπτωτική πρωτείνη survivin. Οι μαύρες γραμμές στα θηκογράμματα δείχνουν τη διάμεσο τιμή για κάθε ομάδα, ενώ το κατώτερο μέρος του θηκογράμματος την 25η ΕΘ και το ανώτερο την 75η ΕΘ. Οι μπάρες σε σχήμα Τ (whiskers) και οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν την ελάχιστη και μέγιστη τιμή, ενώ οι συνδετικές γραμμές καταδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (post hoc αναλύσεις με το εργαλείο Dunn's pairwise test, με διορθώσεις Bonferroni).



Εικόνα 25. Ποσοτικοποίηση γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών της πρωτεΐνης survivin a) 2B, b) ΔEx3, c) WT και d) 3B, για την ομάδα των ενήλικων σηπτικών ασθενών, σε σύγκριση με ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (trauma/surgery) και υγιείς μάρτυρες (healthy controls). Οι συνδετικές γραμμές ανάμεσα στα ραβδογράμματα (bars) καταδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (post hoc αναλύσεις με το εργαλείο Dunn's pairwise test, με διορθώσεις Bonferroni).



Εικόνα 26. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικής έκφρασης των αποπτωτικών συμπαραγόντων a) Bax πρωτεΐνης, b) κασπάσης-8, c) Smac/Diablo και d) του αντιαποπτωτικού συμπαράγοντα XIAP για την ομάδα των ενήλικων σηπτικών ασθενών, σε σύγκριση με ενήλικους ασθενείς με μη λοιμώδη βαριά νόσο (trauma/surgery) και υγιείς μάρτυρες (healthy controls). Οι συνδετικές γραμμές ανάμεσα στα θηκογράμματα (boxplots) καταδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (post hoc αναλύσεις με το εργαλείο Dunn's pairwise test, με διορθώσεις Bonferroni).

Όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, και σύμφωνα με τα στοιχεία που παρατίθενται στον **Πίνακα 6**, οι ασθενείς με σήψη παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά (p=0.022) υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin στον ορό (διάμεση τιμή= 158pg/ml, IQR= 100-444), συγκριτικά με τις δύο ομάδες ελέγχου (ομάδα Τ με διάμεση τιμή της survivin 122.7pg/ml και ομάδα Υ με διάμεση τιμή 118.6pg/ml. Αναφορικά με τις γονιδιακές ισομορφές της πρωτεΐνης survivin, το αποπτωτικό μετάγραφο -2B ανευρέθηκε με στατιστικά σημαντική χαμηλότερη έκφραση στην ομάδα της σήψης (p=0.037), συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Επίσης, στους παιδιατρικούς σηπτικούς ασθενείς καταγράφηκαν αυξημένες τιμές της κασπάσης-9 (p=0.017), συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Ωστόσο, δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες για τα υπόλοιπα αποπτωτικά βιομόρια που καταμετρήθηκαν στον παιδιατρικό πληθυσμό.

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά βιομόρια που αντιπροσωπεύουν την αποπτωτική ή αντιαποπτωτική κατεύθυνση στον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης.

Αποπτωτικά και Αντιαποπτωτικά βιομόρια	Υγιείς Μάρτυρες median (IQR)	Μη λοιμώδης Φλεγμονή Median (IQR)	Σήψη Median (IQR)	p-value
Survivin protein (pg/ml)	118.6 (108-123) **	122.7 (98-368)	158 (100-444) †,**	**0,022**
Survivin -2B (copies/ml)	0.1 (0.052-0.26)	0.15 (0.022-3.4)	0.065 (0.052- 0.16) †	**0,037**
Survivin WT (copies/ml)	0.15 (0.12-0.18)	0.16 (0.02-0.87)	0.35 (0.33-0.42)	0,805
Survivin –ΔEx3 (copies/ml)	0.008 (0.006-0.009)	0.032 (0.002-0.21)	0.02 (0.003-0.03)	0,310
Survivin -3B (copies/ml)	0.01 (0.007-0.03)	0.03 (0.004-0.17)	0.15 (0.06- 0.17)	0,396
Caspase 3 (ng/ml)	10.1 (5.4-13.5)	3.86 (2.6-14.2)	3.71 (2.3-6.1)	0,465
Caspase 9 (ng/ml)	165 (125-217.6)	198.5 (150.4-241.4)	218 (163-310) **	**0,017**
Caspase 8 (ng/ml)	9.43 (7.25-12.64)	7.51 (4.5-10.9)	7.9 (5.23-10.52)	0.595
Bax protein (ng/ml)	12.1 (6.54-15.2)	11.34 (4.9-17.5)	11.1 (3.42-20.8)	0.420
Smac/Diablo (ng/ml)	1.7 (0. 5-184)	4.1 (0.5-12.8)	6.9 (0.95-30.1)	0.708
XIAP (ng/ml)	6.62 (0.31-86.3)	28.8 (2.28-40.3)	6.16 (0.56-37.5)	0.384
IL-6 (pg/ml)	15.7 (11.8-24.3) *,**	94.6 (43-181) *	84.6 (24.5-165) **	**0,000**
IL-8 (pg/ml)	38.4 (24-87.4)	97 (65.6-131.7)	62.4 (35.2-108.1)	0,178
IL-10 (pg/ml)	3.7 (2.7-8) *,**	25,4 (12.4-35) *	38 (15.8-66.8) **	**0,002**

Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (Kruskal–Wallis): Διαφορές Post hoc: *control-SIRS, **control-sepsis, †SIRS-sepsis. WT=wild type, IQR= interquartile range, SE= standard error of mean, IL= interleukins, Bax= Bcl-2-associated X-protein, XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein, Smac/Diablo= Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with Low pI. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 95% (p<0.05).

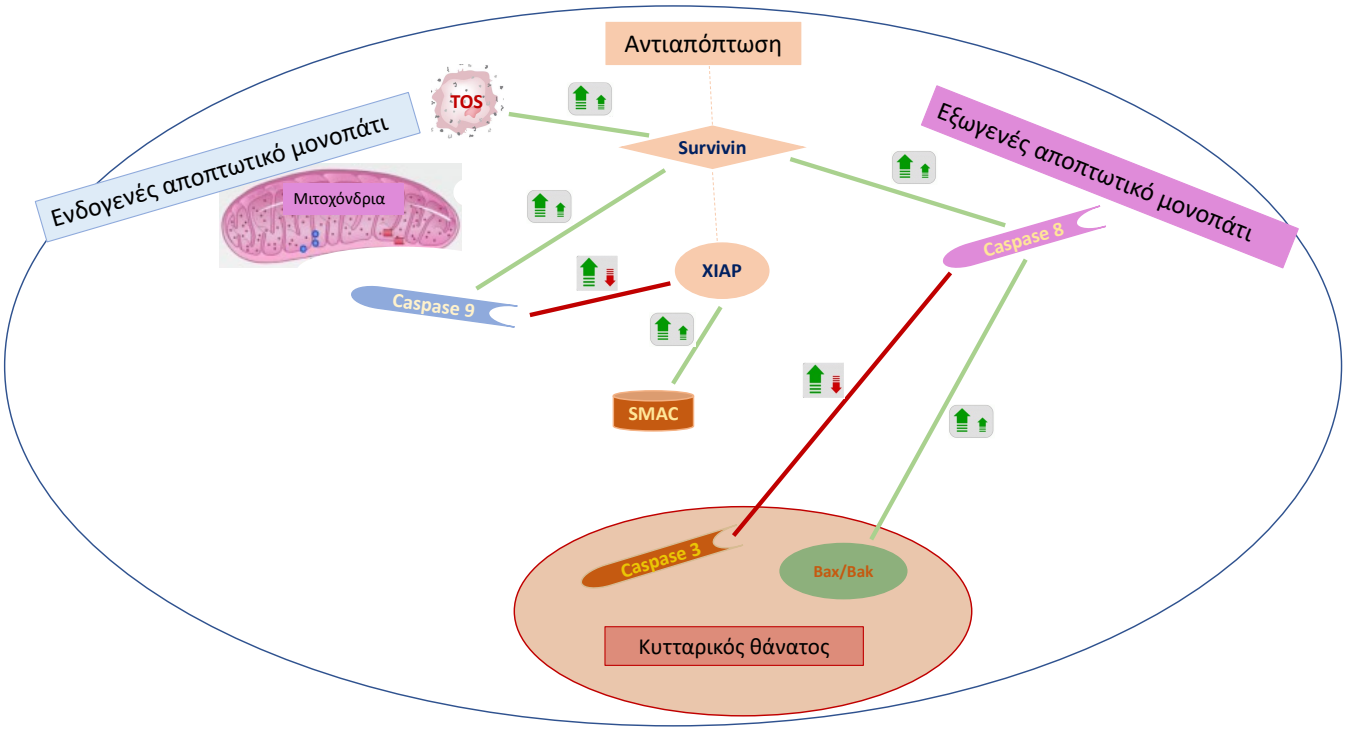
- Συσχετίσεις

Στον ενήλικο πληθυσμό της παρούσας εργασίας, καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην αποπτωτική κασπάση-9 και την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin (Spearman's rho= 0.372, p=0.003), την ισομορφή -WT (r_s= -0.33, p=0.03), τα σκορ βαρύτητας APACHE II, SOFA, SAPS III (r_s= 0.63, p<0.001), καθώς και την προκαλσιτονίνη (r_s= 0.76, p=0.01), αλλά όχι με άλλους κοινούς εργαστηριακούς δείκτες, όπως η CRP ή το γαλακτικό οξύ. Επίσης, σημειώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της αντιαποπτωτικής XIAP και της αποπτωτικής Smac πρωτεΐνης (r_s=0.421, p=0.001). Δεν σημειώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα υπόλοιπα αποπτωτικά ή αντιαποπτωτικά βιομόρια της μελέτης.

Αναφορικά με την οξειδωτική κατάσταση των ενηλίκων ασθενών, δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των οξειδωτικών δεικτών TOS ή TAC με την ηλικία των βαρέως πασχόντων ενήλικων ασθενών (p=0.116). Θετικές συσχετίσεις καταγράφηκαν μεταξύ του λόγου TOS/TAC με την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin (Spearman's rho= 0.19, p=0.009) και τις ισομορφές αυτής -2B, -ΔEx3, -WT (r_s= 0.32-0.4, p<0.009), καθώς και με τα σκορ βαρύτητας (p<0.001) και τους κοινούς εργαστηριακούς δείκτες φλεγμονής, με κυρίαρχη την προκαλσιτονίνη (r_s=0.56, p=0.002). Επίσης, ο δείκτης οξειδωτικού στρες TOS συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα ψευδαργύρου (Zn) (r_s=-0.37, p=0.001) στο αίμα των ενηλίκων ασθενών.

Όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης, η επαγόμενη από το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάση-9 κατέγραψε σημαντική αρνητική συσχέτιση με την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη XIAP (r_s =-0.526, p=0.021), ενώ η αποπτωτική Smac κατέγραψε θετική συσχέτιση με την αντιαποπτωτική XIAP (r_s=0.478, p=0.004), αλλά αρνητική συσχέτιση με την επαγόμενη από το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάση-8 (r_s= -0.294, p=0.05).

Στον συνολικό πληθυσμό της μελέτης, η επαγόμενη από το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάση-8 συσχετίστηκε θετικά με την αποπτωτική Bax πρωτεΐνη (r_s= 0.257, p=0.03). Επίσης, η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη XIAP συσχετίστηκε θετικά με την αποπτωτική Smac (r_s=0.649, p=0.042), αλλά αρνητικά με την επαγόμενη από το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι κασπάση-9 (r_s= -0.527, p=0.025). Οι στατιστικά σημαντικές θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις των καταμετρημένων βιομορίων της μελέτης παρατίθενται σχηματικά στην **Εικόνα 27**.



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση των στατιστικά σημαντικών θετικών ή αρνητικών συσχετίσεων (correlations) των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών βιομορίων, που καταμετρήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία (θετική συσχέτιση, αρνητική συσχέτιση μεταξύ των βιομορίων).

- Συσχετίσεις των βιομορίων της μελέτης με κοινούς εργαστηριακούς δείκτες

Στον ενήλικο πληθυσμό της μελέτης ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταγράφων survivin-2B και ΔEx3 και της προκαλσιτονίνης (Spearman's r_s<0.588, p<0.044 και για τις δύο συσχετίσεις). Οι ίδιες ισομορφές ανευρέθηκαν αρνητικά σχετιζόμενες με τις καταμετρημένες τιμές του ψευδαργύρου ορού (Spearman's r_s< -0.545, p=0.001 και για τις δύο συσχετίσεις). Αντίθετα η C-reactive protein (CRP) ορού ανευρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με την ισομορφή survivin-WT (r_s= 0.258, p=0.03). Αναφορικά με τη νεφρική λειτουργία, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ της ισομορφής survivin-WT, των κασπασών -3 και -9 και της ουρίας ορού (r_s<-0.331, p<0.034 για όλες τις συσχετίσεις) των ενήλικων ασθενών, ενώ η survivin-WT, όπως και η κασπάση-3 ανευρέθηκαν θετικά σχετιζόμενες με την κρεατινίνη ορού (r_s<0.366, p<0.013 για τις συγκεκριμένες συσχετίσεις). Τέλος, αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αλβουμίνης ορού και της survivin-WT καταγράφηκε για τον ενήλικο πληθυσμό (r_s= -0.290, p=0.013).

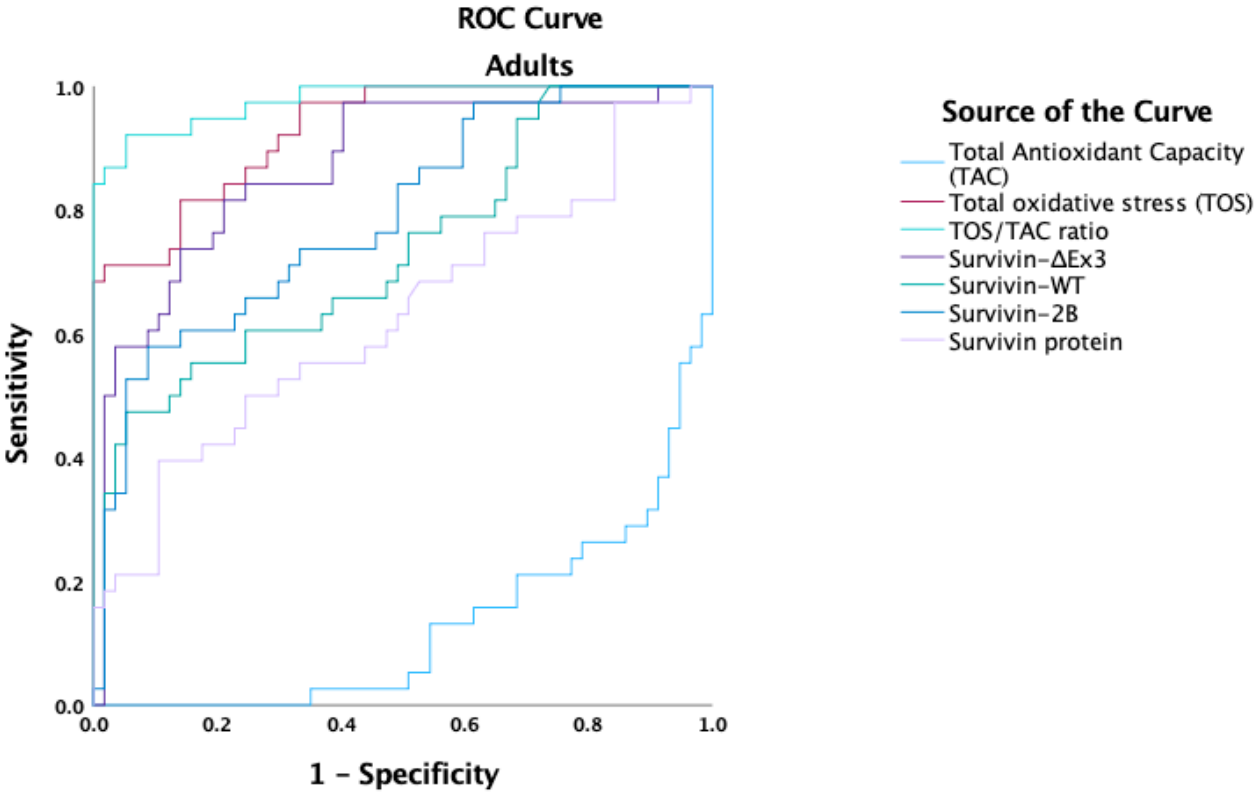
Στον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης καταγράφηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση των μεταγράφων της survivin-2B, -ΔEx3 και -WT με το γαλακτικό οξύ του ορού των ασθενών (Spearman's r_s<0.415, p<0.020 για όλες τις συσχετίσεις). Επίσης, η CRP ανευρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με το μετάγραφο survivin-WT (r_s= 0.417, p=0.034). Αναφορικά με τη νεφρική

λειτουργία, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ της αποπτωτικής Bax πρωτεΐνης και της ουρίας ορού (r_s= -0.634, p=0.020) των παιδιατρικών ασθενών, ενώ η κασπάση-3 ανευρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με την κρεατινίνη ορού (r_s= 0.29, p=0.046).

Δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων ή της γλυκόζης ορού εισαγωγής και των καταμετρημένων βιομορίων της μελέτης, τόσο για τον ενήλικο, όσο και για τον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης.

- Διαγνωστική διάκριση αρχόμενης σηπτικής κατάστασης

Για τη διάκριση της σηπτικής κατάστασης, ο λόγος TOS/TAC, η TOS, η μειωμένη TAC και τα μετάγραφα survivin-2B, -ΔEx3 και -WT επέδειξαν ανεξάρτητη διαγνωστική αξία στη διάγνωση της σήψης. Ο λόγος TOS/TAC πέτυχε το μεγαλύτερο εμβαδόν κάτω από την καμπύλη, με την ανάλυση λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Area Under Receiver operating characteristic curve analysis-AUROC), ίσο με 0.977 (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης= 0.953-1, p<0.001), όπως φαίνεται από την **Εικόνα 28**. Η ROC ανάλυση αποκάλυψε ότι το εμβαδόν για τον λόγο TOS/TAC ($AUC_{TOS/TAC}$) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο, συγκριτικά με τις μεμονωμένες αναλύσεις για την TOS ($AUC_{TOS,}$ z=3.1, p=0.002) ή την TAC ($AUC_{TAC,}$ z=20, p<0.001), στη διάκριση της σήψης από τις δύο ομάδες ελέγχου (μη- λοιμώδης φλεγμονή/βαριά νόσος και υγιείς μάρτυρες). Το βέλτιστο κατώφλι της τιμής του λόγου TOS/TAC προσδιορίστηκε ως 3.963 (ευαισθησία 85% και ειδικότητα 98%), υπολογιζόμενο μέσω του δείκτη Youden (J) και βάσει αναγνωρισμένων κριτηρίων {Closest to (0,1) Criteria (ER)}.



Area Under the Curve[a]

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error[b]	Asymptotic Sig.[c]	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Total Antioxidant Capacity (TAC)	.128	.036	.000	.058	.199
Total oxidative stress (TOS)	.929	.025	.000	.881	.977
TOS/TAC ratio	.977	.013	.000	.953	1.000
Survivin-ΔEx3	.871	.038	.000	.796	.945
Survivin-WT	.736	.053	.000	.632	.840
Survivin-2B	.791	.047	.000	.699	.883
Survivin protein	.630	.060	.032	.512	.748

Εικόνα 28. Καμπύλη ROC και αναλυτικά οι τιμές για το Εμβαδόν Κάτω από την Καμπύλη (Area Under ROC curve- AUROC) των πιθανών προβλεπτικών μεταβλητών για ανάπτυξη σήψης στους ενήλικες βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Ο αυξημένος λόγος TOS/TAC, η πρωτεΐνη survivin και οι γονιδιακές ισομορφές survivin-ΔEx3 και -WT ανευρέθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες σήψης (AUROC>0.736, p<0,05). Ο λόγος TOS/TAC πέτυχε την καλύτερη AUROC (0,977, με 95% Διάστημα εμπιστοσύνης 0,953-1 και p<0,001).

- Ανάλυση αντιστοίχισης τάσης βαθμολογίας (Propensity score) για τον λόγο TOS/TAC

Λόγω της αδυναμίας εξομοίωσης (matching) των ομάδων της μελέτης ως προς τις σημαντικότερες μεταβλητές, που θα μπορούσαν να επιδρούν στα αποτελέσματα, οι πιο σημαντικοί πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες (ηλικία και φύλο) συνεκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου αντιστοίχισης τάσης βαθμολογίας (propensity score analysis) σε μοντέλο διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης. Στην εν λόγω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή ο λόγος TOS/TAC (οριζόμενη ως δίτιμη μεταβλητή, με κατώφλι την τιμή 3.963, όπως υπολογίστηκε από τον δείκτη Youden κατά τη ROC ανάλυση), ούτε το propensity score για την ηλικία και το φύλο (p=0.421), ούτε το SOFA score (p=0.157) δεν φάνηκαν να σχετίζονται με τις μεταβολές του λόγου TOS/TAS, σε αντίθεση με τη σήψη, η οποία αποτελούσε τον κύριο παράγοντα που επηρέαζε τον λόγο TOS/TAC (Exp(B)=8.011, p<0.001) **(Πίνακας 7)**. Η διασπορά των τιμών του λόγου TOS/TAC για τις μεμονωμένες περιπτώσεις όλων των ομάδων της μελέτης παρατίθεται σχηματικά στην **Εικόνα 22**. Έτσι, στους σηπτικούς ασθενείς, η διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικής κατάστασης/αντιοξειδωτικής ικανότητας φαίνεται να κατανέμεται άνωθεν της βασικής τιμής, που ορίστηκε ως κατώφλι, όπως έχει ήδη αναφερθεί (p<0.001), ενώ κάτωθεν της βασικής τιμής κατανέμονται οι περιπτώσεις που ανήκαν στις δύο ομάδες ελέγχου (μη λοιμώδης φλεγμονή και υγιείς μάρτυρες).

Πίνακας 7. Μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης με συνεκτίμηση της αντιστοίχισης τάσης βαθμολογίας των πιο γνωστών συγχυτικών παραγόντων και εξαρτημένη μεταβλητή τον διχοτομημένο λόγο TOS/TAC.

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1[a]	Propensity score	-63,902	79,386	,648	1	,421	,000	,000	6,623E+39
	Φύλο	,120	,484	,061	1	,804	1,128	,436	2,913
	Ηλικία	,374	,466	,642	1	,423	1,453	,583	3,623
	Sofa score	-,068	,046	2,159	1	,142	,935	,854	1,023
	Σήψη	2,081	,347	36,037	1	,000	8,011	4,061	15,803
	Constant	10,292	17,866	,332	1	,565	29483,709		

- Πρόβλεψη θνητότητας

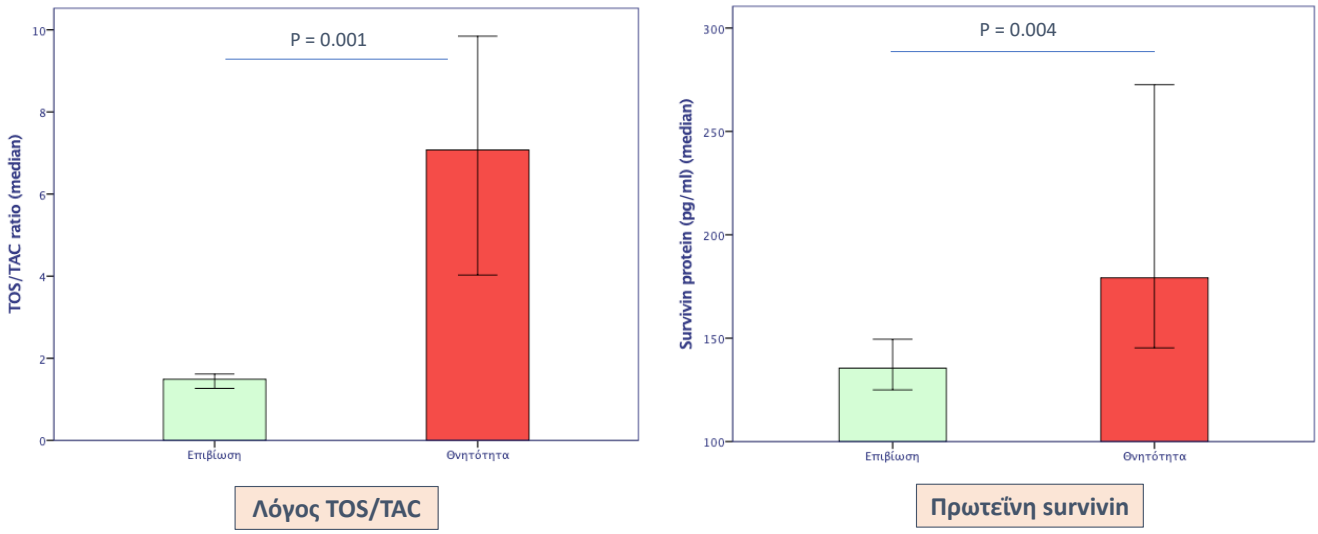
Ο λόγος TOS/TAC, οι παράμετροι TOS και TAC, η πρωτεΐνη survivin στον ορό των ενήλικων ασθενών (p< 0.004), όπως και τα μετάγραφα -2B και -WT ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στην ομάδα των αποβιωσάντων ενηλίκων σηπτικών ασθενών (p<0.022), εν συγκρίσει με όσους σηπτικούς ασθενείς επέζησαν **(Εικόνα 29)**. Επίσης, στην ομάδα των ασθενών που δεν κατάφεραν να επιβιώσουν καταγράφηκε αυξητική τάση για τις αντιαποπτωτικές XIAP και survivin (στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο για την survivin), αλλά πτωτική τάση για τις αποπτωτικές κασπάση-8 και Bax στους αποβιώσαντες, συγκριτικά με τους επιζήσαντες ασθενείς, χωρίς ωστόσο να καταγράφονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες έκβασης για τους αποπτωτικούς και αντιαποπτωτικούς συμπαράγοντες της μελέτης **(Πίνακας 8)**. Αντίστοιχα, και στις δύο ομάδες βαριάς νόσου των ενηλίκων (σήψη και μη-λοιμώδης φλεγμονή στη ΜΕΘ) καταγράφηκαν αυξητικές τάσεις των Smac και XIAP, αλλά πτωτική τάση της Bax για όσους δεν επιβίωσαν, χωρίς στατιστικές διαφορές αναφορικά με τη θνητότητα. Όσον αφορά τους παιδιατρικούς ασθενείς, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των καταμετρημένων βιομορίων ανάμεσα στις ομάδες έκβασης, με μόνη εξαίρεση τη στατιστικά σημαντική πτωτική τάση της πρωτεΐνης Bax για τα παιδιά που δεν επιβίωσαν **(Εικόνα 30)**. Στην πρόβλεψη της θνητότητας, ο λόγος TOS/TAC πέτυχε το καλύτερο εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC (AUROC= 0.787, 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης 0.695-0.878, p<0.001) **(Εικόνα 31)**.

Βάσει των ανωτέρω, σχεδιάστηκε η καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα της μελέτης, τον λόγο TOS/TAC. Από το διάγραμμα της μελέτης επιβίωσης φανερώνεται ότι οι ασθενείς, που παρουσίαζαν τιμή TOS/TAC >3.963 παρουσίαζαν σαφώς μικρότερη πιθανότητα επιβίωσης, συγκριτικά με τις χαμηλότερες τιμές του λόγου TOS/TAC (log rank chi-square =15.063, Exp (B)= 2.669, 95% CI= 1.59-4.47, p=0.001) **(Εικόνα 32)**.

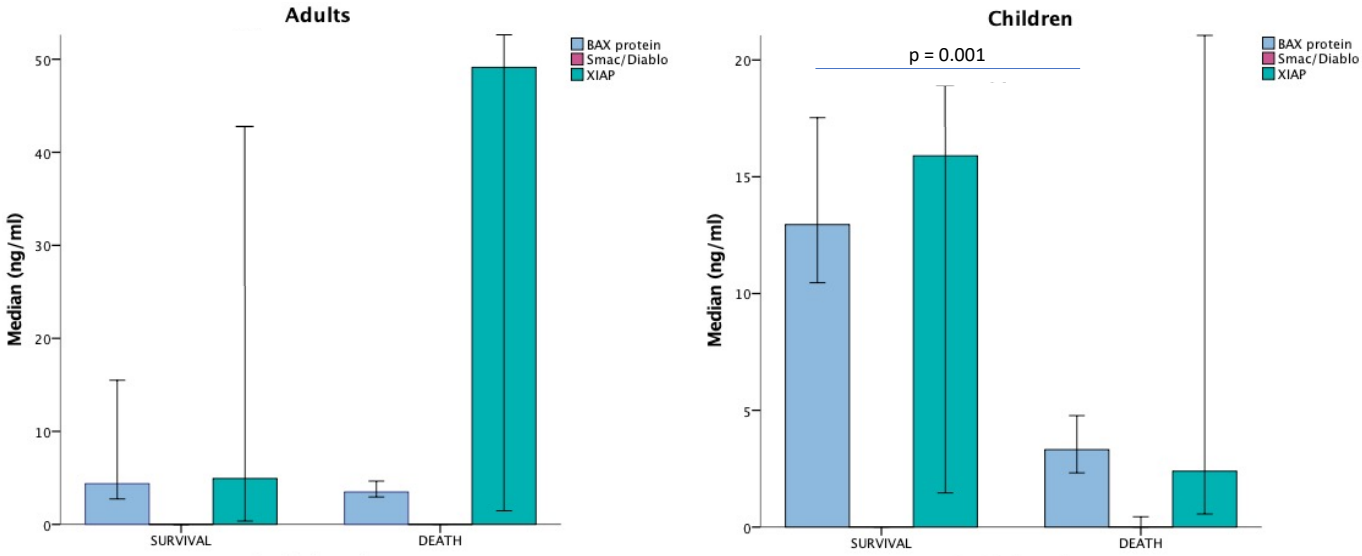
Πίνακας 8. Διαφορές των καταμετρημένων βιομορίων, που αντιπροσωπεύουν οξειδωτικό στρες, φυσική ανοσία και αποπτωτικά ή αντιαποπτωτικά μονοπάτια, αναφορικά με τη θνητότητα στον ενήλικο πληθυσμό της μελέτης.

Μεταβλητή	Επιβίωση median (IQR)	Θνητότητα Median (IQR)	
Λόγος TOS/TAC	1.52 (0.7–3)	7.5 (3.2–26)	**0.001**
TOS (mol/L)	318 (172.5–568)	1243 (505–2104)	**0.001**
TAC (mol/L)	197 (160–257)	142 (72–258)	**0.001**
IL-6 (pg/mL)	32 (3.7–130)	64 (26–310)	**0.002**
IL-8 (pg/mL)	60.6 (30–168)	77.8 (51.4–126)	0.785
IL-10 (pg/mL)	9 (1.2–20)	13.9 (1.5–55)	0,148
Zinc (μg/dl)	56 (41–76)	55.5 (43–66)	0,409
Survivin protein (pg/mL)	138 (39.2–460)	408.8 (133–762)	**0,004**
Survivin-WT isoform (copies/L)	0.007 (0.002–0.03)	0.022 (0.004–0.27)	**0,022**
Survivin-2B isoform (copies/L)	0.07 (0.01–0.16)	0.25 (0.1–0.33)	**0,021**
Survivin-ΔEx3 isoform (copies/L)	0.006 (0.001-0.043)	0.035 (0.009-0.13)	0.228
Survivin-3B isoform (copies/L)	0.078 (0.002-0.27)	0.16 (0.035-0.36)	0.186
XIAP (ng/ml)	4.93 (0.5-29.7)	49.1 (25.3-104.9)	0.598
Caspase-3 (ng/mL)	21.1 (5.1–55.4)	15.2 (5.1–92.6)	0,674
Caspase-9 (ng/mL)	102.3 (87.5–136.5)	102 (92.3–135.4)	0,784
Caspase-8 (ng/ml)	8.7 (8.5-9.7)	7.3 (5.7-10.1)	0.251
Bax protein (ng/ml)	4.4 (3.5-9.84)	3.47 (3.2-4.06)	0.880
Smac/Diablo (ng/ml)	0.002 (0.0007-0.025)	0.003 (0.002-0.16)	0.648
Αρτηριακό pH, mean (SD)	7.37 (0.082)	7.33 (0.1)	**0.004**
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.9 (0.7-1.4)	1.9 (1-2.7)	**0.001**
Αλβουμίνη ορού (mg/dl)	2,85 (0.7)	2.51 (0.64)	**0.002**

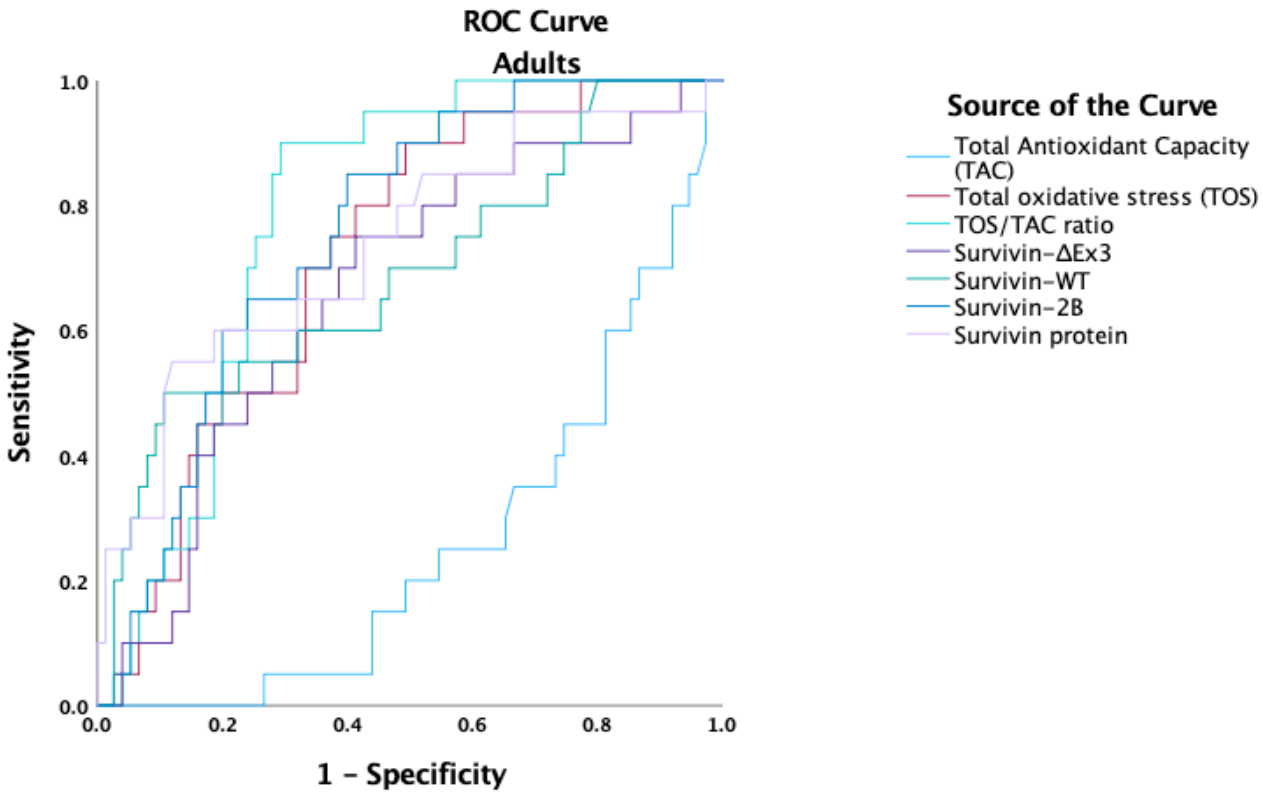
Διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (Mann-Whitney U-test μεταβλητών): TOS = Total Oxidative Stress, TAC = Total antioxidant capacity, IQR = Interquartile Range, IL = Interleukin, Bax= Bcl-2-associated X-protein, XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein, Smac/Diablo= Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with Low pI



Εικόνα 29. Αυξητική τάση του λόγου TOS/TAC και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin για τους αποβιώσαντες ασθενείς, συγκριτικά με τους επιβιώσαντες ενήλικους ασθενείς.



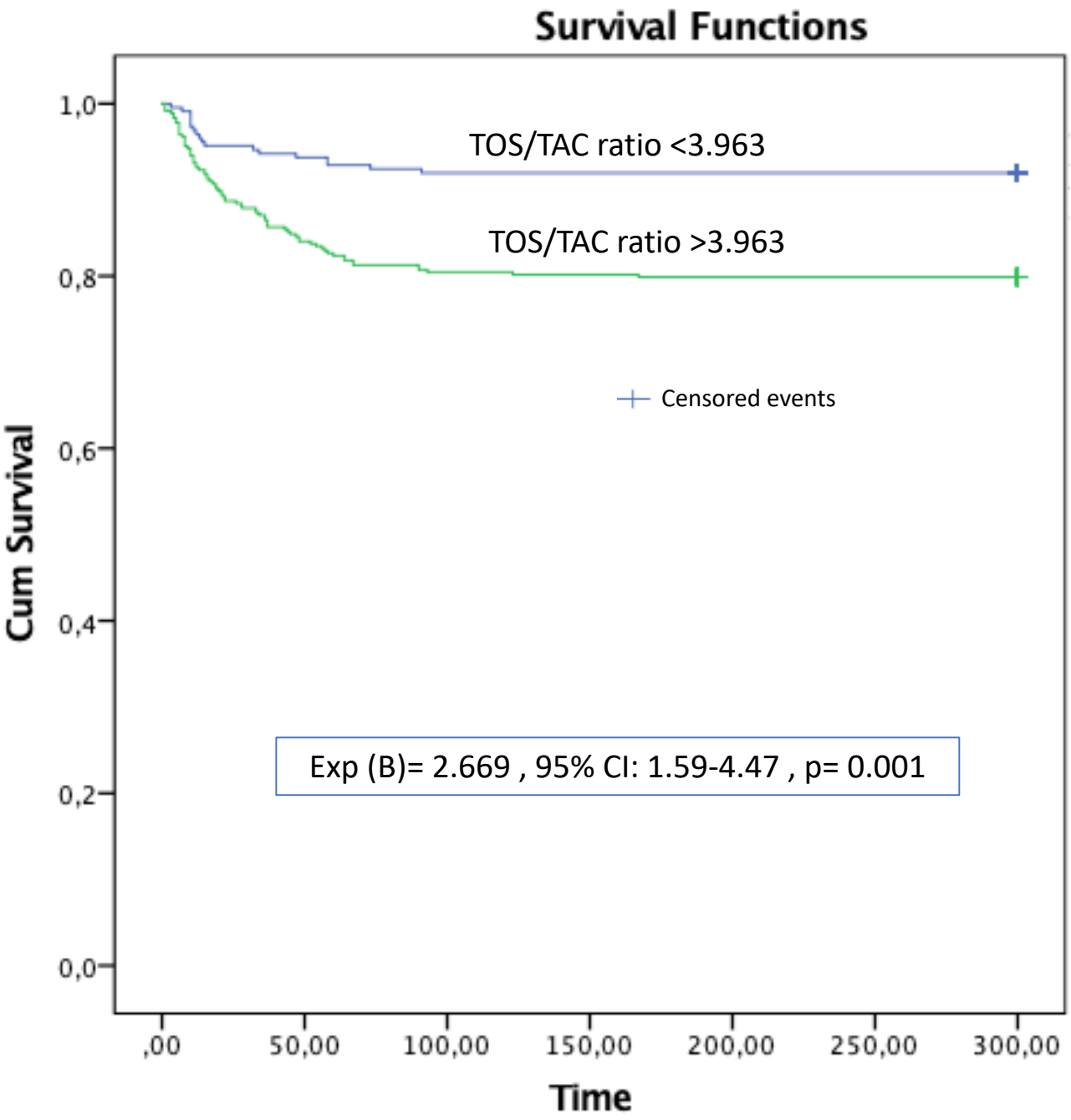
Εικόνα 30. Αυξητική τάση του αποπτωτικού Smac/Diablo και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης XIAP, αλλά μειωμένα επίπεδα του αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax για τους αποβιώσαντες ασθενείς, συγκριτικά με τους επιβιώσαντες ενήλικους και παιδιατρικούς ασθενείς. Bax= Bcl-2-associated X-protein, XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein, Smac/Diablo= Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with Low pI



Area Under the Curve[a]

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error[b]	Asymptotic Sig.[c]	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Total Antioxidant Capacity (TAC)	.258	.056	.001	.148	.368
Total oxidative stress (TOS)	.720	.056	.003	.610	.830
TOS/TAC ratio	.787	.047	.000	.695	.878
Survivin-ΔEx3	.665	.066	.024	.536	.795
Survivin-WT	.688	.071	.010	.550	.827
Survivin-2B	.755	.052	.000	.653	.858
Survivin protein	.735	.067	.001	.605	.866

Εικόνα 31. Καμπύλη ROC και αναλυτικά οι τιμές για το Εμβαδόν Κάτω από την Καμπύλη (Area Under ROC curve- AUROC) των πιθανών προβλεπτικών μεταβλητών για τη θνητότητα στους ενήλικους σηπτικούς ασθενείς. Ο αυξημένος λόγος TOS/TAC ανευρέθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης θνητότητας και πέτυχε την καλύτερη AUROC (0,787, με 95% Διάστημα εμπιστοσύνης 0,695-0.878 και p<0.001).



Εικόνα 32. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier (KM), που φανερώνει τη μικρότερη πιθανότητα επιβίωσης για τους ασθενείς που παρουσίαζαν λόγο TOS/TAC μεγαλύτερο από την τιμή-κατώφλι 3.963, όπως υπολογίστηκε από τον δείκτη Youden (log rank chi-square = 15.063, p=0.001).

Συζήτηση

Τα υπέρμετρα επίπεδα οξειδωτικών ουσιών, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, φαίνεται να χαρακτηρίζουν τη σήψη, αποδιοργανώνοντας την κυτταρική ομοιόσταση και οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, η σήψη φάνηκε να είναι ανεξάρτητα συνδεδεμένη με μία οξειδωτική/αντιοξειδωτική ανισορροπία, η οποία διέφερε σημαντικά μεταξύ σηπτικών και μη σηπτικών βαρέως πασχόντων ασθενών. Έτσι, ο αυξημένος λόγος TOS/TAC αναδείχθηκε ως πρώιμος δείκτης διάκρισης της βαριάς νόσου και της σοβαρότητας της σήψης, ενώ συνδέθηκε και με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας για τους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Αυτή η αποδιοργανωμένη οξειδωτική κατάσταση των βαρέως πασχόντων ασθενών συνοδεύτηκε από ταυτόχρονη ενεργοποίηση της εναρκτήριας του ενδογενούς (μιτοχονδριακού) αποπτωτικού μονοπατιού κασπάσης-9, και της εκτελεστικής του ενδογενούς και εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού κασπάσης-3, όπως επίσης και από μεταβολές της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin. Πολλαπλές ανασκοπήσεις για το θέμα αυτό συμπεραίνουν ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη σήψη σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και την ανεπαρκή αξιοποίηση του κυκλοφορούντος οξυγόνου από τους ιστούς, οδηγώντας τελικά τα κύτταρα σε ενεργειακή ένδεια (154). Επίσης, τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών θεραπειών έχουν δημοσιευθεί σε πολλαπλές κλινικές μελέτες σε σηπτικούς ασθενείς (155,156).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αποτύπωση της έκφρασης των κύριων εκπροσώπων της απόπτωσης και της αναστολής της απόπτωσης, αλλά και της οξειδωτικής κατάστασης των σηπτικών ασθενών, που νοσηλεύονται σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας. Τέτοιες αντιδιαμετρικές διαδικασίες, ενδεχομένως να αντιμάχονται μεταξύ τους κατά την επαφή με τον εκάστοτε λοιμογόνο παράγοντα, σε μια προσπάθεια των κυττάρων για την επαναφορά της ομοιοστασίας, ενώ η διατήρηση ισορροπίας πιθανώς να αποδειχθεί στο μέλλον ότι υφίσταται σοβαρή μεταβολή στα προχωρημένα στάδια της σηπτικής κατάστασης. Η προσπάθεια αυτή αναμένεται να διευρύνει τους ορίζοντες και να ανοίξει τον δρόμο για μεγαλύτερες και στοχευμένες ερευνητικές προσπάθειες στη διερεύνηση και αποκρυπτογράφηση της σηπτικής παθοφυσιολογίας.

- Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες και η χρόνια φλεγμονή φαίνεται ότι αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που οδηγούν σε ποικίλες χρόνιες παθήσεις, που αποδίδονται γενικότερα στη γήρανση των κυττάρων, όπως η αθηροσκλήρωση ή σχετικές καρδιογενείς διαταραχές, τα νεοπλασματικά νοσήματα, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, διάφορες ανοσολογικές διαταραχές, αλλά και η ίδια η διαδικασία της γήρανσης από μόνη της. Αντίστοιχα, στη βαριά νόσο, η ανάπτυξη οξειδωτικού στρες αναπαριστά ένα κοινό τελικό μονοπάτι, συνδεόμενο με φλεγμονή, ισχαιμία-επαναιμάτωση, πολυοργανική ανεπάρκεια και σήψη (157). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά, που αναδεικνύει ότι η αυξημένη έκφραση αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών παραγόντων στο οξύ στρες συνδέεται με την επαγωγή TOS και αλλαγή του λόγου TOS/TAC, τα οποία αποτελούν ισχυρούς παράγοντες

πρόβλεψης της βαρύτητας και του κινδύνου θνητότητας στη σήψη. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνει ένα μοντέλο σε πειραματόζωα, που ανέδειξε το πρώιμο πολυοργανικό αποτύπωμα από την οξειδωτική βλάβη στις θανατηφόρες περιπτώσεις (158). Παρόμοια με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι Hsiao et al. ανακοίνωσαν πρόσφατα ότι το οξειδωτικό στρες, σε συνδυασμό με μια αποδυναμωμένη αντιοξειδωτική άμυνα, προδιαθέτουν στην ανάπτυξη σήψης, ενώ οι διαδοχικές μετρήσεις TOS και TAC θα μπορούσαν να είναι υποσχόμενοι δείκτες πρόβλεψης της σηπτικής εξέλιξης (159). Επίσης, σε συμφωνία με άλλες μελέτες, μια διαταραγμένη ισορροπία ανάμεσα σε οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες πιθανώς να καθορίζει τη σοβαρότητα της βαριάς νόσου, τόσο στη σήψη όσο και σε τραυματικές κακώσεις (160–162). Αντιθέτως, οι Lorente et al., μέσω ποσοτικού προσδιορισμού βιοδεικτών υπεροξείδωσης λιπιδίων από το οξειδωτικό στρες, έχουν αναδείξει το αυξημένο οξειδωτικό στρες στη σήψη, το οποίο όμως συνοδευόταν από αυξημένη TAC σε σηπτικούς ασθενείς και πολυτραυματίες (163–166), χωρίς ωστόσο να έχει γίνει διάκριση της εν λόγω ισορροπίας μεταξύ λοιμώδους και μη λοιμώδους βαριάς νόσου. Μια προηγηθείσα αναφορά, επίσης, ανέδειξε ότι οι μεμονωμένες ανεξάρτητες μετρήσεις TOS ή TAC μπορεί να μην προσδιορίζουν με ακρίβεια το οξειδωτικό προφίλ του ασθενή. Ο λόγος για αυτό είναι η δυναμική ισορροπία μεταξύ του TOS και του TAC. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι θα έπρεπε να γίνεται ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση του TOS και TAC για τη συνολική αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης της εκάστοτε περίπτωσης (167).

- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) φαίνεται να μην επαρκεί, ώστε να μπορέσει να ανταπεξέλθει ο οργανισμός έναντι μίας σηπτικής κατάστασης, υποδηλώνοντας ότι η σήψη προκαλεί μία ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών κυτταρικών διεργασιών (168). Στην παρούσα συγκριτική μελέτη μεταξύ δύο κλινικών ομάδων βαρέως πασχόντων ασθενών, αναδείχθηκε ότι η TAC μειώνεται στη σήψη, συγκριτικά με τη μη λοιμώδη φλεγμονή και τους υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε ότι η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, συνοδευόμενη από ενεργοποίηση οξειδωτικού στρες, αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών παραγόντων, είναι ανεξάρτητα συνδεδεμένη με τη θνητότητα στη σήψη. Παρόμοια αποτελέσματα με μειωμένους αντιοξειδωτικούς παράγοντες έχουν δημοσιευτεί και σε άλλες πρόσφατες μελέτες σε βαρέως πάσχοντες σηπτικούς ασθενείς (159–161). Αντιθέτως, άλλες μελέτες ανέδειξαν αυξημένα επίπεδα TAC σε σηπτικούς ασθενείς, συνδεόμενα με θνητότητα (163,164,169). Αναφορικά με τα επίπεδα TAC σε τραυματικής αιτιολογίας βαρέως πάσχοντες ασθενείς, οι δημοσιευμένες μελέτες είναι αντικρουόμενες. Οι Lorente et al. βρήκαν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης TAC και του κινδύνου θνητότητας σε ασθενείς με βαριά τραυματική κάκωση εγκεφάλου (165,166), ενώ άλλοι ερευνητές ανέδειξαν σημαντικά μειωμένη TAC στους πολυτραυματίες (170,171). Στη σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων στην παρούσα εργασία, ανευρέθηκε μειωμένη TAC στη σήψη, αλλά όχι στους τραυματικής αιτιολογίας βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Βάσει όλων αυτών των δεδομένων, η εξαγωγή συμπερασμάτων παραμένει εξαιρετικά δύσκολη, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορετικές μεθοδολογίες ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής

αντιοξειδωτικής κατάστασης. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα τονίζουν την ιδιαίτερη σημασία που θα έχει η μελλοντική ανάπτυξη καλά σχεδιασμένων μελετών, μέσω σταθμισμένων τεχνικών μέτρησης του οξειδωτικού στρες και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού.

Αναφορικά με άλλα αντιοξειδωτικά προστατευτικά συστήματα, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μικροθρεπτικών συστατικών (micronutrients), όπως η βιταμίνη A, C, D, το σελήνιο, η α-τοκοφερόλη, το λυκοπένιο, ή το ασκορβικό οξύ, έχουν ανευρεθεί μειωμένα στη σήψη (172–174). Στην παρούσα εργασία, ο ψευδάργυρος (Zn) ανευρέθηκε επίσης μειωμένος στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς και παρουσίαζε αρνητική συσχέτιση με την TAC, αλλά ωστόσο, τα μειωμένα αποθέματά του δεν φάνηκε να συνδέονται με χειρότερη έκβαση (θνητότητα). Η ομοιόσταση μικροθρεπτικών συστατικών φαίνεται ότι αποτελεί σημαντική παράμετρο για τη διατήρηση ενός υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος. Ανάμεσα σε αυτές τις μικροθρεπτικές ουσίες, ο ψευδάργυρος φαίνεται ότι παρουσιάζει σημαντικότατες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, που πιθανότατα συνδέονται με την ικανότητά του να μειώνει τόσο την παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου (ROS), όσο και την ενεργοποίηση του TNF-α, της IL-1β, αλλά του NF-κB. Ο ψευδάργυρος θεωρείται σήμερα ένα απαραίτητο στοιχείο για τη ρύθμιση των αποκρίσεων της φυσικής και επίκτητης ανοσίας, ενώ η καίρια δράση του έγκειται και στην ενεργοποίηση σχηματισμού των εξωκυττάριων παγίδων ουδετεροφίλων (NET) και της φλεγμονώδους αντίδρασης του ξενιστή, μέσω της επίδρασής του στον παράγοντα NF-κB και στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την καίρια δράση του στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες και στη μείωση της έκφρασης οξειδωτικών βιοδεικτών. Επίσης, η αναπλήρωση των αποθεμάτων ψευδαργύρου έχει μειώσει την επίπτωση λοιμώξεων στους μεγαλύτερους σε ηλικία ανθρώπινους πληθυσμούς (175). Επομένως, θα μπορούσε να είναι αναμενόμενο το γεγονός ότι η έλλειψη ψευδαργύρου συνδέθηκε με χειρότερη έκβαση στις σηπτικές καταστάσεις, σύμφωνα με μια πρόσφατη ερευνητική εργασία (176), ενώ σε μια τελευταία μελέτη σε ασθενείς με COVID-19, η έλλειψη ψευδαργύρου, αλλά όχι σεληνίου, οδηγούσε σε χειρότερη νόσηση, χωρίς όμως καμία από τις δύο ουσίες να συσχετιστεί με τη θνητότητα (177). Ωστόσο, παρά το ότι πολλαπλές υποσχόμενες μελέτες προτείνουν μια ποικιλία στρατηγικών για την αναπλήρωση αντιοξειδωτικών ουσιών, ώστε να αποτραπούν τα σημαντικά ελλείμματα ενέργειας ή η απόπτωση, ή και να βελτιωθεί η έκβαση σηπτικών ασθενών, πρόσφατες μελέτες έχουν αμφισβητήσει την αποτελεσματικότητα μιας τέτοιας παρέμβασης (178–180).

- Ανισορροπία TOS/TAC

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τη μοναδική ερευνητική προσπάθεια, που έχει αναδείξει τον λόγο TOS/TAC ως τον καλύτερο δείκτη διάκρισης της βαρύτητας της σήψης, συγκριτικά με τις μεμονωμένες μετρήσεις TOS ή TAC. Ο μεθοδολογικός σχεδιασμός ακολούθησε το πρότυπο άλλων μελετών σε νεοπλασματικές ασθένειες, όπου ο λόγος TOS/TAC αναδείχθηκε ως ο καλύτερος δείκτης διάκρισης των ασθενών από τους υγιείς μάρτυρες (181). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η ανισορροπία TOS/TAC προβλέπει καλύτερα τη θνητότητα, συγκριτικά με τις μεμονωμένες μετρήσεις TOS ή TAC, την πρωτεΐνη survivin ή τις αποπτωτικές κασπάσες -3 και -9. Αυτό μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι το προφίλ οξειδωτικού στρες ενός

ασθενούς μπορεί να προσεγγιστεί καλύτερα με την ταυτόχρονη αξιολόγηση της δυναμικής ισορροπίας κυτταρικής οξείδωσης και αντιοξειδωτικών συστημάτων, συγκριτικά με τη μεμονωμένη εκτίμηση TOS ή TAC (182). Ενισχύοντας τις προηγούμενες καταγραφές, τέτοια δεδομένα αναδεικνύουν μια ανεξάρτητη, μη γραμμική συμπεριφορά του λόγου TOS/TAC, ξεχωριστή για ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή από την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, το κάπνισμα, ο διαβήτης ή οι επιγενετικές αλλαγές, μπορεί επηρεάζουν τον λόγο TOS/TAC στις διάφορες ομάδες (183). Τέλος, αναφορικά με τους παιδιατρικούς πληθυσμούς, έχει προταθεί πρόσφατα ότι η αυξημένη αντιοξειδωτική ενζυμική δραστηριότητα σε παχύσαρκα παιδιά μπορεί να αποτελεί μια προσπάθεια του οργανισμού να ισορροπήσει την αυξημένη παραγωγή τοξικών ριζών οξυγόνου (184,185), ενώ φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα επιφαινόμενο, οδηγούμενο από ένα φάσμα διαφορετικών και πολύπλοκων διεργασιών, που συνδέονται με αλλαγές στον συστηματικό μεταβολισμό και οδηγούν σε μια ποικιλία φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως για παράδειγμα το παιδιατρικό άσθμα, η αντίσταση στην ινσουλίνη, ο διαβήτης ή διάφορα καρδιοαγγειακά νοσήματα (186,187). Πρόσφατες μελέτες για την παιδιατρική σήψη, επίσης, τονίζουν την οξειδωτική/αντιοξειδωτική ανισορροπία στον σηπτικό παιδιατρικό ασθενή, η οποία φαίνεται ότι αποτελεί το εναρκτήριο έναυσμα πυροδότησης, αλλά και διαμεσολάβησης των συστηματικών φλεγμονωδών αποκρίσεων στη σήψη (188). Έτσι, σε πρόσφατη μελέτη, η σήψη στα παιδιά συσχετίστηκε με τον μειωμένο λόγο μιας κατηγορίας αντιοξειδωτικών ουσιών (θειόλες), ως προς το οξειδωμένο παράγωγό τους (δισουλφίδια). Η συγκεκριμένη μελέτη συμπεραίνει ότι η διαταραχή της ομοιόστασης του λόγου θειολών/δισουλφιδίων χαρακτηρίζει τους βαρέως πάσχοντες σηπτικούς παιδιατρικούς ασθενείς (189), χωρίς ωστόσο να έχει επικυρωθεί η σύνδεση των υπό μελέτη οξειδωτικών παραγόντων με την έκβαση των σηπτικών παιδιατρικών ασθενών έως του παρόντος συγγράμματος (190).

- Αποπτωτική/αντιαποπτωτική κατάσταση και οξειδωτικά/αντιοξειδωτικά μονοπάτια

Οι μοριακοί μηχανισμοί οξειδωτικού στρες και φλεγμονής και η αλληλεπίδρασή τους με τις διαφορετικές μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου παραμένουν ακόμα ασαφείς (163). Στην παρούσα μελέτη, οι κασπάσες -3 και -9 επάγονται ταυτόχρονα με το οξειδωτικό στρες στην πρώιμη σήψη. Πολλαπλές μελέτες φαίνεται να επιβεβαιώνουν ότι το οξειδωτικό στρες ενισχύει τις αποπτωτικές διεργασίες, μέσω ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, που ενεργοποιούνται από τη διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των κασπασών -3 και -9 (191–193). Επιπλέον, μια μελέτη ανέδειξε ότι το οξειδωτικό στρες δεν επάγει μόνο την ενεργοποίηση του διαμεσολαβούμενου από την κασπάση- 9 κλασικού μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού, αλλά και μία πιο αργή ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από την κασπάση-8 εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού, που φαίνεται ότι επίσης ενισχύει την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων στην περίπτωση ανεπαρκούς απόκρισης του ενδογενούς μονοπατιού (194).

Πρόσφατες αναφορές στη σήψη συσχετίζουν τη θνητότητα με παρατεταμένες περιόδους ανοσοπαράλυσης, επαγόμενες αλλαγές του ανοσοποιητικού συστήματος και ανεξέλεγκτη ή

υπερβολική αποπτωτική καταστροφή κυττάρων του ανοσοποιητικού (195,196). Παρομοίως, έχει ανευρεθεί ότι η απόπτωση και το οξειδωτικό στρες είναι αλληλοσυνδεόμενες καταστάσεις, στενά συνδεδεμένες με πολλαπλές καρδιοαγγειακές, μεταβολικές, αυτοάνοσες και νευροεκφυλιστικές διαταραχές (197,198). Στην παρούσα μελέτη, οι κασπάσες -3 και -9 φάνηκε να αυξάνονται στους σηπτικούς ασθενείς, συγκριτικά με τη μη λοιμώδη φλεγμονή και τους υγιείς μάρτυρες. Ωστόσο, για πρώτη φορά ανευρέθηκε αυξημένη έκφραση τριών αντιαποπτωτικών ισομορφών της πρωτεΐνης survivin σε περιφερικά λευκοκύτταρα, όσο και αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της survivin στον ορό των σηπτικών ασθενών, τα οποία συσχετίστηκαν με τη μειωμένη TAC και τον κίνδυνο θνητότητας στη σήψη. Το ανωτέρω ευρήματα είναι σε συμφωνία με μια άλλη πρόσφατη μελέτη, που έδειξε ότι φαινομενικά ανταγωνιστικά μονοπάτια με προ- και αντιαποπτωτικούς παράγοντες επάγονται ταυτόχρονα στην πρώιμη σήψη (199). Νέοι θεραπευτικοί παράγοντες, που προωθούν την παραγωγή ATP και τις μιτοχονδριακές διεργασίες, φάνηκε σε μια μελέτη να μειώνουν τα επίπεδα τοξικών ριζών οξυγόνου, μέσω αναστολής της δραστηριότητας της κασπάσης-3 (200), ή μέσω αύξησης της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών βιομορίων (201). Παρόμοιες επιστημονικές εργασίες, που θα επικεντρωθούν στα αποπτωτικά/αντιαποπτωτικά και οξειδωτικά/αντιοξειδωτικά μονοπάτια στη σήψη, θα μπορούσαν να φανερώσουν νέους υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους και να ενισχύσουν καινοτόμες παρεμβάσεις στο μέλλον.

- Αποπτωτική και αντιαποπτωτική κατεύθυνση στους σηπτικούς ασθενείς της μελέτης

Η σύνθετη κλινική οντότητα της σήψης ορίζεται ως μια δραματική απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη, διαμεσολαβούμενη από υπέρμετρη αποπτωτική δραστηριότητα του λεμφικού και παρεγχυματικών ιστών, ανοσοκαταστολή και τελικά πολυοργανική δυσλειτουργία (19,20). Οι κασπάσες αποτελούν μια ομάδα ουσιών με κυρίαρχο ρόλο στη σήψη, μέσω της ενεργής συμμετοχής τους στις διαδικασίες της απόπτωσης, πυρόπτωσης, νεκρόπτωσης και γενικότερα της φλεγμονής (82,202,203). Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε για πρώτη φορά ότι στην πρώιμη σήψη ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα αποπτωτικών κασπασών, συμπεριλαμβανομένων των ενεργών και των διασπασμένων (cleaved) μορφών κασπασών, που συνοδεύονται από υπερέκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη survivin, αλλά και οι αντίστοιχες ενδοκυττάριες γονιδιακές ισομορφές της. Παράλληλα, εκτός από τη θετική της συσχέτιση με την κασπάση-9, η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin φάνηκε να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα διάκρισης της βαρύτητας της σήψης και της θνητότητας. Επίσης, καταγράφηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά αλλά και γονιδιακά επίπεδα των ισομορφών της πρωτεΐνης survivin (-WT, -2B, ΔEx3) στους αποβιώσαντες βαρέως πάσχοντες σηπτικούς και μη σηπτικούς ασθενείς.

Η πιλοτική αυτή μελέτη αποτελεί την πρώτη ερευνητική προσπάθεια διερεύνησης της πρώιμης απόκρισης των ενδοκυττάριων γονιδιακών ισομορφών έκφρασης της survivin και της απελευθερούμενης τελικά ολικής πρωτεΐνης survivin στον ορό ασθενών με σήψη ή με σοβαρό τραύμα. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι το mRNA των ισομορφών -2B, -ΔEx3 και -WT αυξάνεται πρώιμα στη σήψη, διακρίνοντάς την από άλλη οξεία κατάσταση στρες σε ασθενείς ΜΕΘ. Η τελευταία ισομορφή που καταμετρήθηκε (survivin -3B) παρουσίασε διαφορετική απόκριση

στην ομάδα σήψης από ό,τι στη μη λοιμώδη φλεγμονή, αλλά οι κυμαινόμενες αυτές αυξητικές της τάσεις δεν διαφοροποίησαν τις ομάδες βαριάς νόσου σημαντικά. Τέλος, τα αποτελέσματά έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των αποπτωτικών κασπασών στον ορό αίματος, αλλά και της αντιαποπτωτικής survivin, αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με σήψη. Οι αυξητικές αυτές τάσεις παρατηρούνται σε μικρότερο βαθμό στη μη λοιμώδη φλεγμονή (τραύμα/χειρουργείο), αποκαλύπτοντας μια πρώιμη απόκριση στο στρες και για τις δύο κατηγορίες βαρέως πασχόντων ασθενών, ιδιαίτερα όμως στους ασθενείς με σήψη.

- Αποπτωτική δραστηριότητα σε λοιμώδη και μη λοιμώδη νοσήματα

Η αυξημένη δραστηριότητα των αποπτωτικών πρωτεϊνών στη σήψη, όπως διαφαίνεται στην παρούσα μελέτη, απασχολεί τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια, με την ανάδυση ενός προφίλ ενεργοποίησης της απόπτωσης, περισσότερο συνυφασμένου με το μιτοχονδριακό μονοπάτι, μέσω των κασπασών -3 και -9 (204). Συμβατά με την παρούσα εργασία είναι τα αποτελέσματα πρόσφατης έρευνας, στην οποία η αυξημένη έκφραση της κασπάσης -3 συνδέθηκε με μεγαλύτερη θνητότητα σε σηπτικούς ασθενείς (205). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση της κασπάσης-3 στη σήψη συσχετίζεται με την αποπτωτική τάση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών του εγκεφαλικού παρεγχύματος, όπως ο ιππόκαμπος, επηρεάζοντας έτσι μακροπρόθεσμα το νοητικό δυναμικό των ασθενών (206). Η χορήγηση αναστολέων της απόπτωσης σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται, επίσης, να σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση λεμφοκυττάρων και βελτιωμένη ανοσιακή απόκριση στη σήψη (207). Αναφορικά με την επόμενη μελετηθείσα αποπτωτική πρωτεΐνη της παρούσας εργασίας, την κασπάση -9, η οποία επίσης φάνηκε να υπερεκφράζεται στους σηπτικούς ασθενείς, οι σύγχρονοι ερευνητές θεωρούν ότι θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο, τόσο για υπερπλαστικά όσο και για εκφυλιστικά νοσήματα (208). Η έκφραση της κασπάσης- 9 θεωρείται σήμερα απολύτως απαραίτητη για τη σωστή κυτταρική λειτουργία, ενώ η αναστολή της λειτουργίας της φαίνεται ότι είναι ασύμβατη με τη ζωή, καθώς οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο, όπως επίσης και σε σοβαρές ανωμαλίες στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, μέσω αναστολής της απόπτωσης κατά την εξαιρετικά κρίσιμη διαδικασία της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Βάσει αυτών των ενδείξεων, φαίνεται ότι η κασπάση-9 είναι απολύτως απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων, αλλά και για την απόπτωση παθολογικών κυτταρικών πληθυσμών σε υπερπλαστικά νοσήματα, μέσω συνεχούς απομάκρυνσης κυτταρικών σειρών με ανεπανόρθωτες λειτουργικές βλάβες (209). Δεδομένων των ανωτέρω, είναι πια απόλυτα αναμενόμενος ο κεντρικός ρόλος των κασπασών στις κρίσιμες διαδικασίες της οργανογένεσης, αλλά και της διατήρησης της ιστικής ακεραιότητας, τόσο στους εμβρυικούς, όσο και στους διαφοροποιημένους ιστούς των ενηλίκων (210). Μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη σε άλογα απέδειξε ότι η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων LPS καθυστέρησε την απόπτωση των ουδετεροφίλων, μέσω τροποποίησης του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, που ήταν στενά συνδεδεμένο με τη σηματοδότηση από τον TLR4. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές προτείνουν ότι η παράταση της διάρκειας ζωής των ουδετεροφίλων θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγεί τον φαύλο κύκλο της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης κατά την ενδοτοξιναιμία (211).

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν τις αλλαγές σε επίπεδο ανοσολογικών κυτταρικών πληθυσμών στη σήψη. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση περιγράφεται ότι η πιο σταθερή αλλαγή στα σηπτικά ουδετερόφιλα είναι η ενεργοποίησή τους σε ένα πρόγραμμα επιβίωσης που ανθίσταται στον αποπτωτικό θάνατο. Επίσης, η μειωμένη έκφραση του μορίου HLA-DR είναι ένα χαρακτηριστικό εύρημα στα σηπτικά μονοκύτταρα, αλλά η αντιμικροβιακή δράση των μονοκυττάρων δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά στη σήψη. Όσον αφορά την επίκτητη ανοσία, η επαγόμενη από τη σήψη απόπτωση οδηγεί σε λεμφοπενία, περιλαμβάνοντας όλα τα είδη των Τ-λεμφοκυττάρων (CD4, CD8 και NK-κύτταρα), με εξαίρεση τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs), γεγονός που ευνοεί με τη σειρά του την ανάπτυξη ανοσοκαταστολής (212). Όλο και περισσότερες μελέτες τονίζουν την ετερογένεια της λειτουργικότητας των ουδετεροφίλων στο ευρύ φάσμα των ανοσολογικών αποκρίσεων κατά τη διάρκεια λοιμωδών καταστάσεων. Έτσι, μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι τα ουδετερόφιλα καθίστανται δυσλειτουργικά στα όψιμα στάδια της σηπτικής διαδικασία, μέσω αναστολής της απόπτωσής τους, ανεπαρκούς ικανότητας χημειοταξίας και εκτεταμένων διηθήσεών τους στους ιστούς. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις έδειξαν ότι αυτές οι αποκρίσεις πιθανώς να σχετίζονται με την έκφραση του μορίου PD-L1 στα ουδετερόφιλα, το οποίο επιδεικνύει ένα ανοσοκατασταλτικό αποτέλεσμα μέσω αναστολής της ενεργοποίησης ή μη φυσιολογικής διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων, ή ακόμα και ενεργοποίησης της απόπτωσης των Τ-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Έτσι, αποδεικνύεται η, μέχρι τώρα, μη καλά καθορισμένη ανοσοκατασταλτική κατεύθυνση, ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης δράσης των ουδετεροφίλων (213). Συνδυαστικά με αυτή την παράταση ζωής των ουδετεροφίλων δρα η ενεργοποίηση των διεργασιών της ουδετεροφιλικής πυρόπτωσης, οι οποίες καθοδηγούν και παρατείνουν την ιστική φλεγμονώδη καταστροφή. Έτσι, η πυρόπτωση αποτελεί μια σημαντική μορφή δυσλειτουργίας των ουδετεροφίλων κατά τη σηπτική διαδικασία. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συστράτευση ουδετεροφίλων στην εστία της αρχικής φλεγμονής οδηγεί στην παραγωγή NETs, οι οποίες με τη σειρά τους θα παρατείνουν τις πυροπτωτικές διεργασίες, μέσω ενεργοποίησης της πυρόπτωσης στον πληθυσμό των μακροφάγων. Αυτά τα ευρήματα τονίζουν τον φλεγμονώδη ρόλο των NETs, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων, γεγονός που φαίνεται ότι καθορίζει την εξέλιξη της φλεγμονώδους διαδικασίας μετά από το εκάστοτε λοιμώδες ερέθισμα (214). Επομένως, καθίσταται όλο και πιο σαφές ότι η ρύθμιση της δράσης των ουδετεροφίλων αποτελεί το πιο κρίσιμο κομμάτι στη θεραπεία της σήψης (215).

Η κυτταρική απόπτωση αποτελεί έναν σαφή πλέον μηχανισμό, ο οποίος φαίνεται ότι δρα ως κατασταλτικός παράγοντας της ανοσολογικής απόκρισης στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς, επηρεάζοντας τη βαρύτητα της συστηματικής ανοσολογικής απάντησης και οδηγώντας σε ανοσοκαταστολή, μέσω μείωσης της έκφρασης του CD14/HLA-DR στα μονοκύτταρα και αναστολής της δράσης των Τ-λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων (109,195,216). Η αυξημένη απόπτωση, επομένως, συνεισφέρει σε έναν επαναπρογραμματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος προς μια αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτική κατεύθυνση. Σε μοριακό και ενδοκυττάριο επίπεδο, σημαντικές μεταβολικές και επιγενετικές αλλαγές ανακατευθύνουν τις δραματικές μεταβολές στα μεταγραφικά προφίλ επαγωγής και διατήρησης της καθοδηγούμενης από τη σήψη ανοσοκαταστολής. Υπό αυτό το πρίσμα, φαίνεται ότι θνητότητα στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς

συνδέεται με την αυξημένη παραγωγή ανώριμων μορφών ουδετεροφίλων, με ενισχυμένες ανοσοκατασταλτικές δράσεις. Επίσης, η μειωμένη δυνατότητα των μονοκυττάρων να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες σε απόκριση σε λοιμώδη ερεθίσματα, ή αλλιώς η ονομαζόμενη ανεργία των μονοκυττάρων, όπως και τα μειωμένα επίπεδα παραγωγής και λειτουργικότητας των δενδριτικών κυττάρων, ή τα ανασταλτικά σήματα για τις Τ-λεμφοκυτταρικές δράσεις αποτελούν κυρίαρχα χαρακτηριστικά της καθοδηγούμενης από τη σήψη ανοσοκαταστολής. Η συστηματική ανοσοκαταστολή φαίνεται να επηρεάζει και τα πρωτογενή ή δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, μέσω αποπτωτικών σημάτων και απώλειας κυττάρων της επίκτητης ανοσίας στον μυελό των οστών, τον θύμο, τον σπλήνα, το αίμα, ή και τους λεμφικούς ιστούς του εντέρου. Εξάλλου, πολλές μελέτες περιγράφουν τη διαταραχή της ωρίμανσης των Τ- λεμφοκυττάρων μετά από μία σηπτική κατάσταση, που επισυμβαίνει τόσο στον μυελό των οστών όσο και τον θύμο και συνδυάζεται με θυμική ατροφία. Το μέγεθος και η επιμονή αυτού του ανθεκτικού ανοσοκατασταλτικού σταδίου, όπως προσδιορίζεται από τη μειωμένη έκφραση του HLA-DR στα μονοκύτταρα, σχετίζεται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας και ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Με αυτό τον τρόπο, οι σύγχρονοι ερευνητές θεωρούν την ανοσοκαταστολή ως μια ξεχωριστή οργανική ανεπάρκεια στη σήψη (44).

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ολικών επιπέδων (πρόδρομες, ενεργές και διασπασμένες μορφές) των κασπασών-3 και -9 στους σηπτικούς ασθενείς της παρούσας μελέτης μπορεί να υποδηλώνουν ότι κυρίως το ενδογενές, και ίσως λιγότερο το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, εμπλέκονται στην επαγόμενη από τη σήψη λεμφοκυτταρική απόπτωση (22). Σε άλλη μελέτη, η τοπική αναστολή της θυμικής κασπάσης-9 ανέστειλε την απόπτωση των λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια πολυμικροβιακής σήψης σε ζωικά σηπτικά μοντέλα (217). Παρομοίως, υψηλότερη δραστηριότητα της κασπάσης-3 έχει ανευρεθεί στα λεμφοκύτταρα (205), που εμπλέκονται στην απόπτωση κυττάρων του ιππόκαμπου του εγκεφάλου σε σηπτικά ζωικά μοντέλα (206). Σε πρόσφατη δημοσίευση ανευρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκεντρώσεων της κασπάσης-3 και του βαθμού βαρύτητας της σήψης, του βαθμού της απόπτωσης και του κινδύνου θνητότητας σε σηπτικούς ασθενείς (13). Φαίνεται ότι ένας εξαρτώμενος από τις κασπάσες, και σχετιζόμενος με τη φλεγμονή στη σήψη, προγραμματισμένος ουδετεροφιλικός θάνατος (πυρόπτωση) μεσολαβείται από φλεγμονοσώματα της φυσικής ανοσίας (215). Στην πειραματική σήψη, η χορήγηση LPS είχε σαν αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της μυοκαρδιακής κασπάσης-3 και σημαντική αύξηση αποπτωτικών καρδιομυοκυττάρων, μέσω του μονοπατιού Akt/eNOS/NO (218), ενώ η κυτταροπλασματική ενεργοποίηση κασπασών οδηγούσε στην απόπτωση, μέσω σηματοδοτούμενων από την ιντερφερόνη-β ανοσολογικών αποκρίσεων (206). Άλλες πειραματικές μελέτες έχουν ανακοινώσει ότι η σήψη συνοδεύεται από απόπτωση λευκοκυττάρων, και κυρίως των CD4 λεμφοκυττάρων, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού των κασπασών (219), ενώ τα μονοκύτταρα φαίνεται να ελέγχονται διαφορετικά και πιθανώς παραμένουν ανεπηρέαστα από τους αποπτωτικούς παράγοντες του αίματος (220). Στην αξιολόγηση του μοντέλου της λεμφοκυτταρικής απόπτωσης στη σήψη, υψηλότερα ποσοστά αποπτωτικών λεμφοκυττάρων και χαμηλότερη έκφραση του HLA-DR προέβλεψε τη θνητότητα σηπτικών ασθενών (221).

Στην παρούσα μελέτη, επίσης, δεν φάνηκε να υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση των επιπέδων της καστάσης-8, της πρωτεΐνης που εκφράζει το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ανάμεσα στις ομάδες υγιών ή ασθενών. Πρόσφατες μελέτες, συνέδεσαν τον κίνδυνο θνητότητας με τις σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της καστάσης-8 στον ορό σηπτικών ασθενών, κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη διάγνωση της σήψης (222,223). Αντίθετα, άλλη πρόσφατη μελέτη συνέδεσε τον κυτταρικό θάνατο διεγερμένων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, κυρίως με την ενεργοποίηση μονοπατιών πυρόπτωσης, ενώ ανέδειξε ότι τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια, που διαμεσολαβούνται από την καστάση-8 του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού, από την καστάση-9 του ενδογενούς μονοπατιού, αλλά και από την εκτελεστική καστάση-3, μπορεί να μην είναι καθοριστικά και να μην ενεργοποιούνται απαραίτητα κατά τη διέγερση των ανοσολογικών πληθυσμών (224). Επίσης, μία στοχευμένη εργασία σε νοσούντες από τον ιό COVID-19, ανέδειξε τη διαμεσολαβούμενη από τη συνδυασμένη διεγερμένη δραστηριότητα των TNF-α και της IFN-γ, που τελικά οδηγεί σε ΠΑΝόπτωση, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού καστάσης-8/FADD. Στην τελευταία εργασία, οι ερευνητές φαίνεται να καταλήγουν ότι ανάλογα με το αίτιο που πυροδοτεί την εκάστοτε λοιμώδη ή φλεγμονώδη διαδικασία, τα κύτταρα μπορεί να βιώνουν ποικίλα επίπεδα διέγερσης των διαδικασιών της απόπτωσης, πυρόπτωσης και νεκρόπτωσης, όπως και ποικίλους βαθμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών, γεγονός που πιθανώς εξηγεί τις διαφορετικές εκφάνσεις της ΠΑΝόπτωσης (225).

Αναφορικά με τα υπόλοιπα αποπτωτικά βιομόρια, που καταμετρήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις ομάδες βαριάς νόσου και τους υγιείς μάρτυρες. Η αποπτωτική Bax πρωτεΐνη ανευρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην ομάδα της μη λοιμώδους φλεγμονής συγκριτικά με τη σηπτική ομάδα και την ομάδα των υγιών μαρτύρων, ενώ τα επίπεδα της αποπτωτικής Smac/Diablo δεν διαφοροποιούνταν ανάμεσα στις ομάδες. Το προ-αποπτωτικό δίδυμο των Bax/Bak πρωτεϊνών αποτελούν σημαντικά μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κατέχοντας κεντρικό ρόλο στη διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης Smac/Diablo, ώστε να μπορεί στη συνέχεια να εκτυλιχθεί η αποπτωτική διαδικασία (226). Σε πρόσφατη μελέτη αναδείχθηκε ότι η ενισχυμένη γλυκόλυση σε σηπτικά καρδιομυοκύτταρα οδηγεί στη διέγερση της έκφρασης αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες Bax/Bak (227). Αντίστοιχα, σε μια πειραματική μελέτη σε επιμολυσμένα από φλαβο-ιούς (flaviviruses, όπως οι ιοί της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, Dengue virus και Zika virus) κύτταρα, η ενίσχυση της αντιαποπτωτικής μορφής της πρωτεΐνης Bcl-2 και η αναστολή των αποπτωτικών Bax/Bak πρωτεϊνών οδήγησε στην επιβίωση των κυττάρων, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελεί τη βάση για μια υποσχόμενη μελλοντική αντιική στρατηγική (228). Συγκεκριμένοι θεραπευτικοί μιμητικοί παράγοντες της αποπτωτικής Smac/Diablo πρωτεΐνης έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα ενδοτοξιναιμίας, οδηγώντας στον περιορισμό της οργανικής δυσλειτουργίας, αλλά και σε βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης (229). Πολλαπλές μελέτες αναδεικνύουν τη σημασία τέτοιων θεραπευτικών στρατηγικών, τόσο σε αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου ή η ψωρίαση, όσο και σε νεοπλασματικά νοσήματα, εκμεταλλευόμενες τις αποπτωτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης Smac/Diablo, αλλά και τις ανασταλτικές της ιδιότητες ενάντια στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας IAPs (230,231).

- Οικογένεια αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών

Η οικογένεια των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Inhibitors of apoptosis proteins- IAPs) αναστέλλει την απόπτωση, μέσω σύνδεσης σε ειδικές κασπάσες και μέσω άλλων μηχανισμών, οι οποίοι έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδο- και διακυττάριας σηματοδότησης (148,150). Η WT (wild-type) ισομορφή της πρωτεΐνης survivin αποτελεί συστατικό του συμπλόκου chromosome passage protein (CPC), συντιθέμενο από μία τουλάχιστον τριπλή έλικα του υποσυμπλόκου BIRC5/survivin, CDCA8/borealin, INCENP, και AURKB ή AURKC. Το εν λόγω σύμπλοκο είναι υπεύθυνο για τη σωστή ευθυγράμμιση και συσπείρωση των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής μίτωσης, ενώ η παρουσία του είναι, επίσης, απαραίτητη για την αποτροπή των αποπτωτικών διαδικασιών κατά την G2/M κυτταρική φάση (232). Η WT ισομορφή της survivin εξασφαλίζει συγκεκριμένα τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα και λειτουργικότητα (233) και αναστέλλει ειδικά τις κασπάσες-3 και -7 (124). Επομένως, η αυξημένη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση της WT ισομορφής της survivin, που ανευρέθηκε στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η δράση αυτής της ισομορφής είναι κρίσιμη για την ανίχνευση του συμπλόκου CPC στη μονομερή του μορφή, ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματική προστασία του κυττάρου ενάντια στην απόπτωση, ή στην ομοδιμερή του μορφή, ώστε μα βελτιώνεται η σταθερότητα δομικών πρωτεϊνών των κυττάρων, όπως η τουμπουλίνη (124). Επίσης, είναι χαρακτηριστικό ότι η μονομερής μορφή του CPC αλληλεπιδρά με αντιαποπτωτικούς συμπαράγοντες, όπως η X-linked mammalian IAP protein (XIAP), ώστε να αναστέλλεται η ενεργή κασπάση-9 μέσα στο αποπτόσωμα, ενώ τόσο η διμερής, όσο και η μονομερής του μορφή, μπορεί να αλληλεπιδρά με το μόριο Smac/Diablo, που είναι ο κύριος ανταγωνιστής της survivin και της XIAP (104). Σύμφωνα με αυτό, οι ταυτόχρονη αύξηση των αποπτωτικών κασπασών και της αντιαποπτωτικής survivin, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητή, θα μπορούσε να υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των αποπτωτικών-αντιαποπτωτικών, αλλά και των συμπαραγόντων τους στη σήψη (234). Με τη φωσφορυλίωσή της, η survivin έχει ανευρεθεί να αλληλεπιδρά με τον αντιαποπτωτικό συμπαράγοντα HBXIP (Hepatitis B virus X protein), ώστε να είναι δυνατόν να ενισχύονται οι αντιαποπτωτικές της ιδιότητες. Το σύμπλοκο που προκύπτει γίνεται έτσι ικανό να προσδεθεί στην προκασπάση-9, αλλά και λιγότερο αποτελεσματικά στην ενεργό κασπάση-9 (235).

- Αντιαποπτωτική δραστηριότητα σε λοιμώδη και μη λοιμώδη φλεγμονώδη νοσήματα

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν αναδείξει την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα για την πρωτεΐνη survivin σε οξέα φλεγμονώδη, αλλά και αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς φαίνεται ότι διάφοροι λευκοκυτταρικοί πληθυσμοί, πλούσιοι σε συγκέντρωση αναφορικά με την πρωτεΐνη survivin, μεταναστεύουν στα σημεία της φλεγμονής, με στόχο την αναστολή της απόπτωσης των Τ-λεμφοκυττάρων, όπως έχει για παράδειγμα αποδειχθεί σε περιπτώσεις οξείας σκωληκοειδίτιδας ή ελκώδους κολίτιδας (135,136).

Στην παρούσα εργασία δεν ελέγχθηκε η συμπεριφορά των αποπτωτικών/αντιαποπτωτικών αποκρίσεων σε σχέση με τον εκάστοτε λοιμογόνο μικροοργανισμό που απομονώθηκε. Ωστόσο, διάφορες μελέτες προτείνουν ότι κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων, η απόπτωση επάγεται μέσω ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού και των κασπασών 3 και 9, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin φαίνεται να αυξάνονται ή να καταστέλλονται ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που έχει απομονωθεί. Επομένως, ανάλογα με το εκάστοτε παθογόνο, η απόπτωση στα κύτταρα του ξενιστή ίσως να είναι ευεργετική ή καταστροφική για την επιβίωση (100,130). Σε σχέση με τις ιογενείς λοιμώξεις, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της survivin περιορίζει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων ιών και την επέκταση ιογενών λοιμώξεων. Ποικίλες μελέτες προτείνουν ότι κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων, η πυρόπτωση επάγεται μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και -9, δηλαδή του ενδογενούς (μιτοχονδριακού) αποπτωτικού μονοπατιού, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin έχουν κατά καιρούς ανευρεθεί αυξημένα ή μειωμένα, ανάλογα με το στέλεχος του ιού που απομονώθηκε (104,137). Έτσι, μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η υπερέκφραση της survivin συνδέεται με την αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού (105). Επίσης, σε μια άλλη πειραματική ερευνητική μελέτη σε καλλιέργειες αστροκυττάρων του εγκεφάλου, από επίμυες επιμολυσμένους με ιό Picorna, αποκαλύφθηκε η υπερέκφραση των γονιδιακών μορφών της πρωτεΐνης survivin στα νευρικά κύτταρα, ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύθηκε καμία ενζυμική δραστηριότητα της κασπάσης -3, λόγω σχηματισμού συμπλόκων survivin και κασπάσης-3, που εμπόδιζαν την αποπτωτική διαδικασία. Τα αποτελέσματα αυτά φανέρωσαν την κυρίαρχη ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών μηχανισμών στην εν λόγω ιογενή λοίμωξη (236), εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπου σημειώθηκε η θετική συσχέτιση μεταξύ αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μηχανισμών. Αντίθετα, προκαταρκτικές μελέτες, σε περιπτώσεις σήψης από βακτηριακά παθογόνα, όπως η pseudomonas aeruginosa, έχουν αναδείξει ότι δύο βασικοί τύποι κυττάρων, τα λεμφοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού σωλήνα, υπόκεινται ενεργά στις διαδικασίες της απόπτωσης, οπότε οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι η ενίσχυση των αντιαποπτωτικών μηχανισμών θα μπορούσε να βελτιώνει την έκβαση των σηπτικών ασθενών (237). Ομοίως, πολλαπλές μελέτες, που αφορούν την ισχαιμία και τη βλάβη που προκαλείται από επαναιμάτωση στην υποξαιμική μυοκαρδιοπάθεια, φαίνεται να προσδίδουν στην πρωτεΐνη survivin σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις, εμπλέκοντας τη στα πολύπλοκα μοριακά μονοπάτια, που προστατεύουν από τη μυοκαρδιακή βλάβη. Η εν λόγω μελέτη αποβλέπει σημαντικά στη survivin, ως κεντρικό μόριο-στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στο μέλλον (20). Νέα πειραματικά δεδομένα, αναδεικνύουν τη δράση της survivin στη μείωση του οξειδωτικού στρες, στον έλεγχο της απόπτωσης και της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου thioredoxin (Trx-1)/hemeoxygenase-1, αλλά και στον περιορισμό της καρδιακής δυσλειτουργίας κατά τη σήψη. Επίσης, οι προστατευτικές δράσεις της σιμβαστατίνης έναντι του LPS, φαίνεται να διαμεσολαβούνται μέσω ενεργοποίησης της survivin, αναστολής της κασπάσης 3 και αναστολής της απόπτωσης ηπατοκυττάρων και λεμφοκυττάρων (19). Τέλος, άλλες πρόσφατες ενδιαφέρουσες μελέτες συνέδεσαν τη σημασία της ακέραιης λειτουργικότητας της πρωτεΐνης survivin με την ενίσχυση της νευρογένεσης και τη βελτίωση της νευρολογικής εικόνας μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση, επιβεβαιώνοντας ότι η αναστολή της δράσης της πιθανώς επιδεινώνει τη μνημονική ικανότητα μετά τον τραυματισμό (238–

240), ενώ οι νευροπροστατευτικές της δράσεις έχουν αναδειχθεί προσφάτως σε πειραματικά μοντέλα, μετά από επαγωγή σφαιρικής ισχαιμίας και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (140,241–243).

- Αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin

Η πρωτεΐνη survivin φαίνεται να εκφράζεται ενεργά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού και δεν εκφράζεται στους περισσότερους καλά διαφοροποιημένους ιστούς των ενηλίκων, ενώ το γονίδιο κωδικοποίησής της περιέχει μια περιοχή BIR, η οποία είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση των αντιαποπτωτικών της λειτουργιών (244,245). Η υπερέκφραση της ισομορφής -WT είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των νεοπλασιών και είναι ενδεικτική μειωμένης επιβίωσης των ασθενών, αυξημένου κινδύνου υποτροπών και ανθεκτικότητας στην αντινεοπλασματική θεραπεία (246). Η καινοτομία της παρούσας εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι για πρώτη φορά αναδείχθηκε η ποσοτικά αυξημένη έκφραση τόσο της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής έκφρασης της survivin-WT, όσο και των ολικών (ενεργών και διασπασμένων μορφών) κασπασών στη σήψη. Επιπλέον, οι γονιδιακές ισομορφές survivin -2B και -WT, όπως και οι πρωτεϊνικές μορφές της κασπάσης-9 και της survivin, φάνηκε να έχουν καλύτερη διακριτική ικανότητα αναφορικά με τη βαρύτητα της σήψης ανάμεσα σε όλους τους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Αυτό το εύρημα ενισχύει τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, που έδειξαν ότι συγκεκριμένα βιομόρια σχετιζόμενα με μειωμένη βιο-ενέργεια και φυσική ανοσία, υπομεταβολισμό ή οξύ ορμονικό στρες μπορούν να διακρίνουν τις βαρύτερες μορφές σήψης, συγκριτικά με κοινούς εργαστηριακούς δείκτες, όπως το γαλακτικό οξύ ή η C-reactive protein (CRP) (247,248).

Μία πιθανή εξήγηση για τα αυξημένα επίπεδα της survivin στη σήψη θα μπορούσε να είναι ότι το κύτταρο παράγει όσο περισσότερα αντιαποπτωτικά βιομόρια μπορεί, σε μια προσπάθεια να επιβιώσει. Έχει δειχθεί στο παρελθόν, ότι σε επικίνδυνες καταστάσεις, οι προστατευτικές πρωτεΐνες θερμικού σοκ απεκκρίνονται ως σήματα κινδύνου, με στόχο να ενεργοποιήσουν τη φυσική και επίκτητη ανοσία του ξενιστή (249,250). Παρότι, αυτή η “υπόθεση κινδύνου” θα μπορούσε να εξηγήσει την ταυτόχρονη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση της survivin στους αποβιώσαντες ασθενείς, μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες στο μέλλον θα μπορούσαν να εστιάσουν σε πολλαπλά μονοπάτια ταυτόχρονα, ώστε να αποκρυπτογραφήσουν καλύτερα αυτή την πολύπλοκη ρυθμιστική ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μονοπατιών και να εξηγήσουν τις αποκρίσεις σε αποπτωτικά σήματα (251,252). Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για τον ρόλο των αντιαποπτωτικών βιομορίων στη σήψη, ωστόσο μια πρόσφατη μελέτη των Lorente et al. ανέδειξε ότι η μεγάλη ηλικία των ασθενών, το υψηλό γαλακτικό οξύ, η ανάπτυξη σηπτικής καταπληξίας, η υψηλή βαθμολογία κατά το SOFA score, αλλά και τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin χαρακτήριζαν τους αποβιώσαντες σηπτικούς ασθενείς της μελέτης (253). Αντίστοιχη μελέτη, επίσης ανέδειξε τα μειωμένα επίπεδα της survivin στον ορό των σηπτικών ασθενών που απεβίωσαν, ωστόσο οι μελέτες αυτές δεν επιβεβαίωσαν τα ευρήματά τους με τον

ταυτόχρονο γονιδιακό προσδιορισμό της δράσης των μεταγράφων της survivin σε ενδοκυττάριο επίπεδο (139).

- Αντιαποπτωτικές ισομορφές της πρωτεΐνης survivin

Εκτός από την -WT ισομορφή της survivin, ποικίλες άλλες ισομορφές, παραγόμενες μέσω εναλλακτικού ματίσματος του ανθρώπινου γονιδίου της survivin (BIRC5) έχουν αναγνωριστεί έως του παρόντος. Όπως έχει ήδη αναλυθεί, οι πιο γνωστές είναι το μετάγραφο ΔEx3 (η ισομορφή που δεν κατέχει το εξώνιο 3), η -2B (ισομορφή η οποία κατακρατά ένα κομμάτι του εσωνίου 2 ως κρυπτικό εξώνιο) και η -3B (ισομορφή στην οποία ένα καινούριο εξώνιο 3B προκύπτει από ένα τμήμα του εσωνίου 3), ενώ άλλες ισομορφές δεν έχουν χαρακτηριστεί ικανοποιητικά έως τώρα (145,147). Οι Mokuda et al. έχουν ήδη διερευνήσει την έκφραση και λειτουργία της πρωτεΐνης survivin σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ έχουν επίσης ανιχνεύσει αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης survivin σε ιστούς ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, χρησιμοποιώντας αντισώματα ανίχνευσης των διαφορετικών ισομορφών της survivin (254,255). Βάσει της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για την παρούσα εργασία, καμία μελέτη δεν έχει έως τώρα ασχοληθεί με την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης της wild-type ισομορφής της πρωτεΐνης survivin σε σηπτικούς ασθενείς. Πολλαπλές μελέτες σε νεοπλασματικούς ασθενείς έχουν αναδείξει την αυξημένη έκφραση των μεταγράφων -WT, -2B, -ΔEx3 και -3B της πρωτεΐνης survivin σε καρκινικούς ιστούς, ενώ δεν ανίχνευσαν έκφραση αυτών σε κοντινούς μη καρκινικούς ιστούς (256). Επιπλέον, τα επίπεδα ορού της ισομορφής -WT σε CD4+ και CD19+ λεμφοκύτταρα ασθενών με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα ήταν παρόμοια με αυτά στον ορό σε υγιείς μάρτυρες, ενώ η survivin -2B και -ΔEx3 ήταν σημαντικά αυξημένες στα CD19+ Β-λεμφοκύτταρα (257). Στην παρούσα μελέτη, νέοι πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές σχεδιάστηκαν για την αποφυγή μη ειδικών πολλαπλασιασμών, ενώ η ισομορφή survivin -2B ήταν το κυρίαρχο μετάγραφο. Τα επίπεδα έκφρασης και η ενδοκυττάρια εντόπιση της κάθε ισομορφής φαίνεται να σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες για το κάθε μετάγραφο, γεγονός το οποίο έχει μελετηθεί καλύτερα σε νεοπλασματικούς ασθενείς. Έτσι, τα μετάγραφα survivin-WT, -ΔEx3 και -3B φαίνεται να κατέχουν αντιαποπτωτικές ιδιότητες, ενώ άλλες μελέτες σε αυτοάνοσα νοσήματα αμφισβητούν το αντιαποπτωτικό δυναμικό κυρίως των μεταγράφων -2B -3B και -2α. Επίσης, η survivin-2B φαίνεται να έχει περιορισμένες αντιαποπτωτικές ιδιότητες, ενώ, αντίθετα, πιθανότατα εκτελεί τις αποπτωτικές της λειτουργίες μέσω του διμερισμού της με την -WT (100,258).

Στην παρούσα εργασία, η ισομορφή survivin -2B αναδείχθηκε ως το κυρίαρχο μετάγραφο, που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα στη σήψη. Ωστόσο, σε μελέτες ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή νεοπλασματικά νοσήματα, η ισομορφή -WT αποτελεί την κυρίαρχη μορφή έκφρασης της survivin, ακολουθούμενη από τις -2B και -ΔEx3 (257). Πρόσφατες μελέτες, επίσης, καταδεικνύουν ότι η μορφή -WT αποτελεί το κυρίαρχο μετάγραφο της πρωτεΐνης survivin, με την -2B να ακολουθεί και την -ΔEx3 να αποτελεί τη λιγότερο παραγώγιμη μορφή της πρωτεΐνης (149). Μία πρόσφατη ερευνητική δουλειά αποκάλυψε ότι ένα κοινό ρυθμιστικό δίκτυο είναι υπεύθυνο για την ταυτόχρονη έκφραση λειτουργικά συνδεόμενων ισομορφών της κάθε πρωτεΐνης (259), εύρημα που

ενισχύει τη σύγχρονη αντίληψη ότι καλύτεροι υποψήφιοι θεραπευτικοί παράγοντες, θα έπρεπε να θεωρούνται ξεχωριστά όλα τα διαφορετικά μετάγραφα, που εκφράζονται από το εκάστοτε γονίδιο και όχι απλά το παραγόμενο προϊόν ενός μεμονωμένου γονιδίου (260). Τα ποικίλα μετάγραφα της survivin, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν διαφορετική κυτταρική εντόπιση, που πιθανώς να σχετίζεται με το αντιαποπτωτικό τους δυναμικό. Πειραματικές εργασίες έχουν αποδείξει ότι η wild-type μορφή της πρωτεΐνης μπορεί να παρουσιάζει ετεροδιμερισμό με τις υπόλοιπες ισομορφές, δημιουργώντας διακριτά σύμπλοκα, κάτι που πιθανώς να καθορίζει την κυτταρική τους εντόπιση και δραστηριότητα. Η συνεργική έκφραση, για παράδειγμα, της -WT με την ισομορφή -ΔEx3 φαίνεται ότι συστρατεύει αυτά τα σύμπλοκα στα μιτοχόνδρια, όπου καθίσταται δυνατή η αναστολή της απόπτωσης (261). Επιπλέον, η εντόπιση των διαφορετικών ισομορφών φαίνεται να εξαρτάται και από την ύπαρξη ενός γονιδιακού σήματος εξόδου από τον κυτταρικό πυρήνα (nuclear export signal- NES), το οποίο είναι παρόν για τις ισομορφές 2B και 3B, αλλά απόν για τις ΔEx3 και 2α, οι οποίες ως εκ τούτου εισέρχονται στον πυρήνα με παθητική διάχυση. Η ύπαρξη NES φαίνεται να συνδέεται, επίσης, με τις κυτταροπροστατευτικές δράσεις μερικών ισομορφών της πρωτεΐνης survivin, με κυρίαρχη την ισομορφή -3B, η οποία πιστεύεται ότι εμφανίζει ανάλογη βιολογική δράση με τη -WT μορφή της survivin (258). Οι δράσεις των διαφόρων ισομορφών δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες έως του παρόντος. Οι ισομορφές -ΔEx3 και -3B θεωρούνται αντιαποπτωτικές, ενώ η -2B και η -2α ίσως να εμφανίζουν προ-αποπτωτικές λειτουργίες, πιθανώς οφειλόμενες στον ετεροδιμερισμό τους με την -WT, περιορίζοντας έτσι την αντιαποπτωτική της ικανότητα, ενώ σε άλλες εργασίες περιγράφονται ως κυτταροπροστατευτικές ή ως μη λειτουργικές (262).

- Αντιαποπτωτικοί συμπαράγοντες- πρωτεΐνη XIAP

Στην παρούσα εργασία, καταγράφηκε η αυξητική τάση ενός βασικού αντιαποπτωτικού συμπαράγοντα, της πρωτεΐνης XIAP, στη σηπτική ομάδα, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες της μελέτης, χωρίς ωστόσο αυτή η τάση να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα. Η πρωτεΐνη XIAP θεωρείται ένας πολύ σημαντικός ενδογενής αντιαποπτωτικός παράγοντας, που αναστέλλει την απόπτωση, μέσω αναστολής των εκτελεστικών κασπασών -3 και -7. Επίσης, φαίνεται ότι μπορεί να ελέγχει τη δράση των παραγόμενων τοξικών ριζών οξυγόνου (ROS), αναστέλλοντας την απόπτωση που επάγεται από το οξειδωτικό στρες. Σε πρόσφατη μελέτη σε πειραματικά μοντέλα σήψης φάνηκε ότι τα σηπτικά καρδιομυοκύτταρα, που υφίστανται έμμεση αναστολή της δράσης της αντιαποπτωτικής XIAP, οδηγούνται στην ενεργοποίηση της απόπτωσης και σε παράταση των φλεγμονωδών διεργασιών (263). Ομοίως, σε άλλο πειραματικό μοντέλο σήψης, η μυοκαρδιακή βλάβη φάνηκε να αναστρέφεται μέσω ενεργοποίησης της XIAP και καταστολής του NF-κB (264).

Προοπτική της μελέτης

- Εφαρμογές αναστολής του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης

Οι πολύπλοκες και ευαίσθητες ισορροπίες ανάμεσα σε οξειδωτικούς ή αποπτωτικούς/αντιαποπτωτικούς παράγοντες, που τονίζονται από την παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι δεν αποτελούν ένα εύκολο θεραπευτικό πεδίο. Χαρακτηριστικές είναι οι μελέτες σε νεοπλασματικούς πληθυσμούς, στους οποίους ενισχύθηκε η απόπτωση, σε μια προσπάθεια να κατασταλεί η ογκογόνος δραστηριότητα. Ωστόσο, η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, αντί για ευεργετικά αποτελέσματα, ανέδειξε μια παράδοξη "σκοτεινή επίδραση", που ανοίγει το κουτί της Πανδώρας, καθώς η παραγωγή κυτταρικών αποβλήτων πυροδότησε την ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών, που δεν οδηγούσαν μόνο σε επιδιόρθωση των ιστών, αλλά και σε όγκο-αναγεννητική ενίσχυση (265). Έτσι, οι θεραπευτικές προσπάθειες προς οποιαδήποτε αποπτωτική/οξειδωτική ή αντιαποπτωτική/αντιοξειδωτική κατεύθυνση αποτελούν έναν δυσεπίλυτο γρίφο, που θα πρέπει να αποκρυπτογραφηθεί προσεκτικά. Επομένως, η όσο το δυνατόν πληρέστερη κατανόηση όλων των πολύπλοκων μηχανισμών, που εμπλέκονται στις δυσερμήνευτες ανοσολογικές αποκρίσεις, φαίνεται ότι αποτελεί έναν κρίσιμο επιστημονικό στόχο για το μέλλον.

Η παρούσα έρευνα αποτελεί το εφαλτήριο, επάνω στο οποίο θα μπορούσε να στηριχτεί μια ευρύτερη πολυκεντρική μελέτη, με στόχο να συμπεριλάβει μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Αναμένονται με μεγάλο ενδιαφέρον τα αποτελέσματα από ένα ευρύτερο δείγμα ενήλικων και παιδιατρικών ασθενών και ίσως από περισσότερες συσχετίσεις με σημαντικές παραμέτρους φλεγμονής και σήψης. Η προοπτική της μελλοντικής παρέμβασης στα μονοπάτια της απόπτωσης μέσω της εκλεκτικής καταστολής ισομορφών της απόπτωσης ή της ενίσχυσης αντιαποπτωτικών βιομορίων, όπως η survivin, φαντάζει ένα ελκυστικό σενάριο θεραπευτικής παρέμβασης στη σήψη.

Περιορισμοί της μελέτης

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθούν ορισμένοι περιορισμοί της μελέτης. Καταρχάς, το μέγεθος του δείγματος των σηπτικών ασθενών δεν επέτρεψε την εκτέλεση ισχυρών αναλύσεων συγκεκριμένων λοιμωδών υποκατηγοριών (ιογενείς, βακτηριακές λοιμώξεις), ώστε να μπορούσε ενδεχομένως να προσεγγιστεί καλύτερα η αλληλεπίδραση οξειδωτικών και αποπτωτικών μονοπατιών, που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της σηπτικής διαδικασίας. Έτσι, δεν καταγράφηκαν συγκεκριμένοι λοιμογόνοι παράγοντες ή κατηγορίες λοιμώξεων, που θα μπορούσαν να διαφοροποιούν τις κλινικές ομάδες ως προς την έκφραση συγκεκριμένων βιομορίων. Μια τέτοια προσπάθεια θα απαιτήσει τον σχεδιασμό εκτεταμένης πολυκεντρικής μελέτης, που θα συμπεριλάβει ικανό αριθμό ασθενών και ταξινομήσεις σε υπο-ομάδες μελέτης (sub-cohorts). Στην παρούσα εργασία, οι υπό μελέτη ομάδες αντιπροσώπευσαν έναν πραγματικό κλινικό πληθυσμό των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας, οπότε η εξομοίωση (matching) μεταξύ μεγαλύτερων σε ηλικία σηπτικών ασθενών (ομάδα σήψης) και νεότερων πολυτραυματιών (ομάδα μη λοιμώδους φλεγμονής) δεν θα μπορούσε να είναι απόλυτα εφικτή. Για καλύτερη εξομοίωση η ομάδα των χειρουργικών ασθενών θα έπρεπε να περιλαμβάνει κυρίως μεγαλύτερους σε ηλικία νεοπλασματικούς ασθενείς, ωστόσο οι συγκεκριμένοι ασθενείς εξαιρέθηκαν από τη μελέτη βάσει των κριτηρίων αποκλεισμού. Έτσι, για να περιοριστεί η επίδραση του προβλήματος της εξομοίωσης διενεργήθηκε ανάλυση αντιστοίχισης τάσης βαθμολογίας (propensity probability analysis). Η εν λόγω ανάλυση, που έλαβε υπόψιν την ηλικία και το φύλο ως τους πιθανότερους συγχυτικούς παράγοντες αλλοίωσης των αποτελεσμάτων του οξειδωτικού στρες, δεν ανέδειξε σημαντική επίδραση αυτών των συμπαραγόντων στον λόγο TOS/TAC, όπως παρουσιάστηκε στο τμήμα των αποτελεσμάτων της μελέτης. Επίσης, στον έλεγχο συσχετίσεων διμεταβλητών δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική η επίδραση της ηλικίας στον λόγο TOS/TAC. Παρόμοια προηγηθείσα μελέτη στο οξειδωτικό στρες δεν ανέδειξε, επίσης, σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ηλικιακές ομάδες (καρκινοπαθείς ασθενείς <60 ετών συγκριτικά με καρκινοπαθείς ασθενείς >60 ετών, $p>0.05$) (266). Αναφορικά με τις κασπάσες, αν και η παρούσα εργασία προσπάθησε να προσδιορίσει ποσοτικά τη συνολική συγκέντρωση όλων των μορφών των κασπασών (ενεργές και διασπασμένες μορφές κασπασών), μελλοντικές μελέτες θα χρειαστούν για να αποσαφηνίσουν επακριβώς την ενζυμική τους δραστηριότητα και ενεργότητα στη σήψη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα πρωταρχικό βήμα στον προσδιορισμό της πρώιμης αντιαποπτωτικής απόκρισης της πρωτεΐνης survivin στην επαγωγή κυρίαρχων αποπτωτικών βιομορίων, όπως η κασπάση-3 και -9. Αυτός είναι και ο λόγος, που δεν εστίασε σε περισσότερο ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που ρυθμίζουν την έκφραση της survivin, ή σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, στους οποίους μπορεί η survivin στη σήψη να παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά. Περισσότερες μελλοντικές μελέτες θα χρειαστούν για να επιβεβαιώσουν και να διασαφηνίσουν καλύτερα αυτά τα πρώιμα ευρήματα, αναφορικά με τους οξειδωτικούς και αποπτωτικούς/αντιαποπτωτικούς βιοδείκτες σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, που πλήττονται κυρίως από τη σηπτική διαδικασία, αλλά και στις διαφορετικές κατηγορίες βαρύτητας των σηπτικών και μη-σηπτικών βαρέως πασχόντων ασθενών.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η σήψη φάνηκε να είναι ανεξάρτητα συνδεδεμένη με μια αυξημένη οξειδωτική-αντιοξειδωτική ανισορροπία, συγκριτικά με τη μη σηπτική βαριά νόσο. Αυτή η διαταραχή της οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ομοιόστασης, συνοδευόμενη από αυξημένη δραστηριότητα των κασπασών του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης, φαίνεται ότι αποτελεί έναν πρώιμο δείκτη της σηπτικής διαδικασίας, που σχετίζεται με τη θνητότητα. Επίσης, οι αλλαγές του λόγου TOS/TAC φαίνεται ότι επηρεάζονται από την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη survivin και καθορίζουν τη βαρύτητα της σήψης. Οι μη γραμμικές μεταβολές του δείκτη TOS/TAC, όπως καταγράφηκαν στους πληθυσμούς της μελέτης, πιθανώς υποδηλώνουν ότι χρειάζεται να εξασφαλιστούν εξατομικευμένες μελλοντικές θεραπευτικές πρακτικές, βάσει καλά μελετημένων σηπτικών φαινοτύπων. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε, επίσης, την υπερέκφραση των αποπτωτικών κασπασών -3 και -9, που συνοδεύτηκε από σύγχρονη υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin σε υπερφλεγμονώδεις σηπτικές καταστάσεις. Οι εν λόγω διαφοροποιήσεις στη σήψη επιβεβαιώθηκαν μέσω της καταγεγραμμένης αντιαποπτωτικής γονιδιακής δραστηριότητας συγκεκριμένων ισομορφών της survivin, με την ανεύρεση αυξημένης έκφρασης των ισομορφών -WT, -2B, και -ΔEx3, αλλά, αντίθετα, μειωμένης έκφρασης μόνο της ισομορφής -3B στην πρώιμη σηπτική κατάσταση. Έτσι, η εναλλακτική συρραφή εξωνίων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός σηματοδότησης και διαφοροποίησης των υγιών από διάφορες παθολογικές κυτταρικές διεργασίες. Για πρώτη φορά, έγινε μια προσπάθεια στην παρούσα εργασία να μελετηθούν οι πιθανές επιδράσεις τόσο της πρωτεϊνικής όσο και της γονιδιακής έκφρασης των διαφορετικών μορφών της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin, όπως και η επίδραση των αποπτωτικών κασπασών στην έκβαση της σήψης. Έτσι, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης αυτών των βιομορίων θα μπορούσε να προβλέπει τη βαρύτητα της νόσου και την έκβαση, όπως και να παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την αποτελεσματικότερη κλινική διαχείριση των σηπτικών ασθενών. Συγκεκριμένα αποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μονοπάτια θα μπορούσαν να αποτελούν ερευνητικούς ελκυστικούς στόχους για την αποκρυπτογράφηση της παθοφυσιολογίας της σήψης. Η κατηγοριοποίηση των σηπτικών ασθενών, βάσει γενετικών ¨σφραγίδων¨, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών πρακτικών στο μέλλον. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψιν και να προχωρήσουν ένα βήμα παραπέρα τις γνώσεις μας για τους οξειδωτικούς και αποπτωτικούς/αντιαποπτωτικούς βιοδείκτες, που χαρακτηρίζουν την έκβαση στη σήψη. Η οποιαδήποτε συσχέτιση του οξειδωτικού/αποπτωτικού/αντιαποπτωτικού προφίλ του εκάστοτε ασθενούς με την πολυοργανική ανεπάρκεια και τη θνητότητα θα αποτελέσει εφαλτήριο, υποδηλώνοντας τον κεντρικό ρόλο αυτών των βιομορίων στην παθογένεση της σήψης ή της σηπτικής καταπληξίας, οδηγώντας σε σημαντικές μελλοντικές επιστημονικές εξελίξεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP, Billman K, Eisenhaure T, Hung DT, et al. An immune-cell signature of bacterial sepsis. Nat Med. 2020 Mar;26(3):333–40.

2. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. SAGE Open Med. 2019 Mar 21;7:2050312119835043.

3. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. Lancet Respir Med. 2014 Dec;2(5):380–6.

4. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. Nat Rev Dis Primers. 2016 Jun 30;2:16045.

5. Bruse N, Leijte GP, Pickkers P, Kox M. New frontiers in precision medicine for sepsis-induced immunoparalysis. Expert Rev Clin Immunol. 2019 Mar;15(3):251–63.

6. Bline KE, Hall MW. Immune Function in Critically Ill Septic Children. Pathogens. 2021 Sep 25;10(10):1239.

7. Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM, et al. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. Crit Care Med. 2017 Feb;45(2):253–62.

8. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2013 Dec;13(12):862–74.

9. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. Front Immunol. 2018 Oct 2;9:2171.

10. Luan Y yi, Yao Y ming, Xiao X zhong, Sheng Z yong. Insights into the Apoptotic Death of Immune Cells in Sepsis. J Interferon Cytokine Res. 2015 Jan 1;35(1):17–22.

11. Duplessis C, Gregory M, Frey K, Bell M, Truong L, Schully K, et al. Evaluating the discriminating capacity of cell death (apoptotic) biomarkers in sepsis. Journal of Intensive Care. 2018 Aug 13;6(1):72.

12. Smith C, Wang X, Yin H. Caspases come together over LPS. Trends Immunol. 2015 Feb;36(2):59–61.

13. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, González-Rivero AF, López RO, Ferreres J, et al. Sustained high serum caspase-3 concentrations and mortality in septic patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Feb;37(2):281–8.

14. Briassoulis G, Briassoulis P, Miliaraki M, Ilia S, Parlato M, Philippart F, et al. Biomarker cruises in sepsis: who is the CAPTAIN? Discussion on “Circulating biomarkers may be unable to detect infection at the early phase of sepsis in ICU patients: the CAPTAIN prospective multicenter

cohort study.” Intensive Care Med. 2019;45(1):132–3.

15. Wang Y, Yin X, Yang F. Comprehensive Analysis of Gene Expression Profiles of Sepsis-Induced Multiorgan Failure Identified Its Valuable Biomarkers. DNA Cell Biol. 2018 Feb;37(2):90–8.

16. Atreya MR, Wong HR. Precision medicine in pediatric sepsis. Curr Opin Pediatr. 2019 Mar 18;

17. Qiu P, Cui X, Sun J, Welsh J, Natanson C, Eichacker PQ. Antitumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials: a meta-analysis. Crit Care Med. 2013 Oct;41(10):2419–29.

18. Grimaldi D, Goicoechea Turcott EW, Taccone FS. IL-1 receptor antagonist in sepsis: new findings with old data? J Thorac Dis. 2016 Sep;8(9):2379–82.

19. Nežić L, Amidžić L, Škrbić R, Gajanin R, Nepovimova E, Vališ M, et al. Simvastatin Inhibits Endotoxin-Induced Apoptosis in Liver and Spleen Through Up-Regulation of Survivin/NF-κB/p65 Expression. Front Pharmacol. 2019;10:54.

20. Shinozaki S, Inoue Y, Yang W, Fukaya M, Carter EA, Yu YM, et al. Farnesyltransferase inhibitor improved survival following endotoxin challenge in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 15;391(3):1459–64.

21. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, Angus DC, Moldawer LL, Crouser ED, et al. Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 Antibody (BMS-936559). Crit Care Med. 2019 May;47(5):632–42.

22. Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis. Cell Death Dis. 2014 Nov 20;5:e1526.

23. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801–10.

24. Napolitano LM. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. Surg Infect (Larchmt). 2018 Mar;19(2):117–25.

25. Liu C, Suo S, Luo L, Chen X, Ling C, Cao S. SOFA Score in relation to Sepsis: Clinical Implications in Diagnosis, Treatment, and Prognostic Assessment. Comput Math Methods Med. 2022;2022:7870434.

26. Matics TJ, Sanchez-Pinto LN. Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. JAMA Pediatr. 2017 Oct 2;171(10):e172352.

27. Kahn JM, Davis BS, Yabes JG, Chang CCH, Chong DH, Hershey TB, et al. Association

Between State-Mandated Protocolized Sepsis Care and In-hospital Mortality Among Adults With Sepsis. JAMA. 2019 Jul 16;322(3):240–50.

28. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. Intensive Care Med. 2020 Feb;46(Suppl 1):10–67.

29. Matics TJ, Sanchez-Pinto LN. Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. JAMA Pediatr. 2017 Oct;171(10):e172352.

30. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. N Engl J Med. 2015 Apr 23;372(17):1629–38.

31. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):762–74.

32. Menon K, Schlapbach LJ, Akech S, Argent A, Biban P, Carrol ED, et al. Criteria for Pediatric Sepsis—A Systematic Review and Meta-Analysis by the Pediatric Sepsis Definition Taskforce*. Crit Care Med. 2022 Jan;50(1):21–36.

33. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005 Jan;6(1):2–8.

34. Proulx F, Fayon M, Farrell CA, Lacroix J, Gauthier M. Epidemiology of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in children. Chest. 1996 Apr;109(4):1033–7.

35. de Souza DC, Machado FR. Epidemiology of Pediatric Septic Shock. J Pediatr Intensive Care. 2019 Mar;8(1):3–10.

36. Zhang YY, Ning BT. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. Signal Transduct Target Ther. 2021 Nov 25;6(1):407.

37. Zhu CL, Wang Y, Liu Q, Li HR, Yu CM, Li P, et al. Dysregulation of neutrophil death in sepsis. Front Immunol. 2022;13:963955.

38. Tapping RI. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. Semin Immunol. 2009 Aug;21(4):175–84.

39. Nakamori Y, Park EJ, Shimaoka M. Immune Deregulation in Sepsis and Septic Shock: Reversing Immune Paralysis by Targeting PD-1/PD-L1 Pathway. Front Immunol. 2020;11:624279.

40. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. Br J Haematol. 2005 Nov;131(4):417–30.

41. Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. Immunol Rev. 2009 Jan;227(1):5–8.

42. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. Chest. 2003 Sep;124(3):1103–15.

43. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2017 Jul;17(7):407–20.

44. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. Nat Rev Nephrol. 2018 Feb;14(2):121–37.

45. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 2003 Jan 9;348(2):138–50.

46. Marshall JC, Charbonney E, Gonzalez PD. The immune system in critical illness. Clin Chest Med. 2008 Dec;29(4):605–16, vii.

47. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. J Exp Med. 2011 Dec 19;208(13):2581–90.

48. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol. 2001 Jun 1;166(11):6952–63.

49. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. J Trauma Acute Care Surg. 2012 Jun;72(6):1491–501.

50. Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. Surg Infect (Larchmt). 2003;4(2):171–80.

51. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Kumar Srivastava V, Mehta SK, Jyoti A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. Scand J Immunol. 2018 Apr;87(4):e12653.

52. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol. 2000 Feb;190(3):244–54.

53. Díaz NL, Finol HJ, Torres SH, Zambrano CI, Adjounian H. Histochemical and ultrastructural study of skeletal muscle in patients with sepsis and multiple organ failure syndrome (MOFS). Histol Histopathol. 1998 Jan;13(1):121–8.

54. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jun;161(6):1781–5.

55. Takatani Y, Ono K, Suzuki H, Inaba M, Sawada M, Matsuda N. Inducible nitric oxide synthase during the late phase of sepsis is associated with hypothermia and immune cell migration. Lab Invest. 2018 May;98(5):629–39.

56. El-Awady MS, Nader MA, Sharawy MH. The inhibition of inducible nitric oxide synthase

and oxidative stress by agmatine attenuates vascular dysfunction in rat acute endotoxemic model. Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Oct;55:74–80.

57. Wang L, Bastarache JA, Ware LB. The coagulation cascade in sepsis. Curr Pharm Des. 2008;14(19):1860–9.

58. Tang D, Wang H, Billiar TR, Kroemer G, Kang R. Emerging mechanisms of immunocoagulation in sepsis and septic shock. Trends Immunol. 2021 Jun;42(6):508–22.

59. Nguyen TC, Carcillo JA. Bench-to-bedside review: thrombocytopenia-associated multiple organ failure--a newly appreciated syndrome in the critically ill. Crit Care. 2006;10(6):235.

60. Vieillard-Baron A. Septic cardiomyopathy. Ann Intensive Care. 2011 Apr 13;1(1):6.

61. Jones AE, Puskarich MA. Sepsis-induced tissue hypoperfusion. Crit Care Nurs Clin North Am. 2011 Mar;23(1):115–25.

62. Achuthan AA, Lee KMC, Hamilton JA. Targeting GM-CSF in inflammatory and autoimmune disorders. Semin Immunol. 2021 Apr;54:101523.

63. de Roquetaillade C, Monneret G, Gossez M, Venet F. IL-7 and Its Beneficial Role in Sepsis-Induced T Lymphocyte Dysfunction. Crit Rev Immunol. 2018;38(6):433–51.

64. Shindo Y, McDonough JS, Chang KC, Ramachandra M, Sasikumar PG, Hotchkiss RS. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. J Surg Res. 2017 Feb;208:33–9.

65. Wen X, Xie B, Yuan S, Zhang J. The “Self-Sacrifice” of ImmuneCells in Sepsis. Front Immunol. 2022;13:833479.

66. Tummers B, Mari L, Guy CS, Heckmann BL, Rodriguez DA, Rühl S, et al. Caspase-8-Dependent Inflammatory Responses Are Controlled by Its Adaptor, FADD, and Necroptosis. Immunity. 2020 Jun 16;52(6):994-1006.e8.

67. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. Cell Biol Toxicol. 2020 Apr;36(2):145–64.

68. Zhang G, Dong D, Wan X, Zhang Y. Cardiomyocyte death in sepsis: Mechanisms and regulation (Review). Mol Med Rep. 2022 Aug;26(2):257.

69. Wang R, Hao M, Kou X, Sui B, Sanmillan ML, Zhang X, et al. Apoptotic vesicles ameliorate lupus and arthritis via phosphatidylserine-mediated modulation of T cell receptor signaling. Bioact Mater. 2023 Jul;25:472–84.

70. Ou Q, Tan L, Shao Y, Lei F, Huang W, Yang N, et al. Electrostatic Charge-Mediated Apoptotic Vesicle Biodistribution Attenuates Sepsis by Switching Neutrophil NETosis to Apoptosis. Small. 2022 Dec;18(20):e2200306.

71. Wang Y, Kanneganti TD. From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. Comput Struct Biotechnol J.

2021;19:4641–57.

72. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. Nat Immunol. 2011 Nov 16;12(12):1143–9.

73. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. Nature. 2015 Jan 15;517(7534):311–20.

74. Leng Y, Zhang Y, Li X, Wang Z, Zhuang Q, Lu Y. Receptor Interacting Protein Kinases 1/3: The Potential Therapeutic Target for Cardiovascular Inflammatory Diseases. Front Pharmacol. 2021;12:762334.

75. Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Nov;14(11):727–36.

76. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell. 2009 Jun 12;137(6):1112–23.

77. Zhang T, Yin C, Boyd DF, Quarato G, Ingram JP, Shubina M, et al. Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis. Cell. 2020 Mar 19;180(6):1115-1129.e13.

78. Heckmann BL, Tummers B, Green DR. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. Cell Death Differ. 2019 Jan;26(1):41–52.

79. Mishra AP, Salehi B, Sharifi-Rad M, Pezzani R, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, et al. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. Mol Diagn Ther. 2018 Jun;22(3):281–95.

80. Zheng X, Chen W, Gong F, Chen Y, Chen E. The Role and Mechanism of Pyroptosis and Potential Therapeutic Targets in Sepsis: A Review. Front Immunol. 2021;12:711939.

81. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. Cell Microbiol. 2006 Nov;8(11):1812–25.

82. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. Immunol Rev. 2017;277(1):61–75.

83. Li YF, Nanayakkara G, Sun Y, Li X, Wang L, Cueto R, et al. Analyses of caspase-1-regulated transcriptomes in various tissues lead to identification of novel IL-1β-, IL-18- and sirtuin-1-independent pathways. J Hematol Oncol. 2017 Feb 2;10(1):40.

84. Wang L, Qin X, Liang J, Ge P. Induction of Pyroptosis: A Promising Strategy for Cancer Treatment. Front Oncol. 2021;11:635774.

85. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. Nat Commun. 2017 Jan 3;8:14128.

86. Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, Li P, Nilson R, Tang AY, et al. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Nov 13;115(46):E10888–97.

87. Wiscovitch-Russo R, Ibáñez-Prada ED, Serrano-Mayorga CC, Sievers BL, Engelbride MA, Padmanabhan S, et al. Major adverse cardiovascular events are associated with necroptosis during severe COVID-19. Crit Care. 2023 Apr 20;27(1):155.

88. Malireddi RKS, Gurung P, Kesavardhana S, Samir P, Burton A, Mummareddy H, et al. Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity–independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease. J Exp Med. 2019 Dec 23;217(3):jem.20191644.

89. Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Wei Y, Ginet V, Zhang L, et al. Autosis is a Na+,K+-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17;110(51):20364–71.

90. Liu C, Liu Y, Chen H, Yang X, Lu C, Wang L, et al. Myocardial injury: where inflammation and autophagy meet. Burns Trauma. 2023;11:tkac062.

91. Busch K, Kny M, Huang N, Klassert TE, Stock M, Hahn A, et al. Inhibition of the NLRP3/IL-1β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2021 Dec;12(6):1653–68.

92. Sun Y, Chen P, Zhai B, Zhang M, Xiang Y, Fang J, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020 Jul 1;127:110108.

93. Li N, Wang W, Zhou H, Wu Q, Duan M, Liu C, et al. Ferritinophagy-mediated ferroptosis is involved in sepsis-induced cardiac injury. Free Radic Biol Med. 2020 Nov 20;160:303–18.

94. Li N, Zhou H, Wu H, Wu Q, Duan M, Deng W, et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3. Redox Biol. 2019 Jun;24:101215.

95. Hassannia B, Wiernicki B, Ingold I, Qu F, Van Herck S, Tyurina YY, et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. J Clin Invest. 2018 Aug 1;128(8):3341–55.

96. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. Crit Care. 2011 Jul 28;15(4):R183.

97. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA. 2011 Dec 21;306(23):2594–605.

98. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. Cell Death Differ. 2017 Aug;24(8):1380–9.

99. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: A Dual Player in Healthy and Diseased Skin. The Journal of investigative dermatology. 2011 Sep 8;132:18–27.

100. Pavlidou A, Kroupis C, Goutas N, Dalamaga M, Dimas K. Validation of a real-time quantitative polymerase chain reaction method for the quantification of 3 survivin transcripts and evaluation in breast cancer tissues. Clin Breast Cancer. 2014 Apr;14(2):122–31.

101. Newton K, Wickliffe KE, Maltzman A, Dugger DL, Reja R, Zhang Y, et al. Activity of caspase-8 determines plasticity between cell death pathways. Nature. 2019 Nov;575(7784):679–82.

102. Wang Y, Karki R, Mall R, Sharma BR, Kalathur RC, Lee S, et al. Molecular mechanism of RIPK1 and caspase-8 in homeostatic type I interferon production and regulation. Cell Rep. 2022 Oct 4;41(1):111434.

103. Herr AB. Evolution of an allosteric “off switch” in apoptotic caspases. J Biol Chem. 2018 Apr 13;293(15):5462–3.

104. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. J Virol. 2009 Apr;83(8):3647–56.

105. Barrera-Vázquez OS, Cancio-Lonches C, Hernández-González O, Chávez-Munguia B, Villegas-Sepúlveda N, Gutiérrez-Escolano AL. The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downregulation and apoptosis. Virology. 2019 Jan 15;527:146–58.

106. Rathore R, McCallum JE, Varghese E, Florea AM, Büsselberg D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). Apoptosis. 2017 Jul;22(7):898–919.

107. Lamkanfi M, Moreira LO, Makena P, Spierings DCJ, Boyd K, Murray PJ, et al. Caspase-7 deficiency protects from endotoxin-induced lymphocyte apoptosis and improves survival. Blood. 2009 Mar 19;113(12):2742–5.

108. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. J Leukoc Biol. 2005 Aug;78(2):325–37.

109. Kung CT, Su CM, Chang HW, Cheng HH, Hsiao SY, Tsai TC, et al. The prognostic value of leukocyte apoptosis in patients with severe sepsis at the emergency department. Clin Chim Acta. 2015 Jan 1;438:364–9.

110. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 1]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814742/

111. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. Crit Care Med. 2004 Jul;32(7):1460–9.

112. Harjai M, Bogra J, Kohli M, Pant AB. Is suppression of apoptosis a new therapeutic target in

sepsis? Anaesth Intensive Care. 2013 Mar;41(2):175–83.

113. Xu XE, Liu L, Wang YC, Wang CT, Zheng Q, Liu QX, et al. Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis. Brain Behav Immun. 2019 Aug;80:859–70.

114. Zhao X, Qi H, Zhou J, Xu S, Gao Y. P27 Protects Cardiomyocytes from Sepsis via Activation of Autophagy and Inhibition of Apoptosis. Med Sci Monit. 2018 Nov 27;24:8565–76.

115. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, et al. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. Nature. 2004 Dec 6;429(6987):75–9.

116. Bateman G, Hill B, Knight R, Boucher D. Great balls of fire: activation and signalling of inflammatory caspases. Biochem Soc Trans. 2021 Jun 30;49(3):1311–24.

117. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature. 2015 Oct 29;526(7575):660–5.

118. Tretina K, Park ES, Maminska A, MacMicking JD. Interferon-induced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease. J Exp Med. 2019 Mar 4;216(3):482–500.

119. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature. 2014 Oct 9;514(7521):187–92.

120. Cheng KT, Xiong S, Ye Z, Hong Z, Di A, Tsang KM, et al. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury. J Clin Invest. 2017 Nov 1;127(11):4124–35.

121. Downs KP, Nguyen H, Dorfleutner A, Stehlik C. An overview of the non-canonical inflammasome. Mol Aspects Med. 2020 Dec;76:100924.

122. Choi YJ, Kim S, Choi Y, Nielsen TB, Yan J, Lu A, et al. SERPINB1-mediated checkpoint of inflammatory caspase activation. Nat Immunol. 2019 Mar;20(3):276–87.

123. Dorfleutner A, Chu L, Stehlik C. Inhibiting the inflammasome: one domain at a time. Immunol Rev. 2015 Dec;265(1):205–16.

124. Pavlyukov MS, Antipova NV, Balashova MV, Vinogradova TV, Kopantzev EP, Shakhparonov MI. Survivin Monomer Plays an Essential Role in Apoptosis Regulation. J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23296–307.

125. Sung KW, Choi J, Hwang YK, Lee SJ, Kim HJ, Kim JY, et al. Overexpression of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) is an Independent Unfavorable Prognostic Factor in Childhood de Novo Acute Myeloid Leukemia. J Korean Med Sci. 2009 Aug;24(4):605–13.

126. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. Oncogene. 2008 Oct;27(48):6252–75.

127. Mull AN, Klar A, Navara CS. Differential localization and high expression of SURVIVIN

splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency. Stem Cell Res. 2014 Mar;12(2):539–49.

128. Albadari N, Li W. Survivin Small Molecules Inhibitors: Recent Advances and Challenges. Molecules. 2023 Feb 1;28(3):1376.

129. Jafarzadeh A, Bazargan N, Chatrabnous N, Jafarzadeh S, Nemati M. Contribution of survivin to the immune system, allergies and autoimmune diseases. Hum Immunol. 2023 Apr;84(4):301–10.

130. Grzybowska-Izydorczyk O, Smolewski P. [The role of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2008 Feb 14;62:55–63.

131. Cheung CHA, Chang YC, Lin TY, Cheng SM, Leung E. Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE. Journal of Biomedical Science. 2020 Feb 5;27(1):31.

132. Zareifar S, Ghorbani S, Monabbati A, Bordbar MR, Zekavat OR, Abdolkarimi B, et al. Expression of antiapoptotic proteins livin and survivin in pediatric AML patients, as prognostic markers. Pediatr Hematol Oncol. 2018 Dec;35(4):250–6.

133. Kruszniewska-Rajs C, Smycz-Kubanska M, Strzalka-Mrozik B, Strzelczyk J, Szanecki W, Witek A, et al. Survivin expression at the mRNA level in tumors and the protein concentration in the serum and peritoneal fluid in patients with serous ovarian tumors. Ginekol Pol. 2023 Mar 17;

134. Lu JH, Lai WJ, Jiang LH, Lei FH, Shen LQ, Wu AQ. Design, Synthesis, and Molecular Docking Study of Novel 3-Cyanopyridine Derivatives for the Anti-Cancer Drug Target Survivin Protein. Med Chem. 2023;19(3):246–62.

135. Gravina G, Wasén C, Garcia-Bonete MJ, Turkkila M, Erlandsson MC, Töyrä Silfverswärd S, et al. Survivin in autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2017 Aug;16(8):845–55.

136. Ebrahimiyan H, Aslani S, Rezaei N, Jamshidi A, Mahmoudi M. Survivin and autoimmunity; the ins and outs. Immunol Lett. 2018 Jan;193:14–24.

137. Sen N, Che X, Rajamani J, Zerboni L, Sung P, Ptacek J, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 10;109(2):600–5.

138. Cheng JY, Tang MM, Fang P, Liu Y, Sun J, He QY, et al. Longitudinal associations of serum survivin with the severity and prognosis of community-acquired pneumonia patients. Respir Investig. 2023 Jan;61(1):84–94.

139. Zhang Y, Feng Q, Zhou S, Chen H. Downregulation of serum survivin correlates with increased inflammation, enhanced disease severity and worse prognosis in sepsis patients. Medicine (Baltimore). 2020 Jul 10;99(28):e20272.

140. Sehara Y, Inaba T, Urabe T, Kurosaki F, Urabe M, Kaneko N, et al. Survivin overexpression

via adeno-associated virus vector Rh10 ameliorates ischemic damage after middle cerebral artery occlusion in rats. Eur J Neurosci. 2018 Dec;48(12):3466–76.

141. Scaini G, Fries GR, Valvassori SS, Zeni CP, Zunta-Soares G, Berk M, et al. Perturbations in the apoptotic pathway and mitochondrial network dynamics in peripheral blood mononuclear cells from bipolar disorder patients. Transl Psychiatry. 2017 May 2;7(5):e1111.

142. Wilson RL, Selvaraju V, Lakshmanan R, Thirunavukkarasu M, Campbell J, McFadden DW, et al. Thioredoxin-1 attenuates sepsis-induced cardiomyopathy after cecal ligation and puncture in mice. J Surg Res. 2017 Dec;220:68–78.

143. Zumbrägel FK, Machtens DA, Curth U, Lüder CGK, Reubold TF, Eschenburg S. Survivin does not influence the anti-apoptotic action of XIAP on caspase-9. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jan 22;482(4):530–5.

144. Altieri DC. Survivin - The inconvenient IAP. Semin Cell Dev Biol. 2015 Mar;39:91–6.

145. Moniri Javadhesari S, Gharechahi J, Hosseinpour Feizi MA, Montazeri V, Halimi M. Transcriptional expression analysis of survivin splice variants reveals differential expression of survivin-3α in breast cancer. Genet Test Mol Biomarkers. 2013 Apr;17(4):314–20.

146. Taubert H, Kappler M, Bache M, Bartel F, Köhler T, Lautenschläger C, et al. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. Oncogene. 2005 Aug 4;24(33):5258–61.

147. Sah NK, Seniya C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. Tumour Biol. 2015 Sep;36(9):6623–31.

148. Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. Curr Mol Med. 2011 Nov;11(8):633–49.

149. Vargas IME, Vivas-Mejía PE. Assessment of mRNA splice variants by qRT-PCR. Methods Mol Biol. 2013;1049:171–86.

150. Khan S, Jutzy JMS, Aspe JR, McGregor DW, Neidigh JW, Wall NR. Survivin is released from cancer cells via exosomes. Apoptosis. 2011 Jan;16(1):1–12.

151. L N, L A, R Š, R G, D M, J D, et al. Amelioration of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury and Alveolar Epithelial Cells Apoptosis by Simvastatin Is Associated with Up-Regulation of Survivin/NF-kB/p65 Pathway. International journal of molecular sciences [Internet]. 2022 Feb 26 [cited 2022 Oct 15];23(5). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269738/

152. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. Methods Mol Biol. 2017;1546:125–33.

153. Unal I. Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach. Comput Math Methods Med. 2017;2017:3762651.

154. Almalki WH. The sepsis induced defective aggravation of immune cells: a translational

science underling chemico-biological interactions from altered bioenergetics and/or cellular metabolism to organ dysfunction. Mol Cell Biochem. 2021 Jun;476(6):2337–44.

155. Prauchner CA. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. Burns. 2017 Dec;43(3):471–85.

156. Mantzarlis K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:5985209.

157. Toro-Pérez J, Rodrigo R. Contribution of oxidative stress in the mechanisms of postoperative complications and multiple organ dysfunction syndrome. Redox Rep. 2021 Dec;26(1):35–44.

158. Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. J Surg Res. 2005 May 1;125(1):68–72.

159. Hsiao SY, Kung chia te, Su CM, Lai YR, Huang CC, Tsai NW, et al. Impact of oxidative stress on treatment outcomes in adult patients with sepsis: A prospective study. Medicine. 2020 Jun 26;99:e20872.

160. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Kumar Srivastava V, Mehta SK, Jyoti A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. Scand J Immunol. 2018 Apr;87(4):e12653.

161. Petrovic J, Turnic TN, Zivkovic V, Andjic M, Draginic N, Stojanovic A, et al. Correlation of Redox Status with Procalcitonin and C-reactive Protein in Septic Patients. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:5147364.

162. Bjugstad KB, Rael LT, Levy S, Carrick M, Mains CW, Slone DS, et al. Oxidation-Reduction Potential as a Biomarker for Severity and Acute Outcome in Traumatic Brain Injury. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:6974257.

163. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, López RO, Ferreres J, et al. Serum total antioxidant capacity during the first week of sepsis and mortality. J Crit Care. 2018 Oct;47:139–44.

164. Lorente L, Martín MM, Almeida T, Abreu-González P, Ferreres J, Solé-Violán J, et al. Association between serum total antioxidant capacity and mortality in severe septic patients. J Crit Care. 2015 Feb;30(1):217.e7-12.

165. Lorente L, Martín MM, Almeida T, Abreu-González P, Ramos L, Argueso M, et al. Total antioxidant capacity is associated with mortality of patients with severe traumatic brain injury. BMC Neurol. 2015 Jul 25;15:115.

166. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, González-Rivero AF, Abreu-González P, Ramos L, et al. Traumatic Brain Injury Patients Mortality and Serum Total Antioxidant Capacity. Brain Sci. 2020 Feb 18;10(2):E110.

167. Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, et al. Targeting Oxidative Stress and

Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. Front Mol Neurosci. 2020;13:28.

168. Asci A, Surmeli-Onay O, Erkekoglu P, Yigit S, Yurdakok M, Kocer-Gumusel B. Oxidant and antioxidant status in neonatal proven and clinical sepsis according to selenium status. Pediatr Int. 2015 Dec;57(6):1131–7.

169. Chuang CC, Shiesh SC, Chi CH, Tu YF, Hor LI, Shieh CC, et al. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. Critical Care. 2006 Feb 20;10(1):R36.

170. Keskin D, Kiziltunc A. Reduction of Total Antioxidant Capacity after Femoral Fracture. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2015;82(4):293–5.

171. Servia L, Serrano JCE, Pamplona R, Badia M, Montserrat N, Portero-Otin M, et al. Location-dependent effects of trauma on oxidative stress in humans. PLoS One. 2018;13(10):e0205519.

172. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. Nutrients. 2020 Jul 15;12(7):E2097.

173. Obi J, Pastores SM, Ramanathan LV, Yang J, Halpern NA. Treating sepsis with vitamin C, thiamine, and hydrocortisone: Exploring the quest for the magic elixir. J Crit Care. 2020 Jun;57:231–9.

174. Belsky JB, Wira CR, Jacob V, Sather JE, Lee PJ. A review of micronutrients in sepsis: the role of thiamine, l-carnitine, vitamin C, selenium and vitamin D. Nutr Res Rev. 2018 Dec;31(2):281–90.

175. Prasad AS. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. Front Nutr. 2014 Sep 1;1:14.

176. Gammoh NZ, Rink L. Zinc in Infection and Inflammation. Nutrients. 2017 Jun 17;9(6):624.

177. Fan L, Cui Y, Liu Z, Guo J, Gong X, Zhang Y, et al. Zinc and selenium status in coronavirus disease 2019. Biometals. 2023 Apr 20;1–13.

178. Briassoulis G, Ilia S. Vitamin D Deficiency in Sepsis: "Body Humors" Imbalance or Sepsis "Epiphenomenon"? Crit Care Med. 2017 Feb;45(2):376–7.

179. Briassoulis P, Ilia S, Briassouli E, Miliaraki M, Briassoulis G. The lonely glutamine tree in the middle of the infinite critically ill forest. Crit Care. 2021 Sep 17;25(1):342.

180. Briassouli E, Briassoulis G. Glutamine randomized studies in early life: the unsolved riddle of experimental and clinical studies. Clin Dev Immunol. 2012;2012:749189.

181. Feng JF, Lu L, Dai CM, Wang D, Yang YH, Yang YW, et al. Analysis of the diagnostic efficiency of serum oxidative stress parameters in patients with breast cancer at various clinical stages. Clin Biochem. 2016 Jun;49(9):692–8.

182. Eren E, Abuhandan M, Solmaz A, Taşkın A. Serum paraoxonase/arylesterase activity and

oxidative stress status in children with metabolic syndrome. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2014 Sep;6(3):163–8.

183. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Mar 1;23(3):434–9.

184. Rowicka G, Dyląg H, Ambroszkiewicz J, Riahi A, Weker H, Chełchowska M. Total Oxidant and Antioxidant Status in Prepubertal Children with Obesity. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:5621989.

185. Kilic E, Özer ÖF, Erek Toprak A, Erman H, Torun E, Kesgin Ayhan S, et al. Oxidative Stress Status in Childhood Obesity: A Potential Risk Predictor. Med Sci Monit. 2016 Oct 13;22:3673–9.

186. Grasemann H, Holguin F. Oxidative stress and obesity-related asthma. Paediatr Respir Rev. 2021 Mar;37:18–21.

187. D'Alessandro A, Di Felice G, Manco M, Pastore A, Pezzi S, Mariani M, et al. Study of the Association between Thiols and Oxidative Stress Markers in Children with Obesity. Nutrients. 2022 Sep 2;14(17):3637.

188. Wheeler DS. Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis. Open Inflamm J. 2011 Oct 7;4(s1):74–81.

189. Ayar G, Sahin S, Men Atmaca Y, Uysal Yazici M, Neselioglu S, Erel O. Thiol-disulphide homeostasis is an oxidative stress indicator in critically ill children with sepsis. Arch Argent Pediatr. 2019 Jun 1;117(3):143–8.

190. Molina V, von Dessauer B, Rodrigo R, Carvajal C. Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis: a prospective observational pilot study. Redox Rep. 2017 Nov;22(6):330–7.

191. Li X, Luo J, Li Y, Jia L, Li Y, Ye S, et al. Macrophage-Derived Exosomes in TLR9−/− Mice Ameliorate Sepsis-Induced Mitochondrial Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes. Oxid Med Cell Longev. 2022 Oct 3;2022:5719974.

192. Yuan X, Zhu J, Kang Q, He X, Guo D. Protective Effect of Hesperidin Against Sepsis-Induced Lung Injury by Inducing the Heat-Stable Protein 70 (Hsp70)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/ Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Pathway. Med Sci Monit. 2019 Jan 4;25:107–14.

193. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. Int J Hyperthermia. 2014 Nov;30(7):513–23.

194. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ashurst LH, Barrow SL, Chvanov MA, et al. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Jul;293(1):G296-307.

195. Papadopoulos P, Pistiki A, Theodorakopoulou M, Christodoulopoulou T, Damoraki G, Goukos D, et al. Immunoparalysis: Clinical and immunological associations in SIRS and severe sepsis patients. Cytokine. 2017 Apr;92:83–92.

196. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. Apoptosis. 2021 Apr;26(3–4):152–62.

197. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. J Alzheimers Dis. 2014;42 Suppl 3:S125-152.

198. Modanloo M, Shokrzadeh M. Analyzing Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis: Potential Role of L-carnitine. Iran J Kidney Dis. 2019 Mar;13(2):74–86.

199. Miliaraki M, Briassoulis P, Ilia S, Polonifi A, Mantzourani M, Briassouli E, et al. Survivin and caspases serum protein levels and survivin variants mRNA expression in sepsis. Sci Rep. 2021 Jan 13;11(1):1049.

200. Qi Z, Wang R, Liao R, Xue S, Wang Y. Neferine Ameliorates Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction Through Anti-Apoptotic and Antioxidative Effects by Regulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. Front Pharmacol. 2021;12:706251.

201. Jiang X, Cai S, Jin Y, Wu F, He J, Wu X, et al. Irisin Attenuates Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Apoptosis in the H9C2 Cellular Model of Septic Cardiomyopathy through Augmenting Fundc1-Dependent Mitophagy. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:2989974.

202. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Immunol Rev. 2015 May;265(1):130–42.

203. Wang Y, Liu Y, Liu Q, Zheng Q, Dong X, Liu X, et al. Caspase-1-Dependent Pyroptosis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Is Associated with the Severity and Mortality of Septic Patients. Biomed Res Int. 2020;2020:9152140.

204. Tinsley KW, Cheng SL, Buchman TG, Chang KC, Hui JJ, Swanson PE, et al. Caspases -2, -3, -6, and -9, but not caspase-1, are activated in sepsis-induced thymocyte apoptosis. Shock. 2000 Jan;13(1):1–7.

205. Lorente L, Martín MM, Ferreres J, Solé-Violán J, Labarta L, Díaz C, et al. Serum caspase 3 levels are associated with early mortality in severe septic patients. J Crit Care. 2016 Aug;34:103–6.

206. Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. Mol Neurobiol. 2013 Feb;47(1):394–8.

207. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Nat Immunol. 2000 Dec;1(6):496–501.

208. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. Oncotarget. 2017 Apr 4;8(14):23996–4008.

209. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell. 1998 Aug 7;94(3):325–37.

210. Tran HT, Fransen M, Dimitrakopoulou D, Van Imschoot G, Willemarck N, Vleminckx K. Caspase-9 has a nonapoptotic function in Xenopus embryonic primitive blood formation. J Cell Sci. 2017 Jul 15;130(14):2371–81.

211. Anderson SL, Townsend HGG, Singh B. Role of toll-like receptor 4 and caspase-3, -8, and -9 in lipopolysaccharide-induced delay of apoptosis in equine neutrophils. Am J Vet Res. 2018 Apr;79(4):424–32.

212. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A, et al. IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. Shock. 2016 Mar;45(3):282–91.

213. Qi X, Yu Y, Sun R, Huang J, Liu L, Yang Y, et al. Identification and characterization of neutrophil heterogeneity in sepsis. Crit Care. 2021 Feb 6;25(1):50.

214. Chen L, Zhao Y, Lai D, Zhang P, Yang Y, Li Y, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. Cell Death Dis. 2018 Dec 22;9(6):597.

215. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. Cell Mol Life Sci. 2019 Jun;76(11):2031–42.

216. Pinheiro da Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. Apoptosis. 2009 Apr;14(4):509–21.

217. Oberholzer C, Tschoeke SK, Moldawer LL, Oberholzer A. Local thymic caspase-9 inhibition improves survival during polymicrobial sepsis in mice. J Mol Med (Berl). 2006 Dec;84(5):389–95.

218. Luo R, Chen X, Ma H, Yao C, Liu M, Tao J, et al. Myocardial caspase-3 and NF-κB activation promotes calpain-induced septic apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway. Life Sci. 2019 Apr 1;222:195–202.

219. Tang Y, Zhang R, Xue Q, Meng R, Wang X, Yang Y, et al. TRIF signaling is required for caspase-11-dependent immune responses and lethality in sepsis. Mol Med. 2018 27;24(1):66.

220. Vaki I, Kranidioti H, Karagianni V, Spyridaki A, Kotsaki A, Routsi C, et al. An early circulating factor in severe sepsis modulates apoptosis of monocytes and lymphocytes. Journal of Leukocyte Biology. 2011;89(3):343–9.

221. Jiang W, Zhong W, Deng Y, Chen C, Wang Q, Zhou M, et al. Evaluation of a combination "lymphocyte apoptosis model" to predict survival of sepsis patients in an intensive care unit. BMC Anesthesiol. 2018 Jul 18;18(1):89.

222. Lorente L, Martín MM, Ortiz-López R, González-Rivero AF, Pérez-Cejas A, Martín M, et al. Blood caspase-8 concentrations and mortality among septic patients. Med Intensiva (Engl Ed). 2020 Aug 22;S0210-5691(20)30246-1.

223. Lorente L, Martín MM, Ortiz-López R, González-Rivero AF, Villacampa-Jiménez JJ, Jiménez A, et al. Mortality prediction of septic patients by blood caspase-8 levels. Diagn Microbiol Infect Dis. 2022 Apr;102(4):115639.

224. Chu CM, Chiu LC, Yu CC, Chuang LP, Kao KC, Li LF, et al. Increased Death of Peripheral Blood Mononuclear Cells after TLR4 Inhibition in Sepsis Is Not via TNF/TNF Receptor-Mediated Apoptotic Pathway. Mediators Inflamm. 2021;2021:2255017.

225. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF-α and IFN-γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. Cell. 2021 Jan 7;184(1):149-168.e17.

226. Cosentino K, Hertlein V, Jenner A, Dellmann T, Gojkovic M, Peña-Blanco A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. Mol Cell. 2022 Mar 3;82(5):933-949.e9.

227. Zheng Z, Ma H, Zhang X, Tu F, Wang X, Ha T, et al. Enhanced Glycolytic Metabolism Contributes to Cardiac Dysfunction in Polymicrobial Sepsis. J Infect Dis. 2017 Dec 1;215(9):1396–406.

228. Suzuki T, Okamoto T, Katoh H, Sugiyama Y, Kusakabe S, Tokunaga M, et al. Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. PLoS Pathog. 2018 Sep;14(9):e1007299.

229. Liu H, Liao R, He K, Zhu X, Li P, Gong J. The SMAC mimetic birinapant attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by inhibiting the tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 degradation in Kupffer cells. Immunol Lett. 2017 Dec;185:79–83.

230. Jensen S, Seidelin JB, LaCasse EC, Nielsen OH. SMAC mimetics and RIPK inhibitors as therapeutics for chronic inflammatory diseases. Sci Signal. 2020 Feb 18;13(619):eaax8295.

231. Morrish E, Brumatti G, Silke J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. Cells. 2020 Feb 11;9(2):406.

232. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature. 1998 Dec 10;396(6711):580–4.

233. Liu Y, Lear T, Iannone O, Shiva S, Corey C, Rajbhandari S, et al. The Proapoptotic F-box Protein Fbxl7 Regulates Mitochondrial Function by Mediating the Ubiquitylation and Proteasomal Degradation of Survivin. J Biol Chem. 2015 Dec 8;290(19):11843–52.

234. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell. 2008 Apr 25;30(2):123–35.

235. Marusawa H, Matsuzawa S ichi, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO J. 2003 Jun 2;22(11):2729–40.

236. Rubio N, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. Survivin prevents apoptosis by binding to caspase-3 in astrocytes infected with the BeAn strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus. J Neurovirol. 2012 Oct;18(5):354–63.

237. Hotchkiss RS, Dunne WM, Swanson PE, Davis CG, Tinsley KW, Chang KC, et al. Role of apoptosis in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Science. 2001 Nov 30;294(5548):1783.

238. Johnson EA, Svetlov SI, Pike BR, Tolentino PJ, Shaw G, Wang KKW, et al. Cell-specific upregulation of survivin after experimental traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 2004 Sep;21(9):1183–95.

239. Zhang Z, Wang H, Jin Z, Cai X, Gao N, Cui X, et al. Downregulation of survivin regulates adult hippocampal neurogenesis and apoptosis, and inhibits spatial learning and memory following traumatic brain injury. Neuroscience. 2015 Aug 6;300:219–28.

240. Wang B, Han S. Modified Exosomes Reduce Apoptosis and Ameliorate Neural Deficits Induced by Traumatic Brain Injury. ASAIO J. 2019;65(3):285–92.

241. Chu SF, Zhang Z, Zhang W, Zhang MJ, Gao Y, Han N, et al. Upregulating the Expression of Survivin-HBXIP Complex Contributes to the Protective Role of IMM-H004 in Transient Global Cerebral Ischemia/Reperfusion. Mol Neurobiol. 2017 Jan;54(1):524–40.

242. Mallolas J, Rodríguez R, Gubern C, Camós S, Serena J, Castellanos M. A polymorphism in the promoter region of the survivin gene is related to hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke. Neuromolecular Med. 2014 Dec;16(4):856–61.

243. Mormile R, Mazzei G, Vittori G, De Michele M, Martino L. Progesterone and stroke recovery: a match ultimately won by survivin? Eur J Prev Cardiol. 2012 Oct;19(5):1206–7.

244. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. Apoptosis. 2017;22(3):357–68.

245. Varras M, Polonifi K, Mantzourani M, Stefanidis K, Papadopoulos Z, Akrivis C, et al. Expression of antiapoptosis gene survivin in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer: clinical correlations. Reprod Biol Endocrinol. 2012 Sep 7;10:74.

246. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. Cancer Res. 1998 Nov 15;58(22):5071–4.

247. Spanaki AM, Tavladaki T, Dimitriou H, Kozlov AV, Duvigneau JC, Meleti E, et al. Longitudinal Profiles of Metabolism and Bioenergetics Associated with Innate Immune Hormonal Inflammatory Responses and Amino-Acid Kinetics in Severe Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome in Children. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2018 Aug;42(6):1061–74.

248. Vardas K, Ilia S, Sertedaki A, Charmandari E, Briassouli E, Goukos D, et al. Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality. Intensive Care Med Exp. 2017 Dec;5(1):10.

249. Tavladaki T, Spanaki AM, Dimitriou H, Kondili E, Choulaki C, Georgopoulos D, et al. Similar Metabolic, Innate Immunity, and Adipokine Profiles in Adult and Pediatric Sepsis Versus Systemic Inflammatory Response Syndrome-A Pilot Study. Pediatr Crit Care Med. 2017 Aug 12;

250. Fitrolaki MD, Dimitriou H, Venihaki M, Katrinaki M, Ilia S, Briassoulis G. Increased extracellular heat shock protein 90α in severe sepsis and SIRS associated with multiple organ failure and related to acute inflammatory-metabolic stress response in children. Medicine (Baltimore). 2016 Aug;95(35):e4651.

251. Ilia S, Briassoulis G. Sepsis is change and flows ever onwards. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017 Jun;15(6):515–7.

252. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999 Dec 15;59(24):6097–102.

253. Lorente L, Martín MM, Ortiz-López R, Pérez-Cejas A, Ferrer-Moure C, Jiménez A, et al. Association between septic patient mortality and blood survivin concentrations. Med Intensiva (Engl Ed). 2023 Feb;47(2):84–9.

254. Mokuda S, Miyazaki T, Ito Y, Yamasaki S, Inoue H, Guo Y, et al. The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Sci Rep. 2015 May 22;5:9795.

255. Mokuda S, Miyazaki T, Ubara Y, Kanno M, Sugiyama E, Takasugi K, et al. CD1a+ survivin+ dendritic cell infiltration in dermal lesions of systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2015 Sep 30;17:275.

256. Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han HD, Shahzad MMK, Valiyeva F, Shibayama M, et al. Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane--resistant ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2011 Jun 1;17(11):3716–26.

257. Turkkila M, Andersson KME, Amu S, Brisslert M, Erlandsson MC, Silfverswärd S, et al. Suppressed diversity of survivin splicing in active rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2015 Jul 10;17:175.

258. Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmann J, Dietmaier W, Rödel F, et al. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. Cell Cycle. 2007 Jun 15;6(12):1502–9.

259. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. Cell. 2010 Aug 20;142(4):625–36.

260. Miura K, Fujibuchi W, Unno M. Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. Carcinogenesis. 2012 Dec;33(12):2311–9.

261. Végran F, Boidot R, Bonnetain F, Cadouot M, Chevrier S, Lizard-Nacol S. Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. Endocr Relat Cancer. 2011 Dec;18(6):783–92.

262. Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K. Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. World J Clin Oncol. 2014 Dec 10;5(5):883–94.

263. Chen T, Zhu C, Ye C. LncRNA CYTOR attenuates sepsis-induced myocardial injury via regulating miR-24/XIAP. Cell Biochem Funct. 2020 Oct;38(7):976–85.

264. Zhang C, Chen X, Wang C, Ran Y, Sheng K. Inhibition of XBP1 Alleviates LPS-Induced Cardiomyocytes Injury by Upregulating XIAP through Suppressing the NF-κB Signaling Pathway. Inflammation. 2021 Jun;44(3):974–84.

265. Haak VM, Huang S, Panigrahy D. Debris-stimulated tumor growth: a Pandora's box? Cancer Metastasis Rev. 2021 Sep;40(3):791–801.

266. Huang Q, Feng J, Wu R, Yang Y, Dai C, Li J, et al. Total Oxidant/Antioxidant Status in Sera of Patients with Esophageal Cancer. Med Sci Monit. 2017 Aug 4;23:3789–94.

Επιστημονικές δημοσιεύσεις-ανακοινώσεις

Η επιστημονική έρευνα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει κοινοποιηθεί με τις ακόλουθες ιατρικές δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις:

ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ (PubMed)

1. Miliaraki M., Briassoulis P., Ilia S., Polonifi A., Mantzourani M., Briassouli E. Vardas K., Nanas S., Theodorakopoulou M., Tavladaki T., Spanaki AM., Kondili E., Dimitriou H., Tsiodras S., Georgopoulos D., Armaganidis A., Daikos G., Briassoulis G., (2021). *Survivin and caspases serum protein levels and survivin variants mRNA expression in sepsis.* Scientific Reports; (2021) 11: 1049; doi.org/10.1038/s41598-020-78208-2 (Impact Factor: 4.997)
2. Miliaraki M., Briassoulis P., Ilia S., Michalakakou K., Karakonstantakis T., Polonifi A., Bastaki K., Briassouli E., Vardas K., Pistiki A., Theodorakopoulou M., Tavladaki T., Spanaki AM., Kondili E., Dimitriou H., Venihaki M., Tsiodras S., Georgopoulos D., Mantzourani M., Nanas S., Armaganidis A., Daikos G., Papassotiriou I., Briassoulis G, (2022). Oxidant/Antioxidant status is impaired in sepsis and is related to anti-apoptotic, inflammatory, and innate immunity alterations. Antioxidants (Basel), 11, 231; doi.org/10.3390/antiox11020231 (Impact Factor: 7.675)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Στο πλαίσιο της όλης μελέτης, που έχει περιγραφεί αναλυτικά στο παρόν σύγγραμμα, έχουν γίνει ήδη και προγραμματίζονται και μελλοντικές προφορικές ανακοινώσεις των αποτελεσμάτων της μελέτης, στα 30ο, 31, 32ο, 33ο, 34ο, 35ο και 36ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας (ESICM 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022 και 2023). Στα πρόδρομα αυτά αποτελέσματα έχει αναδειχθεί ότι η σήψη χαρακτηρίζεται από μια στροφή της ισορροπίας του οργανισμού προς το οξειδωτικό στρες, με μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας, καθώς και ταυτόχρονη αύξηση αποπτωτικής και αντιαποπτωτικής δραστηριότητας. Οι τάσεις αυτές παρατηρήθηκαν τόσο στους ενήλικες όσο και στους παιδιατρικούς ασθενείς της μελέτης.

-(2023) Προφορική Ανακοίνωση – “Pro-apoptotic Bax, Smac and caspases interactions with the anti-apoptotic XIAP and survivin protein in sepsis”- **M. Miliaraki**, P. Briassoulis, S. Ilia, K. Bastaki, A. Polonyfi, M. Mantzourani, E. Kondyli, G. Briassoulis, 36th ESICM Congress, Milan (pending to be announced)

-(2022) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal- “Intracellular expression of apoptotic and antiapoptotic molecules in sepsis”- **M. Miliaraki**, K. Bastaki, S. Ilia, C. Kalpadaki, E. Kondyli, G. Briassoulis, 35th ESICM congress, Paris *(nominated for Young Investigator Award),* ICMx 2022, 10(2): 000568

-(2021) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal – "Apoptotic, anti-apoptotic and innate immunity crosstalk in sepsis"- S. Ilia**,** **M. Miliaraki**, P. Briassoulis, A. Polonyfi, M. Mantzourani, E. Briassouli, K. Vardas, S.Tsiodras, A. Armaganidis, S.Nanas, G.Daikos, G.Briassoulis, 34th ESICM Congress, Berlin, ICMx 2021, 9(1): 000665

- (2020) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal – "Survivin and Caspases Upregulation in Sepsis". **M.Miliaraki**, P. Briassoulis, S. Ilia, K. Polonyfi, M. Mantzourani, E. Briassouli, S.Nanas, G.Briassoulis, 33rd ESICM Congress, ICMx 2020, 8(2): 000994

-(2019) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal – "End-expiratory volume and lung stress and strain longitudinal changes evoked by PEEP escalation in ARDS and non-ARDS children". **S. Ilia**; E. Geromarkaki; P. Briassoulis; P. Bourbaki; T. Tavladaki; **M. Miliaraki**; G. Briassoulis. 32nd ESICM Congress, Berlin, ICMx 2019, 7(Suppl 3):000817

-(2019) Προφορική Ανακοίνωση – "Non-invasive optimization of FRC driving pressure lung stress and strain in mechanically ventilated children–a pilot study". E. Geromarkaki, S. Ilia, **M. Miliaraki,** P. Briassoulis, P. Bourbaki, T. Tavladaki, G. Briassoulis. ESPNIC Salzburg, 2019

- (2018) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal "Survivin variants mRNA expression and protein activity in sepsis". **M. Miliaraki**, P Briassoulis, S Ilia, A Polonyfi, M Mantzourani, E Briassouli, S Nanas, A Pistiki, G Daikos, G. Briassoulis. Lives 2018, 31st Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), Paris 20-24 October 2018, Palais des Congres. Intensive Care Medicine Experimental 2018, ICMx 2018, 6(Suppl 2):0819

- (2017) Προφορική Ανακοίνωση και δημοσίευση στο Intensive Care Medicine Experimental (ICMx) journal - Oxidant/antioxidant status of adult and pediatric ICU patients; a key role for sepsis and mortality. **M. Miliaraki**; T. Tavladaki; A.M. Spanaki; P. Briassoulis; S. Ilia; G. Briassoulis. 29th ESICM congress, Vienna Austria (*nominated for Young Investigator Award)*, ICMx 2017, 5(Suppl 2):0008.

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΕΙΣ

Τέλος, στο πλαίσιο των προγραμμάτων μικρού μεγέθους του ΕΛΚΕ του Πανεπιστημίου Κρήτης, έχουν ήδη εγκριθεί χρηματοδότηση για την προώθηση των μετρήσεων των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών παραμέτρων που έχουν προβλεφθεί για τη μελέτη (ΕΛΚΕ Κρήτης- ΚΑ 10782 - 1500 ευρώ- Τα μονοπάτια της πυρόπτωσης στη σήψη και ο ρόλος των κασπασών-2021), αλλά και την ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της μελέτης στα Πανευρωπαϊκά Συνέδρια Εντατικής Θεραπείας της ESICM (ΕΛΚΕ Κρήτης- ΚΑ 11120 -1500 ευρώ) (Ενδοκυττάρια έκφραση αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών βιομορίων σε σηπτικούς ασθενείς- 2022).