



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Επείγουσα και Εντατική Θεραπεία Παιδων Εφήβων και Νέων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Αποπτωτικοί και αντιαποπτωτικοί βιοδείκτες στη σήψη”

Μηλιαράκη Μαριάννα

ΑΜ: 1130027

Ηράκλειο, Ιούνιος 2019



UNIVERSITY OF CRETE -SCHOOL OF MEDICINE

POSTGRADUATE STUDY PROGRAMME – Master of Science

Emergencies and Intensive Care in Children Adolescents

and Young Adults

DIPLOMA THESIS

Apoptotic and Antiapoptotic biomolecules in sepsis

MariannaMiliaraki

ID: 1130027

HeraklionJune, 2019

Επιβλέπων Καθηγητής

Μπριασούλης Γεώργιος, Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδων,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης (επιβλέπων)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Μπριασούλης Γεώργιος, Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδων,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης (επιβλέπων)

Ηλία Σταυρούλα, Επίκουρη καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παιδων, Ιατρική
Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βαπορίδη Αικατερίνη, Επίκουρη καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Μπριασούλης Γεώργιος, Ομότιμος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδων,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης (επιβλέπων)

Ηλία Σταυρούλα, Επίκουρη καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παιδων, Ιατρική
Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βαπορίδη Αικατερίνη, Επίκουρη καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περιεχόμενα

Πρόλογος – Ευχαριστίες.....	6
Συντομογραφίες.....	7
Περίληψη	3
Summary.....	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Εισαγωγή.....	Error! Bookmark not defined.
Σήψη και σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης.....	13
Αναδρομή ορισμών.....	13
Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS)	15
Σήψη- Επιδημιολογία.....	16
Παθογένεια και παθοφυσιολογία στη σήψη.....	Error! Bookmark not defined.
Διαταραχές της μικροκυκλοφορίας στη σήψη	Error! Bookmark not defined.
Απόπτωση και σήψη.....	21
Αντιαποπτωτικά μονοπάτια στη σήψη.....	23
Πρωτεΐνη survivin.....	23
Ισομορφές της survivin.....	Error! Bookmark not defined.
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	Error! Bookmark not defined.
Σκοπός της μελέτης	27
Μεθοδολογία	Error! Bookmark not defined.
1. Συλλογή δειγμάτων	30
2. Ποσοτικοποίηση έκφρασης survivin	31

2.1. Απομόνωση RNA.....	31
2.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του RNA.....	32
2.3. Σύνθεση cDNA	34
2.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	34
2.5. Real Time PCR σε πραγματικό χρόνο στα δείγματα της μελέτης	43
2.6. Πρωτεομική Ανάλυση με τη μέθοδο ELISA	Error! Bookmark not defined.
Αποτελέσματα	46
Πίνακες και Εικόνες	48
Συζήτηση.....	55
Συμπεράσματα.....	59
Περιορισμοί της μελέτης	60
Προοπτική της μελέτης.....	60
Βιβλιογραφία.....	61

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο ολοκλήρωσης των σπουδών μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών "Επείγουσα και Εντατική Θεραπεία Παιδών Εφήβων και Νέων" του Πανεπιστημίου Κρήτης. Πρόκειται για συστηματική μελέτη βαρέως πασχόντων ασθενών, με στόχο τη συνεισφορά επιπρόσθετων γνώσεων στο επίκαιρο "μείζον πρόβλημα" της σήψης που έντονα απασχολεί σήμερα την επιστημονική κοινότητα, ιδιαίτερα δε την εντατική θεραπεία.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μπριασούλη Γεώργιο, για την πραγματικά αξιόπαινη συνεισφορά του όχι μόνο στην ολοκλήρωση της μελέτης, αλλά και για την προετοιμασία και συγκρότησή μου ως επιστήμονα τα τελευταία χρόνια. Προσωπικές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στη διευθύντριά μου κ. Ηλία Σταυρούλα για τις πολύτιμες και καίριες συμβουλές της κατά την εξέλιξή μου, όπως και στην κ. Βαπορίδη Αικατερίνη, για τις σημαντικότερες επισημάνσεις της στη βελτίωση του παρόντος έργου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά και θερμά την κ. Πολονύφη Αικατερίνη, για την απεριόριστη συνεισφορά της στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών διαδικασιών, χωρίς την αγάπη και την κατευθυντήρια γραμμή της οποίας, η παρούσα εργασία θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί. Επίσης συγκινητική, σε όλα τα στάδια, ήταν και η συμβολή του πολύτιμου συναδέλφου κ. Μπριασούλη Παναγιώτη, ο οποίος με την υποστήριξη και την εμπύχωση του συνέβαλε καθοριστικά στο να επιτευχθεί κάτι άρτιο.

Οφείλω επιπλέον να ευχαριστήσω το προσωπικό της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας Παιδών 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 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

AUROC	Area under the receiver operating characteristic curve
BIR	Baculovirus IAP Repeat
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CPC	Chromosomal Passenger Complex
DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecules
HBXIP	Hepatitis B X-interaction protein
IAPs	Inhibitors of apoptosis
MARS	Mixed Antagonist Response Syndrome
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern molecules
PICS	Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism syndrome
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment score
SIRS	Systematic Inflammatory Response Syndrome
SMAC	Secondary Mitochondria-derived Activator of Caspase
TNF	Tumor Necrosis Factor

Περίληψη

Εισαγωγή: Η σήψη οφείλεται σε μια δυσλειτουργική ανοσιακή απάντηση σε ποικίλους λοιμώδεις παράγοντες, με δυσμενή έκβαση σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών. Σήμερα, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται στην αποκρυπτογράφηση των αποπτωτικών (κασπάσες) και 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 παιδιατρικών ασθενών (n=35) με σήψη, συγκρινόμενων με ασθενείς με τραυματικής αιτιολογίας SIRS (n=35) και υγιείς μάρτυρες (n=30). Χαλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της 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 κασπασών 3 και 9 (αποπτωτική τάση), αλλά και της πρωτεΐνης survivin (αντιαποπτωτική τάση).

Αποτελέσματα: Αναφορικά με τη μεταγραφική δραστηριότητα της survivin, οι ισομορφές της survivin 2B και ΔEx3 ανευρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στην ομάδα της σήψης σε σύγκριση με την ομάδα SIRS και τους υγιείς μάρτυρες ($p < 0,05$), εν αντιθέσει με την 3B, που τείνει να καταστέλλεται στη σήψη. Σημαντικά αυξημένα ήταν τα επίπεδα της πρωτεΐνης survivin στη σήψη σε σύγκριση με τις ομάδες SIRS και υγιών ($p < 0,05$). Τέλος, ανάλογη αυξητική τάση ενζυμικής δραστηριότητας ίσχυσε και κατά τη μελέτη των κασπασών, ιδιαίτερα της κασπάσης 9 ($p < 0,05$).

Συμπεράσματα: Η ενεργοποίηση της survivin και των κασπασών 3 και 9 κατά τη φλεγμονώδη διεργασία της σήψης συνοδεύεται από διέγερση των ισομορφών του αντιαποπτωτικού μονοπατιού της survivin. Η μελέτη των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μονοπατιών θα μπορούσε να αποτελέσει ενδιαφέροντες ερευνητικούς στόχους στην αποκρυπτογράφηση της παθοφυσιολογίας της σήψης.

Λέξεις-κλειδιά: Σήψη, SIRS, 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. Recently, interest has been shifted towards apoptotic (caspases) and antiapoptotic pathobiology (survivin protein), which 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 pediatric patients (n=35) with sepsis, compared to patients with traumatic SIRS (n=35) and to healthy controls (n=30). The expression of survivin, was quantified through real-time quantitative polymerase chain reaction for the different survivin splice variants(WT, 2B, 3B and Δ Ex3). The apoptotic or antiapoptotic tendency was specified by measuring both the activity of survivin protein and caspases 3 and 9, through enzyme-linked immunosorbent assay method, according to the manufacturer's instructions in serum samples.

Results: As far as the transcriptional behavior of survivin is concerned, survivin's isoforms 2B and Δ Ex3 were significantly higher in sepsis, compared to the SIRS group and controls ($p < 0.05$), whereas survivin's splice variant 3B tends to be depressed in sepsis. The enzymatic serum activity of survivin was highly expressed in sepsis, compared to SIRS and healthy controls ($p < 0.05$). Finally, the caspases enzymatic study, especially of caspase 9 ($p < 0.05$), also confirmed their upregulated activity in septic patients.

Conclusions: The upregulation of survivin and caspases 3 and 9 during the inflammatory process of sepsis is accompanied by the hyperexpression of isoforms of the antiapoptotic survivin protein. Specific apoptotic and antiapoptotic pathways might represent attractive targets for future research in the clarification of sepsis pathophysiology.

Key words: Sepsis, SIRS, antiapoptotic proteins, apoptosis, caspases, survivin.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

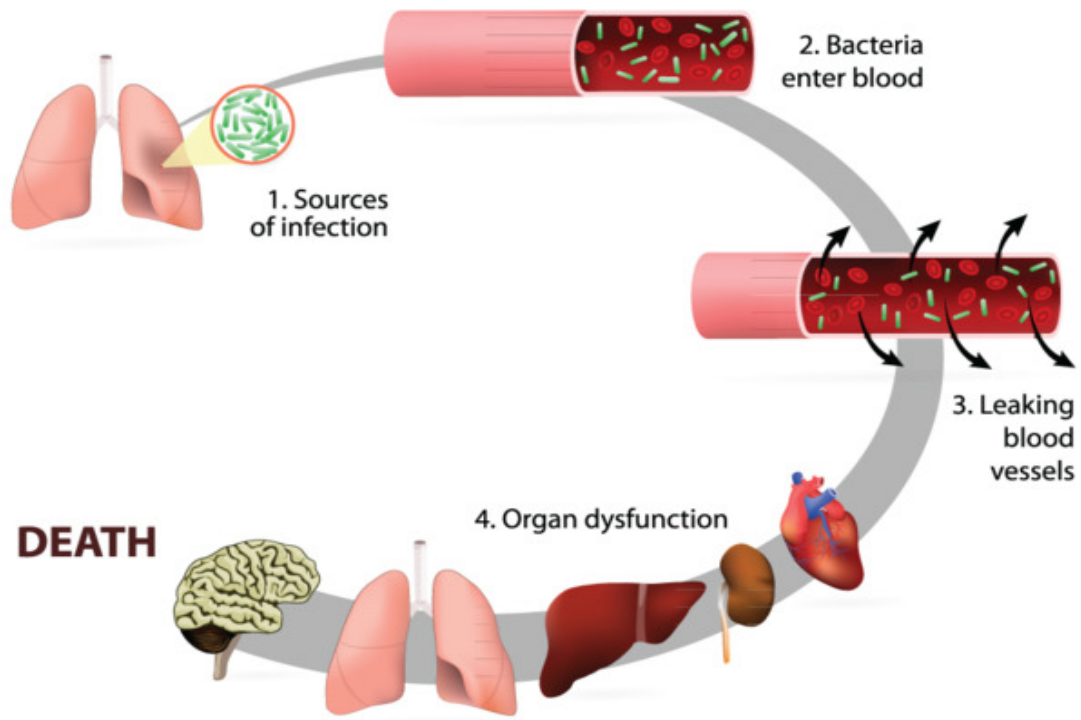
Εισαγωγή

Από τη σήψη έως το τραύμα, η βαριά νόσος χαρακτηρίζεται, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, από διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης. Οι πρώτες αναφορές του όρου "σήψη" πιθανότατα εκτείνονται 2700 χρόνια πριν, σε ποιήματα του Ομήρου, αλλά 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. Η σήψη, εν προκειμένω, εξακολουθεί να αποτελεί ένα επίκαιρο δημόσιο πρόβλημα υγείας και σημαντική αιτία εκατοντάδων θανάτων ετησίως. 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. Αυτή η απειλητική για τη ζωή κλινική οντότητα οφείλεται σε μη φυσιολογική, είτε υπερβολική και ανεξέλεγκτη, είτε σε ελλιπή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, σε ένα πλήθος λοιμωδών παραγόντων, συνήθως με δραματικές επιπλοκές και ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (εικόνα1) (1). Η σηπτική κατάσταση αποτελεί μια δυναμική διαδικασία, καθώς εμπεριέχει τόσο προφλεγμονώδη, όσο και αντιφλεγμονώδη στοιχεία. Έτσι, χαρακτηρίζεται από μια αρχική κατακλυσμιαία φλεγμονή ή/και κορύφωση με την ανάπτυξη ανοσοκαταστολής και αδυναμία επαναφοράς ομοιόστασης του ανοσιακού μηχανισμού (2,3). Η ισορροπία επέρχεται με τη συμβολή στοιχείων της φυσικής αλλά και τη 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)(4,5).Πρόσφατες μελέτες επίσης, υποδηλώνουν ότι η ανοσοκαταστολή στη σήψη πιθανώς να σχετίζεται με την υπέρμετρη ενεργοποίηση αποπτωτικών ή και την απορρύθμιση αντιαποπτωτικών μονοπατιών (6–9).

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. Προβάλλει επομένως 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(10–12). Προσπάθειες ελέγχου της καταίγιδας 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(13,14). 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 (15,16), όπως σε μια πρόσφατη προσπάθεια, όπου η αναστολή μιας ειδικής πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death protein-1 pathway), έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα αναδιοργάνωσης της ανοσολογικής ακεραιότητας σε περίοδο παρακολούθησης 28 ημερών(17). Η σύγχρονη έρευνα, τέλος, εστιάζει στην ανεύρεση θεραπειών που ανατρέπουν τις περιόδους ανοσοπαράλυσης στη σήψη, που αποδίδεται κυρίως στην ενεργοποίηση της απόπτωσης των λεμφικών οργάνων και των παρεγχυματικών ιστών (18).

Sepsis



Εικόνα 1. Ησηπτική διαδικασία (Πηγή: LancetInfectDis– 2013)

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) το 2016 (19), αποφεύγοντας να συμπεριλάβουν τα κριτήρια SIRS για τη διάγνωση σήψης και εγκαταλείποντας την απόλυτη συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένου λοιμώδους αιτίου και φλεγμονής (20). 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. Η σηπτική καταπληξία 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 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. Το ποσοστό θνητότητας που αποδίδεται από τον σύγχρονο ορισμό της σηπτικής καταπληξίας είναι υψηλό (40%), συγκρινόμενο με το αντίστοιχο από τον ορισμό της σήψης (10%). 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(21). Σε πιο πρόσφατες αναλύσεις που συνέκριναν τα κριτήρια SIRS με τη χρήση των SOFA score 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 κατά 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)(22).

Σε πρόσφατη μελέτη των Matics et al, οι παράμετροι του παιδιατρικού SOFA score (pSOFA) προσαρμόστηκε στις φυσιολογικές τιμές ανά ηλικία και έτσι, αξιολογήθηκε η επίδοσή των ορισμών του Sepsis-3 στους παιδιατρικούς ασθενείς, δίδοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την έγκαιρη διάγνωση σήψης, αλλά και την αναγνώριση του κινδύνου θνητότητας στα βαρέως πάσχοντα παιδιά (23).

Τέλος, 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)(19,20).

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 2 τουλάχιστον από τα ακόλουθα 4 κριτήρια(24):

- 1) **Πυρετός** (κεντρική θερμοκρασία από το ορθό ή από κεντρικό καθετήρα $>38,5^{\circ}\text{C}$ ή $<36^{\circ}\text{C}$)
- 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 $<10^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση για την ηλικία, απουσία βαγοτονικών ερεθισμάτων ή φαρμάκων)
- 3) **Ταχύπνοια** (μέση αναπνευστική συχνότητα $>90^{\text{η}}$ 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 καταστάσεις υπερμεταβολισμού μετά από μείζονες τραυματισμούς ή χειρουργεία, θα μπορούσαν να πληρούν τα κριτήρια για SIRS. Η σήψη στα παιδιά, έως του παρόντος και εν αναμονή αναβάθμισης των ορισμών τα επόμενα χρόνια, ορίζεται ως η ύπαρξη SIRS δευτεροπαθώς σε κάποιο λοιμογόνο ερέθισμα, είτε ταυτοποιημένο με μικροβιολογικές μεθόδους, είτε και με μόνη την κλινική ένδειξη λοίμωξης μη ταυτοποιήσιμης.

Σήψη- Επιδημιολογία

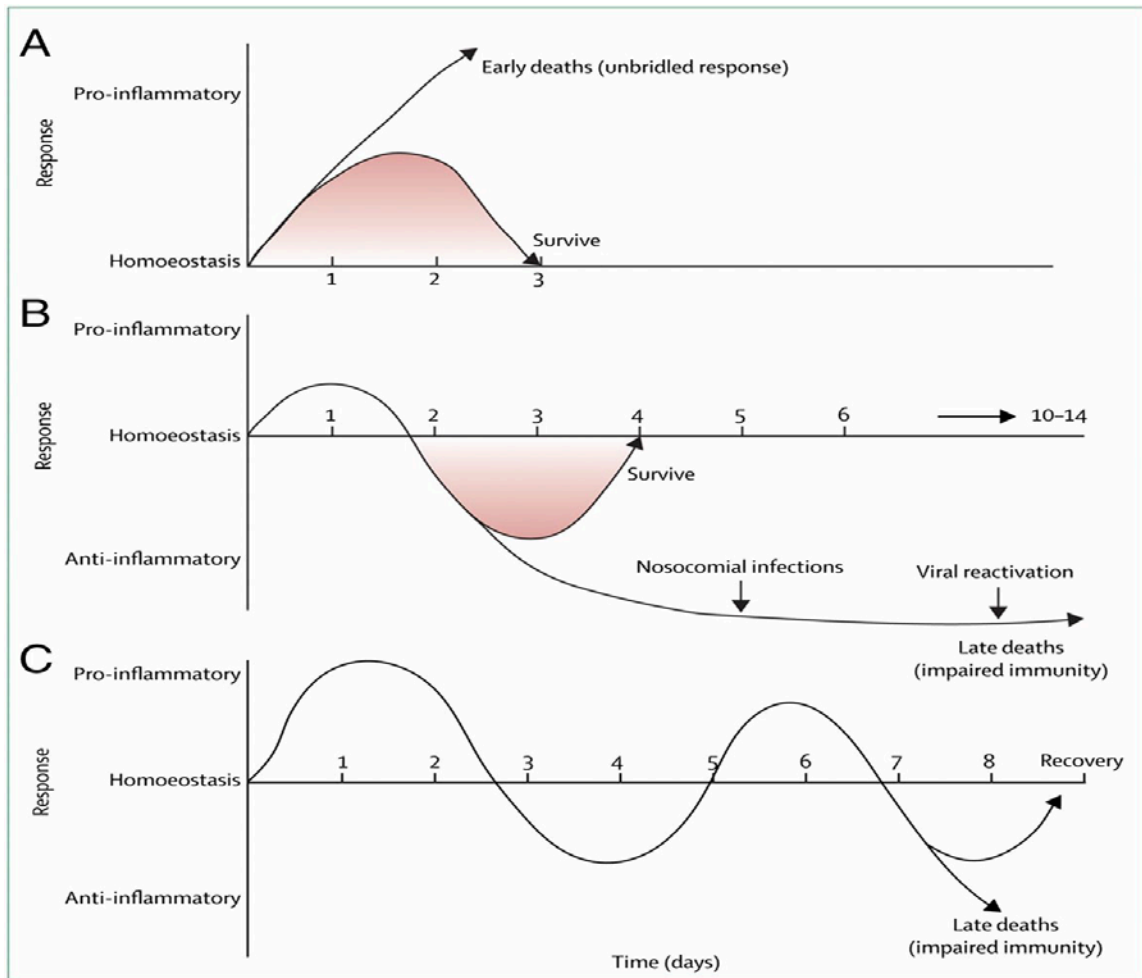
Σύμφωνα με μεγάλη επιδημιολογική μελέτη σε 7000 παιδιατρικούς ασθενείς, η επίπτωση της σοβαρής σήψης ανέρχεται στο 8,2% των εισαγωγών στις παιδιατρικές Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας (ΜΕΘΠ), εύρημα συμβατό με την αντίστοιχη επίπτωση των ενηλίκων(24). Πολυοργανική δυσλειτουργία εμφάνιζε το 67% των νέων περιπτώσεων σήψης κατά την εισαγωγή τους, ενώ στο 30% των περιπτώσεων πολυοργανική ανεπάρκεια αναπτύχθηκε κατά την 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(25).

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 (26).

Παθογένεια και παθοφυσιολογία στη σήψη

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 προφλεγμονώδους 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, υποθέτει ότι η σήψη αποτελεί μια μορφή επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (φυσικής και επίκτητης), οδηγώντας στην ανικανότητα ελέγχου των παθογόνων εισβολών(3,27,28) (εικόνα 2).

Το έναυσμα για την εκκίνηση της φλεγμονώδους αντίδρασης αποτελεί η αναγνώριση παθογόνων, μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αναγνώρισης (pattern recognition receptors-PRRs), σχετιζόμενων με παθογόνα μοριακών αλληλουχιών (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), ή καταστάσεων που προκαλούν ιστική βλάβη (damage-associated molecular patterns- DAMPs). Παραδείγματα PAMPs αποτελούν οι ενδοτοξίνες-λιποπολυκχαρίτες (lipopolysaccharide-LPS) ή το λιποτειχοϊκό οξύ από το κυτταρικό περίβλημα gram-αρνητικών και gram-θετικών μικροβίων αντίστοιχα, μαννάνες από το τοίχωμα μυκήτων, διπλές-έλικες RNA από ιούς, ή μη μεθυλιωμένοDNA, μοναδικό σε βακτηριακά γονιδιώματα. Αντίθετα, η αναγνώριση DAMPs έχει περιγραφεί σε περιπτώσεις τραύματος, υποξίας, ισχαιμίας, ή έκθεσης σε τοξικές ουσίες.



Εικόνα2. Φαινότυποι υπερφλεγμονής ή και ταυτόχρονης ανοσοπαράλυσης στη σήψη (Πηγή: NewsFeature- PNAS- April 2018)

Οι πιο ευρέως μελετημένοι PRRs είναι οι υποδοχείς Toll-like (TLRs), που συστρατεύονται στην ειδική αναγνώριση PAMPs. Για παράδειγμα ο TLR-4 προσδέεται στις LPS, ενώ ο TLR-2 στο λιποτεϊχοϊκό οξύ (29). Μέσω των ανωτέρω αλληλουχιών διεγείρονται φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις, μέσω ενεργοποίησης φαγοκυττάρων και έκκρισης κυτταροκινών, που έχουν ως στόχο να θέσουν υπό έλεγχο τα εισερχόμενα μικρόβια σε τοπικό επίπεδο, να καταστρέψουν τους προσβεβλημένους ιστούς και να αποκαταστήσουν τις βλάβες. Ωστόσο, σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίησή τους, η υπέρμετρη έκκριση κυτταροκινών οδηγεί σε βλάβες στα κύτταρα του ίδιου του ξενιστή. Οι ανωτέρω μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αποστολή σημάτων στον πυρήνα των κυττάρων, την εναλλακτική ενεργοποίηση γονιδίων και μεταφραστική διαφοροποίηση, μέσω

παραγωγής ειδικών πρωτεϊνών-αγγελιοφόρων, για την εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης (30). 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 (31).

Σε συνέχεια των ανωτέρω διαδικασιών, σε πολλές περιπτώσεις ασθενών, δεδομένης της σύγχρονης έγκαιρης διάγνωσης και βελτιωμένης θεραπευτικής προσέγγισης, οι σηπτικοί ασθενείς επιβιώνουν μετά την εισαγωγή τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και αναπτύσσουν μια χρόνια βαριά 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) (2,32).

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 εξωκυττάρια 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 (33). Επόμενη διαταραχή κατά τη σηπτική διαδικασία είναι η ενεργοποίηση της πήκτικης οδού και η συμμετοχή μικροθρόμβων στις διαταραχές σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας. 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 ενδοκυττάριο στον εξωκυττάριο χώρο ως απόρροια της απώλειας του ενδοθηλιακού φραγμού και 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 σε πνεύμονες, νεφρούς και εγκέφαλο των σηπτικών ασθενών. Πολλοί φλεγμονώδεις αγωνιστές μεσολαβούν στην ενδοθηλιακή υπερδιαπερατότητα μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών εξαρτώμενων από ασβέστιο και διαχωρισμό των στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως και σύσπαση του κυτταροσκελετού (34). 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, που γρήγορα θα μπορούσε να οδηγήσει σε πολυοργανική ανεπάρκεια στις σοβαρές περιπτώσεις σήψης, παρά την έγκαιρη και επαρκή ανάνηψη με υγρά (35).

Το νιτρικό οξείδιο (NO), το κύριο μόριο επιτέλεσης της ενδοθηλιακά καθοδηγούμενης χάλασης των αιμοφόρων αγγείων, θεωρείται πλέον ο βασικός μεσολαβητής της σηπτικής καταπληξίας(36). 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 προφλεγμονωδών σημάτων (πχ LPS, TNF-α και IL-1β). Εκτός από την αγγειοδιαστολή, το NO καταστέλλει επίσης τη μυοκαρδιακή λειτουργία και συμμετέχει στο 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 στη σήψη(37,38).

Επίσης, είναι καλά τεκμηριωμένο τα τελευταία χρόνια ότι η φλεγμονώδης διαδικασία είναι στενά συνδεδεμένη με το μονοπάτι της σήψης, οδηγώντας σε διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μικροαγγειακές θρομβώσεις (39). Μειωμένα επίπεδα ενδογενών αντιπηκτικών μορίων, όπως η αντιθρομβίνη III, και οι πρωτείνες S και C, ανευρίσκονται συστηματικά στη σηπτική καταπληξία, ενώ δυσλειτουργία

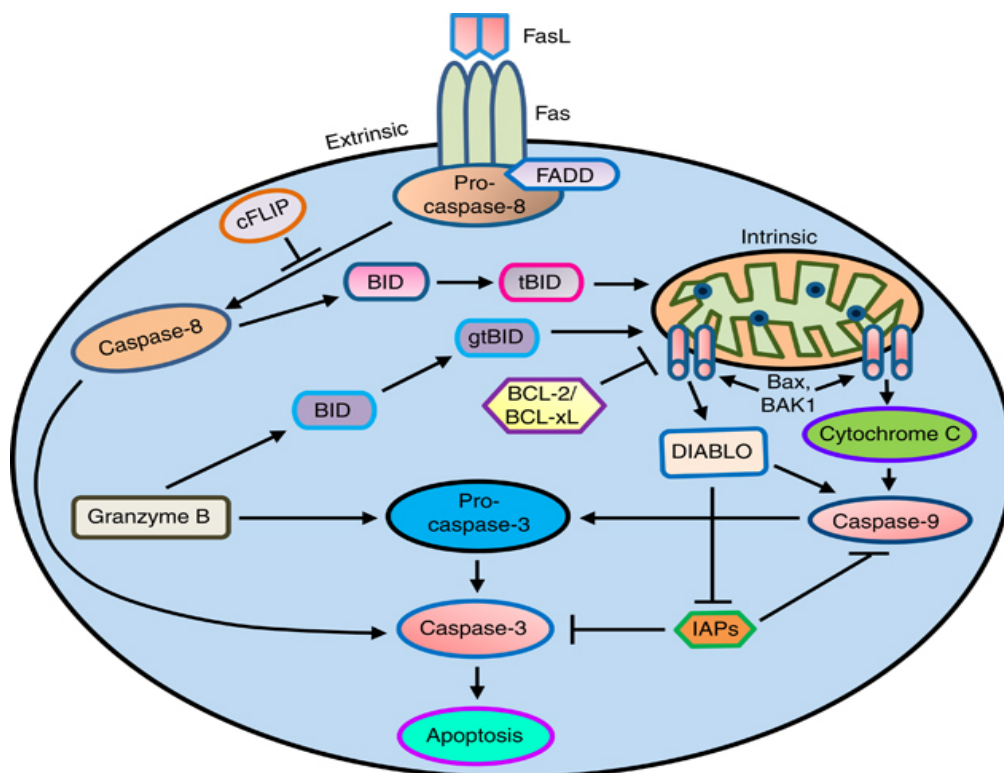
της πρωτεΐνης ADAMTS-13, οδηγεί στο σύνδρομο της πολυοργανικής ανεπάρκειας, σχετιζόμενης με θρομβοπενία (thrombopenia-associated multiple organ failure- TAMOF) (40).

Απόπτωση και σήψη

Οι αποπτωτικές πρωτεΐνες κασπάσες (πρωτεάσες κυστεΐνης) φαίνεται να κατέχουν προεξάρχοντα ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και διατήρησης ανοσολογικής ακεραιότητας, όπως επίσης και στην ενίσχυση της φλεγμονής και της απόπτωσης σε σηπτικούς οργανισμούς, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο μέσω καταστροφής ποικίλων πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (41). Ο κύκλος δράσης των κασπασών περιλαμβάνει δύο ξεχωριστά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές. Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, μέσω πρόσδεσης σε υποδοχείς απόπτωσης (eg. FAS ligands), οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8, η οποία είτε ενεργοποιεί απευθείας τις κύριες εκτελεστικές αποπτωτικές κασπάσες (κασπάσες 3, 6 και 7), είτε ενεργοποιεί το ενδογενές μονοπάτι (εικόνα 3). Αντίθετα, το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από ποικίλα στρεσογόνα κυτταρικά ερεθίσματα, που οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και του Smac/DIABLO από τα μιτοχόνδρια, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και τελικά των προαναφερθέντων εκτελεστικών αποπτωτικών κασπασών (17,40). Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού επίσης οδηγεί στην απώλεια της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω ενεργοποίησης προαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, όπως οι πρωτεΐνες Bax και Bak (43). Το ώριμο μόριο Smac/DIABLO προσδέεται και ουδετεροποιεί τις ανασταλτικές ιδιότητες πολλαπλών IAPs (44). Η κασπάση 3 αποτελεί την κύρια εκτελεστική πρωτεάση, εκ των υπολοίπων κασπασών, και καθοδηγεί την απόπτωση μέσω διάσπασης δομικών πρωτεϊνών, καταστροφή 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 ενεργοποίησή της έχει ενοχοποιηθεί στην ανάπτυξη της νόσου Huntington, Parkinson και Alzheimer's, όπως και στην πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, σε μια σειρά μελετών που στοχεύουν στον έλεγχο της ενεργοποίησης των κασπασών (42).

Η καταλυτική δράση των κασπασών 3 και 9 φαίνεται ότι αναστέλλεται άμεσα από τη surivinin (εικόνα 3), γεγονός που αποδίδεται στην αλληλεπίδραση με άλλους αντιαποπρωτικούς αγωνιστές όπως η πρωτεΐνη XIAP (X-linked IAP) (43). Σε αυτή την αλληλεπίδραση φαίνεται ότι αντιτίθεται η πρωτεΐνη Smac/DIABLO, που αποτελεί έναν από τους κύριους ανταγωνιστές των surivinin 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 προφλεγμονώδης 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(1). Επίσης, όλο και περισσότερη βιβλιογραφία, τονίζει ότι εκτός από την ιστική νέκρωση, η ενεργοποίηση 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 αποπρωτικής κατεύθυνσης στη σήψη (45,46).



Εικόνα 3. Αποπρωτικά μονοπάτια μέσω της δράσης των κασπασών στη σήψη (Πηγή: CellDeathandDisease- 2014)

Αντιαποπτωτικά μονοπάτια στη σήψη

➤ Πρωτεΐνη Survivin

Ιδιαίτερη έμφαση έχει αποδοθεί τελευταία στις ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis proteins- IAPs), με κύριο εκπρόσωπο την πρωτεΐνη survivin, μια πρωτεΐνη με σημαντικές και σύνθετες ρυθμιστικές δράσεις στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών (εικόνες 4 και 5). Η πρωτεΐνη survivin, ο μικρότερος εκπρόσωπος των IAPs, είναι το αποτέλεσμα έκφρασης του γονιδίου BIRC5, το οποίο με εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να παράξει διαφορετικά pre-mRNA για τις διαφορετικές isoμορφές της πρωτεΐνης (ΔEx3, 2B, 3B, 2α), η λειτουργίες των οποίων αναλύονται κατωτέρω(47).

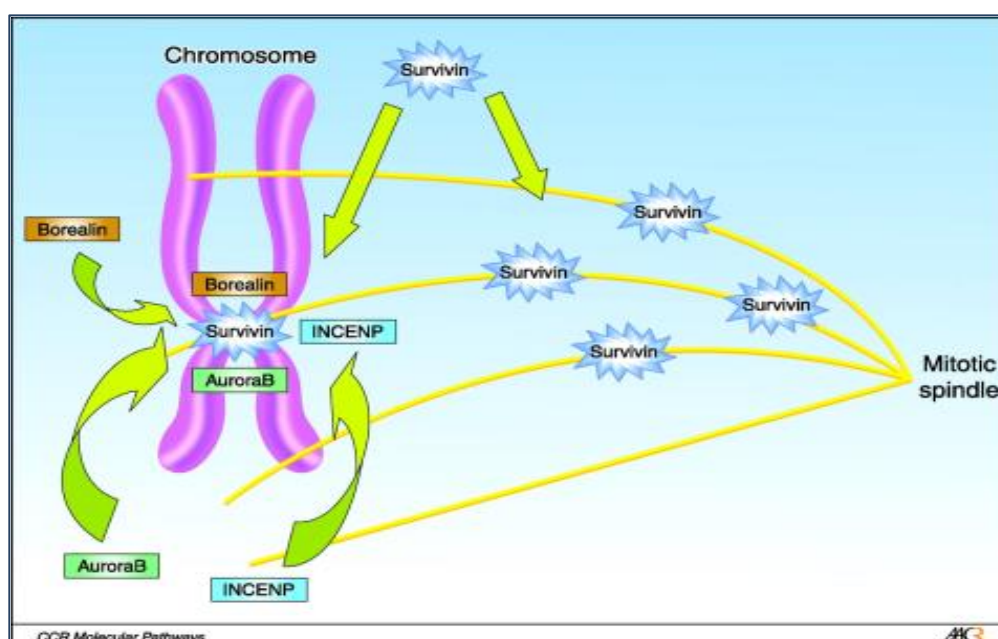
Το αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα της survivin πιθανώς να σχετίζεται με την αναστολή της δράσης διαφόρων αποπτωτικών βιομορίων (FAS ligand, p53, κασπάσες 3,-7,-8, 9), εκ των οποίων, το μονοπάτι αναστολής των κασπασών μελετάται ευρέως στη βιβλιογραφία για τη θεραπεία νεοπλασματικών ή φλεγμονωδών νοσημάτων (48). Βλάβες στον αποπτωτικό μηχανισμό πιθανώς οδηγούν σε μειωμένη επιβίωση λεμφοκυττάρων και στην ανάπτυξη αυτοανοσίας. Δεδομένου 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 (46,47).

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 (41,48). Επιπλέον, η υπερέκφραση της survivin φαίνεται να αναστέλλει τον ιικό πολλαπλασιασμό (44). Έτσι, η ισορροπία αποπτωτικών/αντιαποπτωτικών μηχανισμών θα μπορούσε να είναι σημαντικά επηρεασμένη στις περιπτώσεις σήψης, συγκριτικά με τις περιπτώσεις ιογενών λοιμώξεων ή

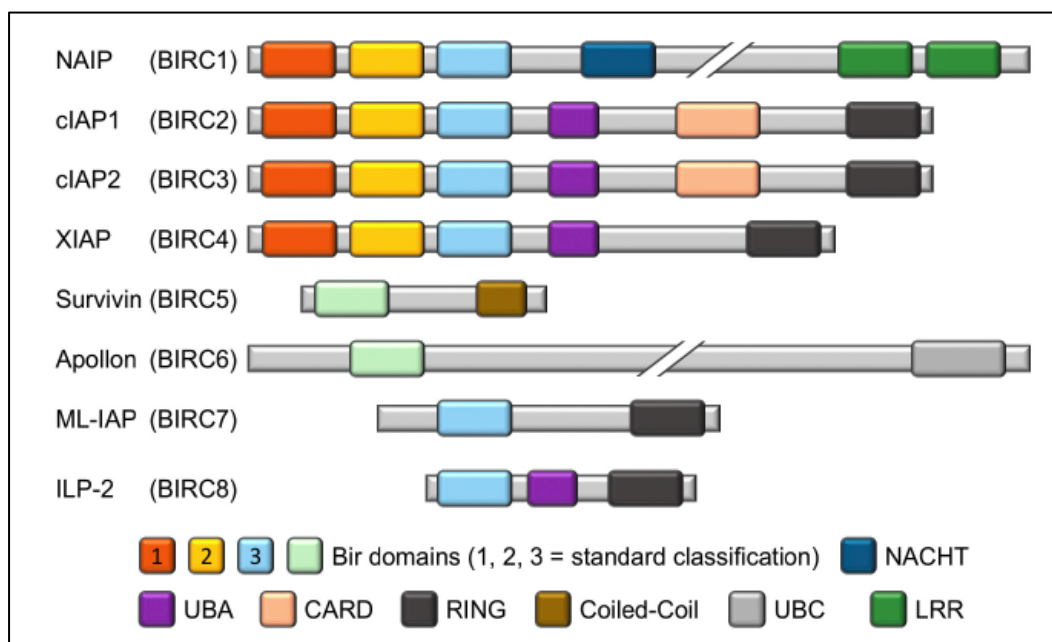
στο μετατραυματικό SIRS, ενώ οι ερευνητές υποθέτουν ότι η αναστολή των αποπτωτικών μονοπατιών, που έχουν ενεργοποιηθεί υπέρ της ανάπτυξης σηπτικής καταπληξίας θα μπορούσαν να προλαμβάνουν την πολυοργανική ανεπάρκεια και να αποτρέπουν την καταστολή της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης (17).

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 (50,51).

Αντίθετα, τα επίπεδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών survivin, Bcl-xL και Bak, ανευρέθηκαν σημαντικά μειωμένα σε περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με διπολική διαταραχή (54). Η αντιαποπτωτική δράση της survivin αποδίδεται επίσης στην άμεση συναγωνιστική της δράση με την πρωτεΐνη XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), αλλά και εμμέσως, ανταγωνιζόμενη τη δράση της πρωτεΐνης Smac έναντι της XIAP (55). 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 (56).



Εικόνα 4. Έλεγχος της μιτωτικής διαδικασίας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την πρωτεΐνη survivin (Πηγή: *ActaBiochimicaandBiophysicaSinica*- 2010)



Εικόνα 5. Η οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (IAPs), στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη survivin

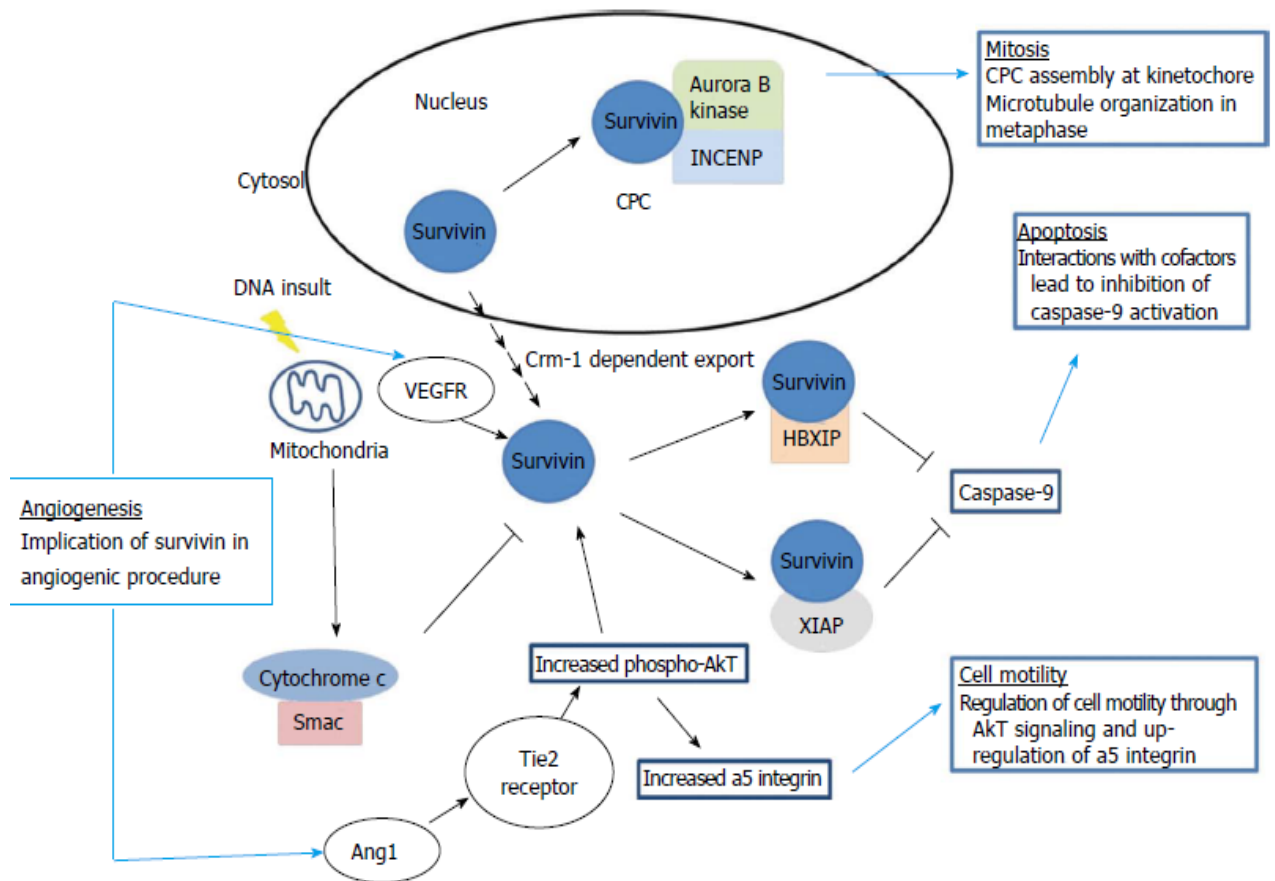
Ισομορφές της πρωτεΐνης survivin

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, κατά την εντόπισή της σε πυρηνικό επίπεδο προωθείται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενώ αντίθετα κατά την κυτταροπλασματική της εντόπιση επάγονται αντιαποπτωτικές λειτουργίες, μέσω απενεργοποίησης της κασπάσης-3 ή αναστολής της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Smac/Diablo (57) (εικόνα 6).

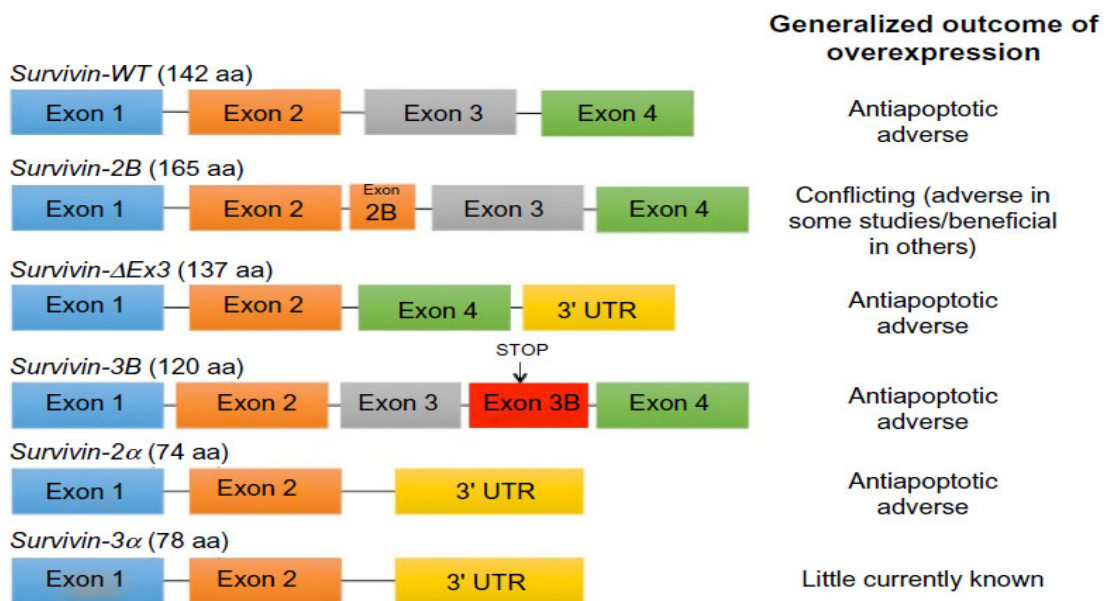
Το γονίδιο (BIRC5) της πρωτεΐνης survivin βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q25 και αποτελείται από 4 εξώνια και 3 εσώνια, με 14.796 νουκλεοτίδια. Το γονίδιο και η παραγωγή mRNA για την πρωτεΐνη survivin, μπορεί με εναλλακτικό μάτισμα (splicing) να κωδικοποιήσει την wild type (WT- πλήρες μετάγραφο) ισομορφή της πρωτεΐνης και πέντε επιπλέον ισομορφές (ΔEx3, -2B, -3B, -2A και 3A), οι οποίες φαίνεται ότι παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση και κυτταρική εντόπιση (58) (εικόνα 7). 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 προαποπτωτικό μόριο, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ισομορφές της πρωτεΐνης (60,61). Οι υπόλοιπες ισομορφές είναι ατελώς χαρακτηρισμένες έως του παρόντος (41). Η διερεύνηση αυτών των πολύπλοκων διεργασιών επιχειρείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στους νεοπλασματικούς ασθενείς (61) (εικόνα 7). 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 παραγωγίμη μορφή της πρωτεΐνης (62). 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 (63).

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.



Εικόνα 6. Το δίκτυο δράσης και οι συνέργειες της πρωτεΐνης survivin



Εικόνα 7. 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

Στόχος της μελέτης είναι να διευκρινιστεί εάν ο αυξημένος κίνδυνος θνητότητας για έναν παιδιατρικό σηπτικό ασθενή, μπορεί να συσχετίζεται με την υπερβολική ενεργοποίηση και δράση καθοριστικών αποπτωτικών βιομορίων, όπως οι κασπάσες, αλλά και το ρυθμιστικό ρόλο που μπορεί να κατέχουν συγκεκριμένα αντιαποπτωτικά πρωτεϊνικά μόρια κατά τη σηπτική διεργασία, όπως η πρωτεΐνη survivin, μέσω της γονιδιακής έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών της. Έτσι, το κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης είναι η καταγραφή των διαφορών αυτών σε ασθενείς με σήψη σε σύγκριση με ασθενείς με μη λοιμώδες (τραυματικής αιτιολογίας) SIRS και με υγιείς μάρτυρες. Η όλη μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει εφαλτήριο καινούριων θεραπευτικών στόχων αλλά και να συμβάλει στην ανεύρεση νέας ισχυρότερης μεταβολικής βάσης για την κατανόηση των μονοπατιών της σήψης.

Μεθοδολογία

Η παρούσα προοπτική μελέτη περιέλαβε παιδιατρικούς ασθενείς με πρώιμη σήψη ή SIRS(εντός 24 ωρών από την εισαγωγή τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παίδων),μετά από έγγραφη συναίνεση των γονέων τους (έγκριση Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου- Αρ. Πρωτοκ. 9452/ 26/6/2018). Τα κριτήρια της σήψης και του τραυματικού SIRSορίσθηκαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες και ορισμούς για τα παιδιά, που αναφέρθηκαν ανωτέρω (Pediatric Sepsis Consensus Conference), ενώ ελέγχθηκε επιπλέον εάν οι παιδιατρικοί ασθενείς πληρούσαν τα σύγχρονα κριτήρια ορισμού της σήψης, που ισχύουν πλέον για τους ενήλικες (SEPSIS-3)(19). Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν σε 35 δείγματα ασθενών με σήψη και 35 δείγματα ασθενών με τραυματικό SIRS, συγκριτικά με 30 δείγματα υγιών μαρτύρων (control group).Μόνο οι ασθενείς με πρώιμη σήψη ή SIRS εντάχθηκαν στη μελέτη (εντός 24 ωρών από την εισαγωγή τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παίδων). Από τη μελέτη 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. Η συλλογή ιατρικών και κλινικών δεδομένων έγινε από τους ιατρικούς φακέλους. Έτσι, καταγράφηκαν κλινικά, δημογραφικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά δεδομένα (λευκά αιμοσφαίρια, πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως η CRP, προκαλσιτονίνη, κλπ). Η συλλογή των στοιχείων ήταν ανώνυμη, αλλά καταγράφηκε ο μοναδικός για κάθε ασθενή αριθμός μητρώου για λόγους αντιστοίχισης. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν για κάθε ασθενή ξεχωριστά, τα αποτελέσματα συστημάτων βαθμονόμησης της σοβαρότητας της νόσησης (PRISM) για τους παιδιατρικούς ασθενείς και πολυοργανικής ανεπάρκειας (PELOADscore), αλλά και η έκβαση της νόσου, με προοπτική παρακολούθηση των ασθενών.

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSSv25. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm SE (standard error of mean) ή διάμεση τιμή (IQR, interquartile range) για παραμετρικές ή μη παραμετρικές τιμές. Αντίστοιχα, στατιστική σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με την ανάλυση ANOVA με τη διόρθωση Tukey's και Games-Howell post hoc tests, ή με το Kruskal Wallis για μη κανονική κατανομή, αλλά και το Mann Whitney U-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα. Η σύγκριση ποσοστιαίων αναλογιών κατηγορικών διμεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 , ενώ η συνάφεια αριθμητικών διμεταβλητών προσδιορίστηκε με τους δείκτες Pearson και Spearman. Στατιστικά σημαντική ορίστηκε η τιμή του μικρότερη του 0,05.

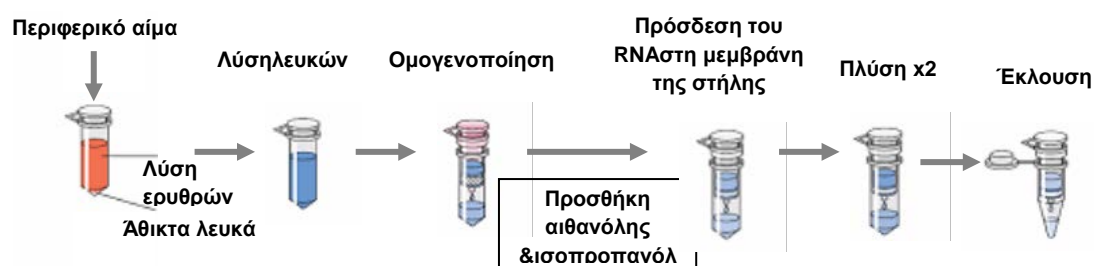
1. Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα ελήφθησαν από τους ασθενείς κατά το πρώτο 24ωρο νοσηλείας στη ΜΕΘ Παιδών, αλλά και από τους υγιείς μάρτυρες της μελέτης, κατόπιν συγκατάθεσης των γονέων τους. Ελήφθη σε ειδικά φιαλίδια ολικό αίμα για την απομόνωση λευκοκυττάρων, που διατηρήθηκε στους -80°C . Επίσης, έγινε φύλαξη φυγοκεντρημένου ορού στους -20°C για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών βιομορίων της μελέτης.

2. Ποσοτικοποίηση έκφρασης της πρωτεΐνης survinin

2.1 Απομόνωση RNA

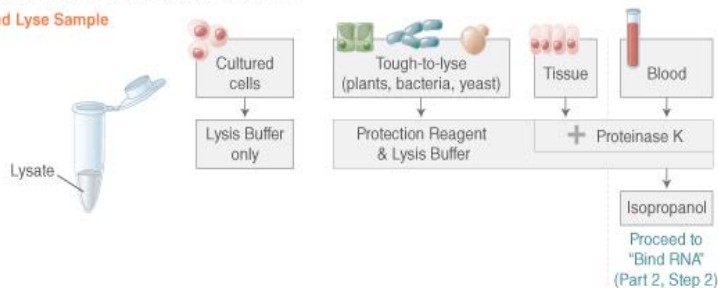
Για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής έκφρασης της πρωτεΐνης survinin, χρησιμοποιήθηκε δείγμα ολικού αίματος από τον κάθε ασθενή για την απομόνωση RNA, διαδικασία που αντανακλά το βαθμό έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στόχου. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος και στη συνέχεια απομόνωση mRNA, βάσει προδιαγραφών του κατασκευαστή του ειδικού εμπορικού kit (Monarch Total RNA Miniprep Kit, New England Biolabs, UK). Στο ανωτέρω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol, ένα μείγμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης, που διαχωρίζει αποτελεσματικά το DNA, RNA και τις πρωτεΐνες κατά την ομογενοποίηση του δείγματος, εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του RNA. Μετά την προσθήκη χλωροφόρμιου και φυγοκέντρηση, το μείγμα καταλήγει σε 3 στρώματα, με την ανώτερη υδατική φάση να αποτελείτο RNA, το οποίο διατηρείται στους -20°C μετά την προσθήκη αιθανόλης και ισοπροπανόλης, για την καθίζηση DNA και πρωτεϊνών αντίστοιχα (Εικόνες 8, 9).



Εικόνα 8. Αδρή αναπαράσταση της διαδικασίας απομόνωσης RNA

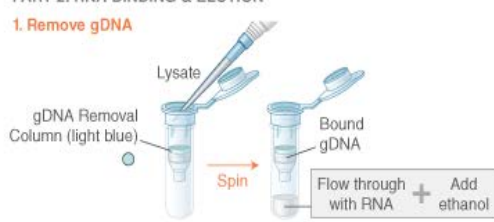
PART 1: SAMPLE DISRUPTION & HOMOGENIZATION

1. Disrupt and Lyse Sample

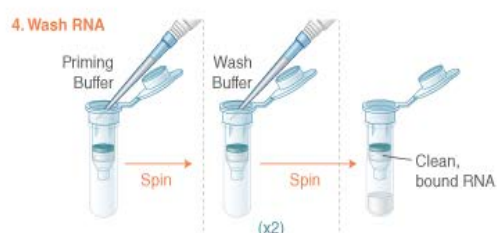


PART 2: RNA BINDING & ELUTION

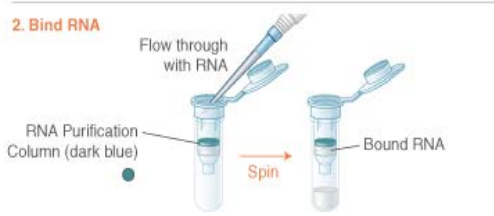
1. Remove gDNA



4. Wash RNA



2. Bind RNA



5. Elute RNA



3. Treat with DNase I (On-column)



Εικόνα 9. 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). Σε μήκος 260nm ελέγχεται η περιεκτικότητα σε νουκλεϊκά οξέα του μονόκλωνου RNA και σε μήκος κύματος 280nm ελέγχονται οι τυχόν

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 διαπερατότητα του διαλύματος (χωρίς μονάδα).

1. A είναι η απορρόφηση ή οπτική πυκνότητα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος λ (χωρίς μονάδα).

2. ε είναι η μοριακή απορρόφηση ή μοριακός συντελεστής αποσβέσεως, με μονάδα μέτρησης $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Εξαρτάται από το μήκος κύματος, τη χημική σύσταση και τη θερμοκρασία, ορίζεται αυτόματα από το μηχάνημα.

3. ℓ είναι το μήκος της οπτικής διαδρομής μέσα στο διάλυμα, αντιστοιχεί στο πλάτος της cuve (σε 1cm).

4. C είναι η μοριακή συγκέντρωση του διαλύματος (σε $mol \cdot L^{-1}$).

Η μια μονάδα απορρόφησης (OD) στα 260nm αντιστοιχεί σε 40μgRNA ανά ml 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 νουκλεϊκών οξέων στα 260nm ως προς αυτήν των πρωτεϊνών στα 280nm (A_{260}/A_{280}). Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση και καθαρότητα της τάξης του 167ng/μl και $A_{260}/A_{280}=1,78$ 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 αιθιδίου (EtBr) (10mg/ml). Το EtBr δεσμεύεται στις βάσεις των νουκλεϊκών 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 (cDNA), με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (real-time quantitative polymerase chain reaction-RT-qPCR). Η μετατροπή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA (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). Ακολούθως, από το ολικό RNA, το mRNA μεταγράφεται σε cDNA. Αρχικά συντίθεται η μια μόνο αλυσίδα του DNA, που είναι συμπληρωματική με την αρχική αλυσίδα του RNA. 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. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής, σε δύο στάδια, με το πρωτόκολλο χρήσης oligo(dT) σε συνδυασμό με τυχαίους εκκινητές (random primers-hexamers), το οποίο προβλέπει εξανουκλεοτίδια ως εκκινητές (ProtoscriptII), με βάση τις προδιαγραφές του κατασκευαστή (iScript cDNA Synthesis kit, Biorad, UK).

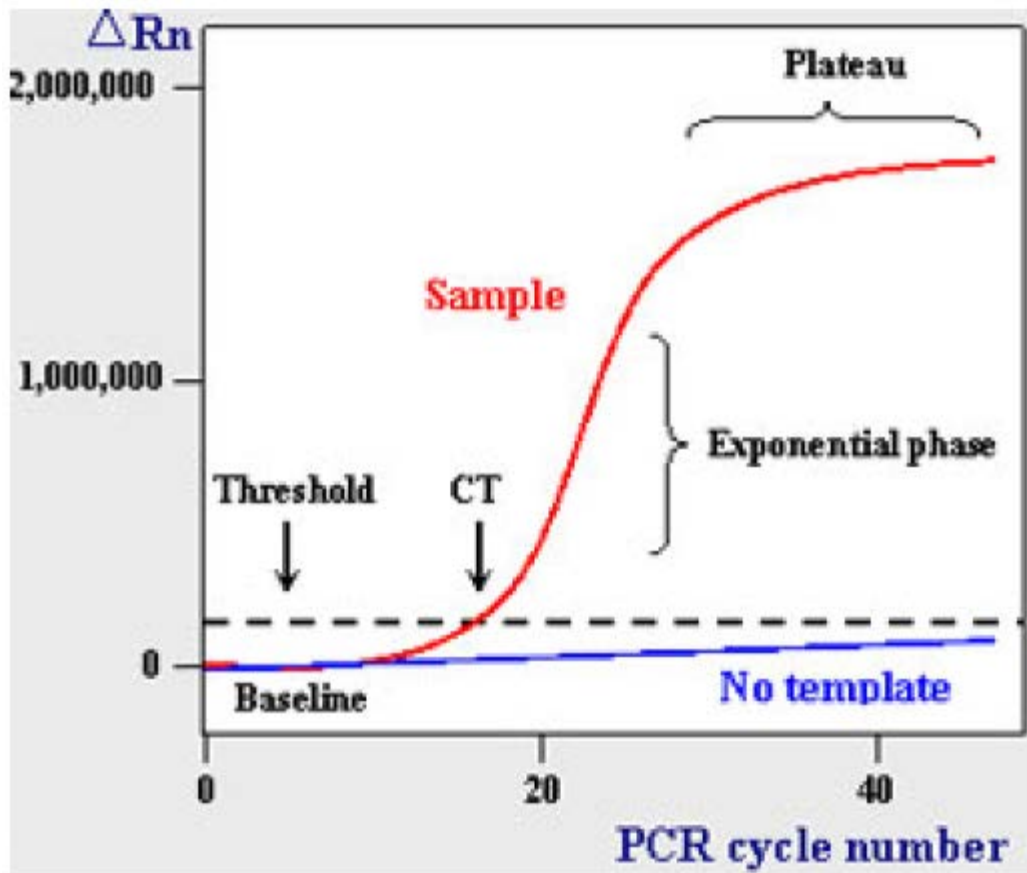
2.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

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 χρωστικών που φθορίζουν και στην αναλογική συσχέτιση της έντασης του φθορισμού με την αρχική συγκέντρωση των πολλαπλασιαζόμενων μορίων DNA του δείγματος (64).

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. 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 προσδιορίζεται από τον αριθμό των κύκλων της PCR αντίδρασης και αναφέρεται ως Ct (cycle threshold, όριο κύκλου). Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο νωρίτερα λαμβάνεται σήμα φθορισμού και άρα τόσο μικρότερη είναι η τιμή του Ct (εικόνα 10). Το σήμα του φθορισμού ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα ενός 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 προσδέονται στο DNA και αλληλεπιδρούν με ειδικούς εκκινήτες (dsDNA dye, SYBR-GreenI), 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, όπως και 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 πολλαπλασιασμένων 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).

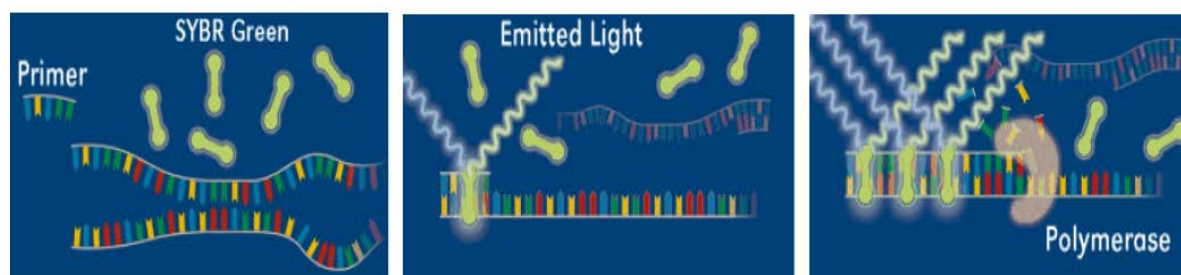


Εικόνα10.Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι ποσοτικοποίησης, η απόλυτη και η σχετική. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον ακριβή αριθμό μεταγράφων του γονιδίου. Αντίθετα στη σχετική ποσοτικοποίηση, που βασίζεται στη σχετική έκφραση δύο γονιδίων, από το οποίο ένα χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, δεν παρέχονται πληροφορίες για τον ακριβή αριθμό των μεταγράφων.

SYBR-Green I

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR-GreenI, η οποία δεσμεύεται σε κάθε διπλή έλικα δίκλωνου μορίου DNA εκπέμποντας φθορίζον σήμα σε ένα καθορισμένο μήκος κύματος κατά την πρόσδεση (Εικόνα 11). Η διέγερση και η μέγιστη εκπομπή του SYBR-GreenI 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-GreenI 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 (probe). 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.

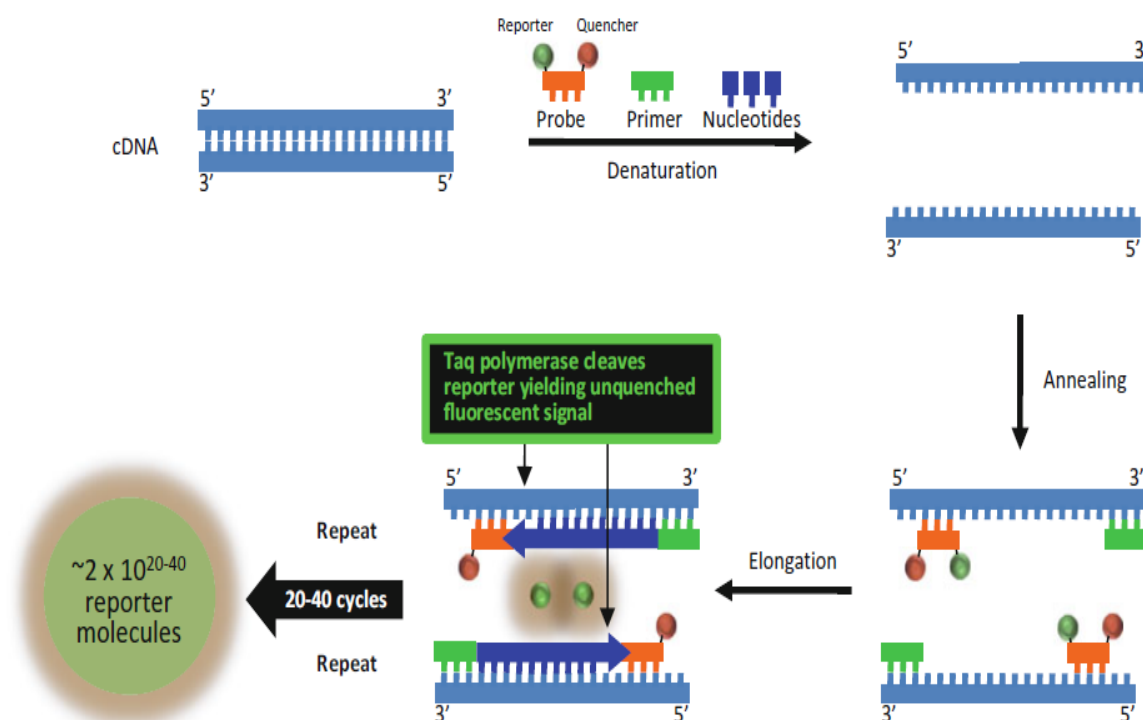


Εικόνα 11. Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBRgreen I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

2.5. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο στα δείγματα της μελέτης

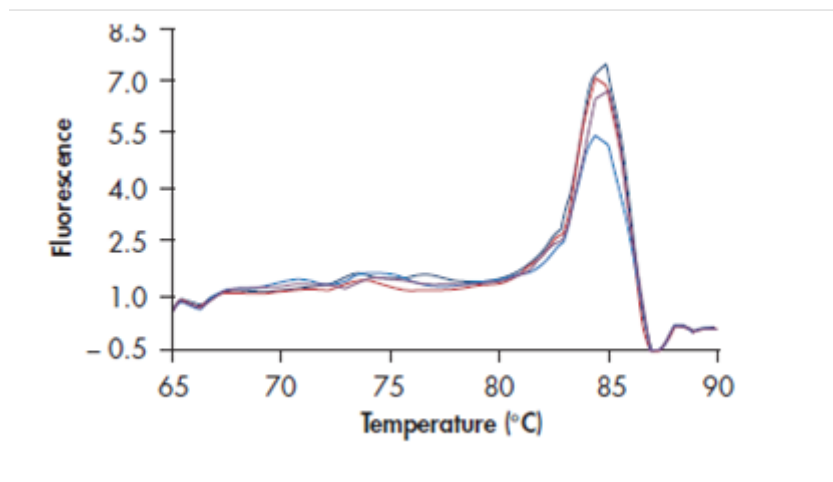
Η Real-Time PCR εφαρμόστηκε με τη χρήση SYBR-Green I και του ένζυμου *hos start Taq* πολυμεράση που είναι μια 94kDa πρωτεΐνη με 5'-3' δραστηριότητα πολυμερισμού, η οποία είναι η πλέον αποτελεσματική στους 70°C έως 80°C. Είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτική και ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 100 κύκλοι. Η αντίδραση (2x Luna® Universal qPCR Master Mix, M3003L, New England Biolabs, USA) συνολικά περιλαμβάνει 35 κύκλους με επαναλαμβανόμενα στάδια της PCR με τα εξής βήματα (Εικόνα 13):

- αρχική αποδιάταξη του cDNA και ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης σε έναν κύκλο (denaturation).
- αποδιάταξη του cDNA, υβριδοποίηση των εκκινήτων με το DNA (α) και επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA (β) για 40 κύκλους.
- Η συλλογή δεδομένων-μέτρηση απορρόφησης γίνεται στην φάση (β) κάθε κύκλου.



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας qPCR

Για κάθε πολλαπλασιαζόμενη περιοχή (amplicon) σχεδιάζεται η καμπύλη τήξης της, 2°C έως 4°C κάτω από το σημείο τήξης (T_m) του PCR προϊόντος. Ακολουθεί ανάλυση της καμπύλης συλλέγοντας δεδομένα φθορισμού καθώς αυξάνουμε τη θερμοκρασία από τους 60°C στους 95°C για έναν κύκλο (melting curve). Κατά αυτό τον τρόπο ελέγχεται η ειδικότητα της αντίδρασης, αφού ο φθορισμός προέρχεται από το προϊόν και όχι από διμερή των εκκινητών (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ανάλυση της καμπύλης τήξης και ειδικότητα της αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς ACTB με το 'peak' του φθορισμού στους 85°C.

Αντίδραση:

Αντιδραστήρια και υλικά

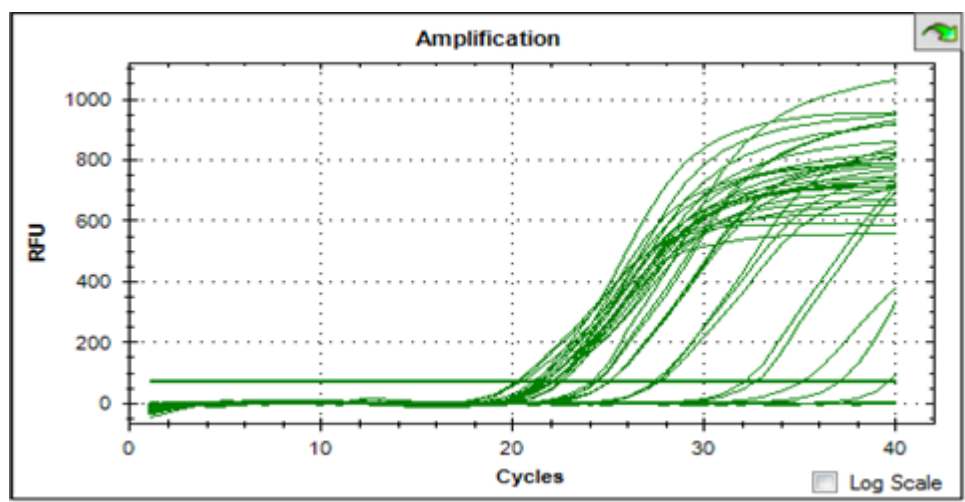
- 2xLuna® Universal qPCR Master Mix, 10μl:
- PCR Buffer: Διάλυμα MgCl₂ (11 mM)
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- Εκκινητές, 0,5μl: sense(s), antisense(as) (20pmol/μl)
- cDNA: 2 μl με τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (probes) SURVIVIN -WT, 2B, ΔEx3, 3B και ACTB (62), ενώ στον ακόλουθο πίνακα 1 αναγράφονται οι συνθήκες της αντίδρασης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Luna® Universal qPCR Master Mix, M3003L, New England Biolabs, USA).

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

Cycles		°C	Time	Acquisition	Rate
1 Cycle	Denaturation	95	1min	None	0,5c/sec
40 Cycles	Denaturation	95	15sec	None	0,5c/sec
	Hybridization	54-58	10sec	Single	0,5c/sec
	Elongation	72	20sec	None	0,5c/sec
1 Cycle	Melting	58	5sec	Continuous	0,5c/sec
	Cooling	40	5sec	None	

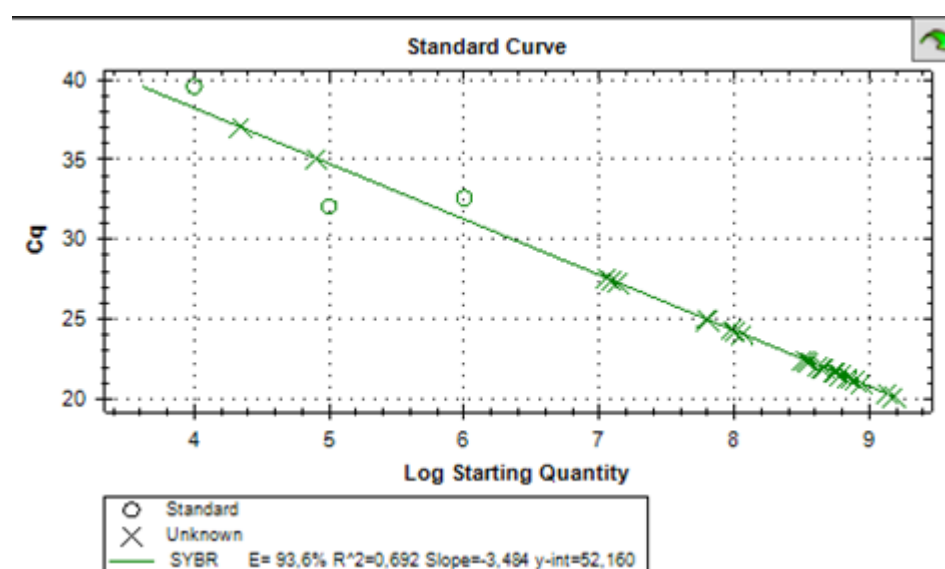
Οι μετρήσεις διεξήχθησαν εις διπλούν για το κάθε γονίδιο και το κάθε δείγμα ξεχωριστά και όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυκλικό θερμοποιητή σε αληθινό χρόνο (Biorad CFX96, USA) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Παρουσίαση αποτελεσμάτων qRT-PCR με SYBR-GreenI για SURVIVIN σε Biorad CFX96 για τις παραπάνω συνθήκες διεξαγωγής πειράματος

Ποσοτικοποίηση DNA

Η ποσοτικοποίηση ανάμεσα σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα έγινε με την μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης με εξωτερική καμπύλη αναφοράς (external standards) (Εικόνα16). 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-B (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 16. Καμπύλη αναφοράς 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 SURVIVIN καθώς και του γονιδίου αναφοράς 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 δεν μεταβάλλεται σημαντικά ανάμεσα στα δείγματα.
- Όλα τα δείγματα cDNA συνετέθησαν από την ίδια αρχική ποσότητα RNA (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 surniniin εκφράζεται ως ο λόγος έκφρασης τους ως προς το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης-B(41,65). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην άμεση σύγκριση του λόγου του αριθμού μεταγράφων του γονιδίου στόχου της surniniin, σε κάθε δείγμα, με τον αντίστοιχο αριθμό του γονιδίου αναφοράς της ACTβ. Η καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε με βάση τον απόλυτο αριθμό μεταγράφων ανά μίτης 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 (41,62).
- Οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού PCR: 95 °C για 15s αποδιάταξης, 54-58 °C για υβριδοποίηση των εκκινητών 10 s, and 72 °C για 20s για επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA, όπως φαίνεται στον πίνακα I.

2.6. Πρωτεομική Ανάλυση

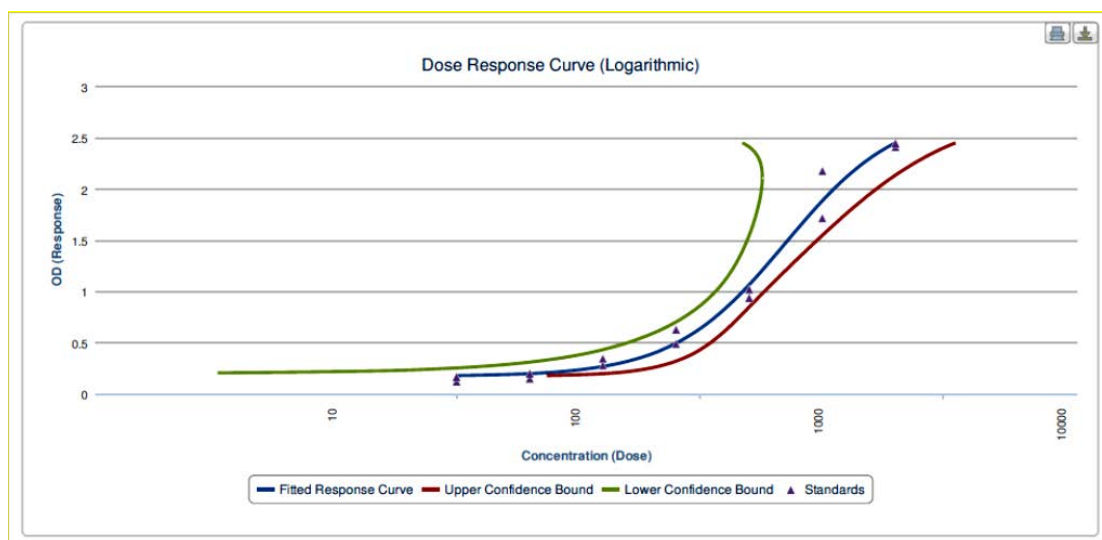
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο sandwich ELISA

Με τη μέθοδο ELISA ποσοτικοποιούνται τα επίπεδα έκφρασης της survivin και των κασπασών στον ορό, αφού φωτομετρηθούν στο μήκος κύματος εκπομπής χρωμοφόρου (Avidin-Horseradish Peroxidase, HRP) στα 450nm. Αρχικά, ειδικό αντίσωμα έναντι της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου βρίσκεται προσκολλημένο σε πλάκα 96 θέσεων. Προστίθεται ο ορός και στη συνέχεια ενσωματώνεται το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης.

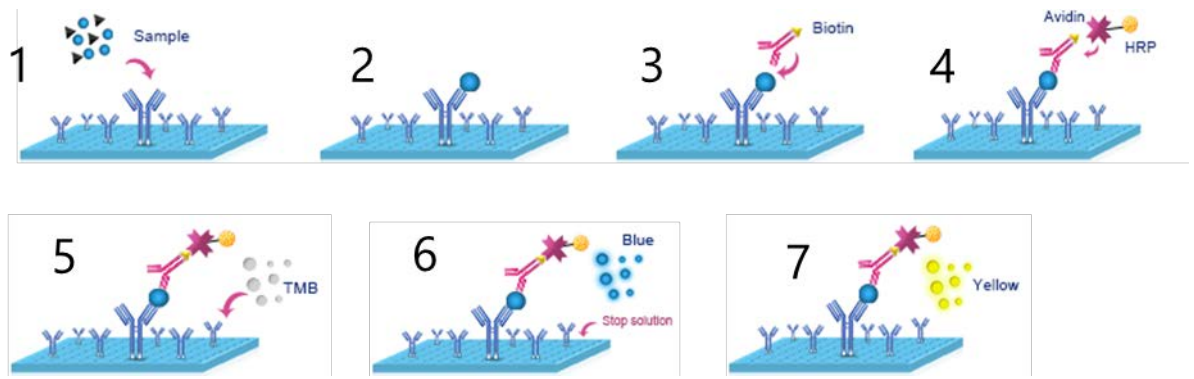
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης survivin και των κύριων αποπτωτικών κασπασών (-3,-9) έγινε σε δείγμα ορού των συμμετεχόντων στη μελέτη, με τη μέθοδο ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA), με συσκευασίες του εμπορίου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Elab Science, USA). Ειδικότερα, ορός του κάθε δείγματος προστίθεται σε ειδικά βοθρία, προ-επικαλυμμένα με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη survivin και τις κασπάσες. 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. 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 $\mu\text{g/ml}$): 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 επώασθη για 90 λεπτά στους 37°C . Κατόπιν, το υγρό απορρίφθηκε και προστέθηκε το διάλυμα με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, 100 μl ανά πηγάδι με ανάδευση. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°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) σε ποσότητα 100 μl ανά πηγάδι και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C . Κατόπιν το υγρό αφαιρέθηκε και έγινε πλύση της πλάκας πέντε φορές. Προστέθηκε το διάλυμα με το υπόστρωμα, 90 μl σε κάθε πηγάδι, και έγινε επώαση για 15 λεπτά στους 37°C στο σκοτάδι. Στο τέλος με προσθήκη 5% φωσφορικού οξέος σταμάτησε η αντίδραση και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm (εικόνα 18).



Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης της συννίνιστη μέθοδο ELISA



Εικόνα 18. Τα στάδια της sandwichELISA

Αποτελέσματα

Περιγραφική Στατιστική Ανάλυση

Στους πίνακες II και III αναγράφονται τα δημογραφικά και τα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία αντίστοιχα, για τον παιδιατρικό πληθυσμό της μελέτης. Όπως φαίνεται στον πίνακα II, τα αγόρια του δείγματος ήταν 167 (53,2%) και τα κορίτσια 142 (45,2%). Η μέση τιμή της ηλικίας των παιδιών που λαμβάνουν μέρος στη μελέτη υπολογίζεται 43,09 μήνες με τυπική απόκλιση 20,501.

Στατιστικά αποτελέσματα

Όπως φαίνεται στον πίνακα II, οι ασθενείς με σήψη είχαν υψηλότερη θνητότητα (50% vs. 6%), διάρκεια νοσηλείας (mean LOS: 17 vs 6) και μεγαλύτερη αναλογία αγοριών (87% vs, 13%) συγκριτικά με την ομάδα SIRS ($p < 0,001$), ενώ σημειώθηκε και στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισης σηπτικών επεισοδίων στις μικρότερες ηλικίες (mean: $6,3 \pm 5,4$ vs. $10,4 \pm 5,4$ ετών, $p < 0,000$). Σε σχέση με τα σκορ βαρύτητας νόσου, οι παιδιατρικοί ασθενείς της μελέτης με σήψη, δεν σημείωσαν στατιστικά σημαντική διαφορά στο PELOD score (median: 12 vs 6,5).

Στον πίνακα III παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού mRNA για κάθε ισομορφή της survinin (2B, ΔEx3, WT, 3B), όπως και του ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών της μελέτης (survinin και κασπάσες 3 και 9), με τη μέθοδο ELISA στα δείγματα αίματος του δείγματος της μελέτης. Όλες οι ισομορφές της πρωτεΐνης survinin (με εξαίρεση την ισομορφή 3B) παρουσίαζαν αυξητικές τάσεις στους σηπτικούς ασθενείς και στην ομάδα SIRS, εν συγκρίσει με τους υγιείς μάρτυρες. Η ποσότητα mRNA των ισομορφών 2B και ΔEx3 (Εικόνες 19 και 20) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στην ομάδα της σήψης και του τραυματικού SIRS σε σχέση με την ομάδα control ($p < 0,05$). Επίσης, ανεδείχθη η τάση αυξημένης έκφρασης της ισομορφής WT και η μειωμένη

έκφραση της 3B στη σήψη, ωστόσο οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν έφθασαν σε στατιστική σημαντικότητα (Εικόνες 21 και 22).

Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της survivin στον ορό αίματος με τη μέθοδο ELISA, η πρωτεΐνη παρουσίασε σταθερή και στατιστικά σημαντική αυξητική τάση ($p=0,000$) στους σηπτικούς ασθενείς σε σύγκριση με τις ομάδες SIRS και υγιών μαρτύρων (Εικόνα 23). Αντίστοιχα, σταθερά αυξημένες βρέθηκαν οι μετρηθείσες κασπάσες 3 και 9 στον ορό των σηπτικών ασθενών, σε σύγκριση με τις ομάδες SIRS και controls, με στατιστικά σημαντική διαφορά ωστόσο μεταξύ των ομάδων να προσεγγίζει μόνο η κασπάση 9 (Εικόνες 25 και 26). Σημειώνεται η θετική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης survivin και των κασπασών στους σηπτικούς ασθενείς ($p<0,001$) (εικόνα 27).

Αναφορικά με την επιβίωση, η αυξημένη πρωτεΐνη survivin (εικόνα 24) συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τη θνητότητα στους σηπτικούς ασθενείς ($p=0,000$), ενώ οι υπόλοιπες ισομορφές ήταν μειωμένες στους αποβιώσαντες. Οι κασπάσες ανευρέθηκαν αυξημένες στους ασθενείς που τελικά απεβίωσαν, με την κασπάση 9 να σημειώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$).

Πίνακες και Εικόνες

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

	CONTROL	SIRS	SEPSIS	
	N=30	N=35	N=35	p-value
Ηλικία, έτη, mean ± SE	10,59 ± 3,12**	10,4 ± 5,37 [†]	6,29 ± 5,37** [†]	0,000
Φύλο, Α/Γ (%)	16/14 (56/44)	27/8 (78/22) [†]	29/6 (87/13) [†]	0,001
ICU LOS, days, median (IQR)		6 (8) [†]	17 (59) [†]	0,026
Survival ICU, n (%)		33 (94%) [†]	17 (50%) [†]	0,031
PELOD score, median (IQR)		6,5 (11)	12 (33)	0,377
APACHE score, mean ± SE		11,73 ± 4 [†]	21 ± 9,5 [†]	0,000
SOFA score, mean ± SE		6 ± 2,2 [†]	8 ± 3,5 [†]	0,015
PRISM-II score, mean ± SE		12,15 ± 4,5 [†]	17 ± 11 [†]	0,007
SAPS score, mean ± SE		43 ± 11,8 [†]	56 ± 12 [†]	0,000
WBC, x10 ³ , mean ± SE		11,6 ± 5,5 [†]	13,63 ± 7,8 [†]	0,352
Lactate, mg/dl, median (IQR)		6,3 (5,8)	16 (32,6)	0,011
CRP, mean ± SE		4 ± 11	15 ± 14,3	0,728
hsp90, median (IQR)	118,9 (79,2)**	127,5 (93,5) [†]	420 (429,5) ^{†, **}	0,002
hsp72, median (IQR)	0,3 (0,29) **	0,4 (0,32) [†]	0,53 (0,39) ^{†, **}	0,008
IL_17, mean ± SE	0,20 ± 0,00	25 ± 35	13,80 ± 10,08	0,246
IL_6, median (IQR)	15,7 (13,9)***	109,5 (136)* [†]	143 (120,6) ^{†, **}	0,000
IL_10, median (IQR)	15,8 (19,43) **	25,8 (33,5) [†]	52,2 (72,5) ^{†, **}	0,002
IL_8, median (IQR)	63,8 (95,3)	99 (143,4)	162,5 (127,7)	0,534

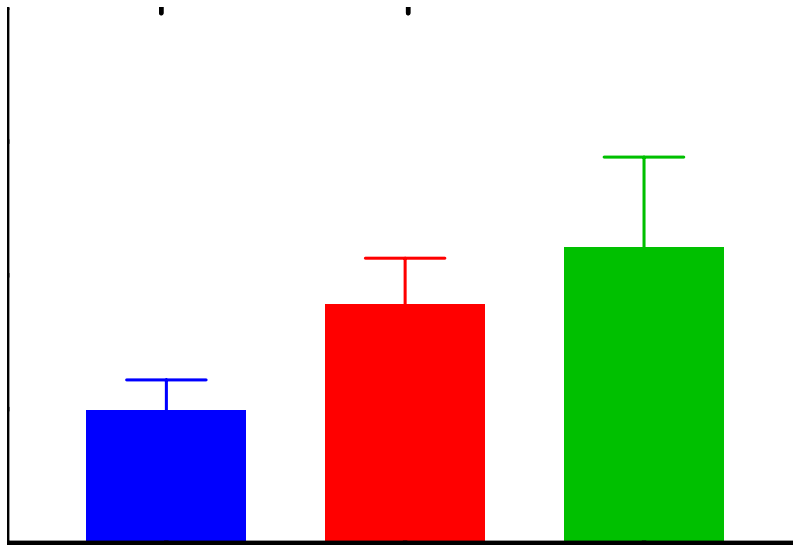
SE (standard error of mean), IQR (interquartile range).

p < 0,05: *control vs SIRS, **control vs sepsis, [†]SIRS vs sepsis.

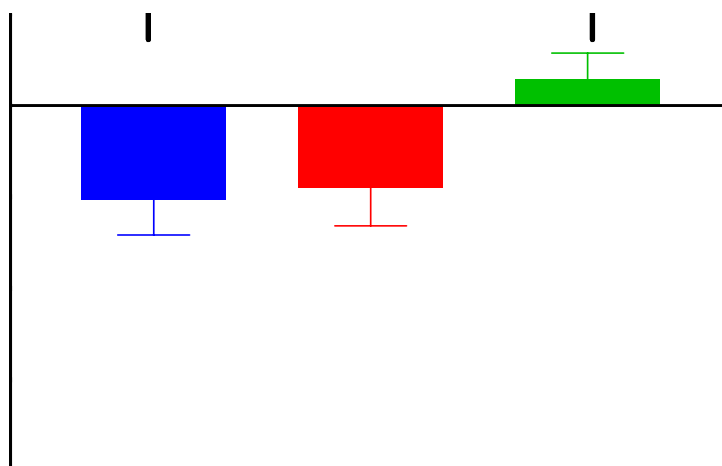
Πίνακας III Περιγραφικά δεδομένα του ποσοτικού προσδιορισμού mRNA των διάφορων ισομορφών της survivin, καθώς και των μετρήσεων της πρωτεϊνικής survivin και κασπασών ορού με ELISA

Descriptives	Controls median (IQR)	SIRS (Τραύμα) Median (IQR)	Σήψη Median (IQR)	p-value
Survivin -2B (No copies/μl)	6,04(8,71)	11,3(13,2)	20,1(29)	0,013
Survivin -ΔEx3 (No copies/μl)	0,005(0,14) **	0,14(0,04)	0,098(2,98)+	0,025
Survivin WT (No copies/μl)	0,005(0,013)	0,04(0,015)	0,004(0,08)	0,595
Survivin -3B (No copies/μl)	0,10(0,24)	0,075 (0,55)	0,2(0,14)	0,396
Survivin protein (pg/ml)	72,8 (109,6) **	125(98,1)	253,5(273)+	0,000
Caspase 3 (ng/ml)	13,05(22,6)	4,7(36)	11,2 (70,88)	0,564
Caspase 9 (ng/ml)	85,4(90,4)	85(19,03)	119,4(53,5)	0,038

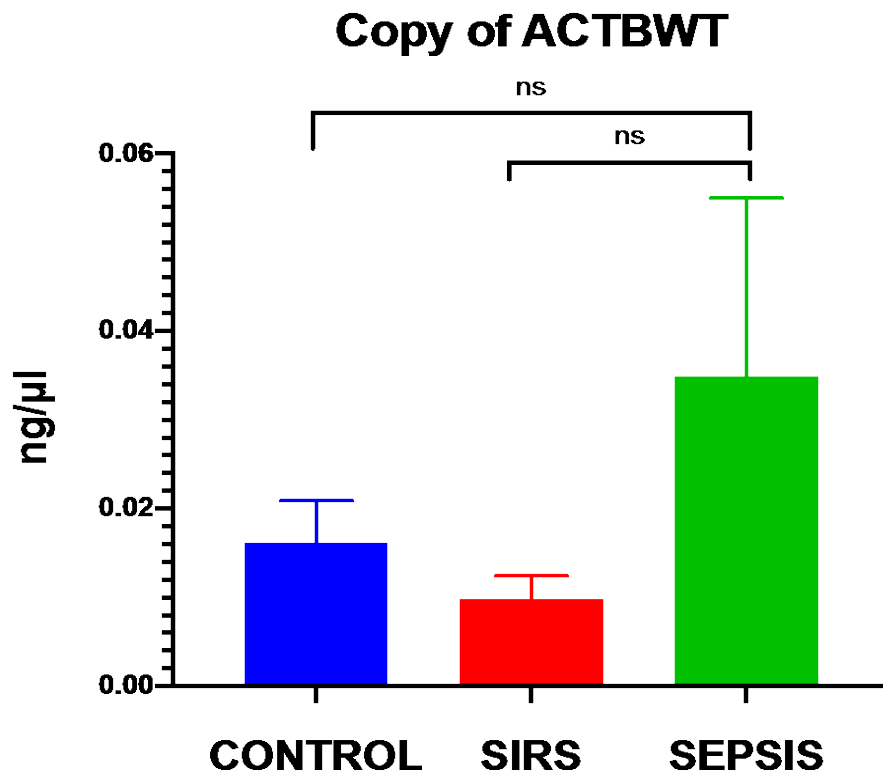
p<0,05: *control vs SIRS, **control vs sepsis, †SIRS vs sepsis.



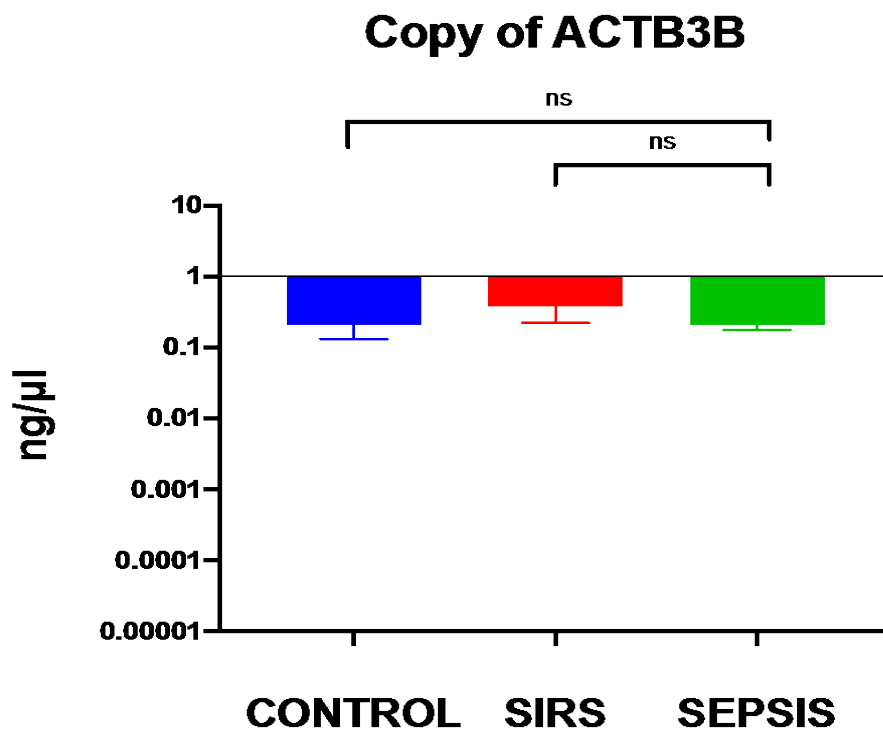
Εικόνα 19. Προσδιορισμός μεταγράφου 2B ($p < 0.001$)



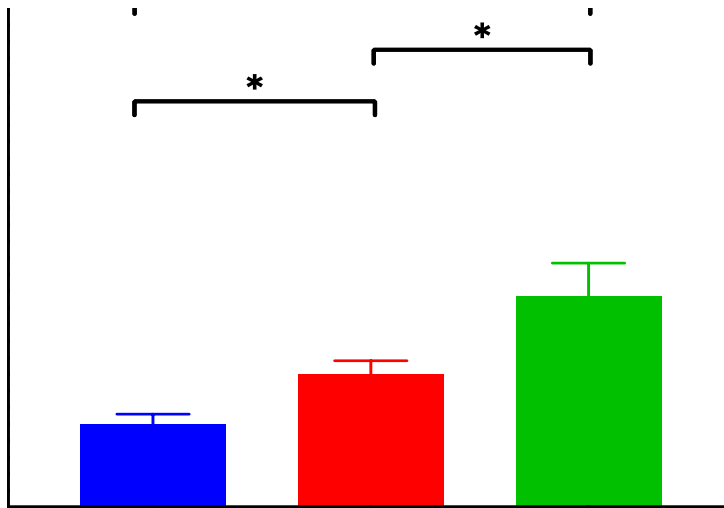
Εικόνα 20. Προσδιορισμός μεταγράφου ΔEx3 ($p < 0.001$)



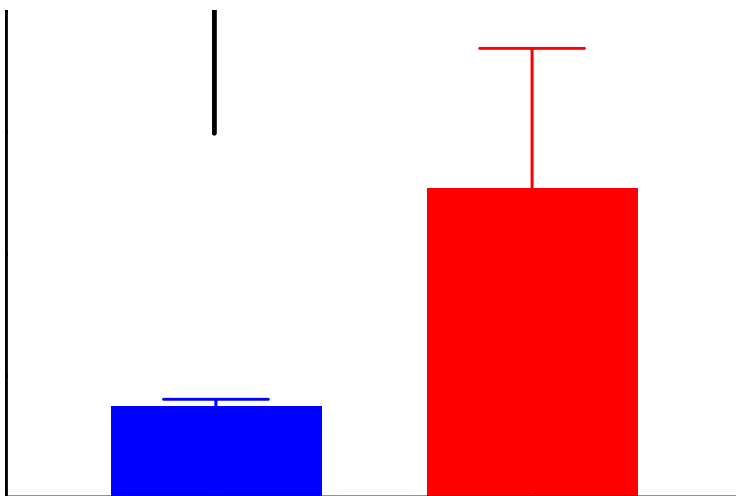
Εικόνα 21. Προσδιορισμός πλήρους μεταγράφου WT



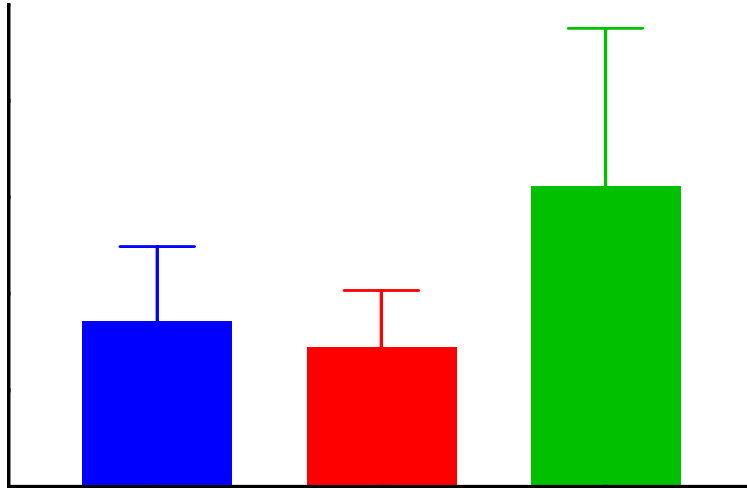
Εικόνα 22. Προσδιορισμός ισομορφής 3B



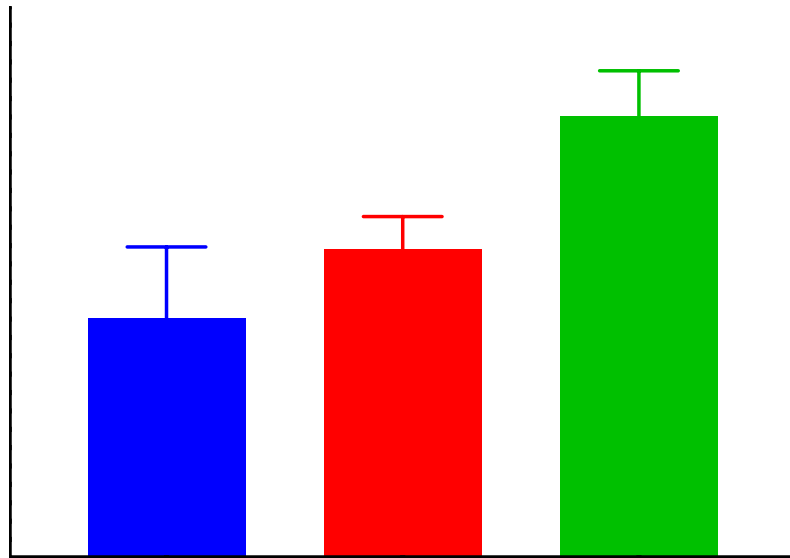
Εικόνα 23. Ποσοτική μέτρηση πρωτεΐνης survivin ($p=0,000$)



Εικόνα 24. Ποσοτική μέτρηση πρωτεΐνης survivin στους αποβιώσαντες ($p<0,001$)

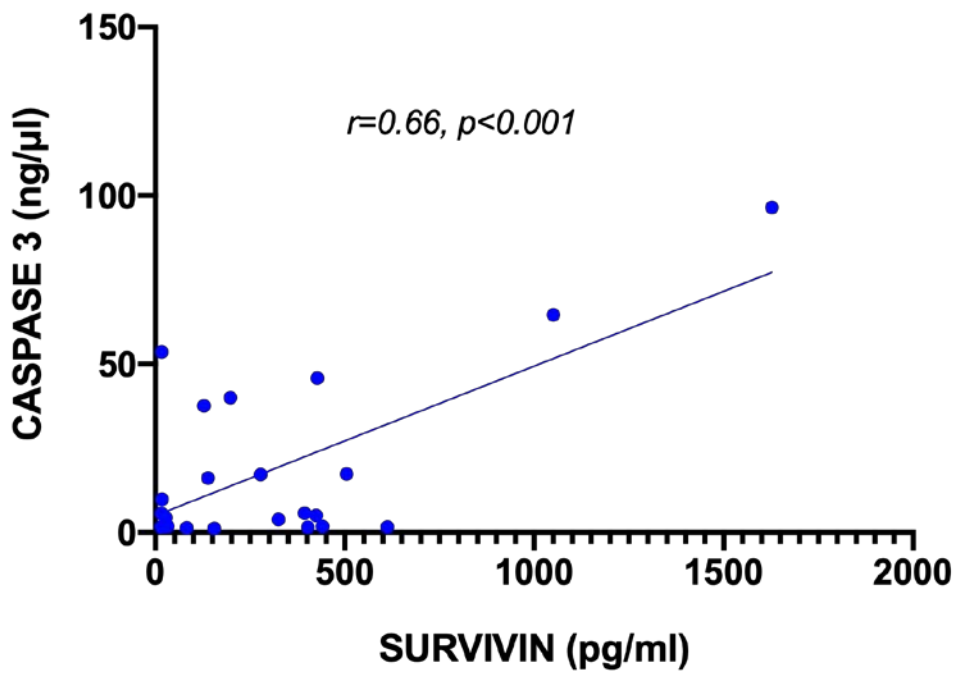


Εικόνα 25. Επίπεδα κασπάσης 3 στον ορό των ασθενών



Εικόνα 26. Επίπεδα κασπάσης 9 στον ορό των ασθενών ($p < 0,001$)

Survivin - Caspase Relation



Εικόνα 27. Συσχέτιση πρωτεΐνης survivin με την κασπάση 3

Συζήτηση

Η πιλοτική αυτή μελέτη αποτελεί την πρώτη ερευνητική προσπάθεια διερεύνησης της πρώιμης αντίδρασης των ενδοκυτταρικών 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 και ΔEx3 αυξάνεται πρώιμα στη σήψη διακρίνοντάς την από άλλη οξεία κατάσταση στρες σε ασθενείς ΜΕΘ. Αν και οι υπόλοιπες ισομορφές (WT και 3B) παρουσιάζουν διαφορετική ανταπόκριση στην ομάδα σήψης από ότι στο SIRS, οι κυμαινόμενες αυτές αυξητικές τους τάσεις δεν διαφοροποιούν τις ομάδες σημαντικά. Τέλος, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των κασπασών στον ορό αίματος, ιδιαίτερα όμως της *survivin*, αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με σήψη. Οι αυξητικές αυτές τάσεις παρατηρούνται σε μικρότερο βαθμό στο τραύμα, αποκαλύπτοντας μια πρώιμη απόκριση στο στρες και για τις δύο ομάδες ασθενών, ιδιαίτερα όμως στους ασθενείς με σήψη.

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 (66). Συμβατά με την παρούσα μελέτη είναι τα αποτελέσματα πρόσφατης έρευνας, στην οποία η αυξημένη έκφραση της κασπάσης 3 συσχετίστηκε με μεγαλύτερη θνητότητα σε σηπτικούς ασθενείς (67). 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 (68). Η χορήγηση αναστολέων της απόπτωσης, σε πειραματικά μοντέλα, φαίνεται επίσης να σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση λεμφοκυττάρων και βελτιωμένη ανοσιακή απόκριση στη σήψη (69). 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 (70). 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 καταστολής της απόπτωσης κατά την εξαιρετικά κρίσιμη διαδικασία της ανάπτυξης του εγκεφάλου(71). 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 (70). 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, αλλά και στους διαφοροποιημένους ιστούς των ενηλίκων (72). 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 εξηγήσει τον φαύλο κύκλο της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης κατά την ενδοτοξιναιμία(73).

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν αναδείξει την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα για την πρωτεΐνη *survivin* σε οξεία φλεγμονώδη, αλλά και αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς φαίνεται ότι λευκοκυτταρικοί πληθυσμοί, πλούσιοι στο επίπεδο της *survivin*, μεταναστεύουν στα σημεία της φλεγμονής, με στόχο την αναστολή της απόπτωσης των T-λεμφοκυττάρων, όπως έχει για παράδειγμα αποδειχθεί σε περιπτώσεις οξείας σκληροειδίτιδας ή ελκώδους κολίτιδας (49). 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 ιού που έχει απομονωθεί (41,48). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση της *survivin* ανέστειλε τον ιικό πολλαπλασιασμό (44).

Επομένως, αναλόγως του εκάστοτε παθογόνου, η απόπτωση στα κύτταρα του ξενιστή ίσως να είναι ευεργετική ή καταστροφική για την επιβίωση. Προκαταρκτικές μελέτες σε περιπτώσεις σήψης από *pseudomonas aeruginosa* έχουν αναδείξει ότι δύο τύποι κυττάρων, τα λεμφοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού σωλήνα, ενεργοποιούνται προς την κατεύθυνση της απόπτωσης (74). 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 αναφερθεί προσφάτως σε πειραματικά μοντέλα, μετά από επαγωγή σφαιρικής ισχαιμίας και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (50,51). Μελέτες σε καλλιέργειες αστροκυττάρων επιμολυσμένων με τον ιό *Picornavirus* αποκάλυψαν την ενεργοποίηση της *survivin* στα νευροκύτταρα και την καταστολή της δράσης της κασπάσης 3, μέσω σχηματισμού συμπλόκων *survivin*/κασπάσης 3, που ανέστειλαν την αποπτωτική διαδικασία (75). Ομοίως, πολλαπλές μελέτες που αφορούν την ισχαιμία και τη βλάβη που προκαλείται από επανααιμάτωση στην υποξαιμική μυοκαρδιοπάθεια, φαίνεται να προσδίδουν στην πρωτεΐνη *survivin* σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις, εμπλέκοντας τη στα πολύπλοκα μοριακά μονοπάτια, που προστατεύουν από τη μυοκαρδιακή βλάβη και αποβλέποντας σε αυτήν για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στο μέλλον (76,77). Τέλος, 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 συμπλοκου *thioredoxin (Trx-1)/hemeoxygenase-1*, περιορίζοντας την καρδιακή δυσλειτουργία κατά τη σήψη (56). Επίσης, οι προστατευτικές δράσεις της σιμβαστατίνης έναντι του LPS, φαίνεται να διαμεσολαβούνται μέσω ενεργοποίησης της *survivin*, καταστολής της κασπάσης 3 και αναστολής της απόπτωσης ηπατοκυττάρων και λεμφοκυττάρων (15).

Στην παρούσα εργασία η ισομορφή *survivin* 2B αναδείχθηκε ως το κυρίαρχο μετάγραφο, που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα στη σήψη, ακολουθούμενη από την 3B. 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 (78). 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 παραγωγίμη μορφή της πρωτεΐνης (62). Μία πρόσφατη ερευνητική δουλειά, αποκάλυψε ότι ένα κοινό ρυθμιστικό δίκτυο είναι υπεύθυνο για την ταυτόχρονη έκφραση λειτουργικά συνδεδεμένων ισομορφών της κάθε πρωτεΐνης (79), 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 (80). 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, κάτι που πιθανώς να καθορίζει και την κυτταρική τους εντόπιση, με τη δημιουργία διακριτών συμπλόκων. 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 (81). 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 2a, 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* (82). Οι δράσεις των διαφόρων ισομορφών δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες έως του παρόντος. Οι ισομορφές ΔEx3 και 3B θεωρούνται αντι-αποπτωτικές, ενώ η 2B και η 2a 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 (83).

Σε σχέση με τις ιογενείς λοιμώξεις, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της *survivin* περιορίζει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων ιών και την επέκταση ιογενών λοιμώξεων (44), ενώ σε μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη σε καλλιέργειες αστροκυττάρων, επιμολυσμένων με πικορνα-ϊό, αποκαλύφθηκε η υπερέκφραση της *survivin*, ενώ αντίθετα η ενζυματική

δραστηριότητα της κασπάσης 3 ανευρέθη κατεσταλμένη, φανερώνοντας έτσι την ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μηχανισμών (84), εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπου σημειώθηκε η θετική συσχέτιση μεταξύ αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών βιομορίων στη σήψη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αποτύπωση της έκφρασης των κύριων εκπροσώπων της απόπτωσης και της αναστολής της απόπτωσης σε σηπτικούς ασθενείς, νοσηλευόμενους σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας. Οι δύο αυτές αντιδιαμετρικές διαδικασίες ενδεχομένως να αντιμάχονται μεταξύ τους, κατά την επαφή με τον εκάστοτε λοιμογόνο παράγοντα, σε μια προσπάθεια των κυττάρων για την επάνοδο της ομοιοστασίας, ενώ η ισορροπία μεταξύ τους, 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 το δρόμο για μεγαλύτερες και στοχευμένες ερευνητικές προσπάθειες στη διερεύνηση και αποκρυπτογράφηση της σηπτικής παθοφυσιολογίας.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η εναλλακτική συρραφή εξωνίων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός σηματοδότησης και διαφοροποίησης των υγιών από διάφορες παθολογικές κυτταρικές διεργασίες. Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την υπερέκφραση συγκεκριμένων αποπτωτικών πρωτεϊνών, αλλά και την εναλλακτική έκφραση αντιαποπτωτικών βιομορίων σε υπερφλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η σήψη στους παιδιατρικούς ασθενείς. Έτσι, η ποσοτικοποίησή 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.

Περιορισμοί της μελέτης

Ένας σημαντικός περιορισμός της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων, κάτι που οφείλεται στο περιορισμένο χρονικό πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ώστε να εξασφαλισθεί η συλλογή ενός επαρκούς για το είδος της μελέτης δειγμάτων αλλά και στην πολύ απαιτητική και χρονοβόρο τεχνική των εργαστηριακών μετρήσεων. Επίσης υπήρχε περιορισμός στην προμήθεια του αριθμού των εμπορικών αναλυσίμων για τις εργαστηριακές μετρήσεις. Επιπλέον η μελέτη δεν εστίασε σε περισσότερο ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση της *surviniin*, ή σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους μπορεί η *surviniin* σήψη να παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά. Τέλος, στην παρούσα εργασία δεν κατεγράφησαν συγκεκριμένοι λοιμογόνοι παράγοντες ή κατηγορίες λοιμώξεων, που θα μπορούσαν να διαφοροποιούν τις κλινικές ομάδες ως προς την έκφραση συγκεκριμένων αποπτωτικών ή αντιαποπτωτικών βιομορίων. Μια τέτοια προσπάθεια θα απαιτήσει τον σχεδιασμό εκτεταμένης πολυκεντρικής μελέτης ώστε να συμπεριλάβει ικανό αριθμό ασθενών που στη συνέχεια θα ταξινομηθούν σε υπο-ομάδες μελέτης (*sub-cohorts*).

Προοπτική της μελέτης

Η παρούσα έρευνα αποτελεί το εφαλτήριο, επάνω στο οποίο θα στηριχτεί η ευρύτερη πολυκεντρική μελέτη *SIBIGHAM*, 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 *surviniin* φαντάζει ένα ελκυστικό σενάριο θεραπευτικής παρέμβασης στη σήψη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016 Jun 30;2:16045.
2. 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.
3. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
4. *Pediatric Critical Care - 5th Edition* [Internet]. [cited 2019 May 19]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/pediatric-critical-care/fuhrman/978-0-323-41558-3>
5. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation [Internet]. [cited 2019 Jun 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190891/>
6. Luan Y, Yao Y, Xiao X, Sheng Z. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015 Jan;35(1):17–22.
7. 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. *J Intensive Care*. 2018;6:72.
8. 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.
9. Smith C, Wang X, Yin H. Caspases come together over LPS. *Trends Immunol*. 2015 Feb;36(2):59–61.
10. 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.

11. 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.
12. Precision medicine in pediatric sepsis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 May 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Atreya+MR%2C+Wong+HR.+Precision+medicine+in+pediatric+sepsis>
13. 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*. *Critical Care Medicine.* 2013 Oct;41(10):2419–29.
14. Grimaldi D, Goicoechea Turcott EW, Taccone FS. IL-1 receptor antagonist in sepsis: new findings with old data? *Journal of Thoracic Disease.* 2016 Sep;8(9):2379–82.
15. 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- κ B/p65 Expression. *Front Pharmacol.* 2019;10:54.
16. Shinozaki S, Inoue Y, Yang W, Fukaya M, Carter EA, Yu Y-M, et al. Farnesyltransferase inhibitor improved survival following endotoxin challenge in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 15;391(3):1459–64.
17. 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.
18. Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 20;5:e1526.
19. 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.
20. Napolitano LM. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect (Larchmt).* 2018 Mar;19(2):117–25.
21. Kaukonen K-M, 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.

22. 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.
23. Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Chi... - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 May 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28783810>
24. 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.
25. Epidemiology of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in children. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 May 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Proulx+F%2C+Fayon+M%2C+Farrell+CA%2C+et+al.+Epidemiology+of+sepsis+and+multiple+organ+dysfunction+syndrome+in+children.+Chest>
26. de Souza DC, Machado FR. Epidemiology of Pediatric Septic Shock. *J Pediatr Intensive Care*. 2019 Mar;8(1):3–10.
27. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138–50.
28. Marshall JC, Charbonney E, Gonzalez PD. The immune system in critical illness. *Clin Chest Med*. 2008 Dec;29(4):605–616, vii.
29. Tapping RI. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2009 Aug;21(4):175–84.
30. Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):5–8.
31. 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.
32. 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.

33. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jun 30;11:e19.
34. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):244–54.
35. 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;13(1):121–8.
36. 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.
37. 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;98(5):629–39.
38. 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.
39. Wang L, Bastarache JA, Ware LB. The coagulation cascade in sepsis. *Curr Pharm Des*. 2008;14(19):1860–9.
40. 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.
41. 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. *Clinical Breast Cancer*. 2014 Apr;14(2):122–31.
42. Herr AB. Evolution of an allosteric “off switch” in apoptotic caspases. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Apr 13;293(15):5462–3.
43. 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.
44. Barrera-Vázquez OS, Cancio-Lonches C, Hernández-González O, Chávez-Munguía 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;527:146–58.

45. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung C-S, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005 Aug;78(2):325–37.
46. Kung C-T, Su C-M, Chang H-W, Cheng H-H, Hsiao S-Y, Tsai T-C, et al. The prognostic value of leukocyte apoptosis in patients with severe sepsis at the emergency department. *Clinica Chimica Acta*. 2015 Jan;438:364–9.
47. 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.
48. Grzybowska-Izydorzyc 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.
49. 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.
50. Ebrahimiyan H, Aslani S, Rezaei N, Jamshidi A, Mahmoudi M. Survivin and autoimmunity; the ins and outs. *Immunol Lett*. 2018;193:14–24.
51. 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 USA*. 2012 Jan 10;109(2):600–5.
52. 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.
53. 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.
54. 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 02;7(5):e1111.

55. Zumbärgel 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.
56. 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;220:68–78.
57. Altieri DC. Survivin - The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Mar;39:91–6.
58. Moniri Javadhesari S, Gharechahi J, Hosseinpour Feizi MA, Montazeri V, Halimi M. Transcriptional Expression Analysis of Survivin Splice Variants Reveals Differential Expression of Survivin-3 α in Breast Cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2013 Apr;17(4):314–20.
59. 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.
60. Sah NK, Seniya C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(9):6623–31.
61. 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.
62. Vargas IME, Vivas-Mejía PE. Assessment of mRNA splice variants by qRT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;1049:171–86.
63. Khan S, Ferguson Bennit H, Asuncion Valenzuela MM, Turay D, Diaz Osterman CJ, Moyron RB, et al. Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. *Biologics*. 2015 Jul 9;9:57–67.
64. PC HS and G. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jun 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27896761>
65. Vargas IME, Vivas-Mejía PE. Assessment of mRNA splice variants by qRT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;1049:171–86.
66. 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.

67. 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;34:103–6.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Tran HT, Fransen M, Dimitrakopoulou D, Imschoot GV, 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.
73. 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.
74. 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.
75. Rubio N, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A. 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.
76. Yang N, Wu L, Zhao Y, Zou N, Liu C. MicroRNA-320 involves in the cardioprotective effect of insulin against myocardial ischemia by targeting survivin. *Cell Biochem Funct*. 2018 Apr;36(3):166–71.
77. Guo Z-X, Zhou F-Z, Song W, Yu L-L, Yan W-J, Yin L-H, et al. Suppression of microRNA-101 attenuates hypoxia-induced myocardial H9c2 cell injury by targeting DIMT1-Sp1/survivin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Oct;22(20):6965–76.

78. 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.
79. 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.
80. Miura K, Fujibuchi W, Unno M. Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Dec;33(12):2311–9.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. Rubio N, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A. 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.