



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ, ΜΕΘ ΠΑΙΔΩΝ
Διευθυντής: Καθηγητής Μπριασούλης Γεώργιος

**Η έκφραση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στα περιφερικά
μονοπύρρηνα αίματος σε συσχέτιση με την διέγερση του άξονα και
των πρωτεϊνών στρες hsp70 και hsp90 σε ασθενείς ΜΕΘ με σήψη ή
τραύμα**

1

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Κωνσταντίνος Γ Βάρδας

Χειρουργός

Ηράκλειο 2017

Αίτηση εκπόνησης διδακτορικής διατριβής: 12/04/2013

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 9/06/2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μπριασούλης Γεώργιος – Επιβλέπων Μέλος

Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Νάνας Σεραφείμ

Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας-Παθολογίας, Ε.Κ.Π.Α

Χαρμανδάρη Ευαγγελία

Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Εφηβικής Ενδοκρινολογίας, Ε.Κ.Π.Α

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μπριασούλης Γεώργιος, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Νάνας Σεραφείμ, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας-Παθολογίας, Ε.Κ.Π.Α

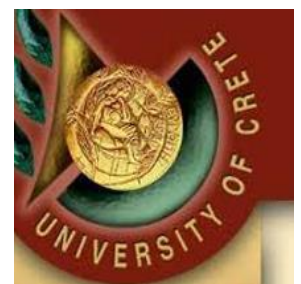
Χαρμανδάρη Ευαγγελία, Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Εφηβικής Ενδοκρινολογίας, Ε.Κ.Π.Α

Σαμώνης Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γαλανάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημητρίου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογικής-Ογκολογίας Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βενυχάκη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης



στη μνήμη του πατέρα μου

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΊΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. **Ω**Υ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. **Α**ΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. **Ω**Υ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. **Ε**Σ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. **Α** Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΔΥΤΑ. **Ο**ΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ω

Όρκος του Ιπποκράτη

"Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ότι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή και εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά".

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	13
Βιογραφικό σημείωμα.....	15
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
Πίνακας κυριότερων συντομογραφιών	23
1.Ορισμός σήψης και ιστορική αναδρομή	25
2.Επιδημιολογικά δεδομένα	29
3.Παθοφυσιολογία φλεγμονώδους αντίδρασης-σήψης.....	30
3.1 Επίδραση της σήψης στο ανοσοποιητικό σύστημα.	33
3.1.1 Ουδετερόφιλα	33
3.1.2 Μονοκύτταρα	33
3.1.3 Λεμφοκύτταρα.....	34
3.1.4 NK κύτταρα (Natural Killer Cells).....	35
3.2 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS)	35
3.3 Toll-Like Receptors (TLRs).....	37
3.4 Damage-Associated-Molecular Patterns(DAMPs)	39
3.5 Κυτταροκίνες	39
4.Συστηματική απάντηση του οργανισμού στο τραύμα	41
5.Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια.....	43
5.1 Αλληλεπίδραση του άξονα με το ανοσοποιητικό σύστημα	43
5.2 Προλακτίνη.....	44
5.3 Δυσλειτουργία του άξονα σε σήψη.....	46
6.Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών	47
6.1 Δομή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	47
6.2 Γονίδιο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	49
6.3 Ισομορφές πρωτεΐνης υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	49
6.4 Γενωμικές δράσεις γλυκοκορτικοειδών.....	51
6.5 Μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	54
6.6 Τροποποιήσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μετά την μεταγραφή	56
7.Πρωτεΐνες θερμικού σοκ.....	57
7.1 Εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ	58
7.2 Πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 70 KDa (HSP70).....	58
7.3 Πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 KDa (HSP90).....	59
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
1.Υπόθεση.....	63

2.Σκοπός της μελέτης.....	64
3.Υλικό και Μεθοδολογία.....	65
3.1 Ασθενείς.....	65
3.2 Σχεδιασμός μελέτης.....	67
3.3 Μετρήσεις - Αναλύσεις.....	67
3.4 Κριτήρια ένταξης στην μελέτη.....	67
3.5 Κυτταρομετρία ροής.....	69
3.5.1 Αντισώματα.....	71
3.5.2 Πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 και 70 kd με κυτταρομετρία ροής.....	72
3.5.3 Πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάριας πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με κυτταρομετρία ροής.....	76
3.6 Ορμονικός προσδιορισμός με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας.....	79
3.6.1 Μέτρηση κορτιζόλης ,προλακτίνης και ACTH.....	80
3.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	81
3.7.1 Κυτταροκίνες.....	83
3.7.2. Πρωτεϊνική έκφραση HSP90 και HSP72α.....	83
3.8 Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	83
3.8.1 Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα.....	84
3.8.1.1 Απομόνωση RNA με TRI Reagent (Ambion, Austin, USA).....	84
3.8.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με TRI Reagent.....	85
3.8.2 Υπολογισμός της καθαρότητας και καθαρισμός του RNA από DNA.....	85
3.8.2.1 Πρωτόκολλο καθαρισμού RNA από DNA με RQ1 RNase-free DNase kit.....	86
3.8.3 Παρασκευή cDNA από το RNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής.....	86
3.8.3.1 Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	86
3.8.4 Βασικά συστατικά αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	87
3.8.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	87
3.8.6 Φθορίζουσες χρωστικές.....	88
3.9 Συνθήκες εκτέλεσης Real-Time RCR.....	90
3.10 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης αποτελεσμάτων.....	91
4.Στατιστική επεξεργασία.....	92
III.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	93
5.1 Δημογραφικά στοιχεία και διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης.....	95
5.2 Σχετική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ολικό αίμα και ενδοκυττάρια έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	99
5.3 Εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ.....	102
5.4 Κορτιζόλη προλακτίνη και ACTH.....	104

5.5 Ενδοκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ.....	107
5.6 Ιντερλευκίνες ορού.	109
5.7 Ανάλυση συσχετίσεων.....	112
5.8 Θνητότητα.....	123
5.9 Προγνωστική αξία hGR.....	129
IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
6.1 Πρωτεϊνική και γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	135
6.2 Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ.....	137
6.3 Άξονας υποθαλάμιος-Υπόφυση-Επινεφρίδια.....	139
6.4 Περιορισμοί της μελέτης.....	141
7.Συμπέρασμα.....	142
8.Περίληψη.....	143
Βιβλιογραφία.....	146
Ξενογλώσσες Δημοσιεύσεις.....	157

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, με τα οποία η συνεργασία ήταν ένα από τα σημαντικότερα οφέλη της παρούσας Διατριβής. Η ευγένεια, η εργατικότητα και η απλότητα τόσο καταξιωμένων επιστημόνων ήταν κάτι που δεν μπορούσα να φανταστώ στα αρχικά μου βήματα στον χώρο της έρευνας. Τις περισσότερες φορές προσπαθούσαν περισσότερο από τους νέους ερευνητές, έθεταν συνεχώς νέους στόχους και είχαν μια ακόρεστη τάση για μάθηση, γεγονός που αποτελεί αναμφισβήτητο μάθημα ζωής για εμάς τους νεότερους.

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον **Καθηγητή κ. Γεώργιο Μπριασούλη**, ο οποίος ήταν επιβλέπων της Διατριβής και χωρίς την βοήθεια και την στήριξη του οποίου θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης προσπάθειας. Ανέλαβε το επίπονο έργο συντονισμού διαφορετικών ερευνητικών ομάδων από ποικίλα ερευνητικά κέντρα και με εμπιστεύτηκε από τα αρχικά στάδια.

Τον **Καθηγητή κ. Σεραφείμ Νανά**, που αποτελεί υπόδειγμα ήθους και μου παρείχε απλόχερα πολύτιμες συμβουλές, στήριξη και εμπιστοσύνη στο δύσκολο έργο ολοκλήρωσης της συγκεκριμένης διατριβής. Αφιέρωσε αναρίθμητες ώρες βοηθώντας την προσπάθειά μου και παρέχοντας καθοδήγηση και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Την **Καθηγήτρια κ. Ευαγγελία Χαρμανδάρη**, που βοήθησε στον σχεδιασμό της μελέτης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχοντας διεθνή καταξίωση και εμπειρία στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

Την **Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χριστίνα Ρούτση**, για την ουσιαστική συνεργασία και την αμέριστη συμπαράσταση της.

Την **Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ελένη Μάγειρα**, που βοήθησε σημαντικά στην επιλογή των ασθενών που εντάχθηκαν στην μελέτη και παρείχε σημαντική βοήθεια στην προετοιμασία των δημοσιεύσεων σχετικά με την διατριβή.

Την **κ. Αμαλία Σερτεδάκη** για την πολύτιμη βοήθεια στην μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και την στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής. Χωρίς την συνδρομή της θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση του συγκεκριμένου εγχειρήματος.

Την **κ. Αικατερίνη Ψαρά**, πρόεδρο της Ελληνικής Εταιρείας Κυτταρολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές και την βοήθεια στη κατανόηση των αρχών της Κυτταρομετρίας. Με φιλοξένησε στο εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Νοσοκομείου «ο Ευαγγελισμός» και στάθηκε πάντα στο πλευρό μου σε οποιαδήποτε δυσκολία ή προβληματισμό είχα.

Τους συναδέλφους, φίλους και συνεργάτες Ευφροσύνη Μπριασούλη και Άλκη Αποστόλου που καταβάλαμε παράλληλη προσπάθεια και μοιραστήκαμε προβληματισμούς, ανησυχίες και κοινούς στόχους.

Την **οικογένεια μου και την Μεταξία** που πάντα βρίσκονται στο πλευρό μου και συμπαραστέκονται διαρκώς με κατανόηση και αγάπη στην πολύ απαιτητική και πολύωρη εργασία μου.

Πάνω από όλους όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη. Σε μια από τις πιο δύσκολες περιόδους της ζωής τους συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση μιας επίπονης ερευνητικής προσπάθειας που πρωτίστως είχε ως επίκεντρο τον άνθρωπο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΟ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Βιογραφικό σημείωμα

Τόπος-Ημερομηνία Γέννησης:	Αθήνα, 29/03/1979
Οικογενειακή Κατάσταση :	Άγαμος
Διεύθυνση Κατοικίας:	Χρυσανθέμων 68 Ζωγράφου, Αθήνα
Τηλέφωνο:	6932655024, 2110181189
e-mail:	costas_vardas@yahoo.gr, cvardas@med.uoc.gr kvardas @med.uoa.gr
Δευτεροβάθμιες σπουδές	2 ^ο Γενικό Λύκειο Ζωγράφου. Απολυτήριο Λυκείου με βαθμό άριστα
Προπτυχιακές σπουδές (9/1997-7/2003)	Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Εισαγωγή με Πανελλήνιες εξετάσεις. Βαθμός αποφοίτησης: Λίαν Καλώς
Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος 23/10/2003	
Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης 23/7/13	Ελάχιστα επεμβατική Χειρουργική, Ρομποτική Χειρουργική και Τηλεχειρουργική Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Βαθμός αποφοίτησης: λίαν καλώς (8.24)

Προϋπηρεσία

7.2014-σήμερα	Επικουρικός Χειρουργός, Χειρουργική Κλινική ΓΝ Σητείας,
8.2013-7.2014	Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης Πανεπιστημίου Κρήτης Συμμετοχή σε πολυκεντρική κλινικο-εργαστηριακή μελέτη στα πλαίσια του προγράμματος ΘΑΛΗΣ
8.2012 -8.2013	Ειδικευμένος Χειρουργός Α΄ Χειρουργική Κλινική και Μονάδα Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» Διευθυντής: Σ. Δρακόπουλος
1.2007 -8.2012	Ειδικευόμενος Ιατρός Α΄ Χειρουργική Κλινική και Μονάδα Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»,
3.2004 – 8.2005	ΓΝ Σητείας – Κ.Υ Σητείας, Υπηρεσία Υπαίθρου.

Διακρίσεις εργασιών

Έπαινος στο 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, για την εργασία:

Νοσογόνος παχυσαρκία στην εφηβεία-συντηρητική ή χειρουργική αντιμετώπιση.

Μαρίνης Αθ, Παπαδημητρίου Γ, Βάρδας Κ, Κομεσίδου Βασιλική, Παπακωνσταντίνου Αλέξανδρος

Διακρίσεις εργασιών σχετικές με τη διδακτορική διατριβή

Πρώτο βραβείο εφαρμοσμένης έρευνας στο 40ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο για την εργασία με θέμα:

Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και διέγερση του άξονα κατά την πρόιμη σήψη.

Κ.Βάρδας, Κ.Αποστόλου, Κ Ψαρρά, Ε.Μπότουλα, Σ.Τσαγκαράκης, Ε.Μάγειρα, Χ. Ρούτση, Ε.Μπριασούλη, Δ.Γούκο, Σ.Νανάς, Γ.Μπριασούλης,

Αθήνα 14-17 Μαΐου 2014.

Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά σχετικές με τη διδακτορική διατριβή

1. Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality.

Vardas K, Iliia S, Sertedaki A, Charmandari E, Briassouli E, Goukos D, Apostolou K, Psarra K, Botoula E, Tsagarakis S, Magira E, Routsis C, Stratakis CA, Nanas S, Briassoulis G.

Intensive Care Med Exp. 2017 Dec;5(1):10. doi: 10.1186/s40635-017-0123-8 IF, under consideration

2. Early Response Roles for Prolactin, Cortisol and Circulating and Cellular levels of Heat Shock Proteins 72 and 90a in Severe Sepsis and SIRS.

Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, Goukos D, Psarra K, Botoula E, Tsagarakis S, Magira E, Routsis C, Nanas S, Briassoulis G. BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 803561. IF 2.13

3. Glutamine may repress the weak LPS and enhance the strong heat shock induction of monocyte and lymphocyte HSP72-proteins but may not modulate the HSP72-mRNA in patients with sepsis or trauma,

Briassouli E, Marianna Tzanoudaki, Christina Routsis, Serafim Nanas, **Konstantinos Vardas**, Kleovoulos Apostolou, Maria Kanariou, George Daikos, George Briassoulis, and Dimitrios Goukos

BioMed Research International 2015; 2015: 806042. IF 2.13

Δημοσιεύσεις περιλήψεων σε ξενόγλωσσα περιοδικά σχετικές με τη διδακτορική διατριβή

1. Heat shock protein 72 and 90 intracellular monocyte expression in patients with sepsis or sirs. preliminary data.

K.T, Apostolou, K Psara, E.Briassouli, **K.Vardas**, T.Tavladaki, E.Mageira, C.Routsis, S.Nanas, G.Briassoulis.

Intensive Care Medicine. Supplement 2, Volume 39, S240, October 2013.

2. Prolactin, cortisol and heat shock proteins in early sepsis: preliminary data.

K Vardas, K. Apostolou, K.Psarra, E.Botoula, S Tsagarakis, E Magira, C Routsis, E. Briassouli, D. Gukos, S. Nanas, G.Briassoulis.

Critical Care 2014,18(sup1): P234, doi:10.1186/cc13424.

3. Glutamine pretreatment may have a role in attenuating LPS or Heat Shock- induced lymphocyte HSP90a in severe sepsis.

E. Briassouli , M. Tzanoudaki, G.L. Daikos, **K. Vardas**, M. Kanariou, C. Routsis, S. Nanas, G. Briassoulis.

Pediatric Critical Care Medicine, May 2014, Vol15, issue4, sup, p136

4. Glutamine modulation of induced heat shock protein 72 differs in septic and healthy human blood mononuclear cells.

E. Briassouli, M. Tzanoudaki, G.L. Daikos, M. Kanariou, **K. Vardas**, C. Routsis, S. Nanas, G. Briassoulis.

Pediatric Critical Care Medicine, May 2014, Vol15, issue4, sup, p136

5. Modulatory effects of heat shock with or without glutamine compared to LPS on peripheral blood mononuclear cells heat-shock-protein 90α expression in severe sepsis and trauma

E Briassouli, M Tzanoudaki, G Daikos, K Vardas, M Kanariou, C Routsis, S Nanas, G Briassoulis

Intensive Care Medicine Experimental 2014, 2(Suppl 1):P14 (26 September 2014)

6. Induction and repression effects of heat shock (HS) and LPS and modulatory effects of glutamine on blood mononuclear cells -hsprotein-72 from icu patients with severe sepsis, trauma and healthy controls

E Briassouli, M Tzanoudaki, G Daikos, K Vardas, M Kanariou, C Routsis, S Nanas, G Briassoulis

Intensive Care Medicine Experimental 2014, 2(Suppl 1):P17 (26 September 2014)

7. Heat shock proteins and glucocorticoid receptor expression in early sepsis.

Konstantinos Vardas, Katherina Psarra, Kleovoulos Apostolou, Eirini Grigoriou, Eleni Magira, Christina Routsis, Efthimia

Botoula, Stylianos Tsagarakis, Efrossini Briassouli, Dimitrios Gukos, Alexandra Tsirogianni, Serafeim Nanas, George Briassoulis

Cytometry Part B: Clinical Cytometry Volume 86, Issue 6, page 370, November 2014

8. Glutamine Contrasting Effects on LPS or Heat Shock-Induced Monocyte or Lymphocyte-HSP90α in Patients with Severe Sepsis or Trauma

E. Briassouli, M. Tzanoudaki, G. Daikos, K. Vardas, M. Kanariou, C. Routsis, M. Nanas, S. Briassoulis

Clinical Nutrition, Volume 33, Supplement 1, September 2014, Pages S263

9. Glutamine May Alter the Weak LPS but not the Strong Heat Shock Intracellular HSP72 Induction in Critically Ill Patients

E. Briassouli, M. Tzanoudaki, G. Daikos, K. Vardas, M. Kanariou, C. Routsis, S. Nanas, G. Briassoulis

Clinical Nutrition, Volume 33, Supplement 1, September 2014, Pages S261

10. Early heat shock protein 72 and 90α intracellular and extracellular responses in patients with severe sepsis or systemic inflammatory response syndrome

K Apostolou, K Vardas, E Briassouli, K Psara, D Goukos, E Mageira, S Nanas, C Routsis, G Briassoulis

Critical Care 2015, 19 (Suppl 1):P41 (16 March 2015)

Ανακοινώσεις - περιλήψεις σε Ελληνικά συνέδρια σχετικές με τη διδακτορική διατριβή

1. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και διέγερση του άξονα κατά την πρώιμη σήψη.

Κ.Βάρδας, Κ.Αποστόλου, Κ Ψαρρά, Ε.Μπότουλα, Σ.Τσαγκαράκης, Ε.Μάγειρα, Χ. Ρούτση, Ε.Μπριασούλη, Δ.Γούκο, Σ.Νανάς,

Γ.Μπριασούλης,

40ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,

14-17 Μαΐου2014, Αθήνα

2. Η επίδραση της γλουταμίνης στην διέγερση της HSP90α με LPS ή θερμικό σοκ σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σοβαρή σήψη.

Ε. Μπριασούλη, Μ. Τζανουδάκη, Γ.Δαίκος, Κ.Βάρδας, Μ.Κανάριου, Χ.Ρούτση, Σ.Νανάς, Γ.Μπριασούλης.

40ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,

14-17 Μαΐου2014, Αθήνα

3.Η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας (HSP72) μονοπύρηννων κυττάρων περιφερικού αίματος σηπτικών ασθενών διεγείρεται με θερμικό σοκ αλλά καταστέλλεται με γλουταμίνη.

Ε. Μπριασούλη, Μ. Τζανουδάκη, Γ. Δαΐκος, Κ. Βάρδας, Μ. Κανάριου, Χ. Ρούτση, Σ. Νανάς, Γ. Μπριασούλης.
40ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,
14-17 Μαΐου 2014, Αθήνα

4. Ενδοκυττάρια και εξοκυττάρια έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins) σε ασθενείς με sirs και σοβαρή σήψη. Προκαταρκτικά δεδομένα.

Κ. Αποστόλου, Κ. Βάρδας, Ε. Μπριασούλη, Κ. Ψαρρά, Δ. Γούκος, Ε. Μάγειρα, Χ. Ρούτση, Σ. Νανάς, Γ. Μπριασούλης.
15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας
14-16 Νοεμβρίου 2014, Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα

Διεθνείς δημοσιεύσεις

1. Small bowel obstruction caused by inflammatory cytomegalovirus tumor in a renal transplant recipient: report of a rare case and review of the literature.

Papadimitriou G, Koukoulaki M, **Vardas K**, Florou E, Argyrakos T, Lakiotis G, Apostolou T, Drakopoulos S.
Transpl Infect Dis. 2012 Oct;14(5):E111-5.

2. Mixed large cell neuroendocrine carcinoma with squamous cell carcinoma of the rectum: report of a rare case and review of the literature.

Vardas K, Papadimitriou G, Chatziara M, Papakonstantinou A, Drakopoulos S.
International journal of Surgery Case Reports 4(2013)1076-1079.

3. Fournier's gangrene due to perioperative iatrogenic colon perforation in a renal transplant recipient: report of a rare case and review of the literature.

Papadimitriou G, Koukoulaki M, **Vardas K**, Grigorakis A, Vougas V, Drakopoulos S. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation (Accepted manuscript in Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation).

4. Presacral Ganglioneuroma: Diagnostic Considerations and Therapeutic strategy.

Vardas k, Manganas D, Papadimitriou G, Vougas V, Bakalis A, Chantziara M, Exarhos D, Drakopoulos S.
Case Reports in Oncology 2013;6:561-568.

5. Intestinal Neuronal Dysplasia type B in adults: a controversial entity.

Vasillis Vougas, **Konstantinos Vardas**, Christos Christou, Georgios Papadimitriou, Evangelia Florou, Christina Magkou, Dimitrios Karamanolis, Dimitrios Manganas, Spiros Drakopoulos.
Case Reports in Gastroenterology 2014; 8:7-12.

6. Laparoscopic adjustable gastric band: 4-years experience and learning curve.

G.Papadimitriou, **K.Vardas**, K.Alfaras, P.Alfaras
JSLS. 2015 Jan-Mar;19(1). pii: e2013.00363. doi: 10.4293/JSLS.2013.00363.

7. Splenic inflammatory pseudotumor like-follicular dendritic cells splenic tumor.

Vardas K, Manganas D, Papadimitriou G, Kalatzis V, Kyriakopoulos G Chantziara M, Exarhos D, Drakopoulos S.
Case Reports in Oncology 2014 Jun 27;(2):410-6

8. Emergency surgery for obstructing colorectal malignancy: prognostic and risk factors.

Papadimitriou G, Manganas D, Phedias Georgiades C, Vougas V, **Vardas K**, Drakopoulos S.
J BUON. 2015 Mar-Apr;20(2):406-12.

9. Esophageal perforation during laparoscopic adjustable gastric band: conversion to open sleeve gastrectomy and endoscopic stent placement.

Papadimitriou G, **Vardas K**, Kyriakopoulos G, Alfaras K, Alfaras P.

G Chir. 2015 Jan-Feb;36(2):70-3.

10. Parastomal evisceration as an extremely rare complication of a common procedure.

Lolis ED, Savvidou P, Vardas K, Loutseti D, Koutsoumpas V.

Ann R Coll Surg Engl. 2015 Aug 14:e1-e2.

Δημοσιεύσεις περιλήψεων σε διεθνή περιοδικά

1. Laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity: our early experience with a three -port approach.

V Drakopoulos, A Bakalis, D Lapatsanis, C Nikolaides, D.Konstantinou, K Vardas, N Roukounakis, D Manganas, V Vougas, S Drakopoulos

Obesity Surgery Vol 25, no 8, p1342-1342

2. How could female infertility be reduced after open IPAA.

T. Emmanouli, C. Christou, A. Chatziioannou, E. Falidas, C. Vardas, N. Kontoravdis, S. Baratsis

Journal of Crohn's & colitis, February 2015(S252), 1876-4479.

Ελληνικές δημοσιεύσεις

1. Η επίδραση της χειρουργικής αντιμετώπισης της νοσογόνου παχυσαρκίας στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών.

A.Μαρίνης, **Κ.Βάρδας**, Γ.Παπαδημητρίου, Β.Κομεσίδου, Α.Παπακωνσταντίνου

Χειρουργικά Χρονικά, 15:34-38,2010

2.Νοσογόνος παχυσαρκία στην εφηβεία.

A.Μαρίνης, Γ.Παπαδημητρίου, **Κ.Βάρδας**, Β.Κομεσίδου, Α.Παπακωνσταντίνου.

Χειρουργικά Χρονικά,15:29-33,2010

3. Η επίδραση της βαριατρικής χειρουργικής στον άξονα υπόφυσης- γονάδων.

A.Μαρίνης, Γ.Παπαδημητρίου, **Κ.Βάρδας**, Β.Κομεσίδου, Α.Παπακωνσταντίνου

Χειρουργικά Χρονικά, 15:39-43,2010

4. Η επίδραση της βαριατρικής χειρουργικής στα επίπεδα των ορμονών του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.

A.Μαρίνης, Γ.Παπαδημητρίου, **Κ.Βάρδας**, Β.Κομεσίδου, Α.Παπακωνσταντίνου.

Χειρουργικά Χρονικά, 15:25-28,2010

Μεταπτυχιακά Εκπαιδευτικά Προγράμματα-Διπλώματα

Διεθνή μετεκπαιδευτικά σεμινάρια

Ημερομηνίες	2009
Διοργάνωση	ATLS Meditteraneo Hospital Course- Αμερικανικό Κολλέγιο Χειρουργών
Τίτλος	Advanced Trauma Life Support (ATLS)
Ημερομηνίες	2011
Διοργάνωση	IRCARD University of Strasburg
Τίτλος	Certificate in training in minimal access surgery
Ημερομηνίες	2009
Διοργάνωση	Greek national faculty, Ρόδος
Τίτλος	Academy for infection management (A.I.M.)
Ημερομηνίες	25-27 Φεβ 2016
Διοργάνωση	Ελληνική Εταιρεία Χειρουργικής Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής- International Association for Trauma Surgery and Intensive Care
Τίτλος	Definitive Surgical Trauma Care Course (DSTC) <i>Completion of 20 hour practical course</i>

Ανακοινώσεις σε Ελληνικά συνέδρια

Συμμετείχα σε πενήντα συνολικά ελεύθερες και αναρτημένες ανακοινώσεις σε Ελληνικά συνέδρια.

Εκπαιδευτικό έργο

Διδασκαλία του μαθήματος <<Ανατομία και Ιστολογία του Ανθρώπου>> (εργαστήριο) στο ΑΤΕΙ Κρήτης, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, κατά το χειμερινό εξάμηνο του έτους 2015-2016.

Το μάθημα περιελάμβανε 4 ώρες υποχρεωτικού εργαστηρίου εβδομαδιαίως για τους φοιτητές του Α΄ εξαμήνου

Α΄ βοηθός για έξι μήνες κατά την διάρκεια της ειδικότητας όπου είχα την ευθύνη κατάρτισης προγράμματος εκπαίδευσης των νεότερων ειδικευομένων.

Συμμετοχή σε οργανωτικές επιτροπές

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής στην **1^η εκπαιδευτική διημερίδα ειλεοπρωκτικής αναστόμωσης με λήκυθο**, 20-21 Απριλίου 2007, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Πρόεδρος Σ. Μπαράτσης.

Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής του **17^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Μεταμοσχεύσεων**, 1-3 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας κυριότερων συντομογραφιών

APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
ACCP	American College of Chest Physicians
AP1	Activator protein-1
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CIRCI	Critical Illness Related Corticoid Insufficiency
CLRs	C-type lectin receptors
CD	Cluster of Differentiation
DAMP	Danger-associated molecular pattern molecules
eHSP	extracellular heat shock protein
FITC	Fluoroisothiocyanate
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
GR	Glucocorticoid receptor
GR α	Glucocorticoid receptor α -isoform
GRE	Glucocorticoid response element
GRP1	Glucocorticoid receptor interacting protein 1
nGRE	Negative glucocorticoid response elements
HMGB-1	High mobility group box 1 protein
HSP	Heat shock protein
IFN- γ	Interferon gamma
I κ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
LOS	Length of stay
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mHSP	monocyte-HSP
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
nHSP	neutrophil-HSP
NK	Natural killer cell
NK-kB	Nuclear Factor-kB
NLR	NOD-like receptor

PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern molecules
PE	Phycoerythrin
PTEFb	Positive transcription elongation factor b
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
RLRs	Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors
PRRs	Pattern-recognition receptors
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment
ROS	reactive oxygen species
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systematic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
STATs	Signal transducers and activators of transcription
TLR	Toll-like receptor
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein–inducing interferon-b
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
RIG	Retinoic acid-inducible gene
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1

1.Ορισμός σήψης και ιστορική αναδρομή

Η λέξη «σήψη» προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «σήψις» που αναφέρεται στην αποσύνθεση ζωικής, φυτικής ή οργανικής ύλης με την παρουσία βακτηρίων. Βλέπουμε, για πρώτη φορά τον όρο σήψη, στα ποιήματα του Ομήρου [1]. Ο Αριστοτέλης, ο Πλούταρχος και ο Γαληνός μετέπειτα, χρησιμοποίησαν τη λέξη σήψη με παρόμοια έννοια, ενώ ο Ιπποκράτης τον 4^ο αιώνα π.Χ, θεωρούσε τη σήψη ως την επικίνδυνη και δύσοσμη βιολογική φθορά, που θα μπορούσε να συμβεί στο σώμα [2]. Παρατηρούμε επομένως, ότι ο όρος «σήψη» χρησιμοποιείται πάνω από 2700 χρόνια και ο ακριβής ορισμός, η αιτιολογία και η ενδεικνυόμενη θεραπευτική προσέγγιση αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας ακόμα και σήμερα.

Στη σύγχρονη Ιατρική, ο Bone πρότεινε συγκεκριμένα κριτήρια επιλογής για τους ασθενείς με σύνδρομο σήψης, σε μια κλινική μελέτη για την χρήση της μεθυλ-πρεδνιζολόνης [3]. Τα κριτήρια αυτά, αποτέλεσαν τη βάση για ένα συλλογικό και αντικειμενικότερο ορισμό της σήψης το 1992, από την ένωση των Αμερικανού Κολλεγίου των Ιατρών Θώρακος (American College of Chest Physicians, ACCP) και των μελών της Society of Critical Care Medicine (SCCM) [4]. Σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε από την παραπάνω ομάδα εργασίας (Πίνακας 1), σήψη ορίζεται ως η παρουσία λοίμωξης σε συνδυασμό με την παρουσία συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης στον οργανισμό (Systematic Inflammatory Response Syndrome-SIRS), η οποία για λόγους απλότητας καθορίζονταν από τέσσερις μόνο μεταβλητές: θερμοκρασία, αναπνευστικό και καρδιακό ρυθμό και αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων. Επιπρόσθετα, η σοβαρή σήψη οριζόνταν ως σήψη με παρουσία ανεπάρκειας οργάνου και το σηπτικό σοκ ως σήψη με παρουσία υπότασης, μη ανταποκρινόμενης στην χορήγηση υγρών.

Πίνακας 1. **Διαγνωστικά κριτήρια SIRS, σήψης, σοβαρής σήψης (1992)**

SIRS	Δύο ή παραπάνω από τα ακόλουθα: Πυρετός (>38 ⁰ C) ή υποθερμία (<36 ⁰ C) Ταχυκαρδία (σφύξεις>90/λεπτό) Ταχύπνοια (αναπνευστικός ρυθμός>20/λεπτό ή PaCO ₂ <32 mm Hg) Λευκοκυττάρωση (>12.000 wbc's/mm ³) ή λευκοπενία (<4.000wbc's/mm ³) ή αύξηση των άωρων μορφών (10%)
Σήψη	SIRS και αποδεδειγμένη ή υποπτευόμενη λοίμωξη

Σοβαρή Σήψη -Σήψη με οργανική δυσλειτουργία

Αρκετά χρόνια, οι παραπάνω ορισμοί αποτέλεσαν την βάση κατηγοριοποίησης ασθενών σε πολλές κλινικές και εργαστηριακές μελέτες. Παρουσίαζαν όμως ορισμένες ελλείψεις, που αποτέλεσαν αντικείμενο κριτικής και δημιούργησαν την ανάγκη ακριβέστερου ορισμού των παραπάνω εννοιών, που έγινε το 2001. Τα κριτήρια αυτά όμως ήταν αρκετά εκτεταμένα, δύσκολα εφαρμόζονταν στην καθημερινή πρακτική και στην ουσία χρησιμοποιούσαμε ακόμα τους ορισμούς του 1991.

Η πρόοδος στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στη σήψη και η κλινική διαπίστωση ότι όλοι οι σηπτικοί ασθενείς δεν εμφανίζουν SIRS, οδήγησε στην ανάγκη να διατυπωθούν σύγχρονοι ορισμοί, που αντικατοπτρίζουν τις παραπάνω αλλαγές [5]. Σύμφωνα με τους τελευταίους ορισμούς του έτους 2016 (Πίνακας 2), ο όρος σοβαρή σήψη δεν χρησιμοποιείται πλέον, το SIRS έχει απομακρυνθεί ως κριτήριο για την διάγνωση της σήψης και εισάγεται ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο το qSOFA (Quick Sequential Organ Failure Assessment score) (Πίνακας 3) για να αναγνωρίσει ασθενείς με σήψη που είναι υψηλού κινδύνου [6]. Η σηπτική καταπληξία, η πιο σοβαρή μορφή σήψης, θεωρείται ως μια μορφή οξείας κυκλοφορικής ανεπάρκειας επακόλουθος της σήψης (Εικ. 1)

Η σήψη, ορίζεται ως απειλητική για τη ζωή οργανική δυσλειτουργία, που προκαλείται από απορρυθμισμένη απάντηση του ξενιστή στην λοίμωξη

- **Οργανική δυσλειτουργία ορίζεται ως οξεία αλλαγή στο ολικό SOFA σκορ ≥ 2 ως επακόλουθο της λοίμωξης.**

Το αρχικό SOFA σκορ θεωρείται μηδέν σε ασθενείς που δεν έχουν προδιαθεσικούς παράγοντες.

SOFA σκορ ≥ 2 αντικατοπτρίζει ένα ποσοστό θνητότητας περίπου 10% σε νοσηλευόμενους ασθενείς με υποπτευόμενη λοίμωξη.

- **Η σήψη, είναι απειλητική για την ζωή κατάσταση, που αναπτύσσεται όταν η αντίδραση του οργανισμού στην λοίμωξη τραυματίζει τους ίδιους τους ιστούς και όργανα.**

Ασθενείς με υποπτευόμενη λοίμωξη, που είναι πιθανό να έχουν παρατεταμένη νοσηλεία στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας ή ακόμα και να πεθάνουν, μπορούν να εκτιμηθούν με την χρήση του q SOFA.

- **Η σηπτική καταπληξία, αποτελεί υποσύνολο της σήψης, στην οποία οι κυκλοφορικές και κυτταρικές/μεταβολικές ανωμαλίες είναι τέτοιες που αυξάνουν σημαντικά τη θνητότητα.**
 - **Ασθενείς με σηπτική καταπληξία, μπορούν να αναγνωριστούν σε κλινικό επίπεδο από την παρουσία σήψης σε συνδυασμό με παρουσία εμμένουσας υπότασης που χρήζει χορήγησης αγγειοσυσπαστικών για να διατηρηθεί Μέση Αρτηριακή Πίεση ≥ 65 mmHg και έχοντας επίπεδα γαλακτικού οξέος ≥ 2 mmol/L (18 mg/dL), παρά την κατάλληλη αναζωογόνηση με υγρά.**
- Με αυτά τα κριτήρια, η νοσοκομειακή θνητότητα υπερβαίνει το 40%.**

Το προγνωστικό σκορ *Quick Sequential Organ Failure Assessment score*

(*qSOFA*)[5] [6]

Υπόταση : Συστολική Αρτηριακή Πίεση < 100 mmHg

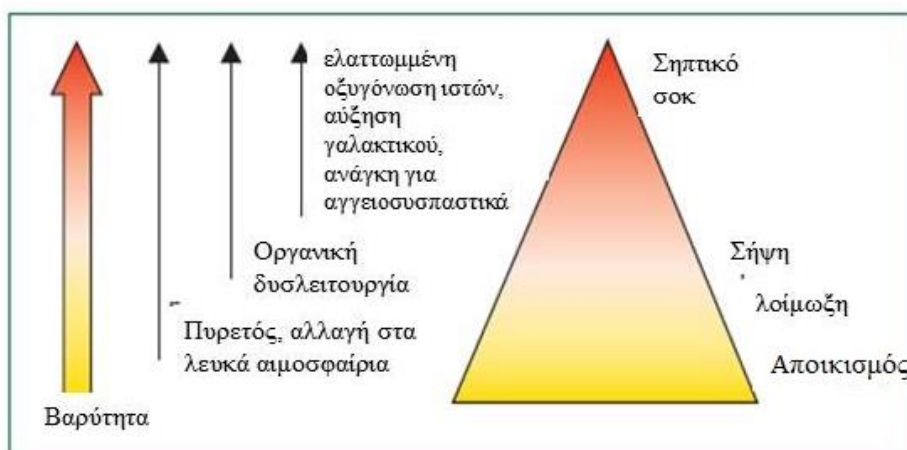
Διαταραγμένο επίπεδο συνείδησης

Ταχύπνοια: αναπνευστικός ρυθμός >22 αναπνοές το λεπτό

Η ύπαρξη > 2 από τα παραπάνω κριτήρια σχετίζεται με φτωχότερη πρόγνωση

Πίνακας 3.

Εικόνα 1. Κλινικά σημεία που συνδέονται με τα διάφορα στάδια της λοίμωξης



2. Επιδημιολογικά δεδομένα

Η σήψη αποτελεί κλινικό σύνδρομο και είναι η συχνότερη αιτία θανάτου νοσηλευομένων ασθενών τον 21^ο αιώνα. Ευθύνεται για περισσότερους από 200.000 θανάτους ετησίως στις Η.Π.Α και η συχνότητα της σοβαρής σήψης υπολογίζεται σε 300 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού [7]. Μελέτες σε Ευρωπαϊκές χώρες αναφέρουν λίγο χαμηλότερα ποσοστά συχνότητας σοβαρής σήψης σε σχέση με τις Η.Π.Α, με τη συχνότητα να κυμαίνεται από 38 έως 110 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού [8],[9],[10], [11].

Η θνητότητα, κατά την διάρκεια της νοσηλείας ασθενών με σοβαρή σήψη, ανέρχεται σε 25% με το ποσοστό αυτό να φτάνει το 50% σε περιπτώσεις σηπτικού σοκ [12].

Τα gram αρνητικά βακτήρια αποτελούν την πιο συχνή αιτία στις ημέρες μας, ακολουθούν τα gram θετικά, ενώ παράλληλα διαπιστώνεται μια αύξηση της μυκητιασικής αιτιολογίας σήψης σε σχέση με το παρελθόν [13]. Η πνευμονία αναγνωρίζεται ως συχνότερη αιτία σήψης, ακολουθούμενη από ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και λοιμώξεις του ουροποιητικού, στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες [14],[15],[11]. Η εστία της λοίμωξης φαίνεται να σχετίζεται με την πρόγνωση. Ο staphylococcus aureus και ο streptococcus pneumoniae είναι τα πιο συχνά gram θετικά βακτήρια που απομονώνονται από καλλιέργειες, ενώ η Escherichia coli και η Klebsiella τα πιο συχνά gram αρνητικά [7],[13]. Στο 1/3 των περιπτώσεων δεν απομονώνεται συγκεκριμένο παθογόνο σε καλλιέργειες αίματος [16]. Δεν έχει βρεθεί διαφορά στη διάρκεια νοσηλείας και στην πρόγνωση σηπτικών ασθενών με θετικές καλλιέργειες αίματος σε σχέση με ασθενείς στους οποίους δεν απομονώθηκε συγκεκριμένο παθογόνο [17].

Αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σήψης παρατηρείται στα βρέφη, μειώνεται στην διάρκεια της παιδικής ηλικίας και εμφανίζεται εκ νέου σε ηλικίες άνω των 60 ετών [8]. Το ανδρικό φύλο έχει συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης σήψης [13],[11],[18]

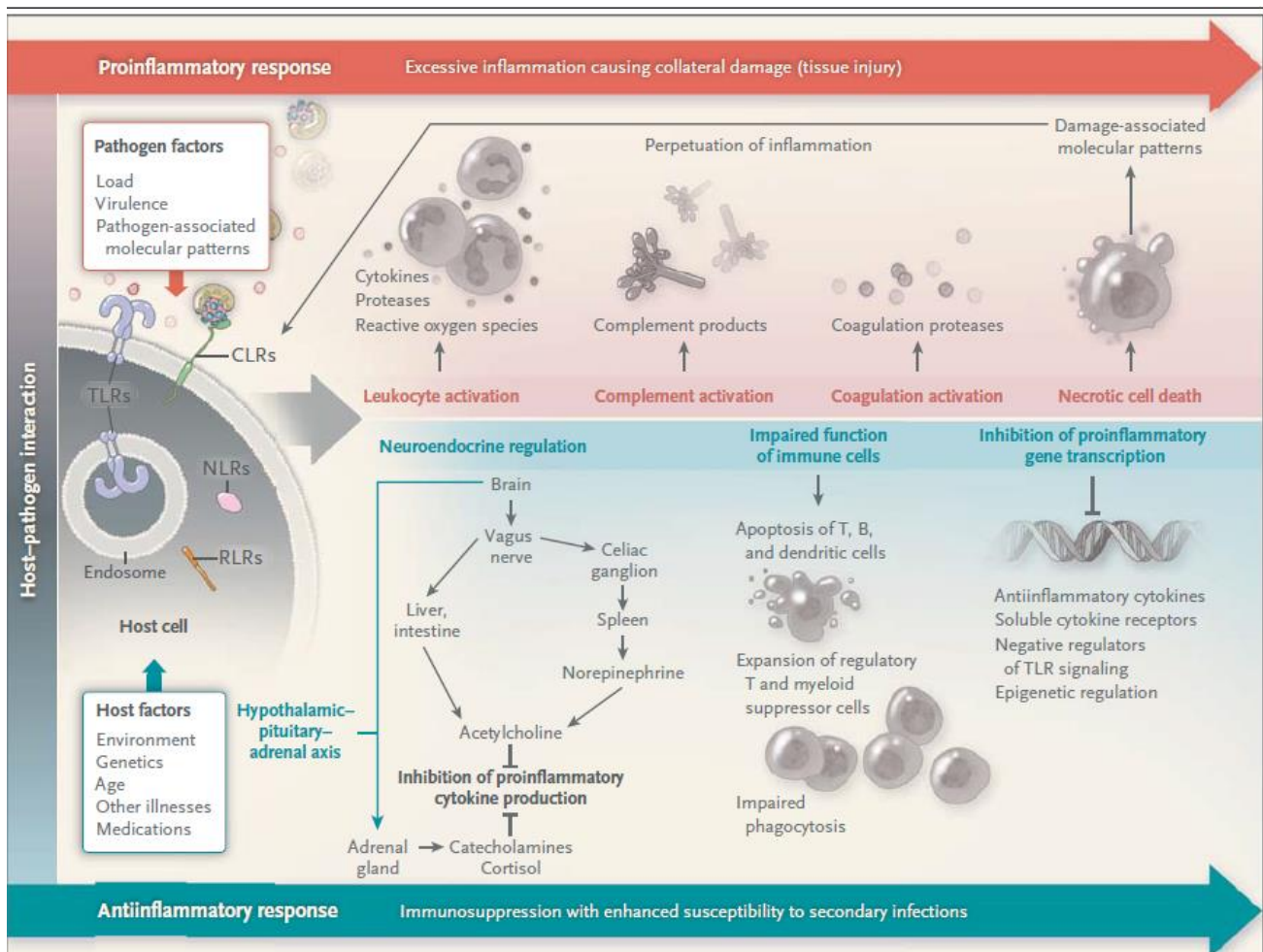
Παρά την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης σοβαρής σήψης, η θνητότητα ανά περίπτωση (case fatality rate) παρουσιάζει μείωση με την πάροδο των ετών, απόρροια της εκτεταμένης έρευνας στην παθοφυσιολογία και τη θεραπευτική προσέγγιση της σήψης [19]. Οι επιζώντες όμως, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου την επόμενη πενταετία σε συνδυασμό με μείωση της γνωστικής λειτουργίας και την παρουσία κινητικών διαταραχών [20] [21].

3. Παθοφυσιολογία φλεγμονώδους αντίδρασης-σήψης

Υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον στην προσπάθεια κατανόησης των πολύπλοκων και δυναμικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών που σχετίζονται με το κλινικό σύνδρομο της σήψης. Η σήψη φαίνεται να αναπτύσσεται όταν η αρχική αντίδραση στην λοίμωξη ενισχύεται και μετά απορρυθμίζεται, οδηγώντας σε ανισορροπία φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών [22] [Εικόνα2]. Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα, που σε αντίθεση με το επίκτητο έχει τη δυνατότητα να αντιδρά άμεσα σε παθογόνα, θεωρείται ότι διαδραματίζει κύριο ρόλο στην παθογένεσή της.

Το αρχικό στάδιο της αντίδρασης σε παθογόνο περιλαμβάνει την μετακίνηση, διαμέσου του ενδοθηλίου στο σημείο της φλεγμονής, κυττάρων του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος (κυρίως ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων). Τα κύτταρα αυτά, αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα, που αποκαλούνται PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns). Εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χυμοκίνες και ROS (reactive oxygen species), μέσω ενεργοποίησης των TLRs και του μονοπατιού NFκB, τα οποία είναι σημαντικά για την αντιμετώπιση του μικροβιακού παράγοντα [23]. Προκαλούν όμως παράλληλα κυτταρική καταστροφή, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την επακόλουθη οργανική βλάβη [24]. Σημαντικός είναι ο ρόλος πρωτεϊνών οξείας φάσης και του συμπληρώματος. Σε αυτό το στάδιο, έχουμε την μετάδοση κατάλληλων σημάτων σε κύτταρα του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος, με σκοπό την εξάλειψη των παθογόνων. Ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, επιταχύνουν την ωρίμανση, μετακίνηση και ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα και τα οποία με την σειρά τους παράγουν INF-γ [25] [26]. Αν δεν αντιμετωπιστεί στο σωστό χρόνο το παθογόνο, η σήψη μεταπίπτει στο αντιφλεγμονώδες ή ανοσοκατασταλτικό στάδιο.

Αποτελούσε επί χρόνια εδραιωμένη αντίληψη ότι η σήψη ήταν το αποτέλεσμα υπερβολικής αντίδρασης του οργανισμού στην είσοδο κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού, με υπερπαραγωγή και συστηματική απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο TNFα και η ιντερλευκίνη 1 [21]. Η υπόθεση ότι η υπερβολική αντίδραση με την ανεξέλεγκτη παραγωγή μεσολαβητών είναι η κύρια αιτία για την δυσμενή έκβαση των σηπτικών ασθενών, έχει αναθεωρηθεί στις ημέρες μας. Η αντίδραση του ξενιστή στην σήψη, περιλαμβάνει πολλές, ταυτόχρονες και μεταγενέστερες διαδικασίες που δεν σχετίζονται μόνο με ανεξέλεγκτη φλεγμονή αλλά και με ανοσοκαταστολή [22]. Η πρώιμη φάση, χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και υπερέκκριση κυτταροκινών, ενώ η όψιμη από ανοσοκαταστολή, αυξημένο κίνδυνο δευτεροπαθών λοιμώξεων και αυξημένη θνητότητα [22], [23][Εικόνα3]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια δεύτερη θεωρία, αυτή της συνύπαρξης και επικάλυψης της φλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής φάσης [24].



Εικόνα 2. Η αντίδραση του ξενιστή στην είσοδο παθογόνου περιλαμβάνει τόσο φλεγμονώδεις όσο και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις.

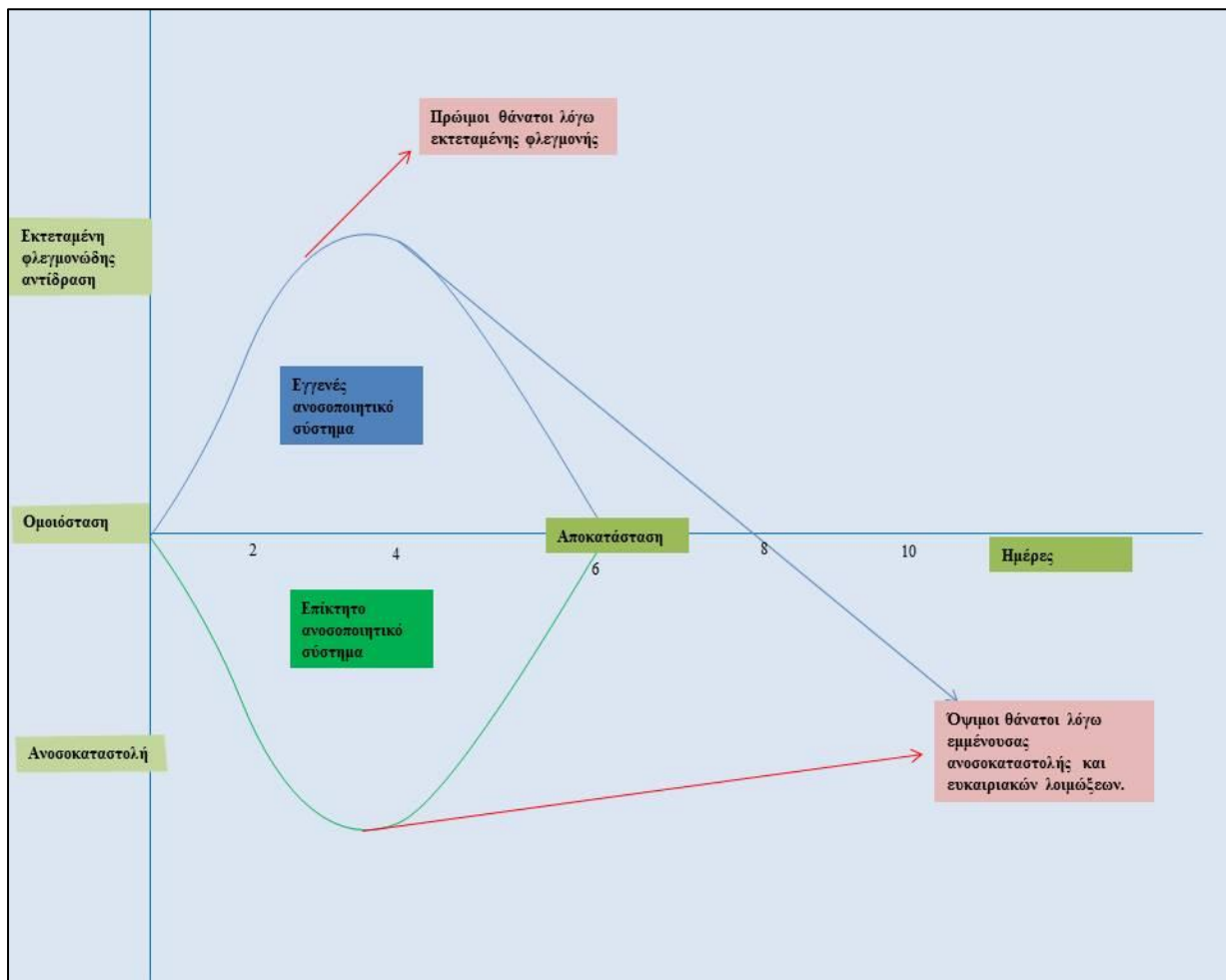
Στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης συμμετέχουν οι TLRs και τα DAMPs. Ξεκινούν ένα καταρράκτη πολύπλοκων κυτταρικών διαδικασιών που περιλαμβάνει: φαγοκύττωση μικροβίων, απελευθέρωση μεσολαβητών, ενεργοποίηση του συμπληρώματος και του καταρράκτη της πήξης και απελευθέρωση κυτταροκινών.

Η αντι-φλεγμονώδης δράση περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με τον άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια, την αυξημένη απόπτωση λεμφοκυττάρων και την αυξημένη έκφραση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών.

Η ανισορροπία στις δύο αυτές αντιδράσεις μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη φλεγμονή και κυτταρική καταστροφή (φλεγμονώδης αντίδραση) ή ανοσοκαταστολή (επικράτηση αντι-φλεγμονώδους αντίδρασης).

TLR: Toll-like receptor, DAMP: Danger-associated molecular pattern molecules, CLRs: C-type lectin receptors, NLRs: NOD-like receptors, RLRs: Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors

Τροποποιημένο από Angus[27].



Εικόνα 3. Αλληλουχία ενεργοποίησης εγγενούς και επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος.

Μια θεωρία υποστηρίζει (επάνω σχήμα) ότι η ενεργοποίηση φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών συμβαίνουν πρώιμα μετά την εμφάνιση σήψης. Κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα, απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες φλεγμονωδών μεσολαβητών (3 πρώτες ημέρες). Πρώιμοι θάνατοι στη σήψη (κόκκινη γραμμή - 3η ημέρα οφείλονται σε υπέρμετρα φλεγμονώδη αντίδραση. Όψιμοι θάνατοι παρατηρούνται λόγω ανοσοκαταστολής.

Μια δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι παρατηρείται πρώιμη ενεργοποίηση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος και καταστολή της επίκτητης ανοσίας.

Τροποποιημένο από Hothkiss [28]

3.1 Επίδραση της σήψης στο ανοσοποιητικό σύστημα.

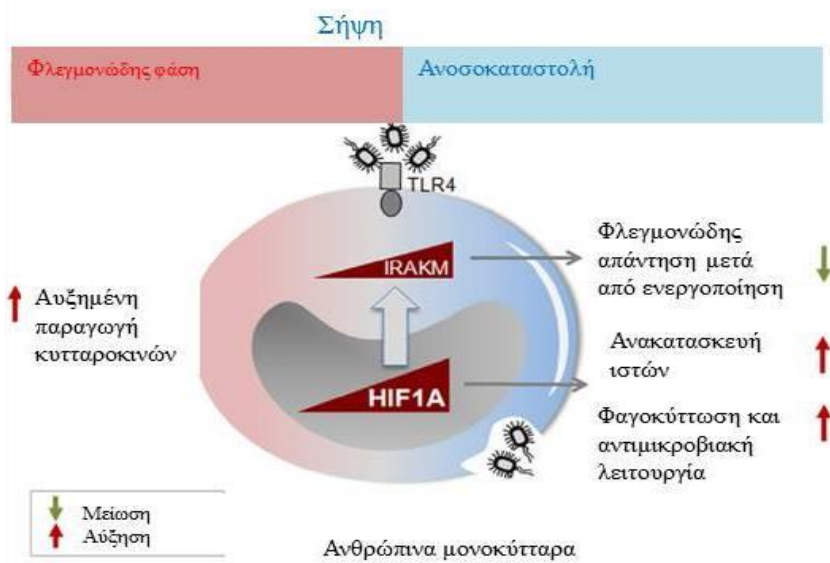
Η σήψη επηρεάζει όλα σχεδόν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρακάτω, περιγράφονται οι κυριότερες επιδράσεις ανά κυτταρικό τύπο.

3.1.1 Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα, είναι κύτταρα με πολυ-λοβωτό πυρήνα, τα οποία συντίθενται στον μυελό των οστών και απελευθερώνονται σε ώριμη μορφή στο περιφερικό αίμα. Η παρουσία των ουδετεροφίλων στο σημείο της φλεγμονής, είναι απαραίτητη στην αντιμετώπιση παθογόνων και την αποφυγή συστηματικής διασποράς της φλεγμονής [29]. Μειωμένη μετανάστευση των ουδετεροφίλων στα σημεία της φλεγμονής παρατηρείται σε πειραματικά μοντέλα σήψης [30] [31]. Έχει επίσης παρατηρηθεί, αυξημένη αναλογία ανώριμων σε σχέση με λειτουργικά ουδετερόφιλα [32] και μείωση της λειτουργικής τους ικανότητας που σχετίζεται με τα επίπεδα ROS και NO [33]. Κατά τη διάρκεια σήψης, η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση του οργανισμού οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων, τα οποία συγκεντρώνονται στον αυλό των τριχοειδών, τον αποφράσσουν και προκαλούν ισχαιμία. Επιπρόσθετα, τα ουδετερόφιλα μπορούν να μεταναστεύσουν σε ζωτικά όργανα, εκκρίνοντας φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λυτικούς παράγοντες, οδηγώντας σε οργανική βλάβη [34].

3.1.2 Μονοκύτταρα.

Τα μονοκύτταρα, αποτελούν το 5% περίπου των λευκοκυττάρων του ανθρώπινου αίματος [35]. Έχουν διακριτά χαρακτηριστικά, τόσο σε σχέση με τα πολυμορφοπύρηνα και τα κύτταρα NK, που επίσης αποτελούν μέρος του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και σε σχέση με τα Β και Τ-λεμφοκύτταρα που απαρτίζουν το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα [35]. Τα μονοκύτταρα βρίσκονται στην κυκλοφορία για αρκετές ημέρες, προτού μεταφερθούν στους ιστούς και ωριμάσουν σε ώριμα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην εγγενή και επίκτητη ανοσία [36]. Απαρτίζουν μαζί με τα λεμφοκύτταρα τα περιφερικά μονοπύρηνα αίματος και παρουσιάζουν σε σηπτικούς ασθενείς ελαττωμένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση [37]. Μελέτες σηπτικών μονοκυττάρων σε αρχική φάση σήψης, σε σχέση με μονοκύτταρα σηπτικών ασθενών που βρίσκονται σε φάση ανάρρωσης, ανέδειξαν ότι παρατηρείται αύξηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, χυμοκίνες και μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ μείωση των γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολικές διαδικασίες [38].



Εικόνα 4. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα υφίστανται αλλαγή στη λειτουργία και τον φαινότυπο και μεταπίπτουν από φλεγμονώδη σε ανοσοκατασταλτική κατάσταση στη σήψη. Ο παράγοντας HIF1A διαδραματίζει σημαντικό ρόλο

HIF1A :hypoxia-inducible factor-1α

IRAKM: Interleukin Receptor Associated Kinase (IRAK)-M

Τροποποιημένο από Shalova[38]

Καλλιέργειες από τα υπερκείμενα των μονοκυττάρων, επιβεβαίωσαν την αύξηση των ιντερλευκινών IL-1α, IL-6 και IL-10, ενώ αντιθέτως παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή κυτταροκινών σε σηπτικά μονοκύτταρα που διεγέρθηκαν με LPS [38]. Σημαντικό στοιχείο είναι ότι υφίστανται αλλαγή στην λειτουργία και τον φαινότυπο, συμμετέχοντας τόσο στην φλεγμονώδη, όσο και την ανοσοκατασταλτική φάση της σήψης [Εικόνα4].

3.1.3 Λεμφοκύτταρα

Μελέτες ασθενών με σηπτική καταπληξία, αναδεικνύουν ότι παρατηρείται αύξηση της απόπτωσης των CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων και των CD19+ B κυττάρων [39]. Εμμένουσα λεμφοπενία συσχετίζεται με τη θνητότητα [40] όπως και με την παρουσία υποθερμίας, τις πρώτες 24 ώρες από τη διάγνωση της σήψης [41]. Παρατηρείται επίσης, αύξηση των CD4+CD25+ ρυθμιστικών T κυττάρων (reg T cells) και η αύξηση αυτή συσχετίζεται με την προκαλούμενη ανοσοπαράλυση [42]. Τα ρυθμιστικά T κύτταρα αναστέλλουν τις δράσεις των CD4+ T ,CD8+ T , NK κυττάρων όπως και των δενδριτικών και B κυττάρων. Πρόσφατη μελέτη, συσχετίζει την παρουσία αυξημένων επιπέδων CD39+ T ρυθμιστικών κυττάρων με μειωμένη πρόγνωση σε σηπτικούς ασθενείς [43].

3.1.4 NK κύτταρα (Natural Killer Cells)

Ο ρόλος των NK κυττάρων αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια και η ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί με τη θνητότητα ασθενών με σήψη [44]. Τα NK κύτταρα συμμετέχουν στην κυτταρική ανοσία, μέσω της άμεσης αναγνώρισης παθογόνων από Toll-Like Receptors και της δυνατότητας αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος [45].

3.2 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS)

Η φλεγμονώδης απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην αιτία που προκαλεί κυτταρική βλάβη (μικροοργανισμοί, τοξίνες, αντιγόνα) ή στις συνέπειές της (κατεστραμμένοι ιστοί, νεκρωμένα κύτταρα) συνιστά μια πολύπλοκη προστατευτική διαδικασία, που χαρακτηρίζεται από την συμμετοχή του εγγενούς και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος.

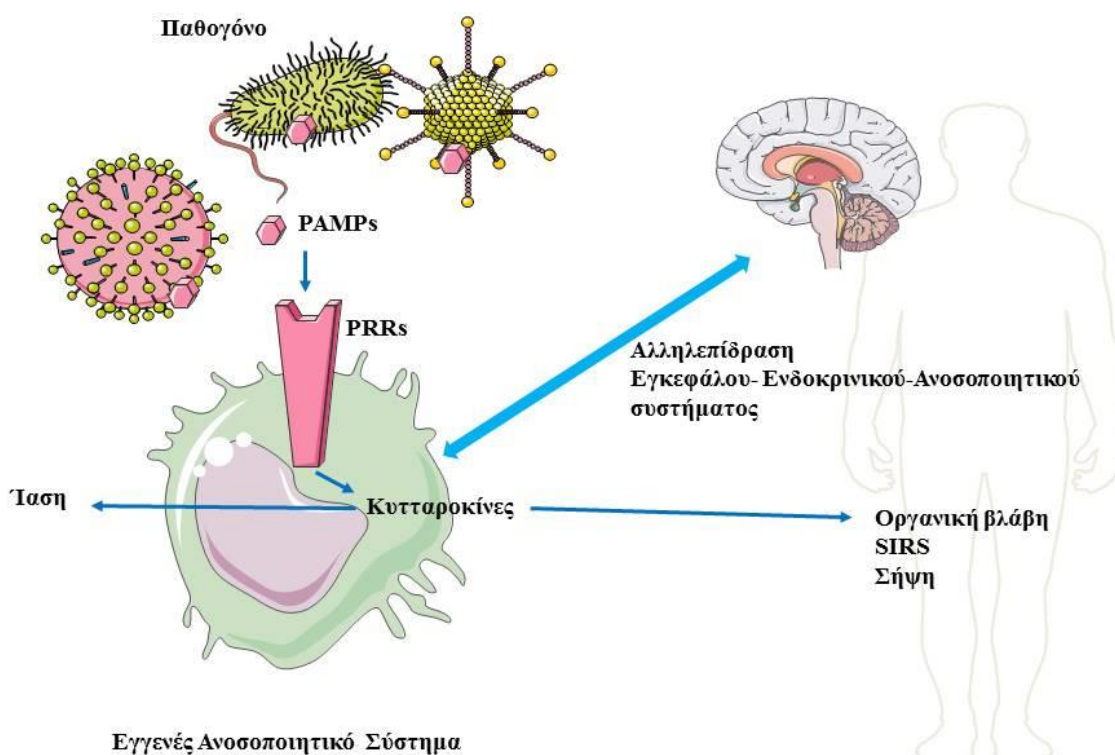
Η ενεργοποίηση του **εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος**, που περιλαμβάνει λευκοκύτταρα (όπως μονοκύτταρα-μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), αιμοπετάλια, δενδριτικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, αποτελεί το πρώτο βήμα στην έναρξη της φλεγμονώδους απάντησης [46]. Αποτελεί δηλαδή τον κύριο παράγοντα που συνεισφέρει στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού, που επάγεται τόσο από την είσοδο κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού, όσο και από κατεστραμμένους ιστούς.

Το εγγενές και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα διαφέρουν στον τύπο των υποδοχέων που χρησιμοποιούν για να αναγνωρίσουν τα παθογόνα. Η **επίκτητη ανοσία** επάγεται κυρίως από δύο τύπος αντιγονικών υποδοχέων, τους υποδοχείς των T και B λεμφοκυττάρων. Ο μηχανισμός με τον οποίο κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζουν και αντιδρούν σε μικροβιακά ερεθίσματα περιλαμβάνει γενετικά κωδικοποιημένους ειδικούς υποδοχείς, τους **PRRs (pattern recognition receptors)**, που ανιχνεύουν την παρουσία μικροβίων μέσω καλά διατηρημένων δομών μεταξύ των μικροβιακών ειδών και ονομάζονται **PAMPs (pathogen associated molecular patterns)** [1].

Βασικό χαρακτηριστικό της αναγνώρισης παθογόνων μέσω PRRs είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος δεν διακρίνουν μεταξύ παθογόνων και μη μικροοργανισμών καθώς τα σημεία πρόσδεσης στους υποδοχείς δεν είναι ειδικά. Επιπλέον, οι υποδοχείς αυτοί έχουν μειωμένη ειδικότητα και μπορούν να προσδεθούν με ένα αρκετά ευρύ πεδίο παθογόνων που έχουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο [47]. Οι PRRs χωρίζονται σε δυο κύριες ομάδες. Η πρώτη, περιλαμβάνει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι υποδοχείς Toll-like receptors (TLRs) και

οι υποδοχείς C-type lectin receptors (CLRs) [48]. Η δεύτερη ομάδα, περιλαμβάνει κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως οι NOD-like receptors (NLRs), Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs), pyrin and HIN domain-containing (PYHIN) family receptors [48] [49]. Οι περισσότεροι PRRs δρουν μέσω καλά διατηρημένων μονοπατιών σηματοδότες όπως το μονοπάτι NF- κ B και AP-1[49].

Βακτήρια, μύκητες και ιοί μπορούν να ενεργοποιήσουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα μέσω των PAMPs. Βακτηριακές PAMPs, περιλαμβάνουν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως λιποπολυσακχαρίτες [50], γλυκοπρωτεΐνες [51] και λιποπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος. Στους μύκητες, η β - γλυκάνη έχει βρεθεί ότι αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα [52]. Σε λοίμωξη από ιούς, ιικό DNA ή RNA ενεργοποιεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα με παρόμοιο τρόπο μέσω ειδικών υποδοχέων με επακόλουθο την παραγωγή ιντερφερόνης α [53].



Εικόνα 5. Η αλληλεπίδραση των PAMPs με τους PRRs των κυττάρων του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας πολύπλοκης διαδικασίας, που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανοσοποιητικού και ενδοκρινικού συστήματος, με τη συμμετοχή του εγκεφάλου. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει είτε σε αντιμετώπιση του μικροβιακού παράγοντα, είτε σε συστηματική φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού και οργανική βλάβη. PAMPs : pathogen associated molecular patterns, PRRs: pattern recognition receptors

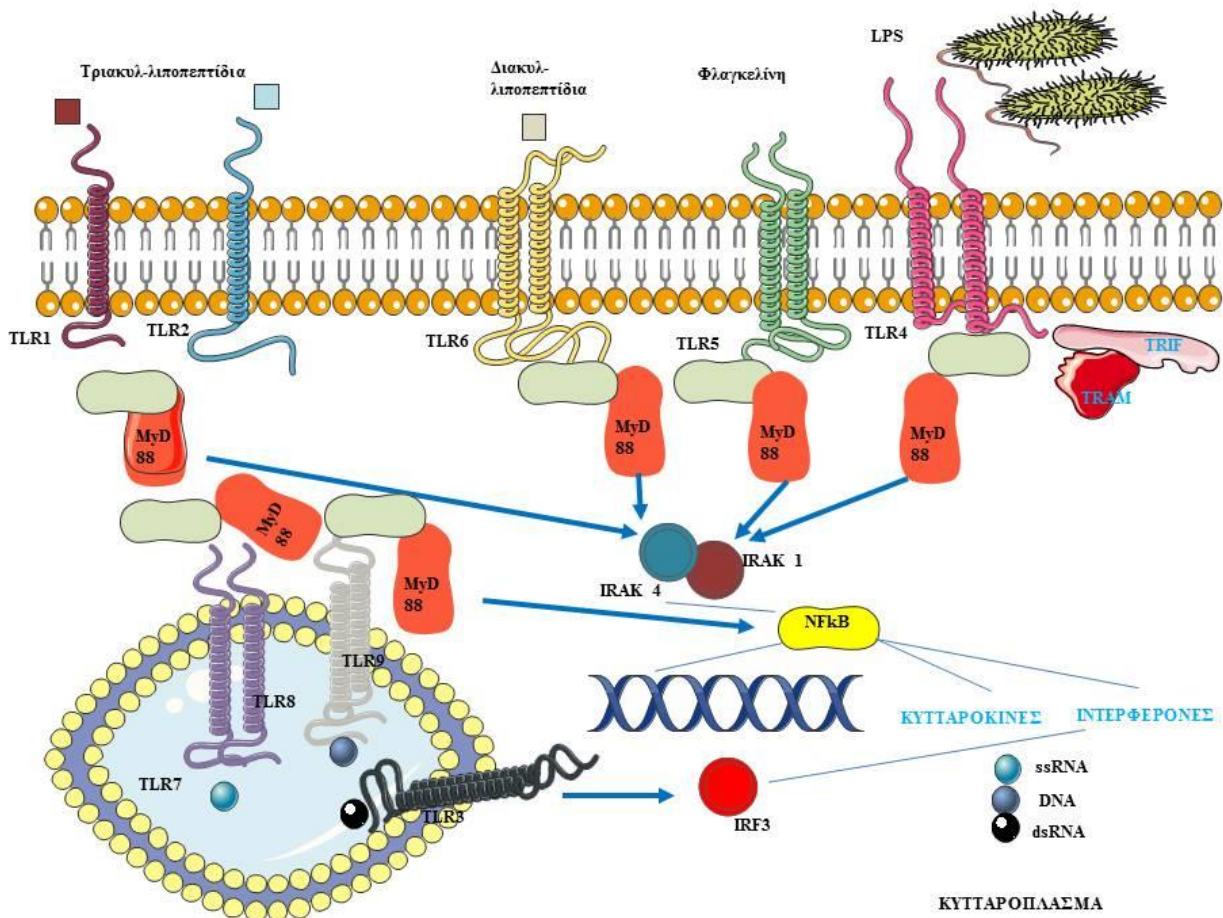
3.3 Toll-Like Receptors (TLRs)

Οι TLRs, είναι οι περισσότερο μελετημένοι υποδοχείς από το σύνολο των PAMPs και έχουν βρεθεί 10 διαφορετικά είδη στον άνθρωπο. Εκφράζονται σε διαφορετικές περιοχές του κυττάρου και σε μια ποικιλία κυττάρων του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος. Ειδικότερα, οι TLR1 TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 εκφράζονται κυρίως στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ οι TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 εδράζονται σε ενδοκυττάρια κενοτόπια, στα ριβοσώματα, λυσοσωμάτια και ενδολυσοσωμάτια και κυρίως αναγνωρίζουν το νουκλεϊκό οξύ [49].

Χαρακτηριστικό της δομής όλων των TLRs, είναι η παρουσία μιας κοινής ενδοκυττάριας περιοχής μετάδοσης σήματος, η TIR (Toll/IL-1 receptor) περιοχή, που είναι απαραίτητη για την μετάδοση σήματος στον πυρήνα και η παρουσία μιας εξωκυττάριας περιοχής πλούσιας σε λευκίνη, που βοηθά την ένωση με τον κατάλληλο προσδέτη [54]. Η ικανότητα διμερισμού των TLRs σε διάφορους συνδυασμούς αυξάνει την δυνατότητα πρόσδεσης με ποικίλες δομές [55].

Οι TLRs είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στην αναγνώριση ενδογενών και εξωγενών σημάτων κινδύνου βοηθώντας στην επίτευξη ομοιόστασης [Εικ.6]. Η σύνδεση με τους κατάλληλους προσδέτες, οδηγεί στην ταχεία ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης, όπως αυτά που επάγονται από τα MAPK, NF-κβ και IFN, με αποτέλεσμα την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξειάς φάσης και αντιμικροβιακών πεπτιδίων [56]. Δυσλειτουργία των υποδοχέων έχει συσχετιστεί με ανεξέλεγκτη παραγωγή κυτταροκινών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σήψης. Πειραματικές εργασίες σε ποντίκια [57] έχουν δείξει ότι η καταστολή των μονοπατιών TLR μέσω της χορήγησης εξωγενών αναστολέων ή αντισωμάτων έναντι των TLRs οδηγεί σε μείωση της παραγωγής κυτταροκινών και σχετίζεται άμεσα με την επιβίωση των κυττάρων στόχων [58].

Ανθρώπινες μελέτες, έχουν συνδέσει την ύπαρξη πολυμορφισμών στην δομή των TLRs με αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις [37]. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον στο πεδίο της σήψης με χορήγηση αγωνιστών και ανταγωνιστών των TLRs [38] [39].



Εικόνα 6.

Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα βασίζεται στην αναγνώριση, καλά διατηρημένων εξελικτικά, μικροβιακών δομών (PAMPs) από τους TLRs.

Η πρόσδεση του παθογόνου στον κατάλληλο υποδοχέα TLR ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης MyD88, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB, μέσω φωσφορύλιωσης από κατάλληλες κινάσες. Ακολουθεί η μετακίνηση του στον πυρήνα και η δέσμευση σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων στόχων, με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στην τροποποίηση της έκφρασης πρωτεϊνών οξείας φάσης, κυτταροκινών (TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1B, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- β) χυμοκινών, ενζύμων και παραγόντων πήξης.

Οι TLR-4 βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και αντιδρούν στην LPS των gram- βακτηρίων. Οι TLR-7 αντιδρούν σε ssRNA και οι TLR-3 σε dsRNA και εδράζονται σε ενδοσώματα.

MyD88: myeloid differentiation primary response protein 88,

TRIF: TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon- β

3.4 Damage-Associated-Molecular Patterns (DAMPs)

Στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας, ο Mantziger πρότεινε τη “θεωρία κινδύνου”, σύμφωνα με την οποία ενδοκυττάρια μόρια που απελευθερώνονται από κατεστραμμένους ιστούς, έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιούν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα [59]. Τα μόρια αυτά, μπορούν να ενεργοποιήσουν μονοπάτια σηματοδότησης παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στην ενεργοποίηση των PAMPs. Ενεργοποιούν έτσι παρόμοια ανοσολογικά απάντηση χωρίς την παρουσία λοίμωξης. Σύμφωνα με την παραπάνω θεωρία, βασικός ρόλος του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος είναι να αντιδρά στον κίνδυνο που προσπαθεί να διαταράξει την ομοιόσταση του οργανισμού και η απάντηση είναι παρόμοια, είτε πρόκειται για εξωγενείς μικροβιακούς παράγοντες είτε για ενδογενή σήματα κινδύνου.

Τα ενδογενή αυτά σήματα κινδύνου ονομάζονται DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων heat shock proteins, HMGB-1, οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και ATP. Πρόκειται για ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο χώρο, δεσμεύονται και ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εκφράζουν PRRs [60]. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι μιτοχονδριακό DNA, που απελευθερώνεται μετά από κυτταρική βλάβη, οδηγεί επίσης σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και σε μια αντίδραση του οργανισμού που μιμείται τον μηχανισμό της σήψης [61]. Η χρήση κοινών μονοπατιών από τους DAMPs και τους PAMPs μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα η σήψη και το SIRS να ενεργοποιούν υποδοχείς που οδηγούν σε κοινό ανοσολογικό αποτέλεσμα [62] και κοινή έκβαση [63].

3.5 Κυτταροκίνες

Βασικό ρόλο στην αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν στη συστηματική απάντηση του οργανισμού στο τραύμα και τη σήψη διαδραματίζουν οι κυτταροκίνες. Διακρίνουμε δύο είδη κυτταροκινών. Τις **φλεγμονώδεις** κυτταροκίνες, που διεγείρουν την συστηματική απάντηση του οργανισμού σε φλεγμονή, και τις **αντιφλεγμονώδεις**, που αναστέλλουν την φλεγμονή και βοηθούν στην επίτευξη της ομοιόστασης [64].

Οι κυτταροκίνες παράγονται από λευκοκύτταρα, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα [64]. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες διεγείρουν τα μακροφάγα και τα μεσεγχυματικά κύτταρα, (επιθηλιακά, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες) και έτσι αυξάνουν την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης και άλλων κυτταροκινών και προσελκύουν φλεγμονώδη κύτταρα [65]. Οι κύριες

φλεγμονώδεις κυτταροκίνες περιλαμβάνουν τις IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ . Οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, περιλαμβάνουν ένα ετερογενές σύνολο ρυθμιστικών μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταξύ των οποίων και την IL-10, που στοχεύουν στο να περιορίσουν την υπερβολικά φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού [65].

Η IL-6, εμφανίζει φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, εκκρίνεται από μια ποικιλία κυττάρων και η πρόωμη αύξηση των επιπέδων της σε πολυτραυματίες έχει συσχετιστεί με οργανική ανεπάρκεια [66], με την βαρύτητα της νόσου και τη θνητότητα [67]. Τα αρχικά επίπεδα της IL-6 μετά από μείζονες τραυματισμούς έχουν χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο για την ανάπτυξη σήψης [68]. Αυξημένα επίπεδα της έχουν βρεθεί σε σήψη [69]. Άλλες μελέτες ανέδειξαν ότι τα επίπεδα της είναι αυξημένα σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία και σε ασθενείς που κατέληξαν από σοβαρή σήψη [70] [71], διατυπώνοντας την υπόθεση ότι αποτελούν την κύρια κυτταροκίνη που σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της σήψης.

Η IFN- γ , αυξάνει την έκφραση του HLA-DR στα μονοκύτταρα και συμβάλλει στην ενεργοποίηση μονοκυττάρων και μακροφάγων κατά τη διάρκεια της σήψης [72]. Ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺ αποτελούν την κύρια πηγή IFN- γ [73]. Χορήγηση IFN- γ σε σοβαρά τραυματίες σχετίστηκε με μείωση των θανάτων από δευτεροπαθείς λοιμώξεις [74].

Η IL-10 είναι αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη [75]. Τα επίπεδα της σχετίζονται με την βαρύτητα της φλεγμονής και την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας σε ασθενείς με σηπτικό σοκ [76]. In vitro μελέτες σε ανθρώπινα πολυμορφοπύρηνα έδειξαν ότι η ενεργοποίησή της ήλεγξε την έκλυση της IFN- γ και του TNF- α μετά από διέγερση με LPS [75].

Η IL-17 δρά ως φλεγμονώδης κυτταροκίνη. Έχει συσχετιστεί με ιστική καταστροφή κατά την διαδικασία απάντησης του ανοσοποιητικού συστήματος στην είσοδο παθογόνων [77]. Η IL-17 διεγείρει την παραγωγή άλλων κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-6, IL-1 β , TNF α , MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) και προσταγλαδινών από διάφορα κύτταρα όπως ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, κερατινοκύτταρα και μακροφάγα [78]. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή σε πολυμικροβιακή λοίμωξη [79]. Ταυτόχρονα, επηρεάζει τη λειτουργία του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των Th1 κυττάρων [80].

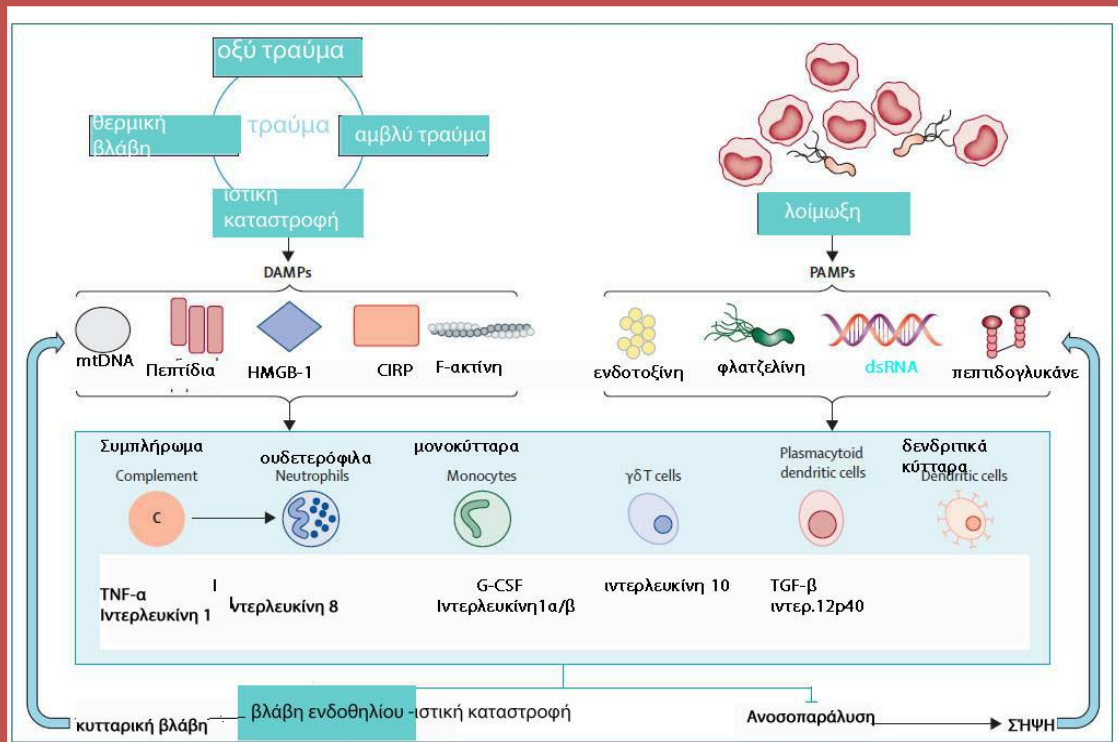
4. Συστηματική απάντηση του οργανισμού στο τραύμα

Το σοβαρό τραύμα σχετίζεται με την πρόκληση συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης του οργανισμού. Η φλεγμονώδης αυτή απάντηση προκύπτει από την απελευθέρωση των DAMPs που σχετίζονται με κυτταρική βλάβη και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις High-mobility group Box-1 (HMGB1), που αποτελούν ένα από τα πλέον μελετημένα μόρια, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, την πρωτεΐνη S100 και το μιτοχονδριακό DNA.

Η πρωτεΐνη HMGB1 απελευθερώνεται από μακροφάγα που διεγείρονται από LPS, TNF α και IL1 β [81] σε ασθενείς με σήψη [82]. Επίσης, η HMGB1 απελευθερώνεται από νεκρωμένα κύτταρα, αλλά ο ρόλος της ως αλαρμίνης δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως [83]. Τα DAMPs ενεργοποιούν απευθείας κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα μονοκύτταρα, μέσω ειδικών υποδοχέων [84] καθώς επίσης και το συμπλήρωμα [85]. Η κοινή φλεγμονώδης απάντηση που παρατηρείται σε περίπτωση διέγερσης των TLRs είτε από LPS είτε από HMGB1 υποδηλώνει ότι υπάρχει ένα κοινό τελικό μονοπάτι σηματοδότησης μεταξύ φλεγμονώδους και μη φλεγμονώδους αιτιολογίας κυτταρικού stress [86].

Οι πρωτεΐνες S100, συνιστούν μια ομάδα δεσμευτικών του ασβεστίου πρωτεϊνών που έχουν προταθεί ως πιθανές αλαρμίνες, κυρίως αυτές που εκφράζονται στα φαγοκύτταρα, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους TLR-4 [87].

Το μιτοχονδριακό DNA εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αλληλεπίδρασης με τους TLR-4 σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Έχει βρεθεί στον εξωκυττάριο χώρο μετά από ιστική καταστροφή σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα [61]. Η ενεργοποίηση που προκαλείται από τα παραπάνω μόρια προκαλεί απελευθέρωση φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και μπορεί να οδηγήσει τελικά σε βλάβη του ενδοθηλίου, κυτταρική βλάβη και αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις.



Εικόνα 7.

Ιστική καταστροφή ή παθογόνοι παράγοντες, δρουν ως σήματα κινδύνου, που οδηγούν στην ανάπτυξη οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης.

Αύτη η διαδικασία, περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων όπου συμμετέχουν ενδοθηλιακά κύτταρα, λευκοκύτταρα και ινοβλάστες, γίνεται ενεργοποίηση του συμπληρώματος και απελευθέρωση πρωτεασών από τα φαγοκύτταρα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στην αποκατάσταση της ομοιόστασης μετά από ιστική καταστροφή. Ανεξέλεγκτη ή παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοπαράλυση και ανάπτυξη σήψης.

5. Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια

Ο άξονας Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια (ΥΥΕ) είναι το κύριο σύστημα που ενεργοποιείται σε καταστάσεις stress [88]. Το stress ορίζεται ως μια κατάσταση κατά την οποία απειλείται η ομοιόσταση του οργανισμού και ο οργανισμός αντιρροπώντας, προσπαθεί να ανταπεξέλθει χρησιμοποιώντας πολύπλοκους προσαρμοστικούς μηχανισμούς [88].

Η εκλυτική ορμόνη της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης [Corticotropin Releasing Hormone (CRH)] είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 41 αμινοξέα και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ρύθμιση της απάντησης στο stress [46]. Διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα διεγείρουν νευροενδοκρινικά κύτταρα του υπεροπτικού και παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης στο πυλαίο σύστημα της υπόφυσης [89]. Η CRH διεγείρει την απελευθέρωση στην κυκλοφορία της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) η οποία με την σειρά της οδηγεί στην σύνθεση κορτιζόλης από την στηλιδωτή στιβάδα του φλοιού των επινεφριδίων. Η κορτιζόλη και τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν μέσω μιας αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης την έκκριση CRH και ACTH.

Η κορτιζόλη αποτελεί το κύριο ενδογενές γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο, είναι το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του άξονα ΥΥΕ και η έκκριση της ακολουθεί κερκαδικό ρυθμό [90]. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η κορτιζόλη ενώνεται με υψηλή χημική συγγένεια σε ποσοστό 80-90 % με την CBG, με χαμηλότερη συγγένεια με την αλβουμίνη, ενώ ένα ποσοστό 5-10% είναι ελεύθερο και ανενεργό [91]. Είναι αξιοσημείωτο ότι 15-20% των γονιδίων που εκφράζονται σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή [92]. Σε κυτταρικό επίπεδο οι δράσεις των κορτικοειδών διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απάντησης, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα ενεργοποιούν τον άξονα ΥΥΕ με τελικό αποτέλεσμα την έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων. Τα παραγόμενα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν στη συνέχεια ποικιλία κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονής.

5.1 Αλληλεπίδραση του άξονα με το ανοσοποιητικό σύστημα

Η στενή αλληλεπίδραση και ο μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης που υπάρχει μεταξύ άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων και ανοσολογικού συστήματος έχει διαπιστωθεί αρκετά χρόνια πριν [93]. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ενεργοποιούν τον άξονα μέσω της

έκκρισης κυτταροκινών, όπως είναι οι IL-1, IL-6, TNF-α και ιντερφερόνες [94]. Τα γλυκοκορτικοειδή παράλληλα, μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία και κινητικότητα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και T-κύτταρα [95]. Επίσης, καταστέλλουν την υπερβολική παραγωγή και απελευθέρωση κυτταροκινών που θα ήταν καταστροφική για τον οργανισμό [96]. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και η ενεργοποίησή του, με την πρόσδεση φυσικών ή συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών [96]. Η καταστολή αυτή πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με τον NF-κΒ και την πρωτεΐνη AP-1.

Σε αντίθεση με την κλασική άποψη, που υποστήριζε ότι τα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν ανοσοκατασταλτική δράση, σήμερα πλέον θεωρείται ότι λειτουργούν κυρίως ως τροποποιητές του ανοσοποιητικού συστήματος [97]. Αρκετές μελέτες αναδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των TLR-2 και TLR-4 [98] [99]. Επιπρόσθετα, ρυθμίζουν την απάντηση του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της δυνατότητας να καταστέλλουν την μετακίνηση των Th1 (T helper cell type 1) και να ενισχύουν την μετακίνηση των Th2 (T helper cell type 2) στα σημεία της φλεγμονής [100].

Η ενεργοποίηση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια μέσω κυτταροκινών, μετά την είσοδο παθογόνου και την επακόλουθη παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια, εθεωρείτο ότι αποτελούσε τον κύριο μηχανισμό ομοιόστασης [101]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων διαθέτουν δικούς τους υποδοχείς TLRs και επίσης εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως TNF-α και IL-6, μετά από διέγερση με LPS [102].

5.2 Προλακτίνη

Η προλακτίνη είναι πολυπεπτίδιο που παράγεται από την υπόφυση και από ποικίλες εκτός υπόφυσης θέσεις (φθαρτός υμένας, μυομήτριο, μαστός, λεμφοκύτταρα, προστάτης) και ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης που πυροδοτούνται από την πρόσδεσή της στον υποδοχέα της προλακτίνης. Αποτέλεσμα της παραπάνω ενεργοποίησης, είναι η έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τον μεταβολισμό, το ανοσοποιητικό σύστημα και άλλες φυσιολογικές λειτουργίες.

Κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης, η προλακτίνη διεγείρει τα T και B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, CD34 αιμοποιητικά κύτταρα όπως επίσης και τα δενδριτικά κύτταρα [103],[104],[105]. Όλες οι παραπάνω δράσεις, μπορεί να πραγματοποιηθούν μέσω προλακτίνης που

συντίθεται στην υπόφυση ή από κύτταρα εκτός υπόφυσης. Μελέτες με την χρήση RT-PCR ανέδειξαν ότι κύτταρα που εκφράζουν mRNA προλακτίνης βρίσκονται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος όπως θύμος, σπλήνας και λεμφαδένες [106]. Ένα μόριο με παρόμοια δομή με την προλακτίνη εκκρίνεται από περιφερικά μονοπύρρηνα αίματος και υποδοχείς προλακτίνης μπορεί να βρεθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα [107]. Η παρουσία, υποδοχέων προλακτίνης σε ποικίλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, υποδηλώνει ότι η προλακτίνη μπορεί να δράσει μέσω της παρρακρινούς ή της αυτοκρινούς οδού [107] [108].

Η έκκριση προλακτίνης από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, τις πρώτες ώρες μετά την ενεργοποίηση, υποδηλώνει την σημασία της προλακτίνης στην πρώιμη φλεγμονώδη αντίδραση και την αλληλουχία των ανοσολογικών απαντήσεων [109] [110]. Άλλη μελέτη, αναφέρει ότι ανθρώπινα μακροφάγα εκκρίνουν προλακτίνη ως απάντηση στην φλεγμονή και σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης [111]. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η προλακτίνη τροποποιεί το ανοσολογικό σύστημα στην οξεία φάση δεν είναι πλήρως γνωστός. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής NO σε περιτοναϊκά μακροφάγα, μέσω πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών, MAPK και ενεργοποίησης καναλιών ασβεστίου [112].

Ο ρόλος της προλακτίνης στην τροποποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έχει μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα σήψης. Η χορήγηση προλακτίνης σε σηπτικά ποντίκια συσχετίστηκε με μεταβολές του ανοσοποιητικού συστήματος και μειωμένη επιβίωση [113]. Πειραματικές μελέτες εξάλλου, αναφέρουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ της προλακτίνης και πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Εντούτοις, ο ρόλος της προλακτίνης ως ορμόνης οξείας φάσης σε ασθενείς με κρίσιμη νόσο παραμένει μέχρι σήμερα αδιευκρίνηστος.

5.3 Δυσλειτουργία του άξονα σε σήψη

Η αντίδραση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια στην σήψη είναι αρκετά περίπλοκη και η ταχεία παραγωγή στεροειδών ορμονών κρίσιμη για την επίτευξη ομοιόστασης. Πολυκεντρική μελέτη σε μεγάλο αριθμό ασθενών με σήψη και σηπτικό σοκ, ανέδειξε ότι ασθενείς που τελικά κατέληξαν είχαν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης στον ορό αλλά ελαττωμένη απάντηση στην διέγερση με ACTH σε σχέση με αυτούς που επιβίωσαν [114].

Έχει παρατηρηθεί διαχωρισμός των επιπέδων ACTH σε σχέση με τα επίπεδα κορτιζόλης, κατά την χρόνια φάση σοβαρής νόσου, ενώ υψηλά επίπεδα τόσο κορτιζόλης όσο και ACTH παρατηρούνται κατά την οξεία φάση [115]. Ο διαχωρισμός των επιπέδων ACTH και γλυκοκορτικοειδών, αποδίδεται στο γεγονός ότι η διέγερση των επινεφριδίων μπορεί να γίνει από εναλλακτικές οδούς, συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης με το ανοσολογικό σύστημα μέσω της έκκρισης κυτταροκινών, της απελευθέρωσης μεσολαβητών μέσω της παρακρινής οδού από ενδοθηλιακά και λιπώδη κύτταρα και μέσω της έκκρισης νευροπεπτιδίων [116]. Ο ελαττωμένος καταβολισμός της κορτιζόλης, μέσω μειωμένης έκφρασης και δραστηριότητας ειδικών ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της κορτιζόλης, έχει προταθεί πρόσφατα ως άλλη μια αιτία για μειωμένα επίπεδα CRH και ACTH [117].

Ο Marik, εισήγαγε τον όρο ανεπάρκεια κορτικοειδών οφειλόμενη σε σοβαρή νόσο [Critical Illness Related Corticoid Insufficiency (CIRCI)] για να περιγράψει μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο, ενώ τα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα μπορεί να είναι φυσιολογικά, ελαττωμένα ή αυξημένα [118]. Η ανεπάρκεια αυτή προκύπτει, είτε από αντίσταση στη δράση της κορτιζόλης σε κυτταρικό επίπεδο, είτε από σχετική επινεφριδική ανεπάρκεια.

6. Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

6.1 Δομή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) εκφράζεται σε κάθε ιστό του σώματος, σε όλα τα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτη σταθερότητα στη δομή και την λειτουργία, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία του στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού [119] [120]. Ο GR ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τους υποδοχείς για τις θυρεοειδικές ορμόνες, το ρετινοϊκό οξύ, τη βιταμίνη D3 και τις στεροϊδικές ορμόνες [121].

Η πρωτεΐνη του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχει αρθρωτή δομή και αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές [122] [Εικόνα 8]:

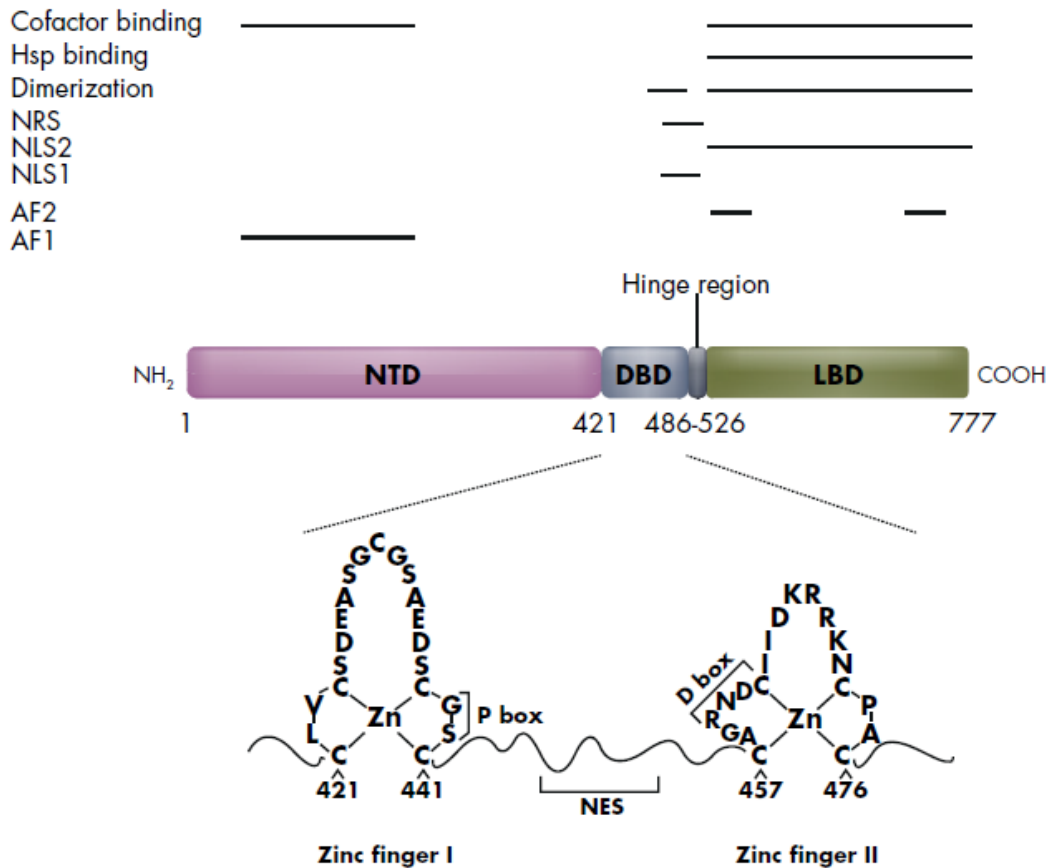
- A. την αμινοτελική περιοχή (NTD)
- B. την περιοχή σύνδεσης με το DNA [DNA binding domain (DBD)]
- Γ. την περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη [ligand-binding domain (LBD)]

Η περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές DBD και LBD είναι γνωστή ως περιοχή του αρμού [hinge region(H)].

Η αμινοτελική περιοχή, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 420, είναι η λιγότερο διατηρημένη εξελικτικά περιοχή ανάμεσα στους πυρηνικούς υποδοχείς. Περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης 1 [Activation Function 1(AF-1)], η οποία ενεργοποιεί γονίδια στόχους με ένα σταθερό τρόπο ανεξάρτητα από την ένωση με συγκεκριμένο προσδέτη, και αποτελεί την κυριότερη περιοχή μετα- μεταγραφικών τροποποιήσεων [123].

Η κεντρική περιοχή σύνδεσης με το DNA είναι η πιο διατηρημένη περιοχή μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων και περιλαμβάνει δυο δακτυλίους ψευδαργύρου, μέσω των οποίων προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους DNA. Αυτές οι DBD αλληλουχίες ονομάζονται αλληλουχίες που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [Glucocorticoid Response Elements (GRE)].

Η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη αποτελεί την περιοχή όπου προσδένονται τα γλυκοκορτικοειδή και περιέχει μια δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης, την περιοχή ενεργοποίησης 2 (AF-2). Η LBD συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες θερμικού σοκ, συνενεργοποιητές και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην LBD εδράζονται αλληλουχίες που είναι σημαντικές για τον διμερισμό του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και για την μετακίνησή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.



Εικόνα 8.

Αρθρωτή δομή της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Διακρίνεται η αμινοτελική περιοχή, η κεντρική περιοχή σύνδεσης με το DNA, η περιοχή του αρμού και η περιοχή δέσμευσης με τον προσδέτη.

Οι οριζόντιες γραμμές πάνω από την πρωτεΐνη απεικονίζουν περιοχές που σχετίζονται με συγκεκριμένες δράσεις. Η δέσμευση των συνενεργοποιητών γίνεται στις NTD και LBD. Αλληλουχίες σημαντικές για τον διμερισμό βρίσκονται τόσο στην LBD όσο και στην DBD.

NTD: αμινοτελική περιοχή

DBD: περιοχή σύνδεσης με το DNA

LBD: περιοχή δέσμευσης του προσδέτη

Cofactor binding: δέσμευση συνενεργοποιητών

Hsp: Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

NRS: Nuclear retention signal

NLS: Nuclear localization signal

AF: Περιοχή ενεργοποίησης

Τροποποιημένο από Vandevyver[124]

6.2 Γονίδιο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

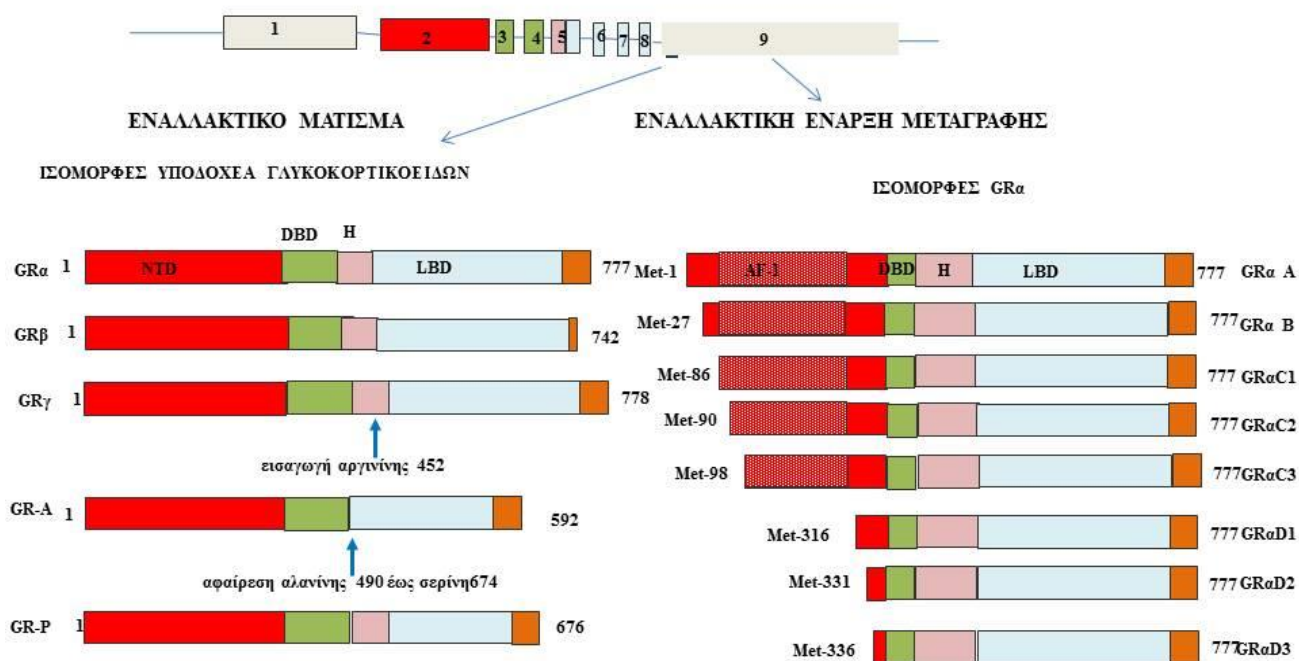
Ο ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών hGR κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (NR3C1) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5(5q31Y32) και αποτελείται από 10 εξώνια [2]. Η υπεύθυνη για την κωδικοποίηση του υποδοχέα περιοχή αποτελείται από τα εξώνια 2-9, ενώ το δέκατο εξώνιο αποτελεί την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Τα εξώνια 2-8 μεταφράζονται σταθερά και αποτελούν πάντοτε συστατικό του mRNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, κάτι το οποίο δεν ισχύει για το εξώνιο 9. Υπάρχουν δύο διαφορετικές ισομορφές του εξωνίου 9, τα εξώνια 9α και 9β που μπορούν να παράγουν διαφορετικό ώριμο mRNA [Εικόνα 9].

6.3 Ισομορφές πρωτεΐνης υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το μάτισμα του εξωνίου 9α δημιουργεί αγγελιοφόρο mRNA για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GRα mRNA) που δημιουργεί μια πρωτεΐνη με μια μοναδική αλληλουχία 50 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του [3]. Η πρωτεΐνη αυτή, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GRα), δεσμεύει την κορτιζόλη, DNA και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, τροποποιώντας έτσι την μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων στόχων.

Η ωρίμανση του εξωνίου 9β δημιουργεί mRNA για τον υποδοχέα τύπου β, το οποίο μεταφράζεται σε πρωτεΐνη με 15 ευδιάκριτα αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο του. Η πρωτεΐνη αυτή, ο GRβ, δεν δεσμεύεται με άλλους προσδέτες και αδυνατεί να ενεργοποιήσει την μεταγραφή. Επομένως, ο GRα αλληλεπιδρά με την κορτιζόλη και είναι ενεργός, ενώ ο GRβ δεν είναι δραστικός καθώς αδυνατεί να προσδεθεί με τα κορτικοειδή και να ενεργοποιήσει την μεταγραφή.

Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου δημιουργεί τρεις επιπλέον ισομορφές της πρωτεΐνης: τις GRγ, GRA και GRP. Η ισομορφή GRγ εμφανίζει το 50% της δραστηριότητας του GRα και η έκφραση της σε οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά έχει συσχετιστεί με αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή [125]. Οι ισομορφές GRA και GRP δεν δεσμεύουν τα γλυκοκορτικοειδή, αφού έχουν απωλέσει μεγάλο τμήμα της περιοχής δέσμευσης (LBD). Η ισομορφή GRP εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς και αυξημένη έκφραση έχει παρατηρηθεί σε αιματολογικές κακοήθειες, όπου παρατηρείται αυξημένη αντίσταση στα κορτικοειδή [126].

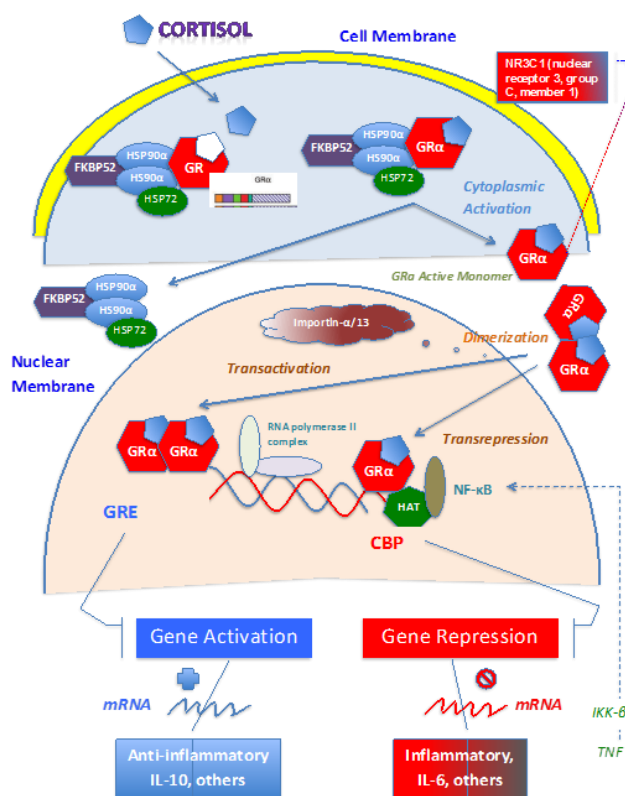


Εικόνα 9.

Το γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q-31. Το μάτισμα του εξωνίου 9α δημιουργεί αγγελιοφόρο mRNA για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GRα mRNA), που δημιουργεί μια πρωτεΐνη με μια μοναδική αλληλουχία 50 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του [3]. Η πρωτεΐνη αυτή, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GRα), δεσμεύει την κορτιζόλη, DNA και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, τροποποιώντας έτσι την μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων στόχων. Η έναρξη της μεταγραφής σε διαφορετικά σημεία του GRmRNA δημιουργεί ισομορφές του υποδοχέα με σταδιακά μικρότερη NTDs. NDT: N-terminal transactivation domain, DBD: DNA binding domain, LBD: ligand binding domain.

6.4 Γενωμικές δράσεις γλυκοκορτικοειδών

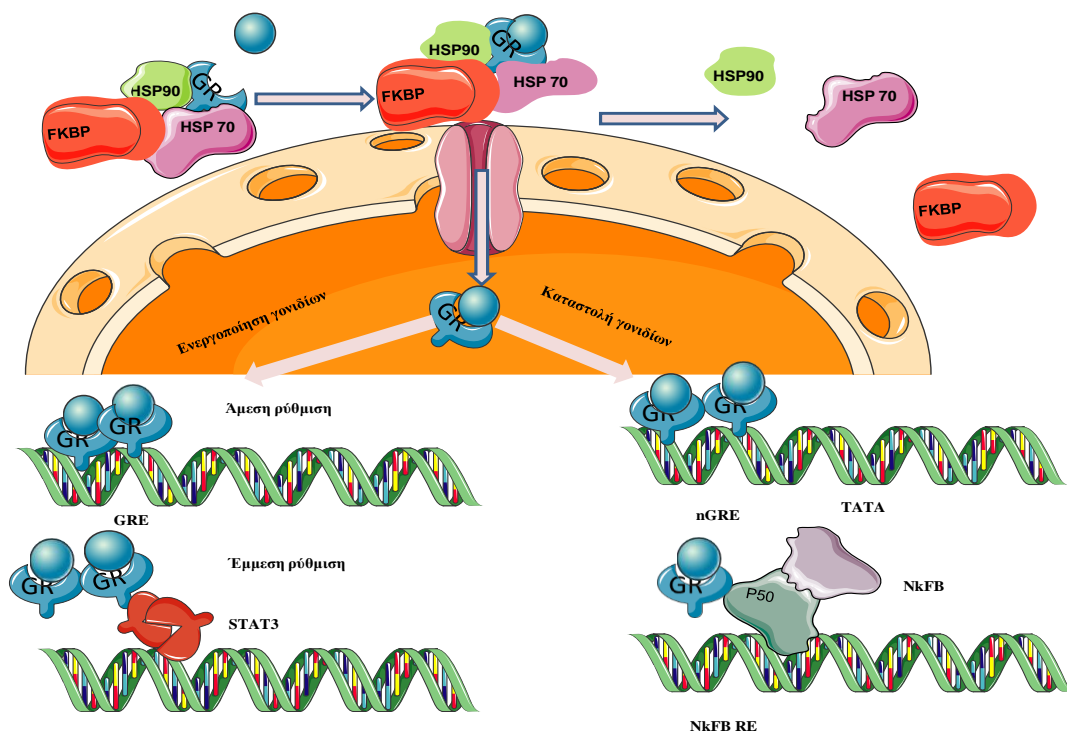
Απουσία κορτικοειδών, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GRα) βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων όπου αποτελεί μέρος ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου που αποτελείται από μοριακές τσαπερόνες (HSP90, HSP 70, HSP 23, HSP 40) και ανοσοφυλλίνες (FKBP51 και FKBP52)[127] [Εικόνα 10]. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 είναι η κύρια πρωτεΐνη του συμπλόκου και συνδέεται με την LBD του GRα ώστε το σύμπλοκο να αποκτήσει την κατάλληλη υψηλής χημικής συγγένειας στερεοδιαμόρφωση [122]. Σε απάντηση στα γλυκοκορτικοειδή το σύμπλοκο GRα υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωση, φωσφορυλιώνεται, αποσυνδέεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και μετατοπίζεται στον πυρήνα [128].



Εικόνα 10. Πρωτεϊνικό σύμπλοκο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μοριακές τσαπερόνες και ανοσοφυλλίνες.

Μέσα στον πυρήνα, ο υποδοχέας προσδένεται ως ομοδιμερές με συγκεκριμένες αλληλουχίες του εκκινητή των γονιδίων στόχων και ρυθμίζει την έκφραση τους θετικά ή αρνητικά [Εικόνα 11]. Ο GRα ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων θετικά ή αρνητικά μέσω άμεσης πρόσδεσης με τις GRE περιοχές των γονιδίων στόχων, είτε έμμεσα βοηθώντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, είτε τέλος με ένα σύμπλοκο τρόπο που περιλαμβάνει τόσο άμεση πρόσδεση στις

συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων στόχων όσο και αλληλεπιδράσεις με μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις [Εικόνα 11]



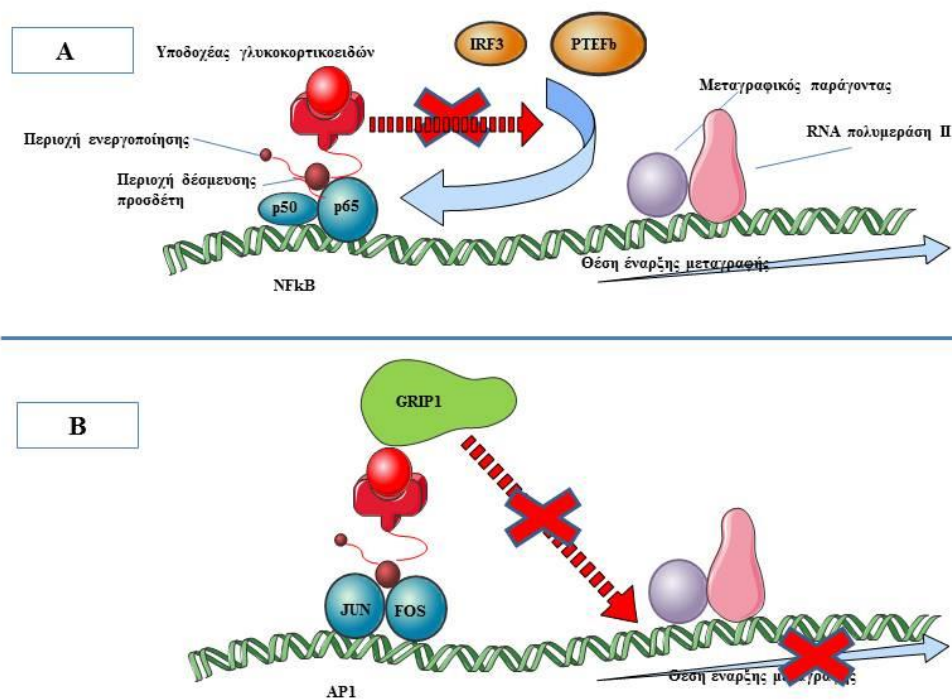
Εικόνα 11. Ο GRα ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων, μετά την είσοδο στον πυρήνα και δέσμευση σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων στόχων, με διαφορετικούς τρόπους α. άμεσα β. έμμεσα, βοηθώντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο STAT3 γ. με ένα σύμπλοκο τρόπο, που περιλαμβάνει τόσο άμεση πρόσδεση όσο και αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες.
 GRE: glucocorticoid response elements, n GRE: negative glucocorticoid response elements,
 HSP: heat shock protein, GR: glucocorticoid receptor, HSP: heat shock protein., STAT :Signal transducers and activators of transcription

Οι περισσότερες από τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να οφείλονται σε ένα σημαντικό μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης που περιλαμβάνει άμεση πρόσδεση και αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες [129]. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την σύνδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με μεταγραφικούς παράγοντες και ειδικότερα με τους nuclear factor (NF)-κB και activator protein-1 (AP1) [130].

Ο NF-κB, που αποτελεί ένα ετεροδιμερές του p50 και p65, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με ανασταλτικές IκB πρωτεΐνες. Ενεργοποίηση του συμπλόκου IκB οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ανασταλτικής πρωτεΐνης (επιτρέποντας έτσι την εκφύλιση της) και δίνοντας την δυνατότητα στον NF-κB να μεταναστεύσει στον πυρήνα και να οδηγήσει στην έκφραση κυτταροκινών, όπως πχ της IL-6. Ο NF-κB χρησιμοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα IRF3

(Interferon Regulatory Factor 3) ως ένα απαραίτητο συν-διεγέρτη συγκεκριμένων γονιδίων στόχων και η σύνδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην υπομονάδα p65 αναστέλλει την ένωση p65-IRF3 [Εικόνα 12α], μετατρέποντας την κατεσταλμένη RNA πολυμεράση σε ενεργό πολυμεράση που μπορεί να παράγει ώριμο mRNA [131]. Με παρόμοιο τρόπο, ο GR εμποδίζει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου PTEFb (positive transcription elongation factor b) με την υπομονάδα p65, η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του NF-κB [132].

Ένας άλλος τρόπος που χρησιμοποιεί ο ενεργοποιημένος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών για να καταστέλλει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις είναι μέσω του GRIP1 (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein-1) [Εικόνα 12β] [133]. Η ικανότητα του GRIP1 να μετατρέπεται από ενεργοποιητής σε καταστολέα της μεταγραφής εξαρτάται από μια συγκεκριμένη περιοχή που καθίσταται ενεργός μετά την πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τους NF-κB ή τον AP-1 [134].



Εικόνα 12

A. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p65 του NF-κB και εμποδίζει την πρόσδεση του IRF3 ή του PTEFb με τον εκκινητή.

B. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τον GRIP1 καταστέλλει την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων.

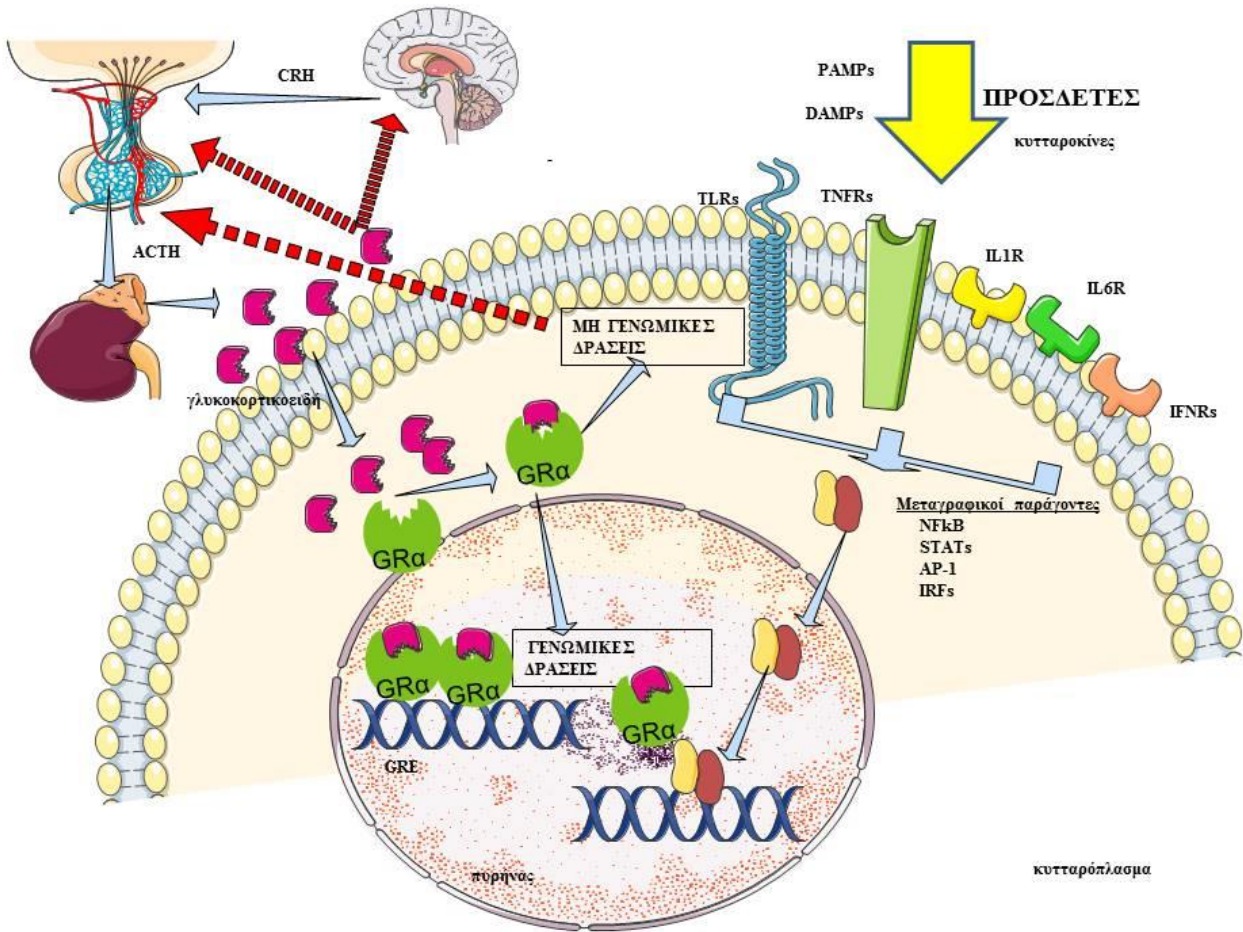
PTEFb: positive transcription elongation factor b), GRIP1: glucocorticoid receptor interacting protein 1, NF-κB: nuclear factor κB, AP1: activator protein-1

Τροποποιημένο από Glass [130]

6.5 Μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Παράλληλα με τις γενωμικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, στις οποίες έχουμε πρωτεϊνική σύνθεση (μέσω της μετατόπισης του GR στον πυρήνα) και οι οποίες δεν συμβαίνουν άμεσα, διακρίνουμε και μη γενωμικές δράσεις, οι οποίες συμβαίνουν εντός δευτερολέπτων ή λεπτών [135]. Σε αντίθεση με τις γενωμικές δράσεις, οι μη γενωμικές δράσεις δεν προϋποθέτουν πρωτεϊνική σύνθεση και πραγματοποιούνται ταχύτατα μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Οι μη γενωμικές αυτές δράσεις, μεσολαβούνται από αλληλεπιδράσεις με τον GR που είναι δεσμευμένος στις κυτταρικές μεμβράνες [136] [137] ή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα [138]. Η αλληλεπίδραση με διάφορες κινάσες, όπως phosphoinositide 3-kinase, AKT, και Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των μη γενωμικών δράσεων [139].

Η παρουσία σε φυσιολογικές συνθήκες του μεμβρανικού GR σε μονοκύτταρα και Β-κύτταρα που απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα έχει διαπιστωθεί εδώ και αρκετά χρόνια [140]. Πρόσφατη μελέτη συσχετίζει τις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών με αναστολή των βασεόφιλων του περιφερικού αίματος [141]. Χαρακτηριστικά επιπλέον παραδείγματα μη γενωμικής δράσης αποτελούν η άμεση καταστολή της έκκρισης ACTH από την πρόσθια υπόφυση [142] [143] και η άμεση καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης που περιλαμβάνει τον υποδοχέα των T-κυττάρων [144]. Συμπερασματικά, οι γενωμικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών αυξάνουν την πολυπολοκότητα και διευρύνουν των εύρος των επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα 13. Γενομικές και μη γενομικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Στις γενομικές δράσεις η δέσμευση των DAMPs ή PAMPs σε υποδοχείς της κτταρικής δράσης οδηγεί σε πρωτεϊνική σύνθεση με την βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων. Αντίθετα οι μη γενομικές δράσεις συμβαίνουν ταχύτατα και δεν προϋποθέτουν πρωτεϊνική σύνθεση. Παράδειγμα μη γενομικής δράσης αποτελεί η άμεση καταστολή της έκκρισης ACTH από την πρόσθια υπόφυση.

NF-κB: nuclear factor κB, AP-1: activator protein-1,

PAMPs: pathogen associated molecular patterns, CRH (Corticotropin Releasing Hormone),

GRα: υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών τύπου α

6.6 Τροποποιήσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μετά την μεταγραφή

Ο ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες επηρεάζουν την μεταγραφική ικανότητα, την σταθερότητα και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, αυξάνοντας περαιτέρω την ετερογένεια στις δράσεις του. Οι τροποποιήσεις αυτές αποτελούν αντικείμενο έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες και περιλαμβάνουν τις α) φωσφορυλίωση β) ακετυλίωση γ) ουμπικουϊτινίωση δ) σουμοϋλίωση ε) νιτροζυλίωση και ζ) οξειδωση.

Η *φωσφορυλίωση* αποτελεί την καλύτερα μελετημένη μετα-μεταγραφική τροποποίηση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [145], [146][147]. Ο ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών έχει τουλάχιστον επτά κατάλοιπα σερίνης (Ser -113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226, Ser-404) που φωσφορυλιώνονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες από διάφορες κινάσες και οι οποίες τροποποιούν την λειτουργία του GR και αυξάνουν περαιτέρω την ετερογένεια στις δράσεις του. Στις δράσεις αυτές εμπλέκονται οι Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), cyclin-dependent kinases, casein kinase II και Glycogen Synthase Kinase 3b(GSK3β) [145]. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών για παράδειγμα είναι ανενεργός και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όταν φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 203 ενώ γίνεται ενεργός όταν φωσφορυλιώνεται στην σερίνη 211 [145]. Άλλη μελέτη έχει αναδείξει ότι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στην σερίνη 211 σε σχέση με την σερίνη 226 επηρεάζουν την μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα [148]. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 404 μεταβάλλει τη μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα, επηρεάζει την έξοδο στο κυτταρόπλασμα και την δραστικότητα του πυρηνικού παράγοντα κβ (NF-κΒ).

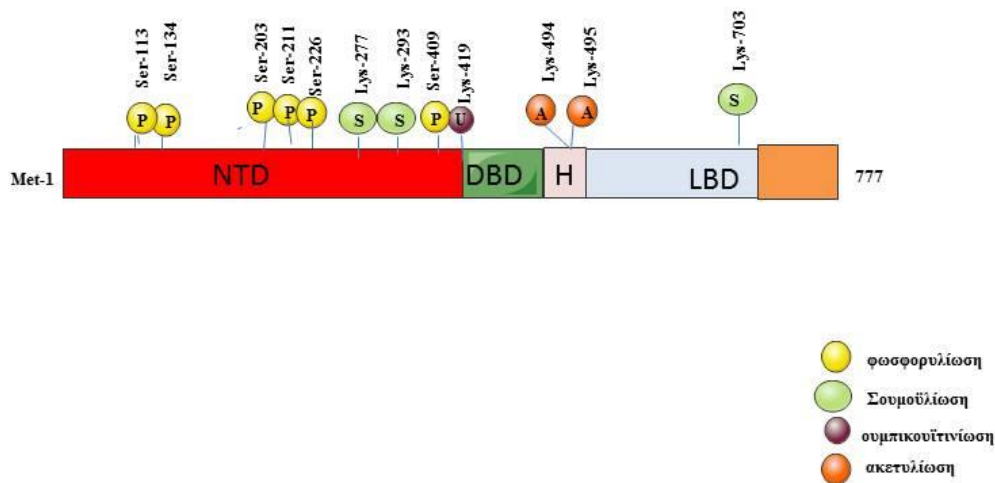
Η *ακετυλίωση* του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών περιγράφηκε για πρώτη φορά στις λυσίνες 494 και 495 της περιοχής του αρμού (hinge region) και σήμερα είναι γνωστό ότι επηρεάζει τις βιολογικές δράσεις των ιστών στόχων [149]. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ότι η ακετυλίωση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Clock (Circadian locomotor output cycle kaput) μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφική δραστικότητα μέσω διαφορετικών μηχανισμών [150],[151].

Η *ουμπικουϊτίνη* είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 76 η οποία όταν δεσμεύεται σε συγκεκριμένες σερίνες καθιστά το σύμπλοκο περισσότερο ευαίσθητο σε εκφύλιση από πρωτεοσώματα και επηρεάζει τα επίπεδα του ενδοκυττάρου υποδοχέα και ακολούθως την μεταγραφή [152],[153].

Σουμοϋλίωση είναι η προσθήκη ενός μορίου με μοριακό βάρος 11KD που ονομάζεται Small Ubiquitin Modifier 1(SUMO-1) και προσδένεται στις λυσίνες της πρωτεΐνης στόχου [154]. Ο hGR περιλαμβάνει τρεις θέσεις σουμοϋλίωσης: τις λυσίνες 277, 293 και 703 [155]. Η σουμοϋλίωση του

hGRα επάγει την εκφύλιση, αποσταθεροποιεί τον υποδοχέα και αναστέλλει την μεταγραφική του δραστηριότητα [156].

Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις GRα



Εικόνα 14. Απεικονίζονται οι κυριότερες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, οι οποίες αυξάνουν περαιτέρω την ετερογένεια στις δράσεις του.

7. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Η παραγωγή πρωτεϊνών ως απάντηση στο θερμικό σοκ παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1962 σε κύτταρα της *Drosophila*, όπου η τυχαία αύξηση της θερμοκρασίας σε πειραματικές συνθήκες οδήγησε στην παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών που έχουν θερμο-ανθεκτικές ιδιότητες και αργότερα ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ [157]. Μετέπειτα μελέτες ανέδειξαν την παρουσία των παραπάνω πρωτεϊνών σε όλα τα ευκαρωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα, διατηρώντας μάλιστα μια αξιοσημείωτη ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των ειδών [158]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αυξάνονται σε κύτταρα που υπόκεινται σε στρεσογόνο ερέθισμα όπως υποξία, οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και πυρετό [159]. Η αύξηση αυτή αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό για το κύτταρο, καθώς οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ δρουν ως μοριακοί συνοδοί (τσαπερόνες), βοηθώντας δηλαδή την σωστή αναδίπλωση των νέο-συντιθέμενων πρωτεϊνών, την εκφύλιση εκείνων με ελαττωματική διαμόρφωση και την αποφυγή πρωτεϊνικών συναθροίσεων [160]. Η κύρια αυτή λειτουργία της σταθεροποίησης των νέων πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα.

Παρά τη σημαντική αυτή δράση τους εντούτοις, έχειδειχθεί σήμερα ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ δεν είναι αποκλειστικά ενδοκυττάρια πρωτεΐνες.

7.1 Εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Η ανέρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε εξωκυττάρια θέση μετά από νέκρωση ιστών [161] και η δυνατότητα ενεργοποίησης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [162] που παρατηρήθηκε στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας, έστρεψαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στις εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η δυνατότητα τροποποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος αποδίδεται τόσο στην δράση τους ως αγωνιστών των TLRs [163] όσο και στην επαγωγή ανοχής στην ενδοτοξίνη [69]. Προκαλούν δηλαδή είτε ανοσοδιέγερση, είτε ανοσοκαταστολή. Σήμερα, καθώς εκτός από την προστασία του κυττάρου δρουν και σαν κυτταροκίνες, περιγράφονται πλέον με τον όρο τσαπεροκίνες [162].

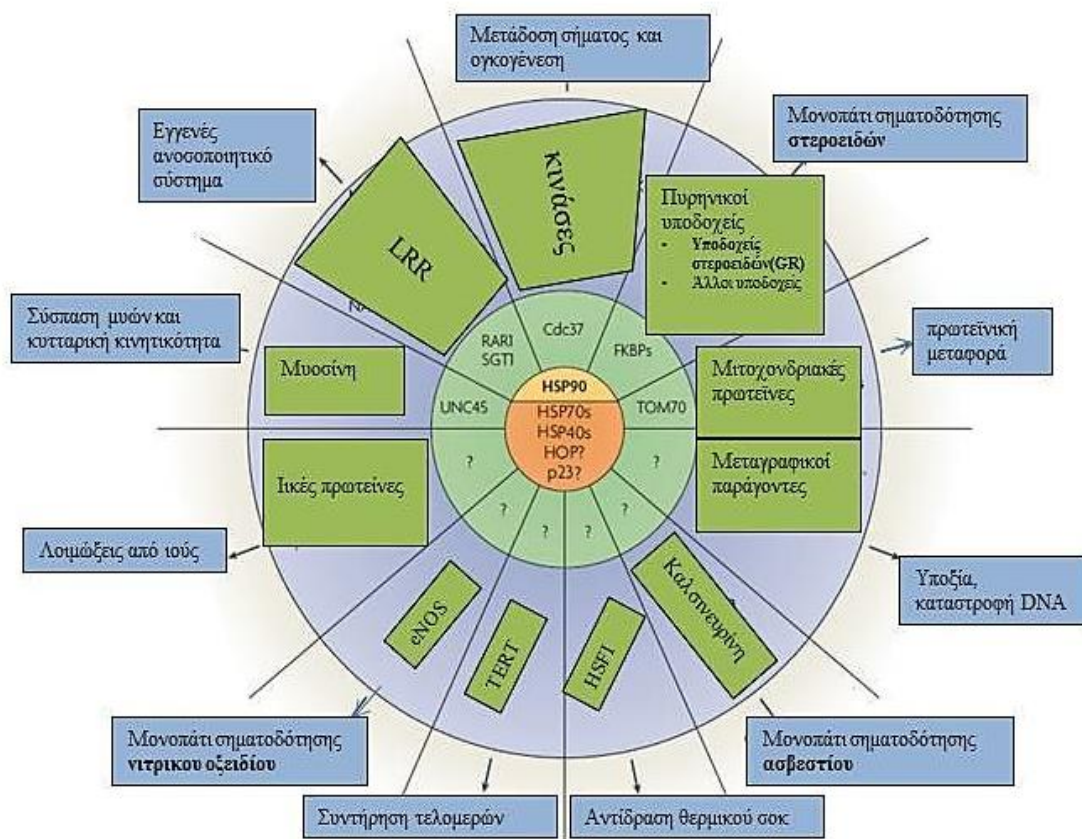
7.2 Πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 70 KDa (HSP70)

Μια από τις κύριες πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι η HSP70 που ονομάστηκε έτσι λόγω του μοριακού της βάρους που είναι περίπου 70 KD. Η μοριακή τσαπεροκίνη HSP70 εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις δράσεις [165] και εμποδίζει παράλληλα την απόπτωση, τον προγραμματισμένο δηλαδή κυτταρικό θάνατο [166] [167]. Η HSP70 ενεργοποιεί υποδοχείς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB και την παραγωγή κυτταροκινών [162]. Αυξημένα επίπεδα HSP72 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με φλεγμονώδη μυοπάθεια, τραυματισμό πνεύμονα [168], οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και στηθάγχη [169], τραύμα [170], φλεγμονή και σήψη [171]. Η χρήση αγωνιστών των TLRs επίσης, οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας έκφρασης της HSP72 και της απελευθέρωσης στον ενδοκυττάριο χώρο [172].

7.3 Πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 KDa (HSP90)

Η HSP 90 είναι από τις πιο άφθονες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και αποτελεί το 1-2% του συνόλου των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων [173]. Ορισμένες HSP 90 μεταναστεύουν στον πυρήνα μετά από στρες ή άλλα ερεθίσματα και η μεταφορά αυτή γίνεται μετά από αλληλεπίδραση με συγκεκριμένες πρωτεΐνες [174]. Η HSP 90 χρησιμοποιεί την ενέργεια από την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP για αναδίπλωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο εγγενές και επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα, την ωρίμανση των πυρηνικών υποδοχέων και τη μεταφορά

σήματος [Εικόνα 15]. Οι λειτουργίες αυτές επιτελούνται μέσω αλληλεπίδρασης με περισσότερες από 20 co-chaperones που βοηθούν την αναγνώριση από κατάλληλες πρωτεΐνες και τροποποιούν τις βιοχημικές τους ιδιότητες [175].



Εικόνα 15. Η HSP 90 ελέγχει διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικές πρωτεΐνες Η HSP 90 συνδέεται με co-chaperones, όπως την p23, την HOP (HSP 90-Organizing Protein), το σύμπλοκο HSP 70- HSP 40 και άλλες (πράσινο χρώμα).

HSF1- heat shock factor 1, TERT- telomerase reverse transcriptase, eNOS- endothelial nitric oxide synthase

GR- glucocorticoid receptor, LRR-Leu-rich repeat, TOM70- translocase of outer membrane 70 kDa, FKBP- FK506-binding protein,

Τροποποιημένο από Taipale et al [175]

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Υπόθεση

Η παρούσα μελέτη εξετάζει την υπόθεση ότι :

Α. Ασθενείς με σήψη ή SIRS παρουσιάζουν στην οξεία φάση του stress μεταβαλλόμενη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου, τη διέγερση των κυτταροκινών και τον κυτταρικό υποπληθυσμό.

β. Οι εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ δρουν ως σήμα κινδύνου σε καταστάσεις στρες ενηλίκων και σχετίζονται με την έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και την παράλληλη διέγερση του άξονα και της προλακτίνης.

2.Σκοπός της μελέτης

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με κορτικοειδή και ο κατάλληλος χρόνος χορήγησης αυτών σε ασθενείς με σήψη αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης ερευνητικής μελέτης εδώ και αρκετές δεκαετίες. Οι πολύπλοκοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί όμως που σχετίζονται με την αντίσταση στην κορτιζόλη παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι και το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε μοριακό επίπεδο στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Στόχος μας ήταν:

α. να μελετήσουμε την γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (mRNA GRα) σε ολικό αίμα, σε ασθενείς με σήψη και να τη συγκρίνουμε με την αντίστοιχη έκφραση σε ασθενείς με άσηπτη φλεγμονή μετά από τραύμα και σε υγιείς ενήλικες.

β. να μελετήσουμε την πρωτεϊνική έκφραση (MFI) του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε μονοκύτταρα στις υπό μελέτη ομάδες και να εξετάσουμε εάν υπάρχει συσχέτιση γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς και συσχέτισή τους με τα επίπεδα ορμονών του άξονα, προλακτίνης, HSP72 και 90a και ιντερλευκινών.

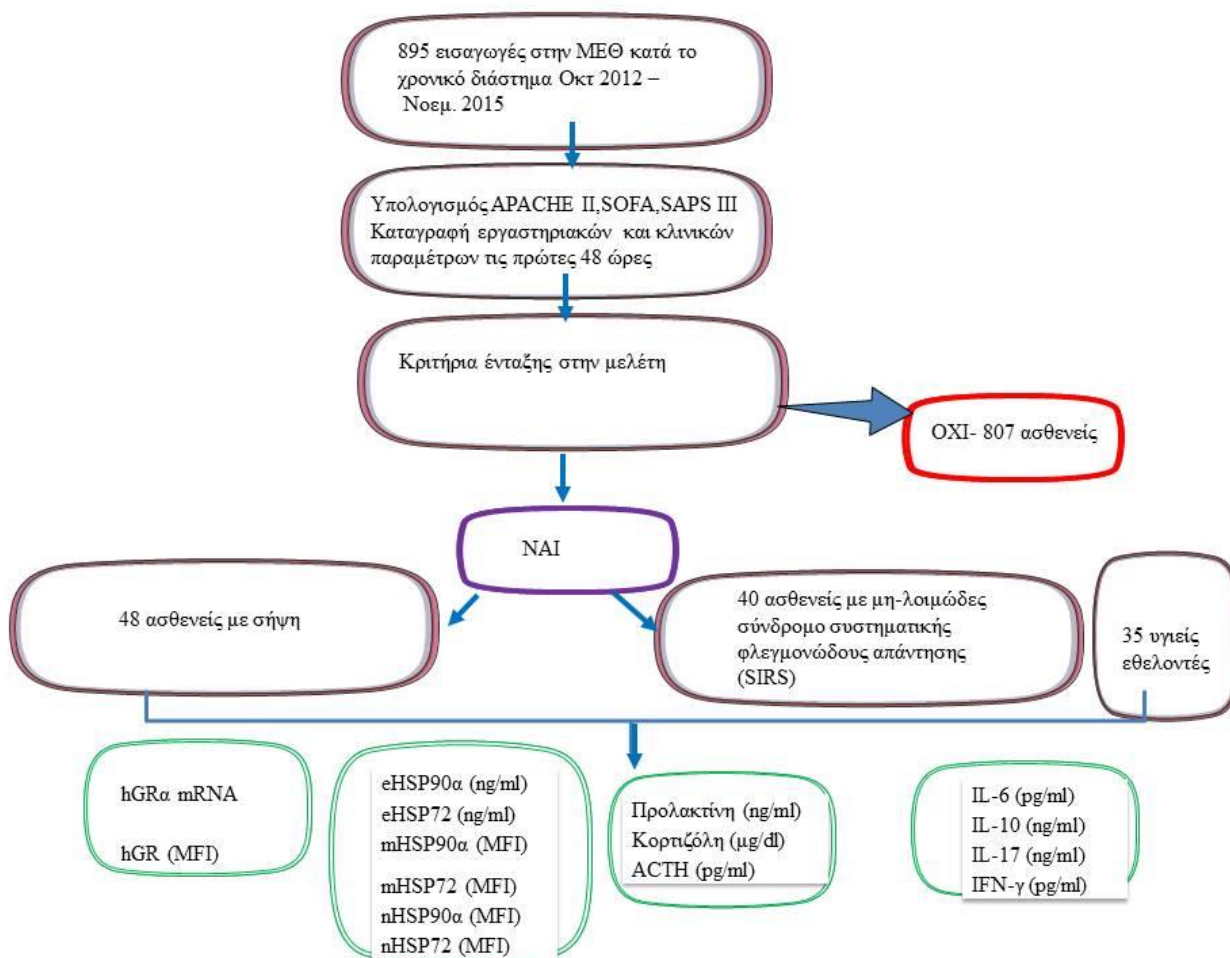
γ. να συγκρίνουμε τα επίπεδα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των GR υποδοχέων σε συνδυασμό με εκείνα των ACTH, κορτιζόλης, προλακτίνης, ιντερλευκινών και των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων HSP σε ενήλικες με πρώιμο σηπτικό σοκ, πρώιμο SIRS μη φλεγμονώδους αιτιολογίας και υγιείς εθελοντές. Να εξετάσουμε πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών σε σχέση με τη θνητότητα.

3.Υλικό και Μεθοδολογία

3.1 Ασθενείς

Η μελέτη που πραγματοποιήσαμε ήταν προοπτική μελέτη σε νοσηλευόμενους ασθενείς της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός και περιλάμβανε ασθενείς με σήψη (48 ασθενείς) και ασθενείς που είχαν μη-λοιμώδες σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS) μετά από τραύμα (40 ασθενείς). Οι ασθενείς που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη ήταν διαδοχικές εισαγωγές οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης από το σύνολο των νοσηλευομένων της ΜΕΘ (Εικ.16)

Εικόνα 16. Διάγραμμα ροής της μελέτης μας



SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; APACHE, Acute Physiology and Chronic Evaluation; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SAPS III, Simplified Acute Physiology Score; CRP, C-Reacting Protein; PCT, Procalcitonin; WBC, White Blood Cells; GR α , glucocorticoid receptor α -isoform; eHSP, extracellular heat shock protein; nHSP, neutrophil-HSP; mHSP, monocyte-HSP; MFI, Mean Fluorescence Intensity; IL, interleukin; IFN- γ , interferon gamma

Η διάγνωση της σηπτικής καταπληξίας και του SIRS έγινε ύστερα από λεπτομερή κλινικό-εργαστηριακό έλεγχο με βάση τα κριτήρια που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σηπτικοί ασθενείς ορίστηκαν οι ασθενείς που είχαν κλινικά σημεία παρουσίας λοίμωξης και δύο ή περισσότερα από τα ακόλουθα:

- Ταχύπνοια (αναπνοές $>20/\text{min}$) ή $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ή επί μηχανικής αναπνοής $\text{VE}/\text{κατά λεπτό αναπνοή} > 10\text{L}/\text{min}$)
- Καρδιακή συχνότητα $>90/\text{min}$
- Θερμοκρασία πυρήνως ή ορθού $>38^\circ\text{C}$ ή κάτω από $<35,6^\circ\text{C}$
- $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 280$ (απουσία πνευμονικής ή καρδιακής νόσου ως αιτία υποξαιμίας)
- Λευκοκυττάρωση ($>12.000\text{wbc}'\text{s}/\text{mm}^3$) ή λευκοπενία ($<4.000\text{wbc}'\text{s}/\text{mm}^3$) ή αύξηση των άωρων μορφών (10%)

Βαριά σήψη ορίστηκε η σήψη που συνοδεύεται από δυσλειτουργία οργάνων, υπόταση ή εκδηλώσεις συστηματικής υποάρδευσης όπως:

- Αύξηση του γαλακτικού οξέος
- Ολιγουρία (διούρηση $<0,5 \text{ ml}/\text{kg BΣ}$ για τουλάχιστον 1 ώρα)
- Οξεία ελάττωση του επιπέδου συνείδησης

Σηπτική καταπληξία ορίστηκε ο συνδυασμός της βαριάς σήψης με υπόταση που δεν ανατάσσεται με χορήγηση φόρτισης υγρών 500ml (υπόταση = συστολική αρτηριακή πίεση $< 90\text{mm Hg}$ ή πτώση $>40 \text{ mm Hg}$ από τη βασική)

SIRS ορίστηκε η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση του ανθρώπινου οργανισμού σε μια ποικιλία σοβαρών κλινικών βλαβών (π.χ. οξεία παγκρεατίτιδα, πολλαπλούν τραύμα, εισρόφηση, έγκαυμα, κλπ). Η συστηματική αυτή φλεγμονώδης απάντηση εκδηλώνεται με δύο τουλάχιστον από τα ακόλουθα:

1. Θερμοκρασία $>38^\circ\text{C}$ ή $< 36^\circ\text{C}$
2. Σφύξεις $>90/\text{min}$
3. Αναπνοές $>20/\text{min}$, ή $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$
4. Λευκοκυττάρωση ($>12.000\text{wbc}'\text{s}/\text{mm}^3$) ή λευκοπενία ($<4.000\text{wbc}'\text{s}/\text{mm}^3$) ή αύξηση των άωρων μορφών (10%)

3.2 Σχεδιασμός μελέτης

Η μελέτη μας εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός (Αριθμός Πρωτοκόλλου 41, ΑΘΗΝΑ 9/2/12) και πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2012 και Νοεμβρίου 2015. Οι συγγενείς των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη, είχαν πρώτα δώσει έγγραφη συγκατάθεση για συμμετοχή των οικείων τους στην μελέτη.

Η διάγνωση της σοβαρής σήψης, σηπτικής καταπληξίας και SIRS έγινε ύστερα από λεπτομερή κλινικο-εργαστηριακό έλεγχο με βάση τα κριτήρια που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

3.3 Μετρήσεις - Αναλύσεις

Οι εργαστηριακές μετρήσεις, αναλύσεις και στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγιναν με τη συνεργασία των Πανεπιστημίων Κρήτης, ΕΚΠΑ και των συνεργαζόμενων στα πλαίσια του ερευνητικού έργου εργαστηρίων:

- Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Νοσοκομείου «ο Ευαγγελισμός»
- Ενδοκρινολογίας Μεταβολισμού και Διαβήτη του Νοσοκομείου Παίδων «η Αγία Σοφία»
- Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής στο Λαϊκό Νοσοκομείο
- Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη του Νοσοκομείου «ο Ευαγγελισμός»

3.4 Κριτήρια ένταξης στην μελέτη

A. Ασθενείς με σοβαρή σήψη – σηπτική καταπληξία

Κριτήρια εισαγωγής:

- Ασθενείς που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ για >24 ώρες
- Διάγνωση: βαριά σήψη, σηπτική καταπληξία
- Διάγνωση τις πρώτες 48 ώρες ανεξάρτητα αν ο ασθενής εισήχθη από το σπίτι (λοίμωξη κοινότητας) ή από άλλο τμήμα του νοσοκομείου (επιδεινούμενη λοίμωξη κοινότητας, νοσοκομειακή λοίμωξη)
- Συγκατάθεση συγγενών

Κριτήρια αποκλεισμού

- Νοσηλεία στη ΜΕΘ < 24 ώρες (πχ μετά από χειρουργική επέμβαση)
- Ανάπτυξη σήψης σε ήδη νοσηλευόμενο ασθενή στη ΜΕΘ >48 ώρες
- Πρόσφατη ή τρέχουσα θεραπεία με κορτικοστεροειδή
- Ασθενείς με καρκίνο
- Ουδετεροπενία ορισθείσα ως <500 ουδετερόφιλα κκχ

- HIV λοίμωξη

B. *Δείγματα από ασθενείς με SIRS μετά από τραύμα που δεν εμφανίζουν λοίμωξη*

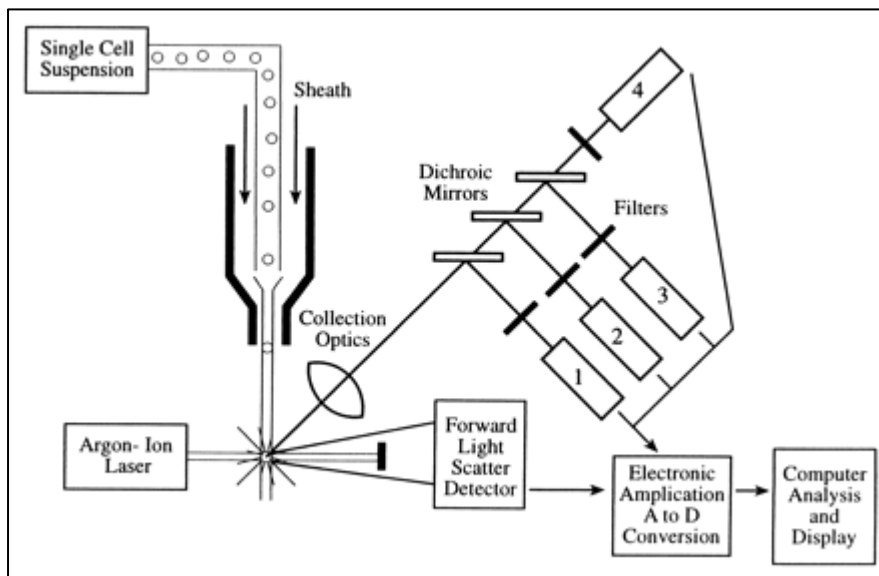
Για συγκριτική εκτίμηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου υγιείς ενήλικες που δεν λάμβαναν ανοσοκατασταλτικά, δεν είχαν αυτοάνοσα νοσήματα ή κακοήθεια και δεν έφεραν άλλα νοσήματα που να μπορούσαν να επηρεάσουν την ανοσολογική κατάσταση του οργανισμού.

3.5. Κυτταρομετρία ροής

Για τον προσδιορισμό των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 και 70 kd στα μονοπύρηνια και πολυμορφοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε και για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στα περιφερικά μονοπύρηνια του αίματος.

Αποτελεί μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων με βάση τον φθορισμό και την σκέδαση του φωτός και με βασική προϋπόθεση το υπό μελέτη υλικό να είναι σε μορφή εναιωρήματος. Ο όρος κυτταρομετρία ροής δηλαδή αναφέρεται στην μέτρηση κυττάρων και την πραγματοποίηση ευαίσθητων πολυπαραμετρικών μετρήσεων σε δείγμα που ρέει.

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από 3 βασικά μέρη α) το υδροδυναμικό σύστημα ροής β) το οπτικό σύστημα γ) το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων.



Εικόνα 17 . Απεικονίζεται η μέθοδος λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής [176].

Το υδροδυναμικό σύστημα, που αποτελεί το πρώτο μέρος του κυτταρομετρητή, απαρτίζεται από την κεντρική κυψελίδα (flow cell), που δρα ως κανάλι μέσω του οποίου διέρχεται το εξεταζόμενο εναιώρημα. Περιβάλλεται από αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα (sheath fluid) και επιτρέπει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη μέσω της υδροδυναμικής εστίασης. Τα κύτταρα διέρχονται

σε σειρά από το ρύγχος της κεντρικής κυψελίδας, σημείο στο οποίο διέρχεται κάθετα η ακτίνα laser του κυτταρομετρητή ροής.

Το **οπτικό σύστημα** αποτελεί το δεύτερο μέρος του κυτταρομετρητή ροής και βασίζεται στη χρήση ακτίνων laser. Καθώς η ακτίνα laser προσπίπτει στα κύτταρα, που διατάσσονται σε σειρά από το ρύγχος της κεντρικής κυψελίδας, προκαλείται σκέδαση του φωτός, αναλόγως με το κυτταρικό μέγεθος (πρόσθιος σκεδασμός) και αναλόγως με την κοκκίωση τους (πλάγιος σκεδασμός). Παράλληλα, η χρήση ειδικών κυτταρικών αντισωμάτων τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές βοηθά στην ακριβέστερη ανάλυση των κυτταρικών ιδιοτήτων με βάση την έκφραση αντιγόνων στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα. Με την διέλευση της ακτίνας laser από τους κυτταρικούς πληθυσμούς δημιουργείται διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών και εκπομπή σήματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος για κάθε φθορίζουσα χρωστική.

Τα φωτεινά αυτά σήματα συλλέγονται από ένα εξελιγμένο σύστημα φωτοανιχνευτών και φωτοπολλαπλασιαστών και διοχετεύονται στο **ηλεκτρονικό μέρος** του κυτταρομετρητή, το τρίτο δηλαδή τμήμα του. Εδώ έχουμε την ανάλυση δεδομένων από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του κυτταρομετρητή.

Πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής είναι η:

- Μέτρηση υψηλού αριθμού κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα και ανίχνευση σπάνιων δεδομένων (1: 100000)
- Ταυτόχρονη ανίχνευση δύο μορφομετρικών και τεσσάρων (ή περισσότερων) παραμέτρων φθορισμού ανά κύτταρο (> 6 παράμετροι ανά κύτταρο)
- Η ανάλυση μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή επιτρέπει τυποποίηση των κυτταρικών πληθυσμών. Έχουμε δηλαδή περισσότερα αποτελέσματα από μικρή ποσότητα δείγματος.
- Ακριβέστερη ταυτοποίηση πληθυσμών μέσω αποκλεισμού ανεπιθύμητων κυτταρικών πληθυσμών
- Ταυτοποίηση κυττάρων με πολύπλοκο ανοσοφαινότυπο.

3.5.1 Αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας ήταν ποντικού έναντι ανθρώπου και απεικονίζονται στον πίνακα 4. Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήσαμε για τη σήμανση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ήταν ισοθειοκυανική φθορεσκεΐνη (FITC) και/ή φυκοερυθρίνη (PE). Η χρήση διαφορετικών φθορίζουσών ουσιών επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσότερων μονοκλωνικών αντισωμάτων με κυτταρομετρία ροής.

Πίνακας 4. Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη μας για τον ενδοκυττάριο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

Μονοκλωνικό Αντίσωμα/σήμανση	Κλώνος	Εταιρεία
CD33 PE/Cy5	clone WM33	BioLegend, San Diego, USA
CD45 PE/Cy7	clone HI30	BioLegend, San Diego, USA
HSP72-FITC	clone C92F3A-5	Enzo Life Sciences USA
HSP90 α -PE	X16857	Enzo Life Sciences USA
GR-FITC	5E4	Thermofiscer Scientific, USA

3.5.2 Πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 και 70 kd με κυτταρομετρία ροής

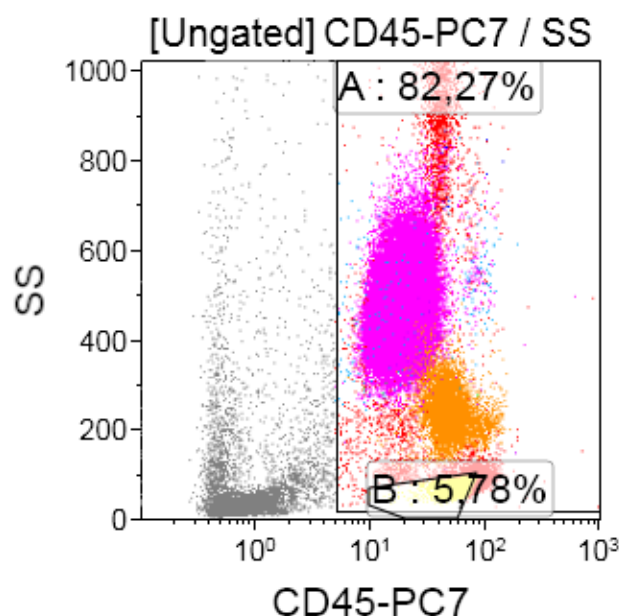
Προσθέσαμε σε 100 μl ολικού αίματος, που μεταφέρονταν απευθείας στο εργαστήριο μετά από την συλλογή σε σωληνάριο Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5 μl επιφανειακού αντισώματος CD33 PE/Cy5 (Cluster of Differentiation 33/μέλος της ομάδας διαφοροποίησης 33) και 5 μl επιφανειακού αντισώματος CD45 PE/Cy7 για τον διαχωρισμό του κυτταρικού πληθυσμού των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Ακολούθησε:

- Προσθήκη 0,5 ml Fixation Buffer (100 μl 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS) για μονιμοποίηση των κυττάρων
- Επώαση 20 λεπτών του διαλύματος στο σκοτάδι.
- Φυγοκέντρηση στα 350g για πέντε λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου
- Ανασύσταση των μονιμοποιημένων κυττάρων σε Permeabilization Wash Buffer 0.1% σαπωνίνη, 10% FCS και 0.1% NaN₃ σε PBS).για αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Αραιώσαμε το Permeabilization Wash Buffer από 10x σε 1x με απεσταγμένο νερό.
- Επαναλάβουμε το παραπάνω βήμα για άλλες δυο φορές.

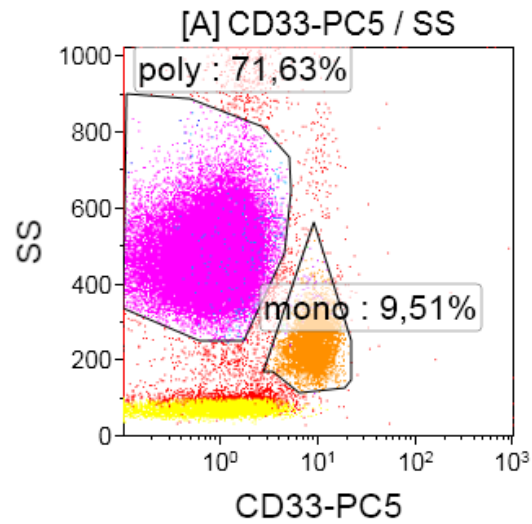
Αραιώση του αντισώματος HSP90a σε αναλογία 10:1, χρησιμοποιούμε δηλαδή 18 μl PBS με 2 μl αντισώματος, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

- Προσθήκη 5 μl αντισώματος HSP72- mAb FITC και 5 μl αραιωμένου αντισώματος HSP90a-PE.
- Επώαση ξανά 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 2 μl Permeabilization Wash Buffer, φυγοκέντρηση στα 350xg για πέντε λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου.
- Λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με 2ml αραιωμένου διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου.
- Επώαση διαλύματος για 10 λεπτά στο σκοτάδι.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 350g για πέντε λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Έκπλυση δύο φορές με 1ml PBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση
- Επαναιώρηση/λύση των κυττάρων σε 500 μl PBS και μέτρηση στον κυτταρομετρητή. (FC 500, BECKMAN COULTER).

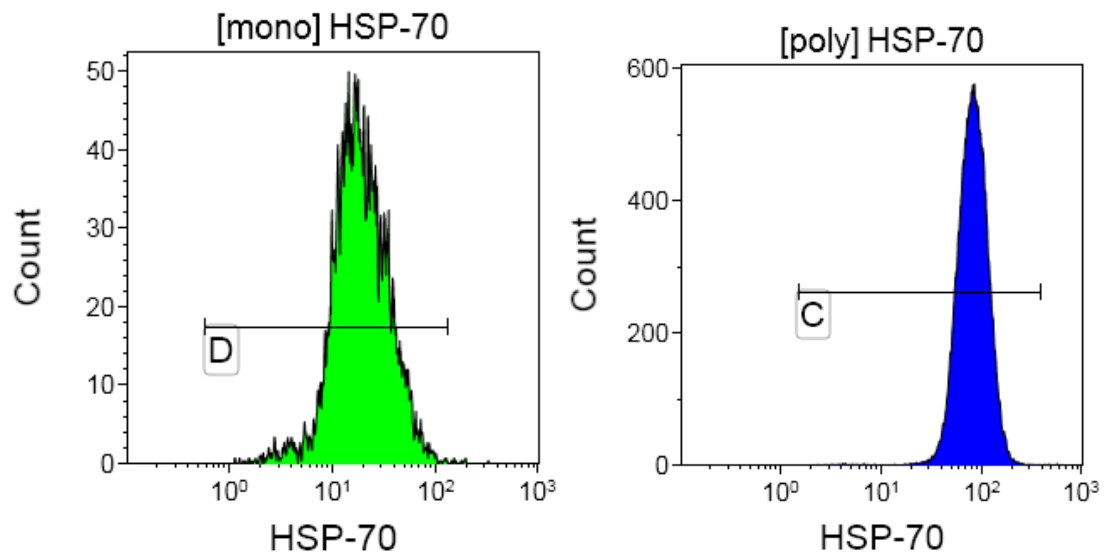
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό CXP version 2 της BECKMAN COULTER. Αρχικά, οριοθετήσαμε τα ζωντανά λευκοκύτταρα με βάση την έκφραση του CD45 και την πλάγια σκέδαση [Εικόνα 18]. Ακολούθησε διαχωρισμός των πληθυσμών των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων με βάση τη σήμανση με το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα [Εικόνα 19]. Καταγράφηκε η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity-MFI) της HSP72 [Εικόνα 20] και HSP90α [Εικόνα 21] στα μονοπύρηνια και ουδετερόφιλα κύτταρα περιφερικού αίματος. Για να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητα των τιμών της MFI, υπήρχε μέριμνα για διατήρηση σταθερών των ρυθμίσεων του κυτταρομετρητή ροής. Προς τον σκοπό αυτό διενεργούσαμε τακτικό ποιοτικό έλεγχο του οργάνου με σφαιρίδια συγκεκριμένης έντασης φθορισμού.



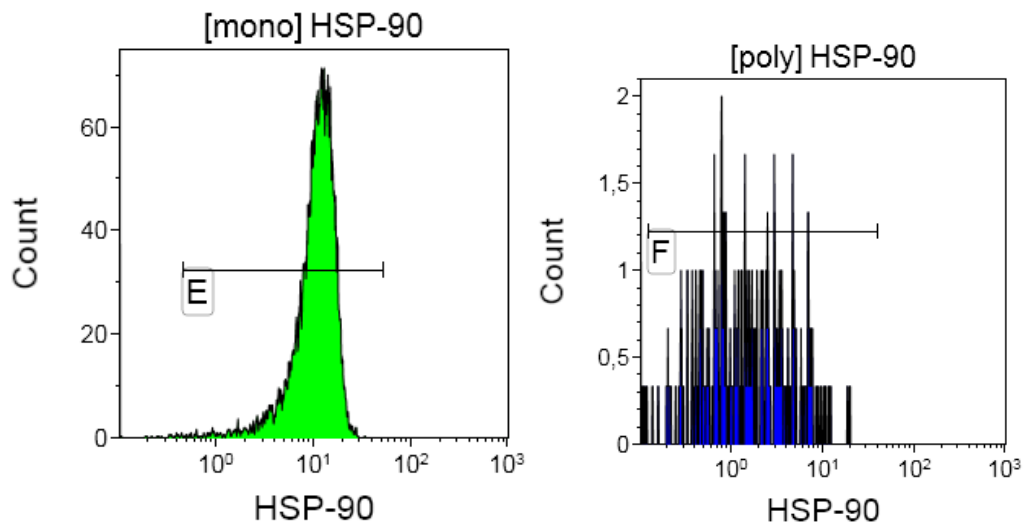
Εικόνα 18. Οριοθέτηση των ζωντανών λευκοκυττάρων με βάση την έκφραση του CD45 και την πλάγια σκέδαση.



Εικόνα 19. Στικτόγραμμα διαχωρισμού των πληθυσμών των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων.



Εικόνα 20. Ιστόγραμμα προσδιορισμού της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) της HSP72 στα μονοπύρηνα και ουδετερόφιλα κύτταρα περιφερικού αίματος.



Εικόνα 21. Ιστόγραμμα προσδιορισμού της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) της HSP90a στα μονοπύρηνα και ουδετερόφιλα κύτταρα περιφερικού αίματος.

3.5.3 Πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάριας πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με κυτταρομετρία ροής

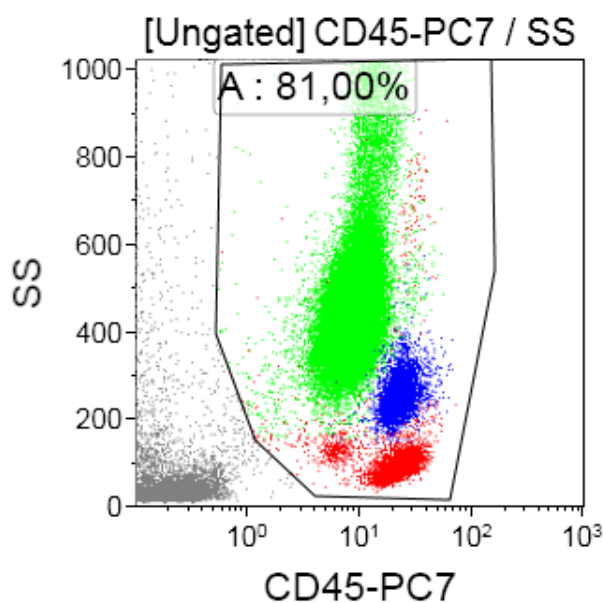
Προσθέσαμε σε 100 μl ολικού αίματος, που μεταφέρονταν απευθείας στο εργαστήριο μετά από την συλλογή σε σωληνάριο Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5 μl επιφανειακού αντισώματος CD33 PE/Cy5 (Cluster of Differentiation 33/μέλος της ομάδας διαφοροποίησης 33) και 5 μl επιφανειακού αντισώματος CD45 PE/Cy7 για τον διαχωρισμό του κυτταρικού πληθυσμού των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Ακολούθησε:

- Προσθήκη 0,5 ml Fixation Buffer (100 μl 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS) για μονιμοποίηση των κυττάρων
- Επώαση 20 λεπτών του διαλύματος στο σκοτάδι
- Φυγοκέντρηση στα 350 g για πέντε λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου
- Ανασύσταση των μονιμοποιημένων κυττάρων σε Permeabilization Wash Buffer (0.1% σαπονίνη, 10% FCS και 0.1% NaN₃ σε PBS) για αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Αραιώσαμε το Permeabilization Wash Buffer από 10X σε 1X με απεσταγμένο νερό.
- Επαναλάβουμε το παραπάνω βήμα για άλλες δύο φορές.

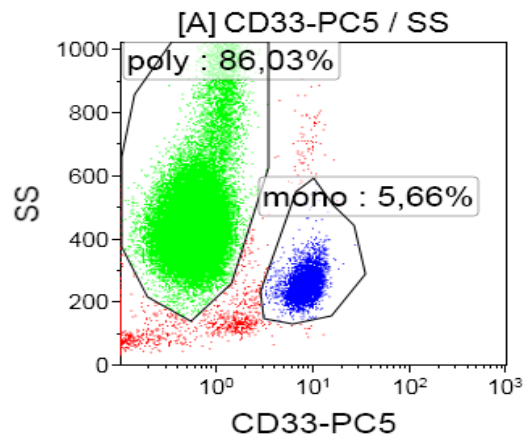
Αραίωση του αντισώματος HSP90a σε αναλογία 10:1, χρησιμοποιούμε δηλαδή 18 μl PBS με 2 μl αντισώματος, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

- Προσθέσαμε 10 μl αντισώματος GR- mAb FITC και 5 μl αραιωμένου αντισώματος HSP90a-PE
- Επώασαμε ξανά 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 2 μl Permeabilization Wash Buffer, φυγοκέντρηση στα 350g (όπως και παραπάνω) για πέντε λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου.
- Λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με 2ml αραιωμένου διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου.
- Επώαση διαλύματος για 10 λεπτά στο σκοτάδι
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 350g για πέντε λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου
- Έκπλυση δύο φορές με 1ml PBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση
- Επαναδιαλύσαμε τα κύτταρα σε 500 μl PBS και μετρήσαμε στον κυτταρομετρητή (FC 500, BECKMAN COULTER)

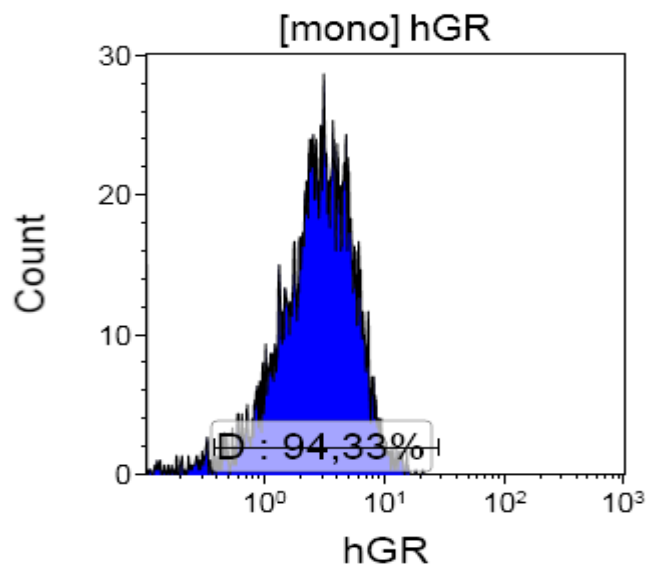
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό CXP version 2 της BECKMAN COULTER. Αρχικά οριοθετήσαμε τα ζωντανά λευκοκύτταρα με βάση την έκφραση του CD45 και την πλάγια σκέδαση [Εικόνα 22]. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την παραπάνω περιοχή οριοθέτησης, ακολούθησε διαχωρισμός του πληθυσμού των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων με βάση την έκφραση του CD33 [Εικόνα 23]. Δημιουργήσαμε ιστόγραμμα της έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [Εικόνα 24] και της HSP90α [Εικόνα 25] και καταγράφηκε η μέση ένταση φθορισμού [Mean Fluorescence Intensity (MFI)] των αντίστοιχων φθορίζουσών ουσιών. Για να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητα των τιμών της MFI, υπήρχε μέριμνα για διατήρηση σταθερών των ρυθμίσεων του κυτταρομετρητή ροής και διενεργούσαμε τακτικό ποιοτικό έλεγχο του οργάνου με σφαιρίδια συγκεκριμένης έντασης φθορισμού.



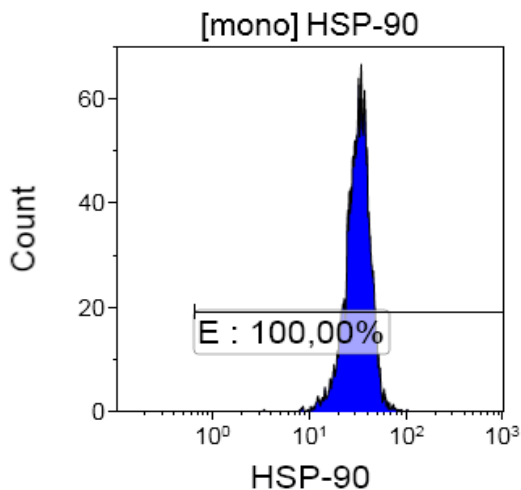
Εικόνα 22. Στικτόγραμμα που προσδιορίζει τα ζωντανά λευκοκύτταρα με βάση την έκφραση του CD45 και της πλάγιας σκέδασης. Αφήνουμε έξω από την οριοθετημένη περιοχή τα νεκρωμένα κύτταρα.



Εικόνα 23. Διαχωρισμός τον πληθυσμό των μονοκυττάρων που είναι θετικός στο CD33 (μπλέ χρώμα οριοθετημένη περιοχή) από τον πληθυσμό που είναι αρνητικός. Με παρόμοιο τρόπο διαχωρίσαμε τον πληθυσμό των πολυμορφοπυρήνων που είναι θετικός στο CD33 (πράσινο χρώμα οριοθετημένη περιοχή) από τον πληθυσμό που είναι αρνητικός ή έχει ασθενέστερη έκφραση.



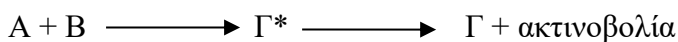
Εικόνα 24. Ιστόγραμμα έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα.



Εικόνα 25. Ιστόγραμμα έκφρασης της HSP90α στα μονοκύτταρα.

3.6.Ορμονικός προσδιορισμός με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας

Χημειοφωταύγεια είναι η μέθοδος που βασίζεται στην παραγωγή ακτινοβολίας από μια εξώθερμη χημική αντίδραση. Η οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση παρέχει την ενέργεια σε ένα ενδιάμεσο προϊόν το οποίο για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση αποδιεγείρεται και εκπέμπει χαρακτηριστική φωτεινή ακτινοβολία. Η αντίδραση αυτή περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση



όπου A και B οι αντιδρώσες ουσίες και Γ^* το ενδιάμεσο προϊόν το οποίο για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση αποδιεγείρεται και εκπέμπει φωτεινή ακτινοβολία η οποία μπορεί να ανιχνευτεί. Η συσκευή που ανιχνεύει την παραπάνω ακτινοβολία λέγεται φωτόμετρο χημειοφωταυγομετρίας ή λουμινόμετρο.

Πλεονεκτήματα της χρήσης χημειοφωταύγειας στις χημειοαναλύσεις είναι:

- α. ευαισθησία, β. Γραμμικότητα, γ. Ταχύτητα μέτρησης, δ. Απλές συσκευές μέτρησης, ε. Αντιδραστήρια μη τοξικά με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με τα ισότοπα.

3.6.1 Μέτρηση κορτιζόλης, προλακτίνης και ACTH

Η συλλογή αίματος από τους ασθενείς και τους υγιείς που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη έγινε μεταξύ 8.00 και 9.00 πμ τις πρώτες 48 ώρες από την εισαγωγή στη ΜΕΘ. Τα σωληνάρια διατηρήθηκαν συνεχώς πωματισμένα και σε όρθια θέση. Τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -80°C και ο προσδιορισμός έγινε στο τέλος της μελέτης για όλα τα δείγματα μαζί.

Τα επίπεδα κορτιζόλης στον ορό υπολογίστηκαν με ανταγωνιστική μέθοδο ένζυμο-ανοσοχημειοφωταύγειας με την χρήση του αναλυτή ADVIA Centaur Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Ο προσδιορισμός κορτιζόλης με τη μέθοδο αυτή είναι ένας ανταγωνιστικός προσδιορισμός που χρησιμοποιεί τεχνολογία άμεσης χημειοφωταύγειας. Η κορτιζόλη στο δείγμα που χρησιμοποιήσαμε ανταγωνίζεται τη σημασμένη με εστέρα ακριδίνης στο αντιδραστήριο για δέσμευση στο πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-κορτιζόλης κουνελιού στη στερεά φάση. Το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-κορτιζόλης κουνελιού δεσμεύεται στο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-κουνελιού ποντικού, το οποίο είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με παραμαγνητικά σωματίδια σε στερεή φάση. Υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας κορτιζόλης του μελετούμενου δείγματος και της ποσότητας των σχετικών μονάδων φωτός που ανιχνεύεται από το σύστημα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε μετρά συγκεντρώσεις κορτιζόλης στον ορό μέχρι $75\ \mu\text{g/dL}$ και η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου είναι $0,20\ \mu\text{g/dL}$.

Τα επίπεδα προλακτίνης στον ορό υπολογίστηκαν με ανοσοχημειοφωταύγεια δύο θέσεων (two-site sandwich immunoassay) με την χρήση επίσης του αναλυτή ADVIA Centaur Immunoassay Analyzer. Η συσκευασία πρωτογενών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήσαμε περιείχε αντιδραστήριο Lite αποτελούμενο από πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-προλακτίνης αίγας σημασμένο με εστέρα ακριδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του αζώτου και συντηρητικά. Η στερεά φάση αποτελούνταν από μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-προλακτίνης ποντικού ομοιοπολικά συζευγμένο με παραμαγνητικά σωματίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές πρωτεΐνης αζίδιο του νατρίου και συντηρητικά. Για την προλακτίνη, η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου ήταν $0,3\ \mu\text{g/L}$ και το εύρος τιμών $0,3\ \mu\text{g/L}$ - $200\ \mu\text{g/L}$.

Ο προσδιορισμός της ACTH πλάσματος πραγματοποιήθηκε με στερεάς φάσης ανταγωνιστική μέθοδο ένζυμο-ανοσοχημειοφωταύγειας (Solid-phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay) με την χρήση του αναλυτή Immulite 2000 Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

3.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Η μέθοδος της ELISA που περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Engvall and Perlmann είναι μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός αντιγόνου χρησιμοποιώντας ένα συνδεδεμένο με ένζυμο αντίσωμα [177]. Η σύνδεση αντιγόνου αντισώματος αποτελεί την βασική αρχή λειτουργίας της ELISA και η συγκέντρωση του αντισώματος καθορίζει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Η χορήγηση του αντισώματος μπορεί να γίνει με διαφορετικούς τρόπους δημιουργώντας παραλλαγές της μεθόδου.

Συγκεκριμένα, ένα αντίσωμα μπορεί να ενωθεί σε ένα ακινητοποιημένο σε τριβλίο αντιγόνο άμεσα, τεχνική που ονομάζεται άμεση ELISA [Εικόνα 26].

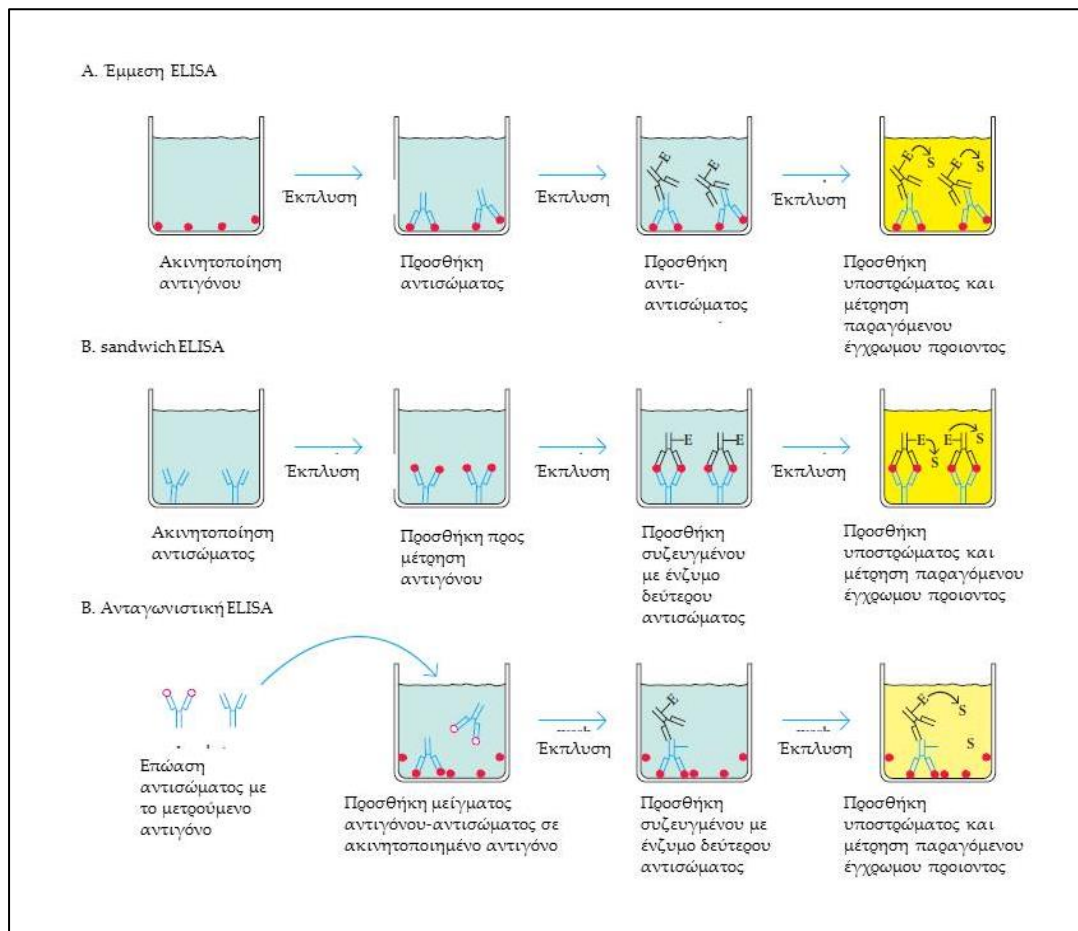
Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα δεύτερο αντίσωμα προκειμένου να ενισχυθεί το σήμα που δημιουργείται από την αρχική ένωση αντιγόνου - αντισώματος, τεχνική που περιγράφεται ως έμμεση ELISA.

Η τρίτη τεχνική, που ονομάζεται σάντουιτς ELISA, βασίζεται στην ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου αντισώματος από ένα δεύτερο συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο του αντιγόνου.

Μια τέταρτη μορφή, επίσης γνωστή ως ανταγωνιστική ELISA, χρησιμοποιεί ένα μίγμα αντισώματος - αντιγόνου και ελεύθερα αντισώματα σε υγρή φάση και αλληλεπιδρά με ακινητοποιημένα σε τριβλία αντιγόνα.

Όλες οι παραλλαγές της μεθόδου χαρακτηρίζονται από:

- α. την πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (ανοσοπροσρόφηση)
- β. την χρήση αντισώματος που είναι συνδεδεμένο με ένζυμο
- γ. την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος με τη χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων
- δ. ο υπολογισμός γίνεται με την χρήση καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα (standards) γνωστής συγκέντρωσης σε κάθε ορμόνη



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων των διαφόρων μορφών ELISA α. έμμεση β. sandwich ELISA γ. ανταγωνιστική ELISA

(τροποποιημένο από Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, Immunology)

3.7.1 Κυτταροκίνες

Τα επίπεδα κυτταροκινών IL-6, IL-10 και IL-17 υπολογίστηκαν με την μέθοδο της ELISA από τα υπερκείμενα που είχαν τοποθετηθεί στους -80°C σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Invitrogen Carlsbad, CA, USA).

3.7.2. Πρωτεϊνική έκφραση HSP90 και HSP72α

Η πρωτεϊνική έκφραση των HSP90 και HSP72α στον ορό/πλάσμα υπολογίστηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA με διαθέσιμα εμπορικά kits και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Enzo Life Sciences-Lausen, Switzerland). Η αραίωση των δειγμάτων ήταν 1:25 για την HSP90α και 1:1 για την HSP72. Σε κάθε μικροκυψελίδα της ELISA προστέθηκε ορός του κάθε ασθενούς και το γνωστών συγκεντρώσεων δείγμα της HSP. Αφού προηγήθηκε έκπλυση για απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων ουσιών προστέθηκε το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα για την HSP90α ή HSP72 τα οποία ήταν συνδεδεμένα με διάλυμα ραφανιδικής υπεροξειδάσης. Η φωτομέτρηση του δείγματος έγινε στα 450 nm. Οι ευαισθησίες των ανιχνεύσεων ήταν 90 pg/mL για την Hsp72 και 50 pg/mL για την Hsp90α. Οι επωάσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

3.8 Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο υπολογισμός της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έγινε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time-PCR). Η real time-PCR πραγματοποιήθηκε με την χρήση του Light Cycler 480 Probes Master kit, χρησιμοποιώντας εκκινητές και ανιχνευτές ειδικά σχεδιασμένους για τα γονίδια NR3C1 (GRα) και RPLP0 (που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς) σε σύστημα Light Cycler 480 (Roche).

Ειδικότερα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα με χρήση TRI Reagent
- Σύνθεση cDNA από RNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής
- Υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του hGRα με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

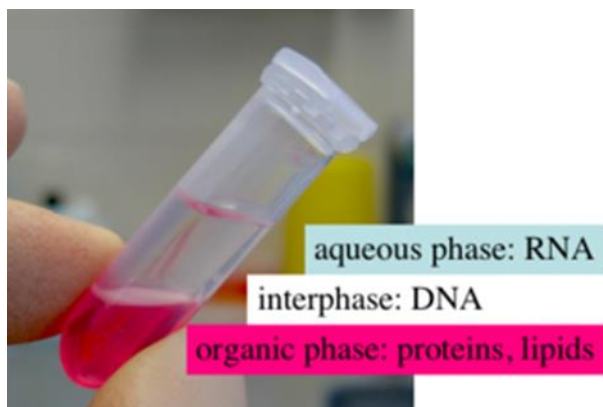
3.8.1 Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα

Η επιτυχής απομόνωση καθαρού και ακέραιου RNA προϋποθέτει την επιτυχή διάσπαση των κυττάρων, την απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών (RNase), και τον καθαρισμό του RNA από DNA και πρωτεΐνες. Το RNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε αποδόμηση και πρέπει να λαμβάνονται ισχυρές προφυλάξεις κατά την απομόνωση του. Αυτές περιλαμβάνουν την χρήση αποστειρωμένων γαντιών, αποστειρωμένων αναλώσιμων και την πραγματοποίηση του πειράματος σε χώρο που είναι απαλλαγμένος από RNAσες. Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση RNA από ολικό περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκε με TRI Reagent (Ambion, Austin, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας.

3.8.1.1 Απομόνωση RNA με TRI Reagent (Ambion, Austin, USA)

Πρόκειται για μια από τις αποτελεσματικότερες τεχνικές για την απομόνωση ολικού RNA και η διαδικασία είναι εξίσου αποτελεσματική για την απομόνωση RNA μορίων, όλων των τύπων και μήκους από 0,1 έως 15kb. Θεωρητικά το RNA που προκύπτει είναι άθικτο, με καθόλου ή ελάχιστη επιμόλυνση από DNA ή πρωτεΐνες.

Το TRIzol, είναι ένα ομοιογενές διάλυμα φαινόλης και ισοθειακυανικής γουανιδίνης το οποίο ταυτόχρονα ομογενοποιεί τα βιολογικά υλικά και αποδομεί τις πρωτεΐνες [Εικόνα 27]. Η προσθήκη χλωροφόρμιου προκαλεί διαχωρισμό φάσεων, όπου οι πρωτεΐνες περιέχονται στην οργανική φάση, το DNA στην ενδιάμεση και το RNA παραμένει στην υδατική φάση. Επομένως, το RNA, το DNA και οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν ταυτόχρονα από ένα μόνο δείγμα και έτσι προκύπτει και η ονομασία TRIzol. Η απομόνωση με TRIzol είναι επίσης αποτελεσματική για την απομόνωση μικρών RNAs, όπως τα miRNAs και τα piRNAs.



Εικόνα 27. Διαχωρισμός φάσεων με την προσθήκη χλωροφόρμιου.

3.8.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με TRI Reagent

Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει τα στάδια α. της λύσης λευκοκυττάρων β. του διαχωρισμού φάσεων γ. της κατακρήμνισης RNA δ. της έκπλυσης RNA και ε. της επαναδιάλυσης RNA.

- Η λύση λευκοκυττάρων έγινε με προσθήκη 800μl TRIzol σε 200μl ολικό αίμα.
- Ο διαχωρισμός φάσεων έγινε με προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου, ακολούθησε έντονη ανάμιξη για 15sec, διατήρηση δείγματος στον πάγο για 10min και φυγοκέντρηση στα 14000rpm στους 4 °C για 15min.
- Η κατακρήμνιση RNA έγινε με μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό σωληνάριο, προσθήκη 500μl παγωμένης ισοπροπανόλης, έντονη ανάμιξη του δείγματος, παραμονή του μείγματος στον πάγο για 15min, φυγοκέντρηση στα 14000rpm στους 4°C για 15min και απομάκρυνση υπερκείμενου.
- Για την έκπλυση προσθέσαμε 0,5 ml παγωμένης αιθανόλης, έγινε φυγοκέντρηση στα 7500rpm στους 4°C για 8min, απομάκρυνση της αιθανόλης και ξανά φυγοκέντρηση στα 14000rpm στους 4°C για 30sec. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.
- Η επαναδιάλυση RNA έγινε με προσθήκη 20μl DEPC H₂O.

3.8.2 Υπολογισμός της καθαρότητας και καθαρισμός του RNA από DNA

Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν την ιδιότητα να απορροφούν το υπεριώδες φως. Η ποσότητα του RNA που περιέχεται σε ένα υδατικό διάλυμα μπορεί να υπολογιστεί με μέτρηση της οπτικής καθαρότητας (Optical Density, OD) σε μήκος κύματος 260 nm OD₂₆₀ με δεδομένο ότι τα νουκλεϊκά οξέα έχουν το μέγιστο ρυθμό απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι πρωτεΐνες απορροφούν το υπεριώδες φως με μέγιστο ρυθμό απορρόφησης στα 280 nm. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της καθαρότητας του RNA που απομονώνουμε. Καθαρά παρασκευάσματα RNA έχουν λόγο OD₂₆₀/OD₂₈₀=2, ενώ λόγος 1,7-2 θεωρείται ικανοποιητικής σταθερότητας. Τιμές λόγου μικρότερες από αυτό δείχνουν ότι υπάρχει πρόσμιξη από πρωτεΐνες ή φαινολικές ενώσεις.

Στην παρούσα μελέτη για τον καθαρισμό από προσμίξεις DNA χρησιμοποιήθηκε kit RQ1 RNase-free DNase της Promega σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η RQ1 Rnase-free DNase είναι μία δεοξυριβονουκλεάση η οποία επάγει την πέψη τόσο μονόκλωνων όσο

και δίκλωνων αλυσίδων DNA σε ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδια κάθε ένα από τα οποία φέρει ελεύθερο το 3' υδροξυλικό του άκρο.

3.8.2.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού RNA από DNA με RQ1 RNase-free DNase kit (Promega)

- RNA (C:2μg/μl) 1-8μl
- RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer 1μl
- RQ1 RNase-free DNase (1u/μl RNA) 1μl
- H₂O καθαρό από νουκλεάσες (έως τελικό όγκο 10μl) 7-0μl
- Επώαση στους 37°C για 30min
- Προσθήκη 1μl RQ1 Stop Solution ώστε να διακοπεί η αντίδραση
- Επώαση στους 65°C για 10min ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο

3.8.3. Παρασκευή cDNA από το RNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής

Αντίστροφη μεταγραφή ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας (complementary) DNA, cDNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα το RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η σύνθεση του συμπληρωματικού RNA στη μελέτη μας έγινε με την χρήση του Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

86

3.8.3.1 Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

- Προστέθηκαν 60μM τυχαίοι εκκινητές (Random Hexamer Primer), 20U αναστολέα της RNάσης (Protector RNA inhibitor), 1 x ρυθμιστικού διαλύματος (Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer), 1μM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, 10U του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης και 100 ng ολικού RNA σε τελικό όγκο 20μl.
- Ετοιμάστηκε μείγμα για το σύνολο των αντιδράσεων κάθε πειράματος.
- Επώαση στους 29 °C προκειμένου να γίνει ο υβριδισμός των εκκινητών.
- Επώαση στους 48 °C για 60 λεπτά με στόχο την δημιουργία του συμπληρωματικού DNA.
- Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης σε θερμοκρασία 48 °C για 60 min.

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιούμε 1 - 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης σε 50 μl τελικού όγκου.

3.8.4 Βασικά συστατικά αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Τα βασικά συστατικά που χρησιμοποιούμε για την διενέργεια της PCR είναι

A. DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που μπορεί να συνθέσει cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο μόριο. Η Taq πολυμεράση έχει απομονωθεί από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus*, παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες και συνθέτει νέα αλυσίδα με κατεύθυνση 5'-3'.

B. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων, οι οποίοι έχουν συμπληρωματική δομή με το DNA στόχο και οριοθετούν το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

Γ. Νουκλεοτίδια. Τα χρησιμοποιούμενα νουκλεοτίδια στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση πραγματικού χρόνου είναι τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTs).

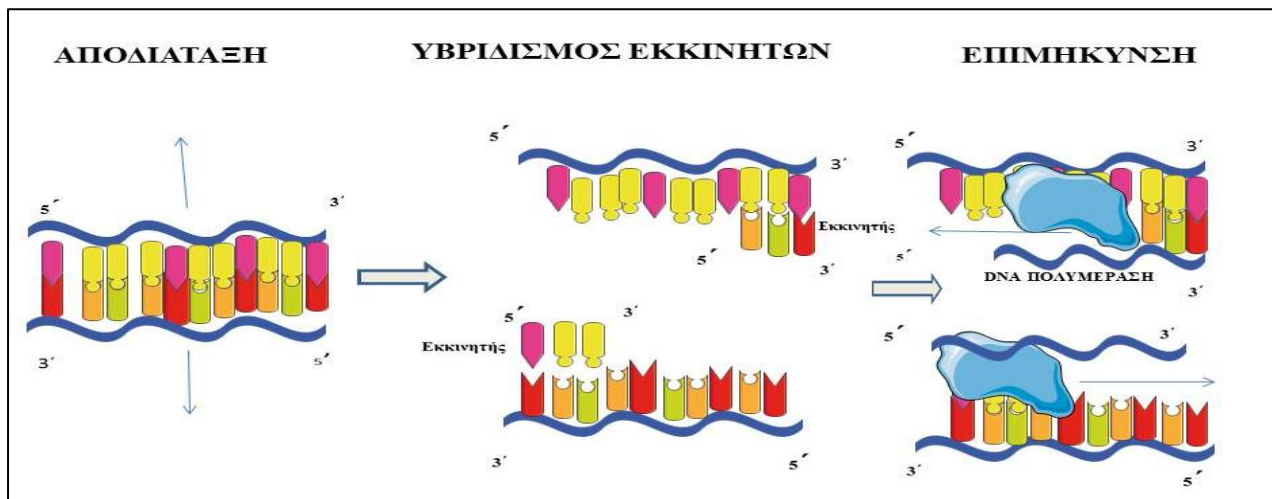
Δ. Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης συντελεί στην διατήρηση ιδανικών συνθηκών pH και αλάτων για βελτιστοποίηση της αντίδρασης. Τα ιόντα Mg⁺⁺ που περιέχονται αποτελούν βασικό συμπράγοντα της DNA πολυμεράσης.

3.8.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η τεχνική της real time- PCR βασίζεται στην ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ανιχνεύοντας παράλληλα το παραγόμενο προϊόν σε πραγματικό χρόνο, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η ανίχνευση αυτή σε πραγματικό χρόνο επιτυγχάνεται με την χρήση φθορίζοντων χρωστικών που είναι ετεροκυκλικοί ή αρωματικοί υδρογονάνθρακες και ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.

Η αντίδραση πολλαπλασιασμού πραγματικού χρόνου του παραγόμενου cDNA πραγματοποιείται σε τρία στάδια όπως και στην κλασική PCR. Τα στάδια αυτά είναι:

A. Αποδιάταξη: οι δυο αλυσίδες DNA αποδιάσσονται στους 90-95 °C



Εικόνα 28. Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Β. Υβριδισμός εκκινητών. Σε θερμοκρασίες 55-60 °C για 30 sec-1 min οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες.

Γ. Επιμήκυνση: Η Taq πολυμεράση επιμηκώνει την αλυσίδα του DNA χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια.

Άνοδος της θερμοκρασίας σε 90-95 °C αποδιατάσσει το δίκλωνο μόριο DNA και ένας νέος κύκλος αποδιάταξης - σύνθεσης ξεκινά. Θεωρητικά σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται το DNA.

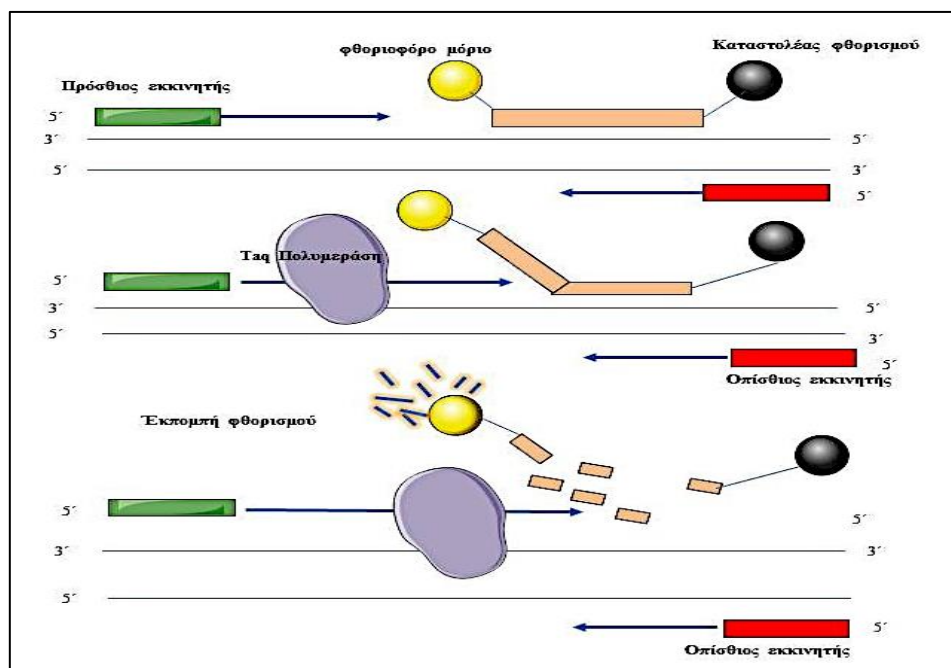
3.8.6 Φθορίζουσες χρωστικές.

Οι φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην PCR διακρίνονται σε ειδικές και μη ειδικές.

Στις *μη ειδικές χρωστικές* περιλαμβάνονται οι SYBR Green I και EvaGreen. Από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η SYBR Green I που αποτελεί φθορίζουσα χρωστική που ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Βασικό πλεονέκτημα της χρησιμοποίησης SYBR Green I αποτελεί η δυνατότητα δέσμευσης με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, καθιστώντας τη μέθοδο αυτή οικονομική. Κύριο μειονέκτημα αποτελεί η σύνδεση της χρωστικής σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που παράγονται κατά την φάση ενίσχυσης, οδηγώντας συχνά σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Οι *ειδικές χρωστικές* είναι προσδεδεμένες σε μικρά μόρια DNA και υβριδίζονται στο γονίδιο στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές. Χωρίζονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του φθοριοφόρου μορίου που χρησιμοποιούν α. ανιχνευτές εκκίνησης (Scorpions, Amplifluor®) β. ανιχνευτές υδρόλυσης (TaqMan, Snake assay) και υβριδισμού (Hybprobe, Molecular Beacons) γ. ανάλογα νουκλεϊκών οξέων (Plexor™ primer, Tiny-Molecular Beacon).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των **Taqman probes** [Εικόνα 29]. Οι ανιχνευτές υδρόλυσης Taqman ανακαλύφθηκαν το 1991 και είναι ολιγονουκλεοτίδια τα οποία στο 5' άκρο τους έχουν ένα φθοριοφόρο μόριο και στο 3' άκρο τους έχουν ένα μόριο που εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού. Σε διάλυμα, ο φθορισμός από το φθοριοφόριο μόριο καταστέλλεται, λόγω του καταστολέα φθορισμού που υπάρχει στο 3' άκρο. Κατά τη φάση της επιμήκυνσης, ο προσδεμένος ανιχνευτής υδρόλυσης εκφυλίζεται λόγω της 5'-3' εξωνουκλεοτιδικής δράσης της Taq πολυμεράσης, αποχωρίζεται από τον καταστολέα φθορισμού και εκπέμπει φθορισμό. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο και η αύξηση του φθορισμού αντιστοιχεί στην αύξηση των παραγόμενων μορίων DNA.



Εικόνα 29.

Διαδοχικά στάδια εκπομπής φθορισμού με την χρήση των Taqman probes.

Κατά τη φάση της επιμήκυνσης, ο προσδεμένος ανιχνευτής υδρόλυσης εκφυλίζεται λόγω της 5' -3' εξωνουκλεοτιδικής δράσης της Taq πολυμεράσης, αποχωρίζεται από τον καταστολέα φθορισμού και εκπέμπει φθορισμό.

3.9 Συνθήκες εκτέλεσης Real-Time RCR.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το LightCycler® 480 Probes Master Kit (Roche) και ο θερμοκός κυκλοποιητής LightCycler® 480.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το NR3C1 και για το γονίδιο αναφοράς RPLP0 απεικονίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αλληλουχία εκκινητών και συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Υβριδοποίηση	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων
hNR3C1a	S	5'TATgCATgAAgTggTTgAAAATCTCC3'	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45
hNR3C1a	A	5'-ggTATCTgATTggTgATgATTTCAgC3'	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45
hNR3C1	FAM	FCATCTCggggAATTCAATACTCATggTC TT-BBQ	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45
RPLP0	S	5'-CTCTGGAGAAACTGCTGCCTCATA- 3'	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45
RPLP0	A	5'-GACTTCACATGGGGCAATGG-3'	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45
RPLP0	FAM	AGGACCTCACTGAGATCAGGGACATG T-BBQ	60°C: 10 λεπτά	72°C: 10 λεπτά	45

3.10 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης αποτελεσμάτων

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει με απόλυτη ή σχετική μέθοδο

Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη, η οποία δημιουργείται υποβάλλοντας σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δείγματα που έχουν γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί.

Σχετική ποσοτικοποίηση

Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στον προσδιορισμό της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου σε σχέση με ένα γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση δεν απαιτεί την παρουσία πρότυπης καμπύλης και ως γονίδιο αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε με γνωστή αλληλουχία. Για να καθορίσουμε την αναλογία του γονιδίου στόχου σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα. Το πλέον χρησιμοποιούμενο είναι το

$$R = 2^{-[\Delta C_p \text{ δείγματος} - \Delta C_p \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$$

$$R = 2^{-[\Delta \Delta C_p]}$$

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο πρότυπων καμπυλών (Standard Curve method).

4. Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (εύρος τιμών) για συνεχείς μεταβλητές και ως συχνότητες για κατηγορικές μεταβλητές. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έγιναν με τη χρήση του SPSS software (version 22.0, SPSS, Chicago, Ill). Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση για ανεξάρτητες μεταβλητές με τη χρήση του Kruskal-Wallis test. Η σύγκριση όλων των δυνατών διαφορών ανάμεσα στις ομάδες έγινε με εκ των υστέρων συγκρίσεις (post hoc) Dunn's pairwise test με διορθώσεις Bonferroni για το Kruskal-Wallis test και το χ^2 (H^2) προσαρμόστηκε για να υπολογίσει το μέγεθος αποτελέσματος (effect size $W^2 = H^2/n-1$). Το μέγεθος αποτελέσματος για το χ^2 υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον δείκτη συνάφειας Cramer's V. Μεταξύ των ομάδων, οι συγκρίσεις έγιναν με το χ^2 για κατηγορικές μεταβλητές και με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman για συσχέτιση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών. Για να εκτιμήσουμε την προγνωστική αξία, υπολογίσαμε την επιφάνεια κάτω από την καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (AUROC) για μεταβλητές που διέφεραν σημαντικά μεταξύ της ομάδας των σηπτικών ασθενών και της ομάδας των πολυτραυματιών ή μεταξύ επιζώντων και μη επιζώντων στην υποομάδα των σηπτικών ασθενών. Για την προγνωστική αξία της σήψης ή της θνητότητας χρησιμοποιήσαμε βιομέτρητα τα οποία συσχετίζονταν σημαντικά μεταξύ τους στις συσχετίσεις κατά ζεύγη. Θεωρήσαμε ότι η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (AUROC) >0.8 ως κλινικά σημαντική, ενώ οι ιδανικές τιμές διαχωρισμού υπολογίστηκαν συνδυάζοντας την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα (μέθοδος Youden Index). Υπολογίσαμε επίσης τη θετική και αρνητική προγνωστική αξία. Διαφορές κατά ζεύγη για συνεχείς μεταβλητές στα ίδια άτομα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το Wilcoxon signed-rank test. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας ανάμεσα στις ομάδες ορίστηκε για $p < 0.05$.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Δημογραφικά στοιχεία και διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό ατόμων και το φύλο μεταξύ των ασθενών με σήψη και υγιών εθελοντών. Αντιθέτως, υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία μεταξύ των παραπάνω ομάδων (Πίνακας 6). Οι ηλικίες των πολυτραυματιών με SIRS δεν διέφεραν ως προς τις άλλες δύο ομάδες, υπήρχε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το φύλο σε σχέση με τους εθελοντές.

Πέντε ασθενείς από τους πολυτραυματίες κατέληξαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας στη ΜΕΘ, ενώ από τους ασθενείς με σήψη κατέληξαν είκοσι ένας συνολικά. Όπως αναμενόταν, οι σηπτικοί ασθενείς νοσηλεύτηκαν πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τους πολυτραυματίες.

Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει κορτικοειδή τον τελευταίο μήνα πριν την εισαγωγή (κριτήρια αποκλεισμού). Δεκαπέντε σηπτικοί ασθενείς είχαν υποβληθεί σε μονήρη δόση εφόδου υδροκορτιζόνης πριν την αιμοληψία, εξαιτίας ανθεκτικής στις κατεχολαμίνες σηπτικής καταπληξίας (31%). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πρωτεϊνική και γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην υποομάδα των ασθενών που είχε λάβει στεροειδή σε σχέση με την ομάδα που δεν είχε. Οι συγκεντρώσεις προλακτίνης ήταν υψηλότερες, ενώ της ACTH χαμηλότερες στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες ($p < 0.001$). Οι ιντερλευκίνες, κορτιζόλη, HSPs, πρωτεΐνη hGR, και hGRα mRNA δεν διέφεραν μεταξύ ανδρών –γυναικών.

Τα βασικά δημογραφικά στοιχεία της μελέτης μας παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Τα αποτελέσματα των κυριότερων μετρήσεων απεικονίζονται στους Πίνακες 6, 7 και 8.

Πίνακας 6. Βασικά δημογραφικά στοιχεία μελέτης και προγνωστικά σκορ βαρύτητας ασθενών

	Υγιείς Εθελοντές	SIRS	Σήψη	Statistic value χ^2 or H^2	Effect size (w^2 or V)***	P value ***
Αριθμός ατόμων	35	40	48			
Ηλικία (Έτη)*	35 (28-50) ^α	41 (32-53) ^γ	58 (44-69) ^{α, γ}	34	0.29	<0.001
Φύλο (Άρρεν/θήλυ)	19/16	31/9	28/20	5,2	0.21	=0.07
Θνητότητα ΜΕΘ (μη επιζώντες /επιζώντες (%))	0/35	5/35 (12.5%)	21/27 (43.8%)	10.2	0.34	=0.001
Θνητότητα Νοσοκομείου (μη επιζώντες /επιζώντες (%))	0/35	6/34 (15.8%)	29/19 (60.4%)	17.5	0.45	<0.001
Ημέρες Νοσηλείας [days]	NA	15.5 (7-28.5)	18.5 (9.2-36.8)	2	0.03	=0.16
APACHE II	NA	15 (10-18) ^γ	21 (16-27) ^γ	15	0.19	<0.001
SOFA	NA	9 (7-11) ^γ	11 (9-13) ^γ	11	0.14	=0.001
SAPS III	NA	41 (43-58) ^γ	41 (61-78) ^γ	32	0.44	<0.001

* Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (εύρος τιμών)

** Για βαθμούς ελευθερίας $df=2$ σύμφωνα με την μεθοδο Cohen, το μέγεθος αποτελέσματος (the effect size) θεωρείται μικρό 0.07 μέσο 0.21 and μεγάλο 0.35

*** Σημαντικότητα με την χρήση της στατιστικής μεθόδου Independent Samples Kruskal-Wallis Test; τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική

^{α, γ} Dunn-Bonferroni πολλαπλές συγκρίσεις (όλες ανά ζεύγη): ^α $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και σηπτικών, ^β $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών με SIRS, ^γ $p < 0.05$ μεταξύ σηπτικών και ασθενών με SIRS.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ορμονικών μετρήσεων, ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και γονιδιακής έκφρασης υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

	Υγιείς Εθελοντές	SIRS	Σήψη	Statistic value χ^2 or H^2	Effect size (w^2 or V)***	P value ***
GR α mRNA (NR3C1)	0.50 (0.12-0.9) ^α	0.64 (0.32-0.77)	0.74 (0.52-1.23) ^α	8.3	0.08	=0.016
GR (MFI)	0.95 (0.76-1.9) ^α	1.1 (0.43-2.5) ^γ	3.3 (1.6-4.6) ^{α,γ}	9.6	0.28	=0.008
Προλακτίνη (ng/ml)	7.5 (5-10) ^{αβ}	18.3 (11-25) ^β	15.4 (9-32) ^α	20.4	0.17	<0.001
Κορτιζόλη (μg/dl)	12.3 (9-15) ^α	16.2 (11-23) ^γ	32.8 (21-67) ^{α,γ}	38.6	0.33	<0.001
ACTH (pg/ml)	17.5 (13-33) ^β	10 (6-19) ^{β,γ}	18.6 (10-38) ^γ	10.4	0.09	=0.005
CRP (mg/dl)	NA	7.1 (1.05-15) ^γ	21 (8.8-27) ^γ	10.5	0.15	=0.001
PCT (ng/ml)	NA	0.9 (0.5-1.8) ^γ	5.2 (1-34) ^γ	7	0.23	=0.008
Γαλακτικό	NA	2.4 (1.4-4.2)	2.8 (1.3-5)	0.23	0.00	=0.63
Glucose (mg/dl)	NA	154 (128-189) ^γ	219 (145-299) ^γ	8.6	0.12	=0.003
Αλβουμίνη (g/dl)	NA	3 (2.3-3.4) ^γ	2.5 (2.1-2.9) ^γ	6.3	0.09	=0.012
WBC (K/μl)	NA	11.4 (7.3-15.5)	10.9 (2.6-19.9)	0.12	0.00	=0.91

* Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (εύρος τιμών)

** Για βαθμούς ελευθερίας $df=2$ σύμφωνα με την μεθοδο Cohen, το μέγεθος αποτελέσματος (the effect size) θεωρείται μικρό 0.07 μέσο 0.21 and μεγάλο 0.35

*** Σημαντικότητα με την χρήση της στατιστικής μεθόδου Independent Samples Kruskal-Wallis Test; Τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική

^{α,γ} Dunn-Bonferroni πολλαπλές συγκρίσεις (όλες ανά ζεύγη): ^α $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και σηπτικών, ^β $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών με SIRS, ^γ $p < 0.05$ μεταξύ σηπτικών και ασθενών με SIRS.

Πίνακας 8. Μετρήσεις εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων HSP90α και HSP72 σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα και ιντερλευκίνες ορού.

	Υγιείς Εθελοντές	SIRS	Σήψη	Statistic value χ^2 or H^2	Effect size (w^2 or V)***	P value ***
eHSP90α (ng/ml)	10.5 (1.2-23) ^{α, β, γ}	32 (22-57) ^{β, γ}	71 (31-124) ^{α, γ}	39.5	0.33	<0.001
eHSP72 (ng/ml)	0.26 (0.14- 0.41) ^α	0.29 (0.19-0.49) ^γ	0.95 (0.41-2.5) ^{α, γ} ^γ	32	0.29	<0.001
mHSP90α (MFI)	24 (12-82)	36 (10.5-64)	33 (7.6-56)	0.07	0.00	=0.96
mHSP72 (MFI)	19.6 (13-32)	22.8 (11-52)	18 (11.7-30.7)	0.84	0.01	=0.65
nHSP90α (MFI)	11 (5.4-25)	17 (4.8-25)	18.3 (6.8-38)	3.5	0.03	=0.17
nHSP72 (MFI)	77 (44-110) ^α	75 (28-154) ^γ	40 (25-65) ^{α, γ}	13.7	0,12	=0.001
IL-6 (pg/ml)	1.4 (0.98- 2.5) ^{α, β}	77 (21-213) ^β	203 (60-539) ^α	72	0.60	<0.001
IL-10 (ng/ml)	0.01 (0.1- 9.5) ^α	4.9 (0.1-11) ^γ	48 (0.1-58) ^{α, γ}	15.6	0.13	<0.001
IL-17 (ng/ml)	0.2 (0.2-33)	0.2 (0.2-6.4)	0.2 (0.2-7.8)	0.05	0.00	=0.98
IFN-γ (pg/ml)	6.2 (0.44- 9.8)	4.7 (0.13-7.8) ^γ	9.7 (4-17) ^γ	12	0.10	=0.03

* Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (εύρος τιμών)

** Για βαθμούς ελευθερίας $df=2$ σύμφωνα με την μεθοδο Cohen, το μέγεθος αποτελέσματος (the effect size) θεωρείται μικρό 0.07 μέσο 0.21 and μεγάλο 0.35

*** Σημαντικότητα με την χρήση της στατιστικής μεθόδου Independent Samples Kruskal-Wallis Test; τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική

^{α, γ} Dunn-Bonferroni πολλαπλές συγκρίσεις (όλες ανά ζεύγη): ^α $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και σηπτικών, ^β $p < 0.05$ μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών με SIRS, ^γ $p < 0.05$ μεταξύ σηπτικών και ασθενών με SIRS.

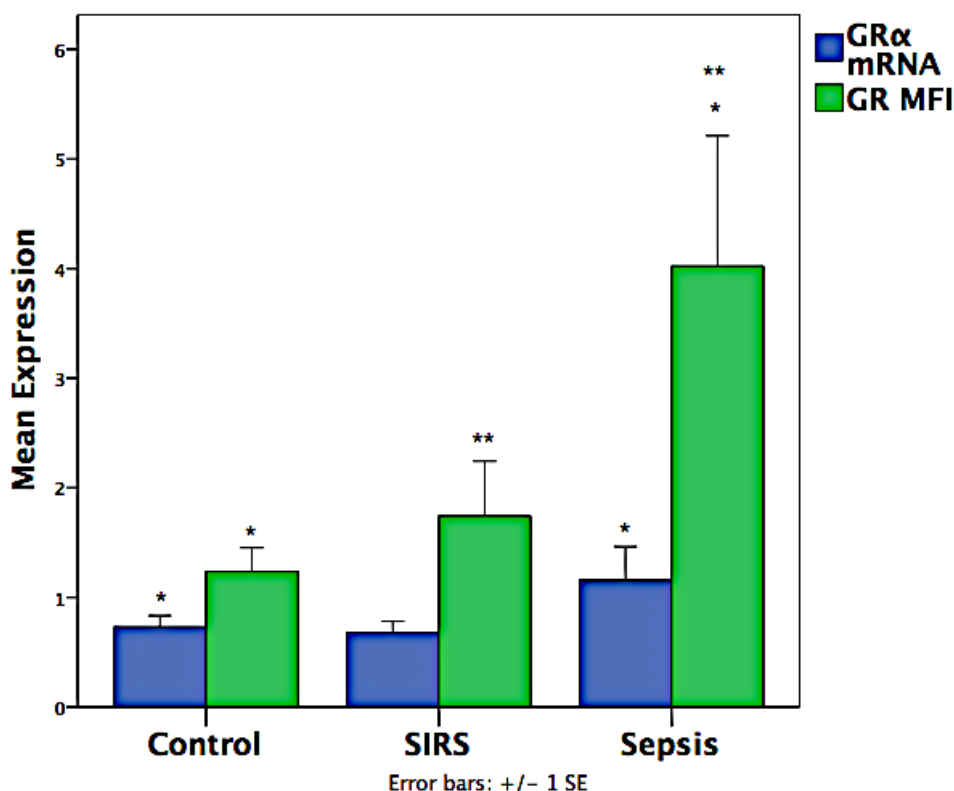
SIRS, Systematic Inflammatory Response Syndrome; APACHE, Acute Physiology and Chronic Evaluation; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SAPS III, Simplified Acute Physiology Score; CRP, C-Reacting Protein; PCT, Procalcitonin; WBC, White Blood Cells; GRα, glucocorticoid receptor α-isoform; eHSP, extracellular heat shock protein; nHSP, neutrophil-HSP; mHSP, monocyte-HSP; MFI, Mean Fluorescence Intensity; IL, interleukin; IFN-γ, interferon gamma

5.2 Σχετική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ολικό αίμα και ενδοκυττάρια έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

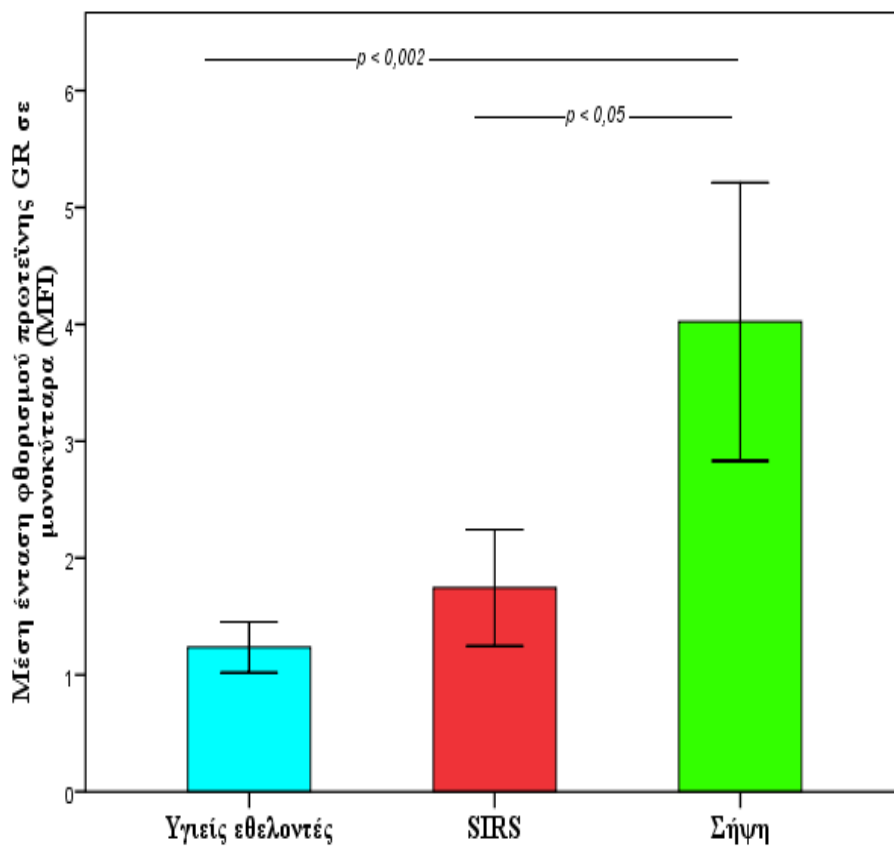
Παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής έκφρασης του mRNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR mRNA) σε ασθενείς με σήψη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 30]. Η σχετική έκφραση hGR mRNA δεν διέφερε μεταξύ ανδρών - γυναικών.

Διαπιστώθηκε επίσης, σημαντική αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση της ισομορφής α του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα, μεταξύ ασθενών με σήψη και εθελοντών ($p < 0.002$) και ασθενών με σήψη και πολυτραυματιών ($p < 0.05$) [Εικόνα 31]. Στην ομάδα ελέγχου, η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ήταν σαφώς μικρότερη σε σχέση με τους ασθενείς της μελέτη μας.

Οι επιζώντες, κατά τη διάρκεια της νοσηλείας στη ΜΕΘ είχαν μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάρια υποδοχέα σε σχέση με τους μη επιζώντες [Εικόνα 32].



Εικόνα 30. Απεικονίζεται η πρωτεϊνική έκφραση της ισομορφής α του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα και το mRNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR mRNA) σε ολικό αίμα ασθενών με σήψη, πολυτραυματιών και υγιών εθελοντών.

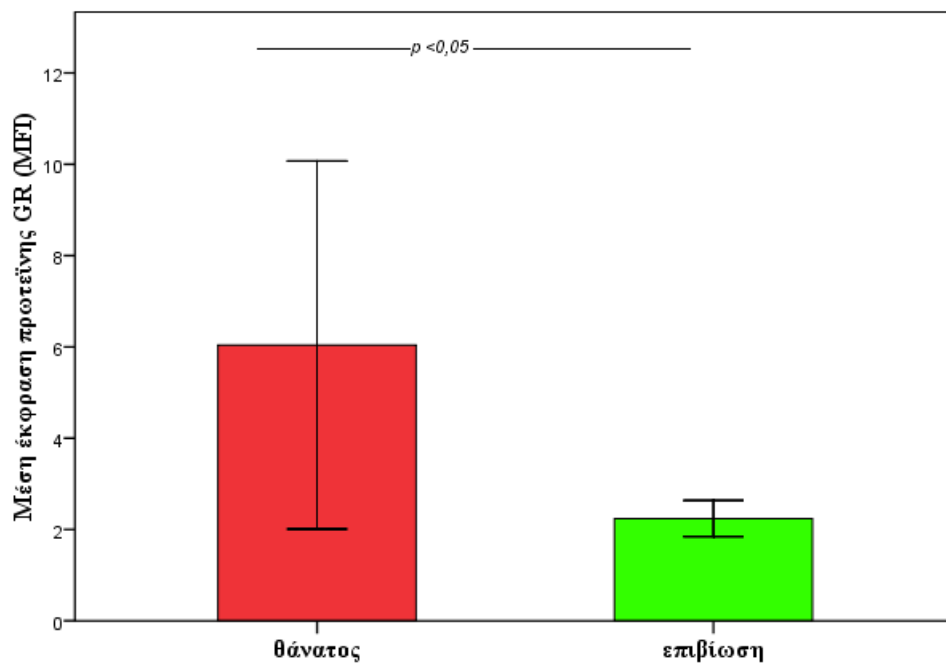


Εικόνα 31.

Η ενδοκυττάρια έκφραση της ισομορφής α του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα σε υγιείς εθελοντές ενήλικες (μπλέ χρώμα), πολυτραυματίες με SIRS (μωβ χρώμα) και ασθενείς με σοβαρή σήψη (πράσινο χρώμα)

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $p < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα



Εικόνα 32.

Παρουσιάζεται η Μέση Ένταση Φθορισμού (MFI) του ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα ασθενών που επιβίωσαν (κόκκινο χρώμα) και αυτών που κατέληξαν (πράσινο χρώμα) κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους στη ΜΕΘ. Οι ασθενείς που επιβίωσαν είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

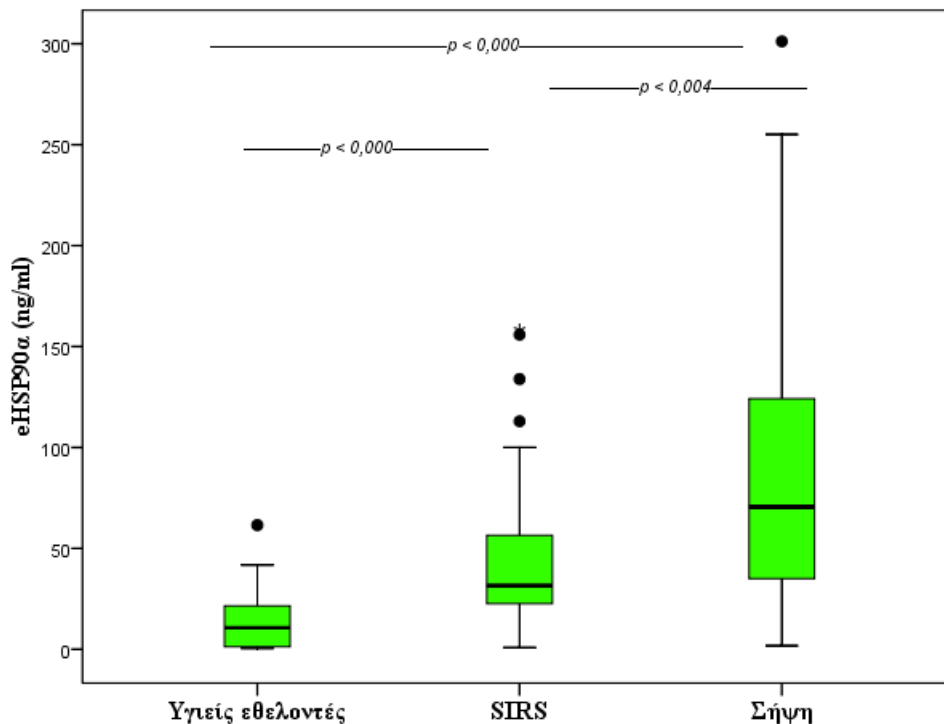
Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)
Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα.

5.3 Εξωκυττάριες πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των εξωκυττάριων πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSP90α τόσο στους ασθενείς με άσηπτη φλεγμονή, όσο και στους ασθενείς με σοβαρή σήψη, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 33].

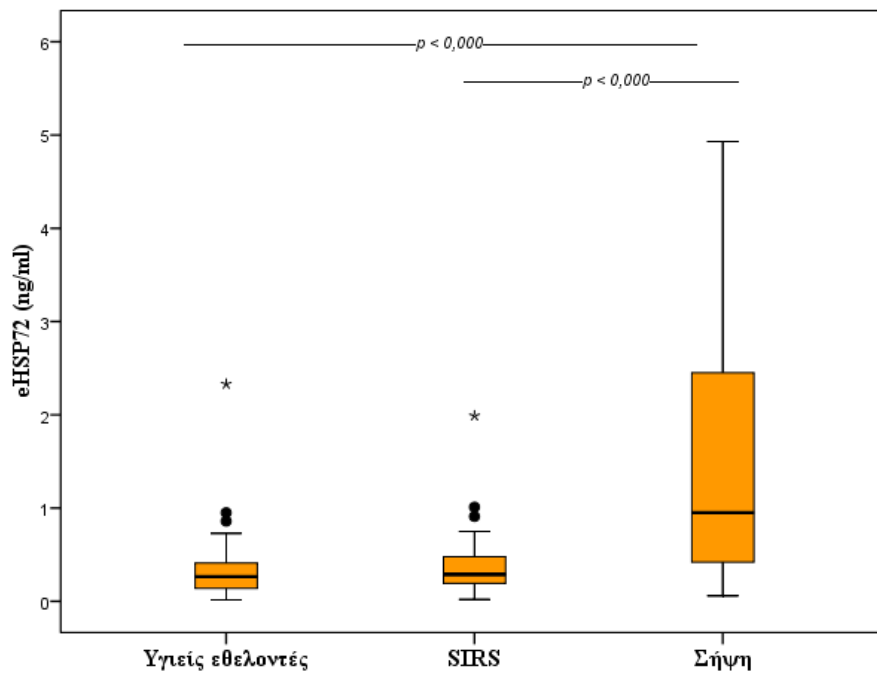
Διαφορά σημειώθηκε και μεταξύ των δυο υποομάδων ασθενών με τα επίπεδα της HSP90α στο πλάσμα να αυξάνονται, ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου.

Τα επίπεδα της HSP72 στον ορό ασθενών με σήψη ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες μελέτης [Εικόνα 34]. Αντιθέτως, δεν παρατηρήσαμε διαφορά στα επίπεδα της HSP72 μεταξύ υγιών εθελοντών και πολυτραυματιών.



Εικόνα 33.

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης HSP90α στο πλάσμα υγιών εθελοντών, ασθενών με SIRS και σήψη. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test). Κάθε πλαίσιο απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (T-bar) απεικονίζουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι τιμές εκτός των ορίων των απολήξεων θεωρούνται ακραίες και υποδεικνύονται στο γράφημα με κύκλους ή αστερίσκους.



Εικόνα 34

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης HSP72 στον ορό υγιών εθελοντών, ασθενών με SIRS και σήψη.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

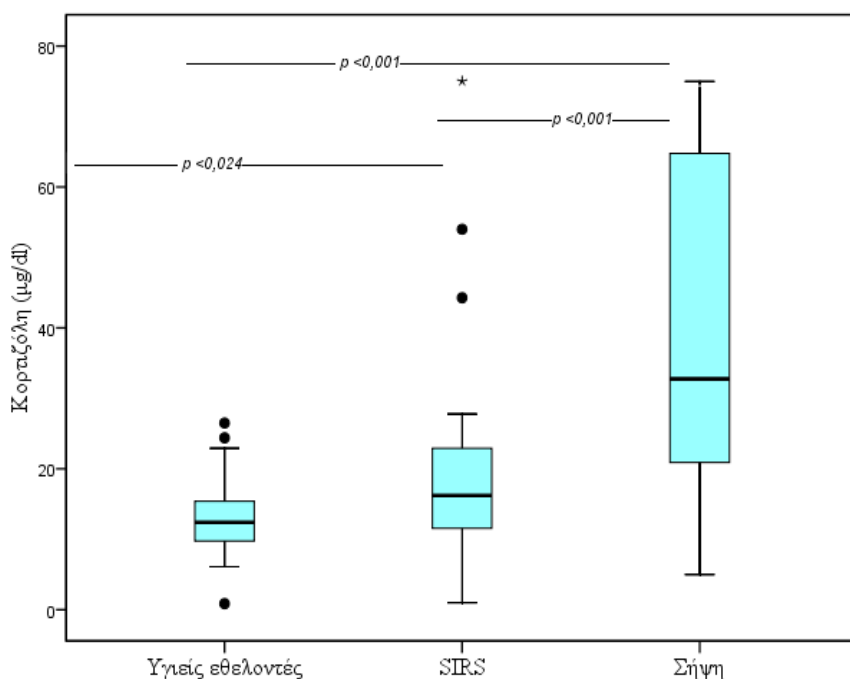
Κάθε πλαίσιο απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (T-bar) απεικονίζουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι τιμές εκτός των ορίων των απολήξεων θεωρούνται ακραίες και υποδεικνύονται στο γράφημα με κύκλους ή αστερίσκους.

5.4 Κορτιζόλη προλακτίνη και ACTH

Τα επίπεδα κορτιζόλης ορού ήταν αυξημένα σε ασθενείς με σήψη σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες μελέτης [Εικόνα 35].

Η προλακτίνη, αυξήθηκε σημαντικά σε ασθενείς με SIRS και σήψη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 36].

Τα επίπεδα ACTH στον ορό πολυτραυματιών ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα υγιών εθελοντών και σηπτικών ασθενών [Εικόνα 37].

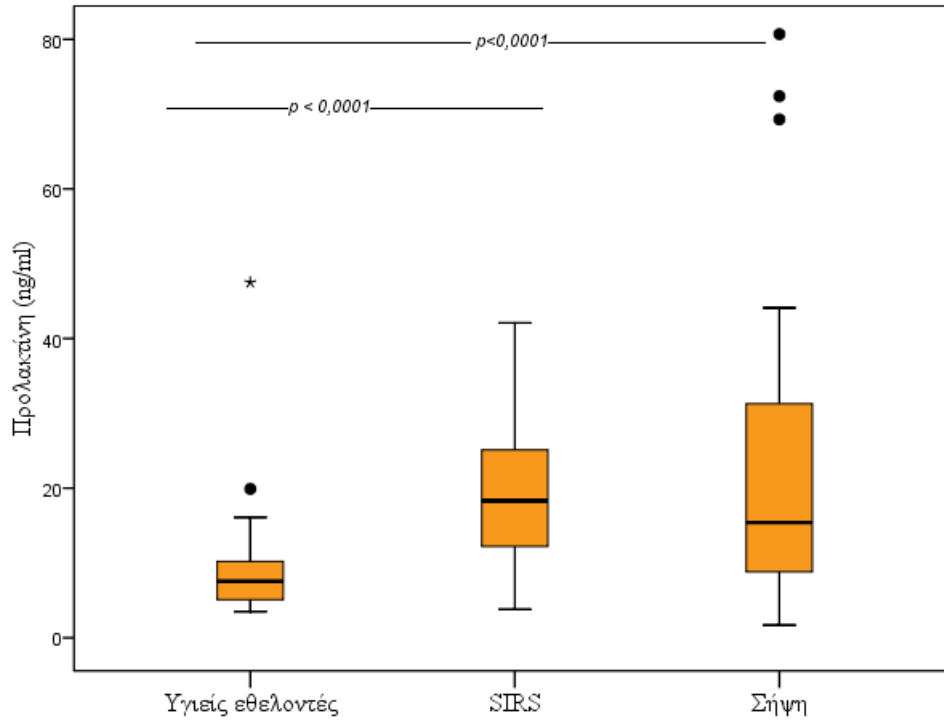


Εικόνα 35

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης κορτιζόλης ορού (mg/dL) σε υγιείς ενήλικες, πολυτραυματίες και ασθενείς με σοβαρή σήψη

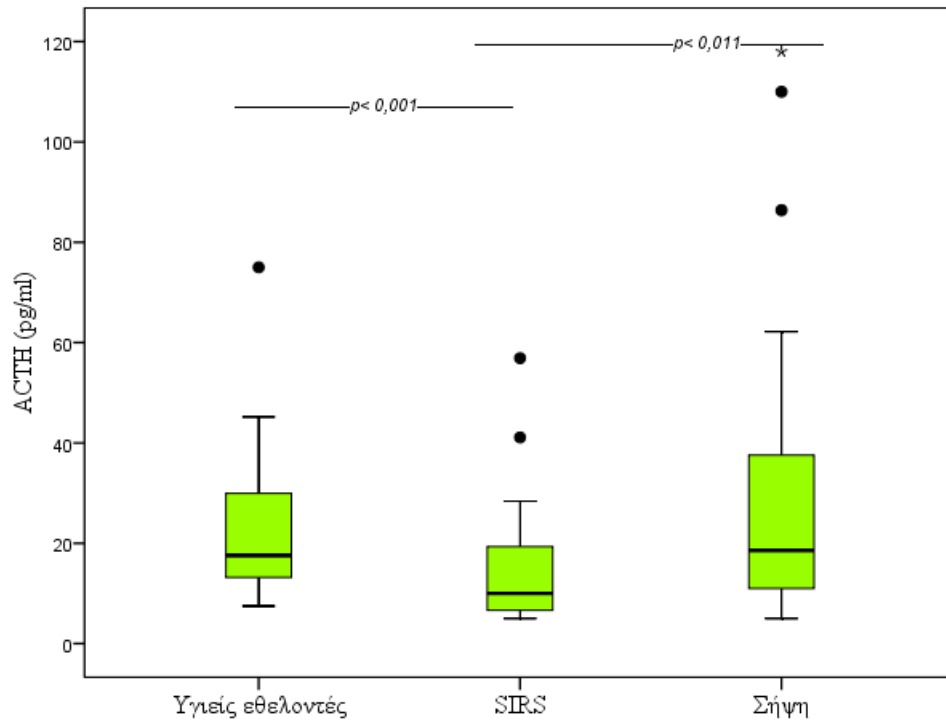
Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

Κάθε πλαίσιο απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (T-bar) απεικονίζουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι τιμές εκτός των ορίων των απολήξεων θεωρούνται ακραίες και υποδεικνύονται στο γράφημα με κύκλους ή αστερίσκους.



Εικόνα 36

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης προλακτίνης ορού (ng/Dl) σε υγιείς ενήλικες, πολυτραυματίες και ασθενείς με σοβαρή σήψη
 Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)



Εικόνα 37.

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης ACTH ορού με την χρήση στερεάς φάσης ανταγωνιστικής μεθόδου ένζυμο-ανοσοχημειοφωταύγειας.

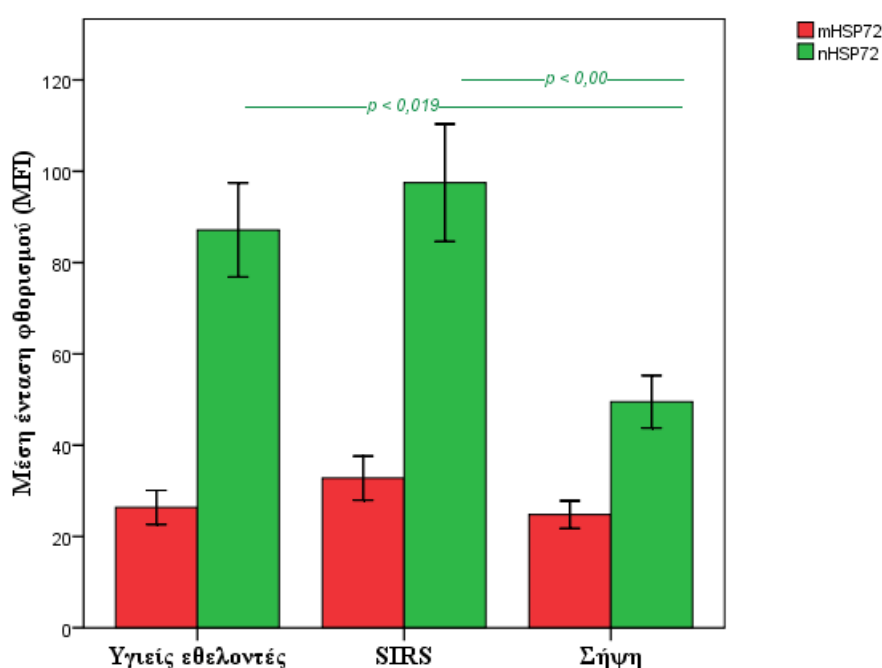
Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

5.5 Ενδοκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της HSP72 στα ουδετερόφιλα (nHSP70) των ασθενών με σήψη σε σχέση με υγιείς εθελοντές ($p < 0.000$) και πολυτραυματίες ($p < 0.019$) [Εικόνα 38].

Οι ασθενείς με SIRS παρουσίαζαν αυξητική τάση των επιπέδων τους σε σχέση με τους πολυτραυματίες.

Αντιθέτως, τα ενδοκυττάρια επίπεδα HSP90 στα ουδετερόφιλα (nHSP70) των ασθενών με σηπτική καταπληξία παρουσίασαν αύξηση σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές ($p < 0.05$) [Εικόνα 39].

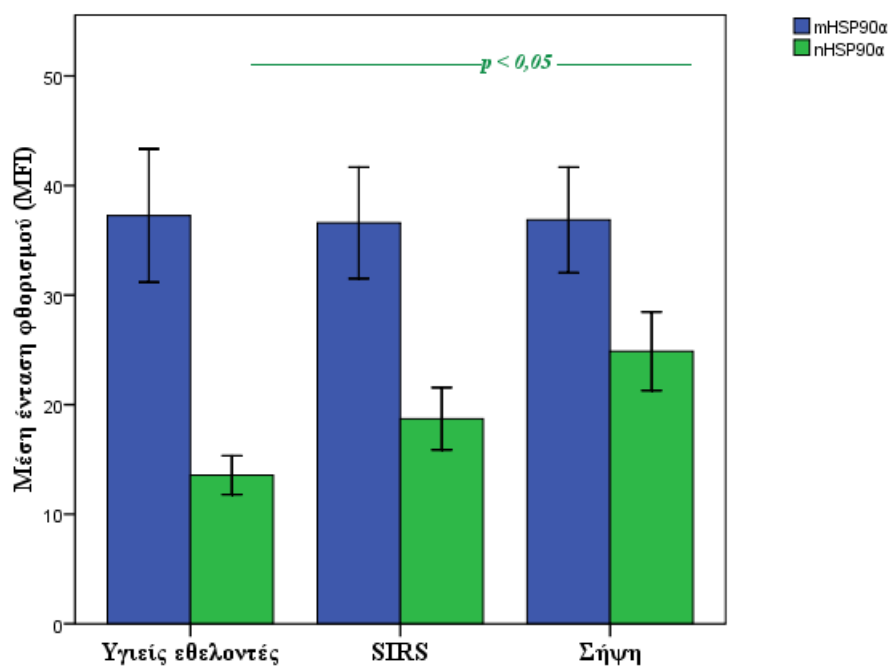


Εικόνα 38.

Μέση ένταση φθορισμού ενδοκυττάριας HSP70 σε μονοκύτταρα (mHSP70) και ουδετερόφιλα (nHSP70) κύτταρα περιφερικού αίματος.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 39.

Μέση ένταση φθορισμού ενδοκυττάριας HSP90α σε μονοκύτταρα (mHSP90α) και ουδετερόφιλα (nHSP90α) κύτταρα περιφερικού αίματος.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

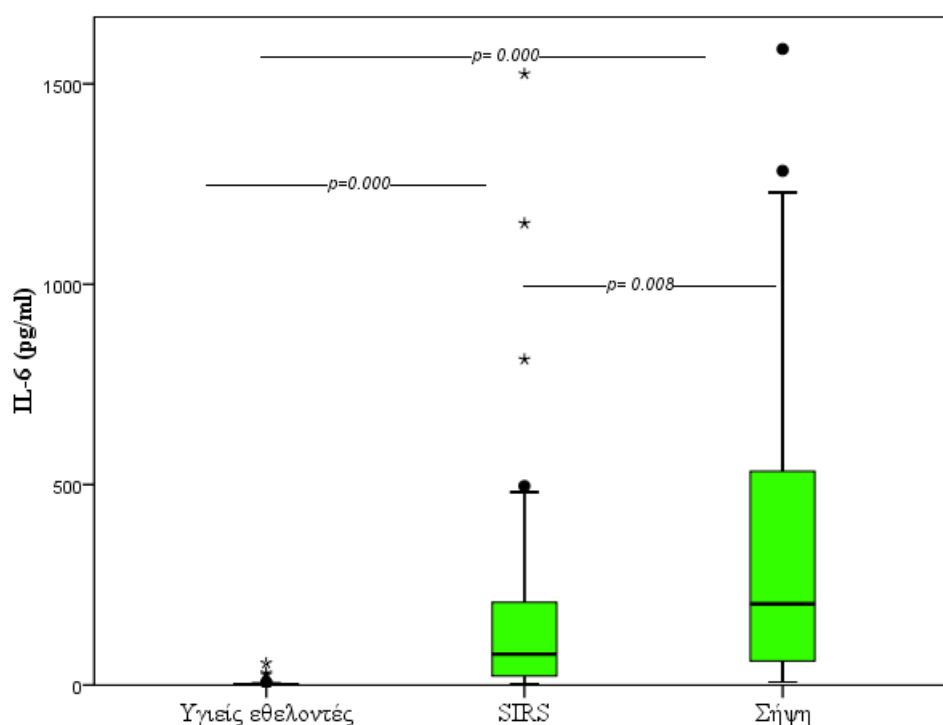
Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα

5.6 Ιντερλευκίνες ορού

Οι συγκεντρώσεις της IL-6 και IL-10 στον ορό των σηπτικών ασθενών ήταν σημαντικά συζημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στον ορό υγιών εθελοντών και πολυτραυματιών [Εικόνα 40-41].

Η συγκέντρωση της IL-6 παρουσίασε σημαντική αύξηση στους πολυτραυματίες σε σχέση με την ομάδα των υγιών εθελοντών.

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στα επίπεδα IFN- γ μεταξύ των ομάδων σήψης και SIRS [Εικόνα 42].

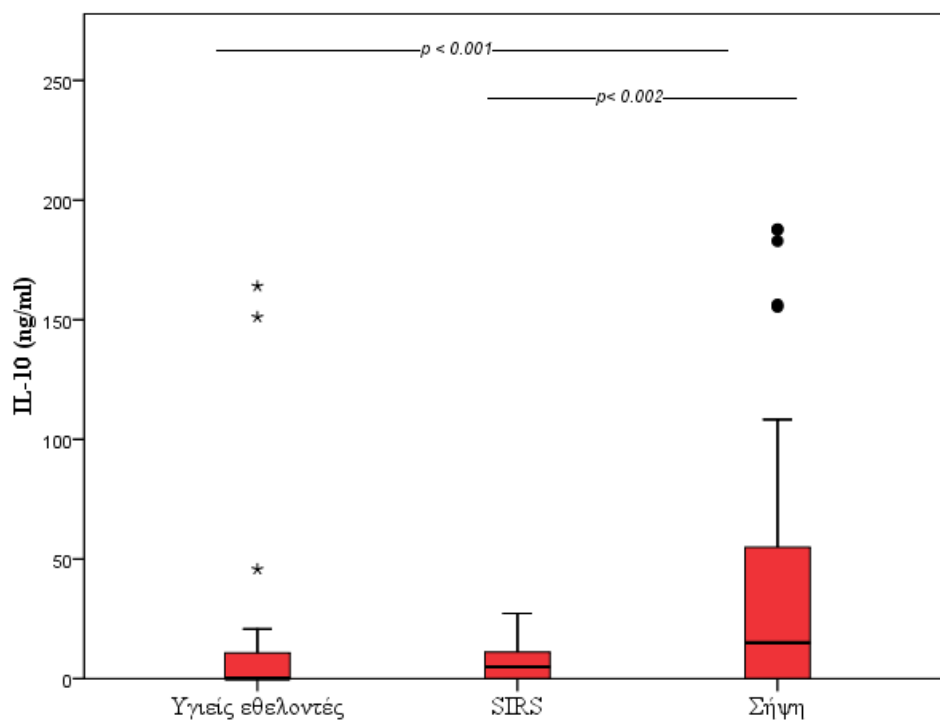


Εικόνα 40.

Θηκόγραμμα της συγκέντρωσης IL-6 (pg/ml) ορού στις ομάδες μελέτης μας.

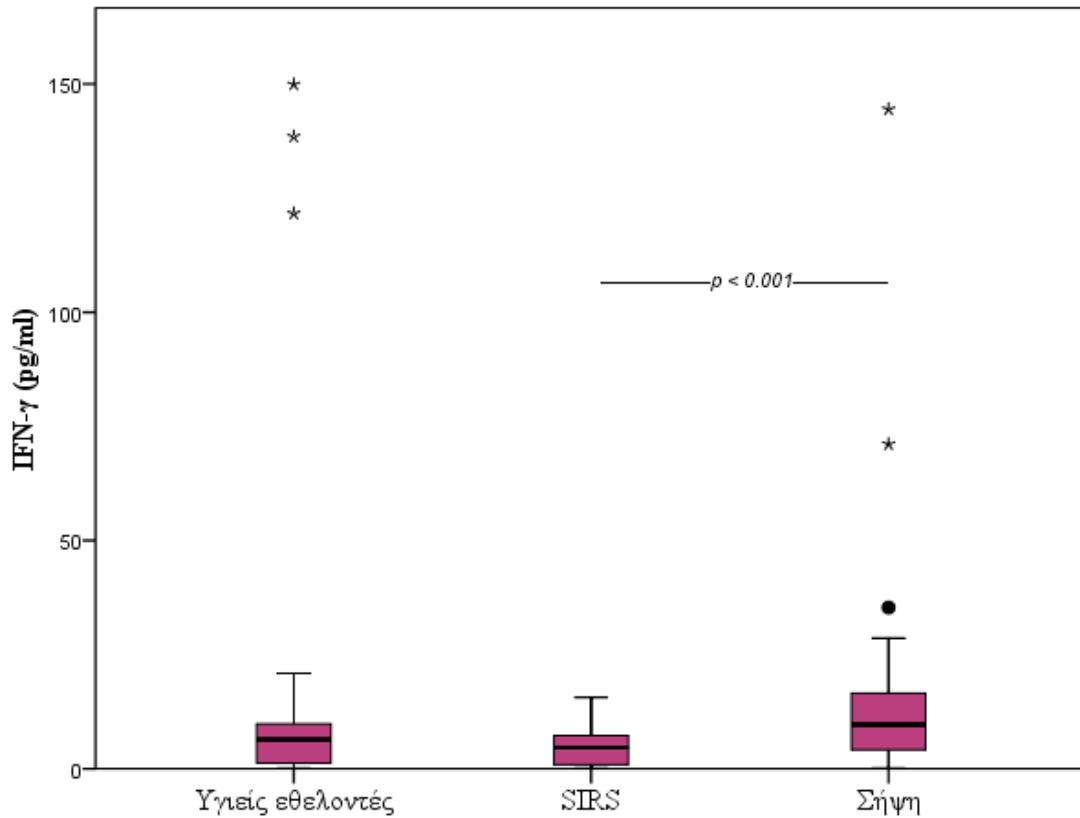
Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 41.

Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης IL-10 (pg/ml) ορού στις ομάδες μελέτης μας. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test) Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα



Εικόνα 42.

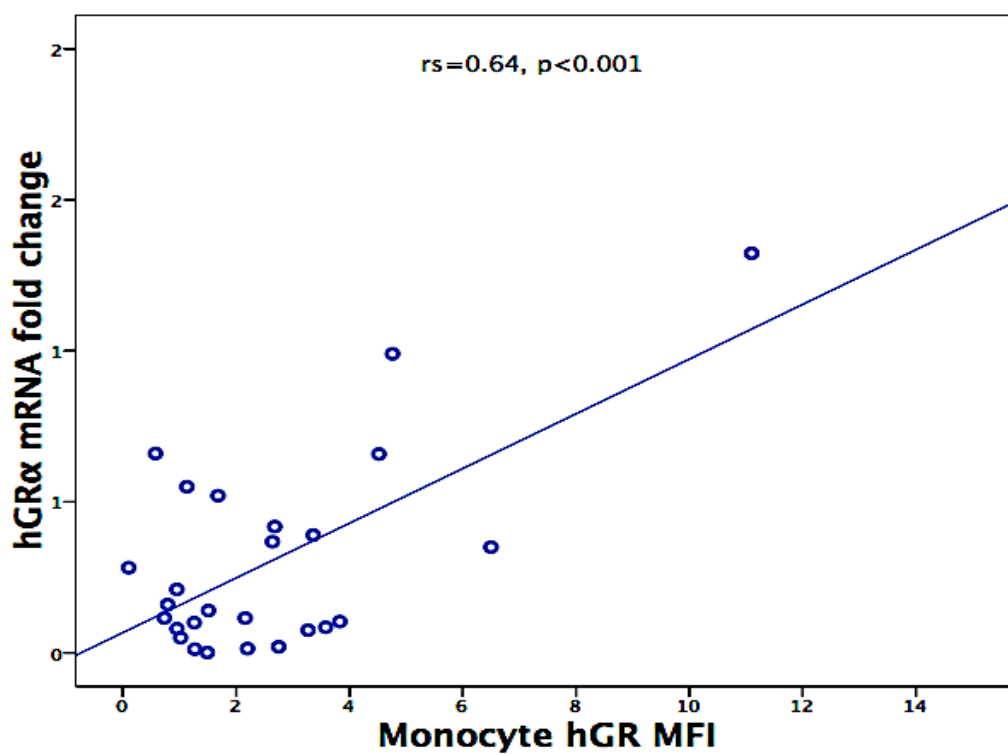
Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων της συγκέντρωσης IF- γ (pg/ml) ορού στις ομάδες μελέτης μας
 Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)
 Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα

5.7 Ανάλυση συσχετίσεων

Η πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα και η γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ολικό αίμα συσχετίστηκαν σημαντικά μεταξύ τους ($r_s=0,64$, $p<0,0001$), ακόμα και όταν η πρωτεΐνη του υποδοχέα σταθμίσθηκε με βάση το ποσοστό των μονοκυττάρων στα λευκά αιμοσφαίρια ($r_s=0,59$, $p<0,01$) [Εικόνα 43]. Η πρωτεΐνη hGR συχετίσθηκε θετικά με την εξωκυττάρια HSP72 ($r_s=0,41$, $p<0,02$) και την εξωκυττάρια HSP90α ($r=0,04$, $p=0,01$) [Εικόνα 44-45]. Θετική συσχέτιση παρουσίασε επίσης με την κορτιζόλη ($r_s=0,38$, $p<0,03$), τη μέση ένταση φθορισμού της HSP90α στα μονοκύτταρα ($r_s=0,6$, $p<0,001$), την IL-6 ($r_s=0,5$, $p<0,003$) και την IL-10 ($r_s=0,40$, $p<0,025$) [Εικόνα 45-50]. Αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και PO_2 ($r_s=-0,72$, $p<0,02$), PO_2/FiO_2 ($r_s=-0,76$, $p<0,005$) και αλβουμίνης ($r_s=-0,38$, $p<0,002$) και θετική με το προγνωστικό σκορ βαρύτητας SOFA ($r_s=-0,56$, $p <0,03$).

Η γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών συσχετίστηκε με την eHSP72 ($r_s=0,34$, $p<0,02$), ACTH ($r_s=0,36$, $p<0,005$), IFN- γ ($r_s=0,42$, $p=0,001$), CRP ($r_s=0,25$, $p<0,05$) και τα λευκά αιμοσφαίρια ($r_s=0,38$, $p<0,002$) [Εικόνα 51-52].

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και προλακτίνης, θερμοκρασίας, γαλακτικού, γλυκόζης ή προγνωστικών σκορ βαρύτητας APACHE II, SAPS III ή SOFA.

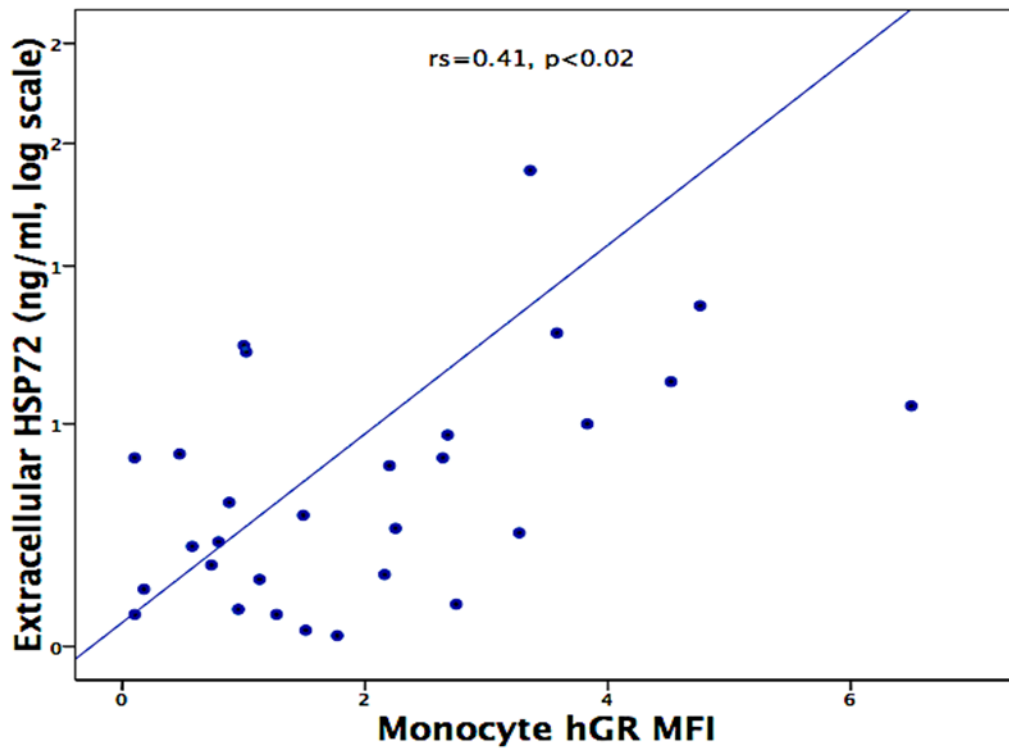


Εικόνα 43.

Διάγραμμα σημείων (scatterplots) της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με τη μέση ένταση φθορισμού του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών .

hGRα: human glucocorticoid receptor α -isoform

MFI: Mean Fluorescence Intensity

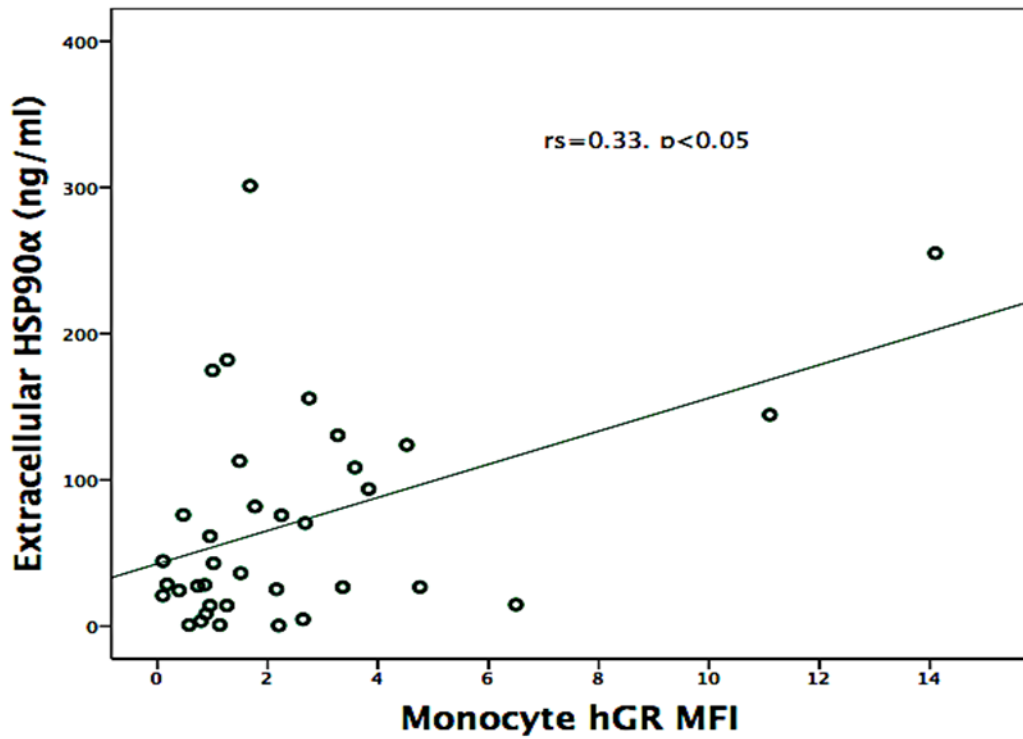


Εικόνα 44.

Διάγραμμα σημείων της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με τη συγκέντρωση της εξωκυττάριας HSP72.

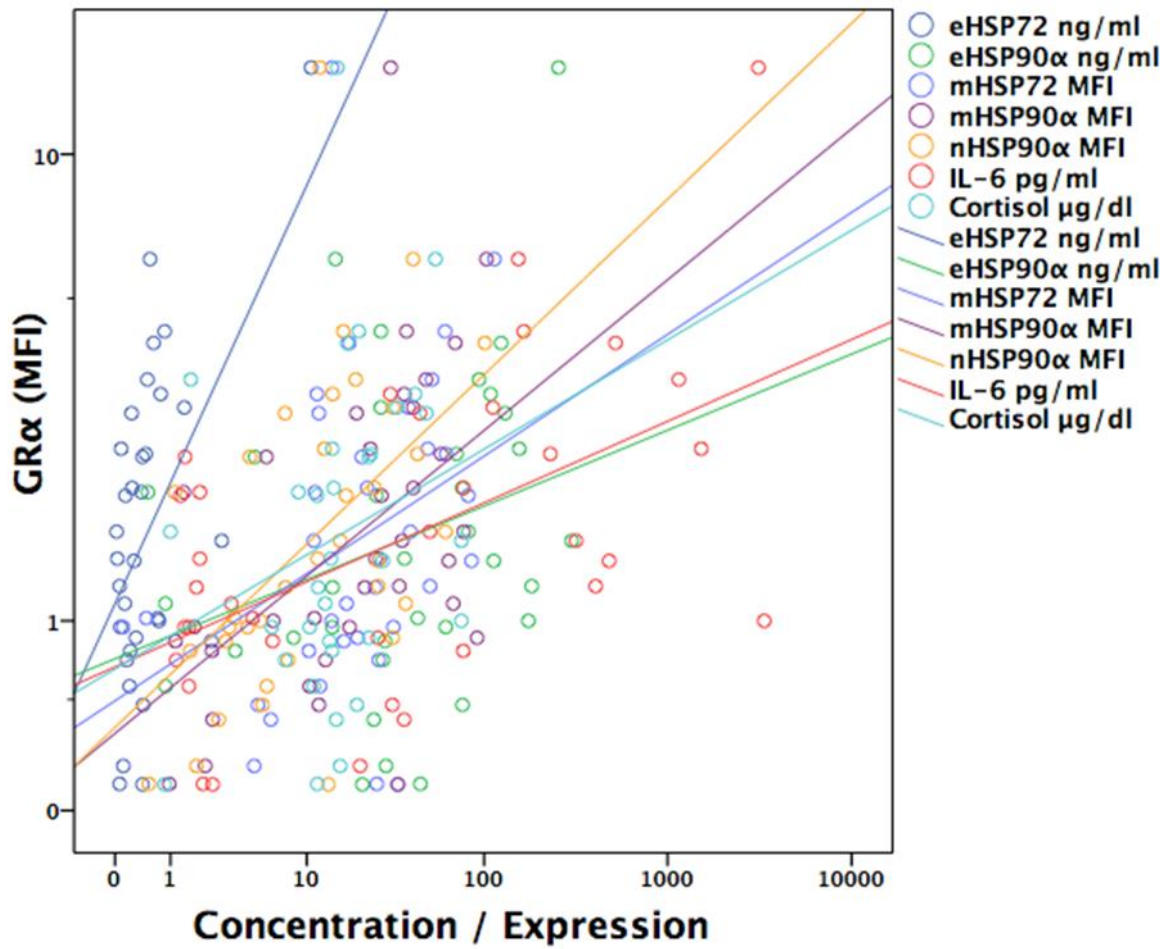
hGRα: human glucocorticoid receptor α-isoform, MFI: Mean Fluorescence Intensity

eHSP 72:extracellular heat shock protein HSP72



Εικόνα 45.

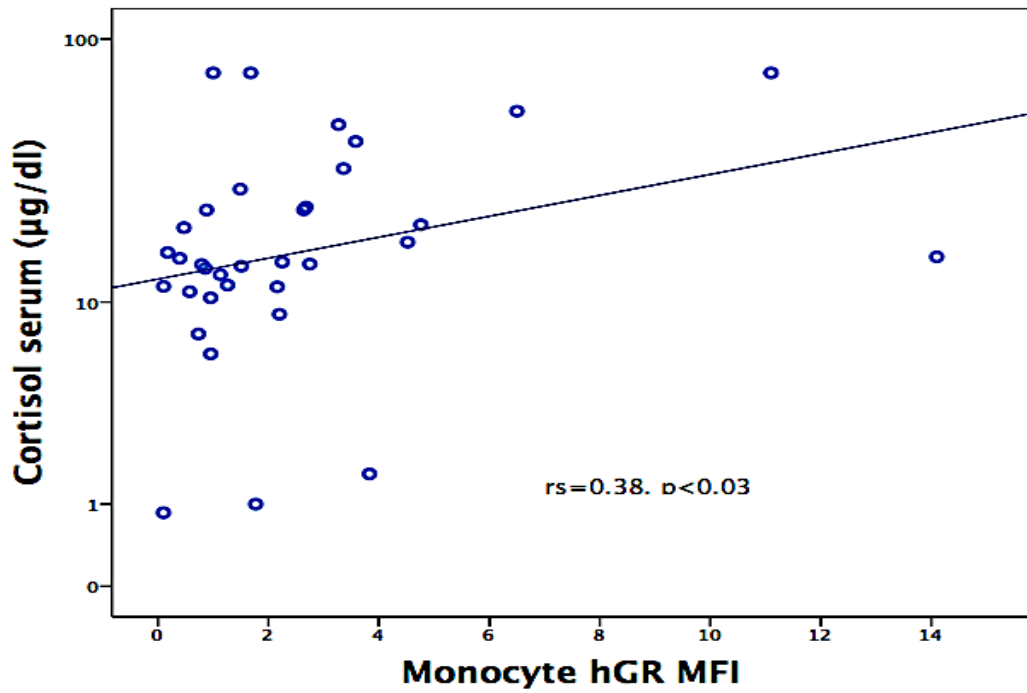
Διάγραμμα σημείων της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (μέση ένταση φθορισμού) σε σχέση με τη συγκέντρωση ορού της εξωκυττάριας HSP90α.



Εικόνα 46

Διάγραμμα πολλαπλών σημείων των συσχετίσεων της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (μέση ένταση φθορισμού) με τη συγκέντρωση της εξωκυττάριας HSP90α και HSP72, τη συγκέντρωση της ενδοκυττάριας HSP90α και HSP72 στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα και τη συγκέντρωση της κορτιζόλης.

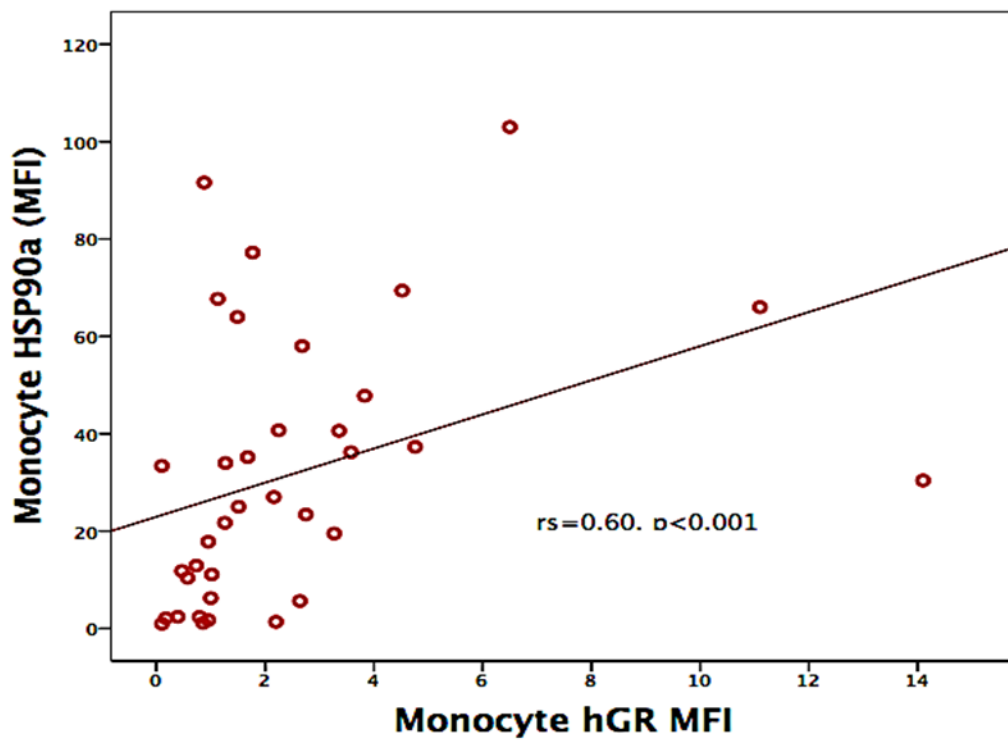
hGRα: human glucocorticoid receptor α-isoform



Εικόνα 47.

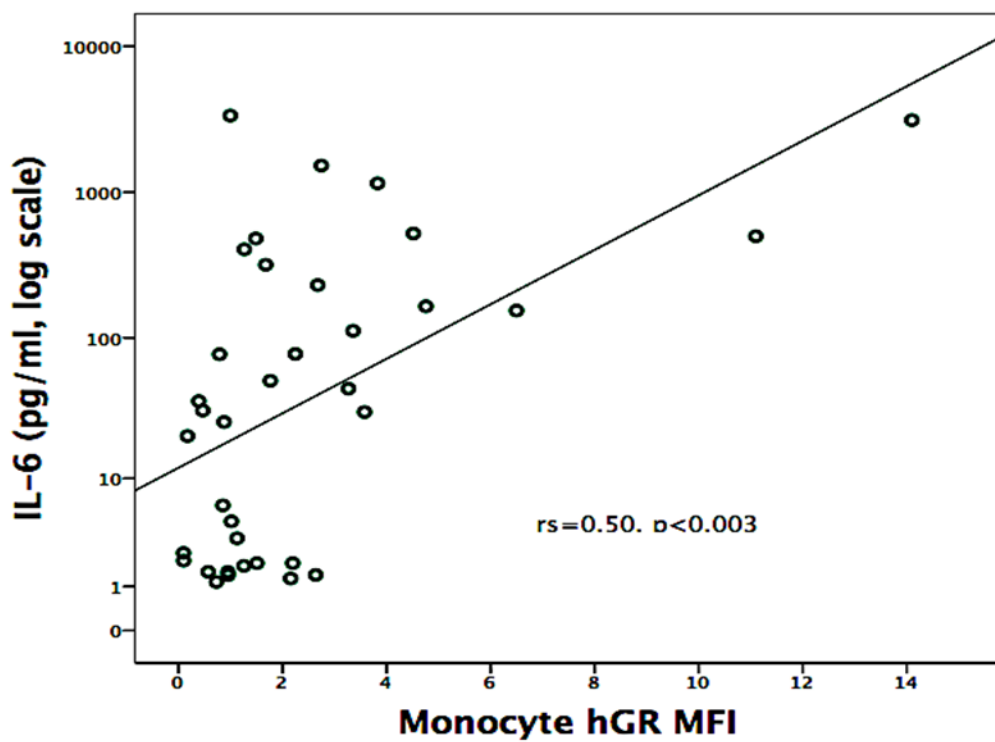
Διάγραμμα σημείων της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (μέση ένταση φθορισμού) σε σχέση με τη συγκέντρωση κορτιζόλης ορού.

hGR: human glucocorticoid receptor α -isoform
MFI: Mean Fluorescence Intensity



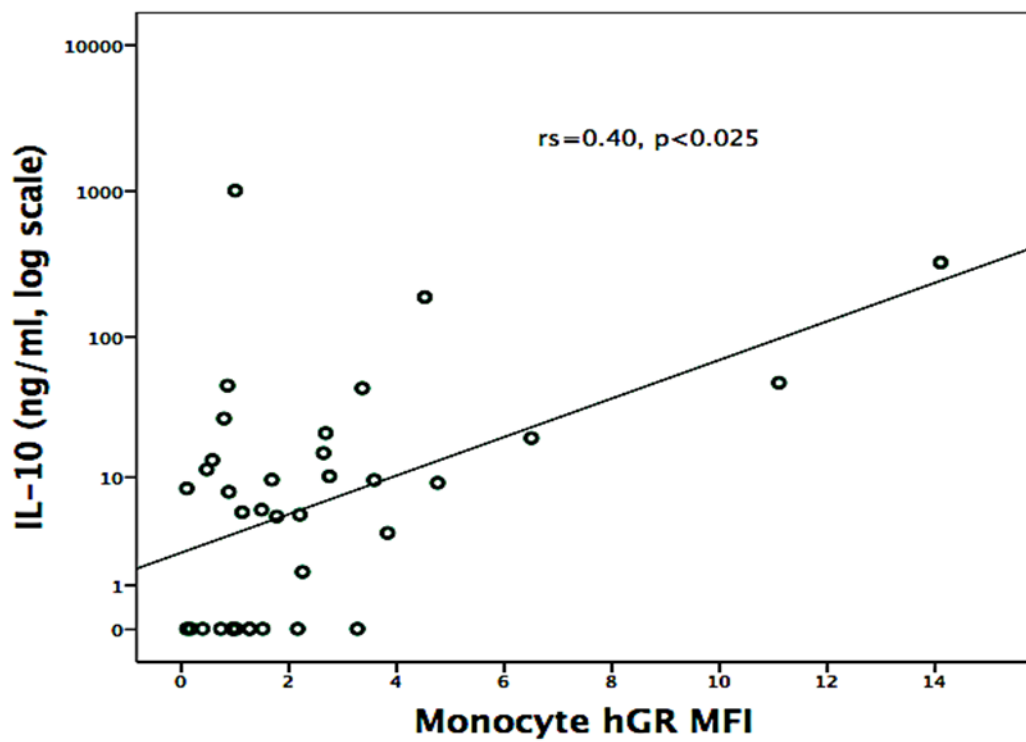
Εικόνα 48.

Διαγραμμα σημείων (scatterplots) της μέσης έντασης φθορισμού του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με την μέση ένταση φθορισμού της HSP90α.



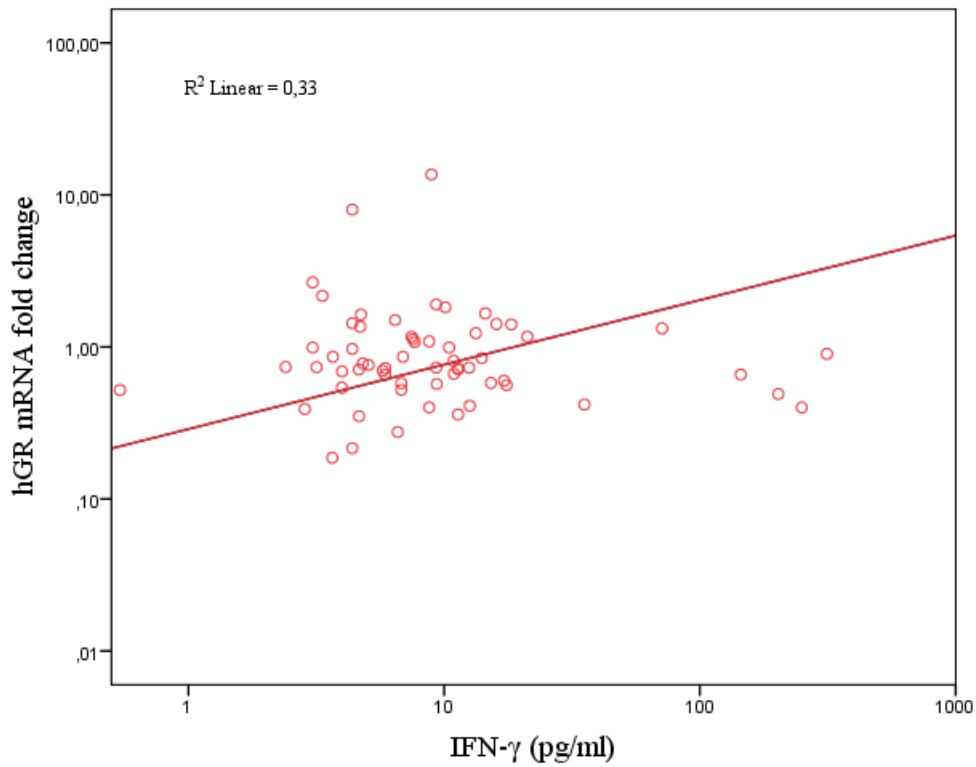
Εικόνα 49.

Διάγραμμα σημείων της πρωτεΐνης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (μέση ένταση φθορισμού) σε σχέση με τη συγκέντρωση ορού της IL-6.



Εικόνα 50.

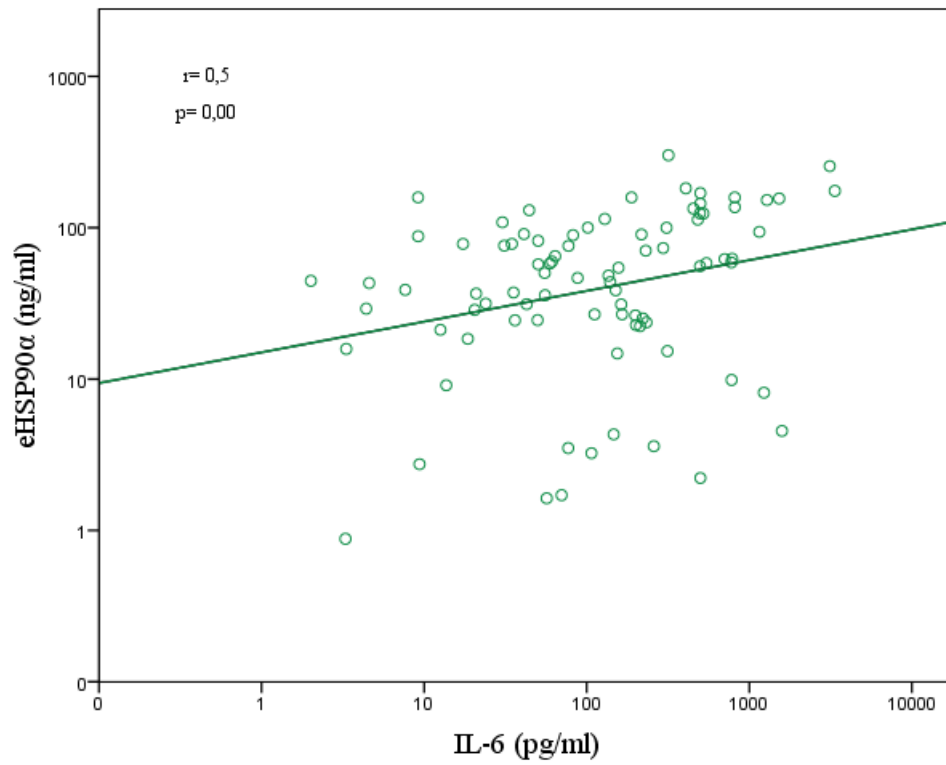
Διαγραμμα σημείων (scatterplots) της μέσης έντασης φορτισμού του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με τη συγκέντρωση ορού της IL-10.



Εικόνα 51.

Διάγραμμα σημείων (scatterplots) της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με την συγκέντρωση ιντερφερόνης ορού.

GRα: glucocorticoid receptor α-isoform
IFN-γ: interferon gamma



Εικόνα 52.

Διάγραμμα σημείων (scatterplots) της συγκέντρωσης εξωκυττάριας HSP90α σε σχέση με την ιντερλευκίνη 6.

eHSP: extracellular heat shock protein

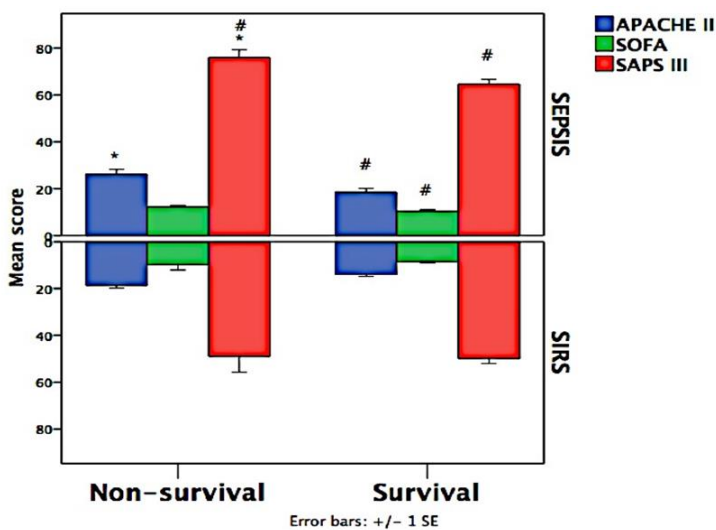
IL: interleukin

5.8 Θνητότητα

Στην ομάδα των σηπτικών ασθενών, τα προγνωστικά σκορ βαρύτητας APACHE II ($p < 0,001$), SAPS III ($p < 0,02$) ή SOFA ($p < 0,02$) ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς που επιβίωσαν σε σχέση με τους μη επιζήσαντες [Εικόνα 53]. Στην ομάδα των πολυτραυματιών, τα επίπεδα εξωκυττάριας HSP90α ($p < 0,02$) ήταν υψηλότερα στους μη επιζήσαντες.

Συγκρίνοντας τις δύο ομάδες ασθενών που νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ, τα επίπεδα APACHE II ($p < 0,03$), SAPS III ($p < 0,001$) ή SOFA ($p < 0,03$), κορτιζόλης ($p = 0,001$), εξωκυττάριας HSP72 ($p < 0,001$), εξωκυττάριας HSP90α ($p < 0,02$), IL-6 ($p = 0,005$) και IL-10 ($p < 0,01$) ήταν υψηλότερα σε ασθενείς που επιβίωσαν με σήψη σε σχέση με ασθενείς που επιβίωσαν με SIRS.

Από τους ασθενείς που κατέληξαν, τα επίπεδα SAPS III ($p < 0,01$), κορτιζόλης ($p < 0,02$), ACTH ($p < 0,04$), εξωκυττάριας HSP72 ($p < 0,05$) και IFN- γ ($p < 0,02$) ήταν υψηλότερα σε σηπτικούς ασθενείς σε σχέση με πολυτραυματίες [Εικόνα 54-58].



Εικόνα 53.

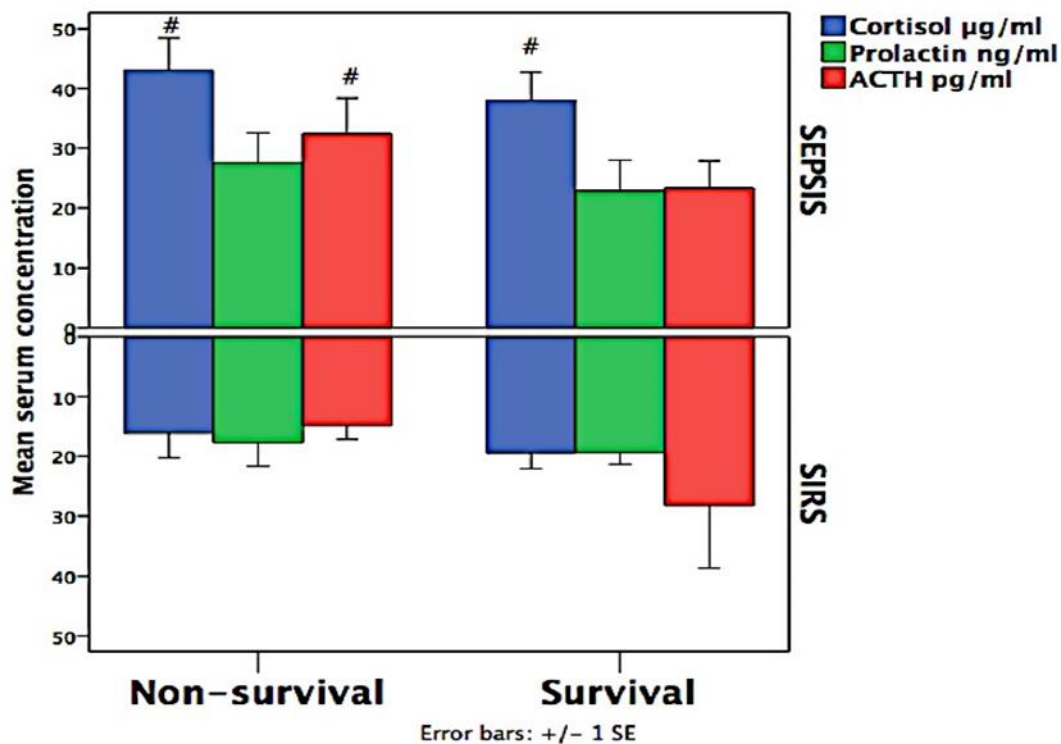
Συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με σήψη και SIRS σε επιζώντες και μη επιζώντες σε σχέση με την βαρύτητα της νόσου.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0,05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ επιζήσαντων και μη επιζήσαντων σε κάθε διαγνωστική ομάδα

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ SIRS και σήψης σε κάθε υπο-ομάδα

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα



Εικόνα 54.

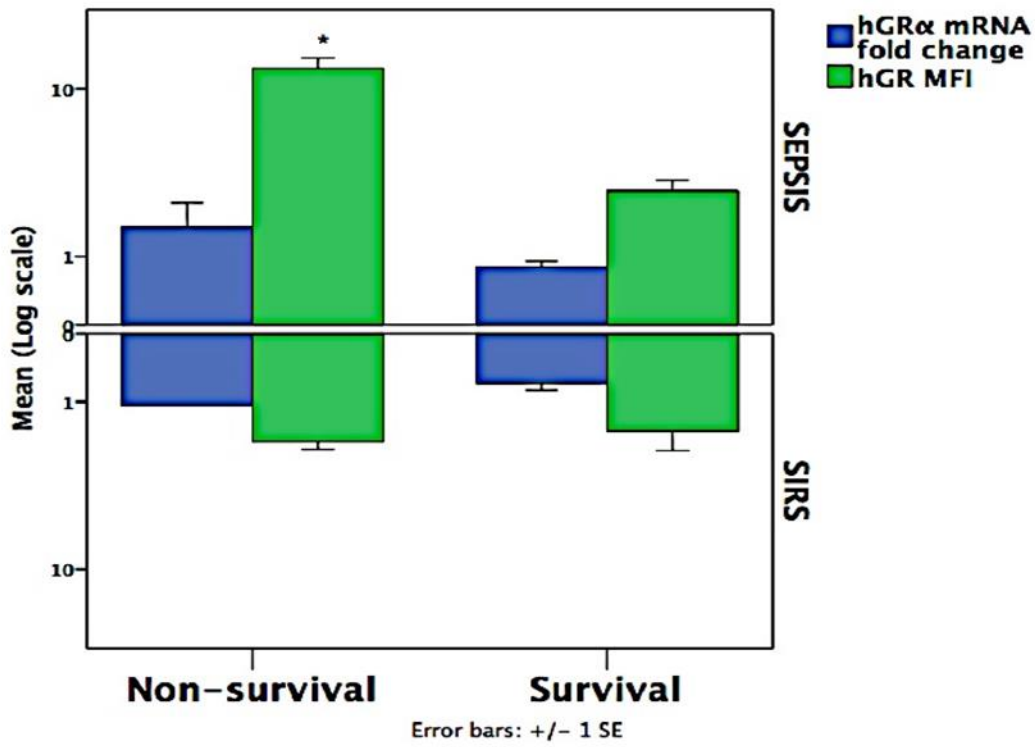
Συγκρίσεις ασθενών με SIRS και σήψη, σε ασθενείς που επιβίωσαν και σε αυτούς που κατέληξαν κατά την παραμονή τους στην ΜΕΘ, σε σχέση με την μέση συγκέντρωση των ορμονών κορτιζόλης, προλακτίνης και ACTH.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που επιβίωσαν και ασθενών που κατέληξαν σε κάθε διαγνωστική ομάδα

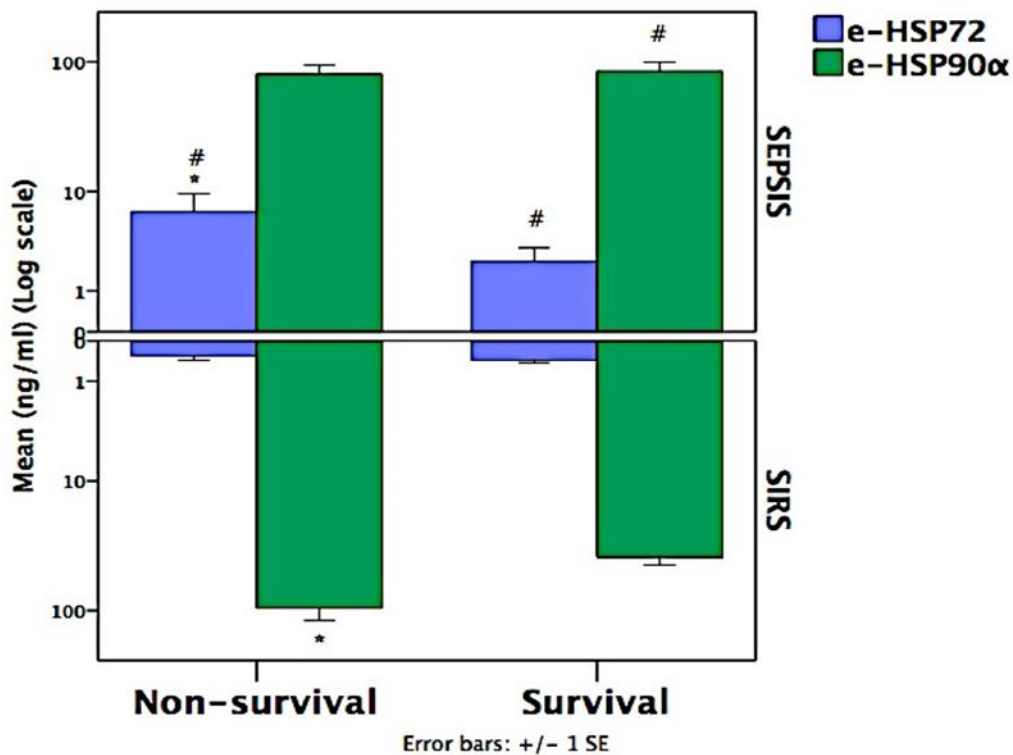
Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ SIRS και σήψης σε κάθε υπο-ομάδα

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) τυπικό σφάλμα



Εικόνα 55.

Απεικόνιση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς που επιβίωσαν και σε αυτούς που κατέληξαν.



Εικόνα 56.

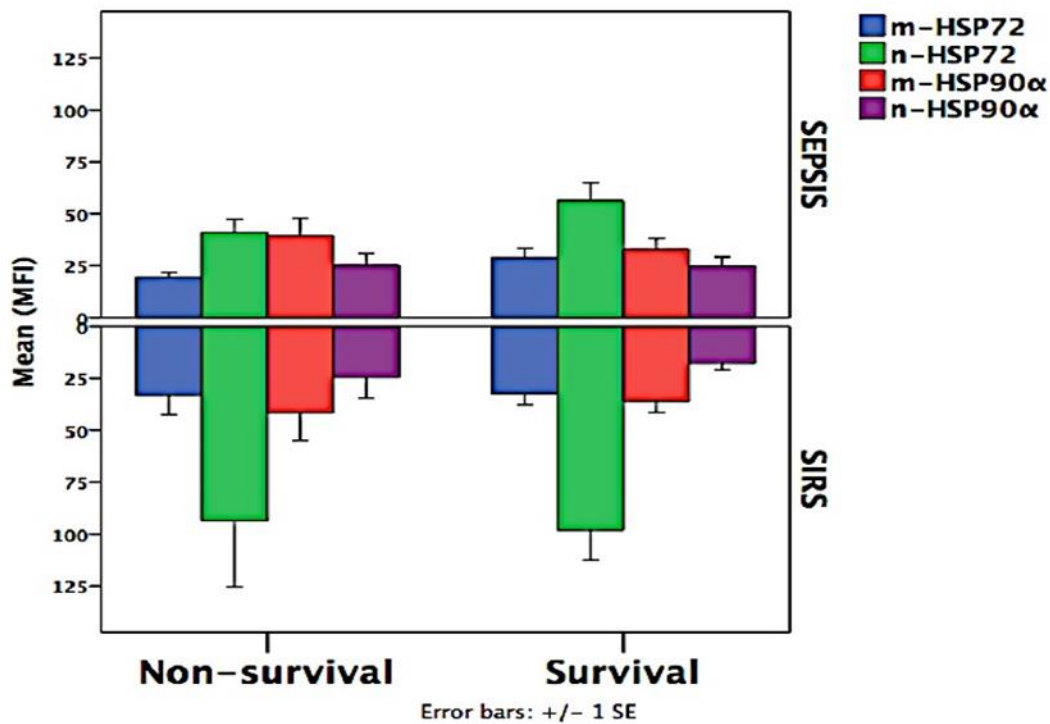
Συγκρίσεις ασθενών με SIRS και σήψη σε σχέση με τις εξωκυττάριας HSP90α και HSP72.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που επιβίωσαν και ασθενών που κατέληξαν σε κάθε διαγνωστική ομάδα

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ SIRS και σήψης σε κάθε υπο-ομάδα

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα



Εικόνα 57.

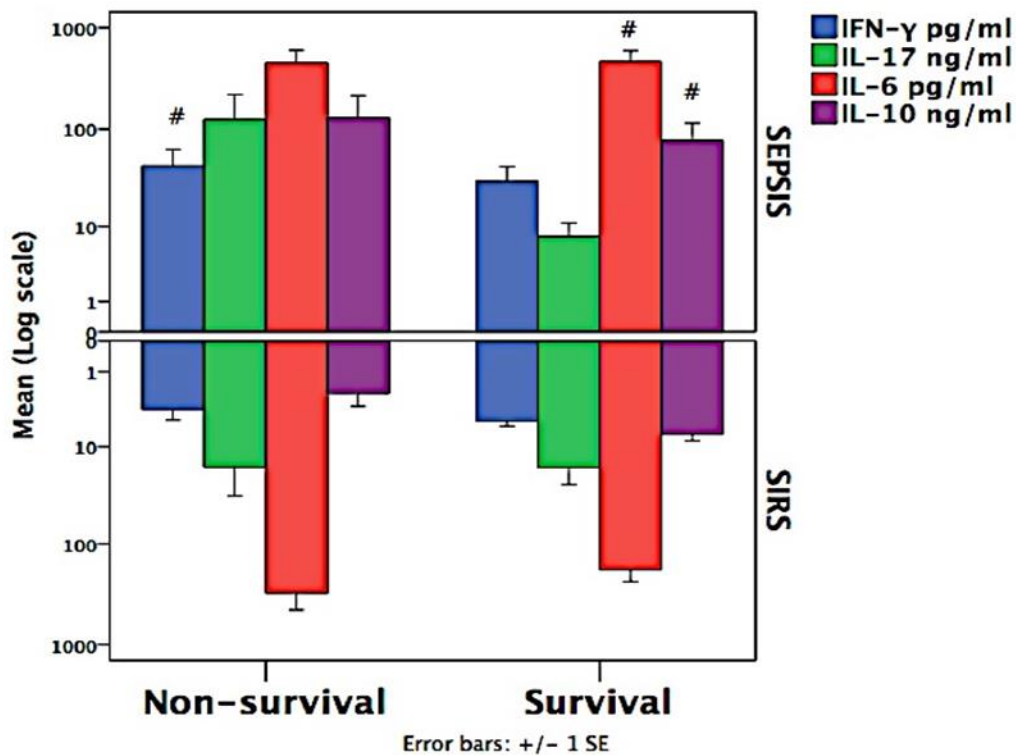
Συγκρίσεις ασθενών της μελέτης σε σχέση με τη μέση συγκέντρωση των ενδοκυττάρων HSP90α και HSP72 σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα κύτταρα περιφερικού αίματος.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που επιβίωσαν και ασθενών που κατέληξαν σε κάθε διαγνωστική ομάδα

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ SIRS και σήψης σε κάθε υπο-ομάδα

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα



Εικόνα 58.

Συγκρίσεις ασθενών της μελέτης σε σχέση με την μέση συγκέντρωση των ιντερλευκίνων ορού.

Το όριο στατιστικής σημαντικότητας P τέθηκε ως $P < 0.05$ (Στατιστική μέθοδος: Mann-Whitney U test)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που επιβίωσαν και ασθενών που κατέληξαν σε κάθε διαγνωστική ομάδα

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ SIRS και σήψης σε κάθε υπο-ομάδα

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm (1) χ τυπικό σφάλμα

5.9 Προγνωστική αξία hGR

Δημιουργήσαμε καμπύλες χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (καμπύλες ROC) για τον ανθρώπινο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, τις πρωτεΐνες στρες που εκφράζουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και την κορτιζόλη με τις καλύτερες τιμές p, για να διαχωρίσουμε τους σηπτικούς από το σύνολο των ασθενών της ΜΕΘ που εισήλθαν στη μελέτη (σήψη και SIRS) ή να προβλέψουμε τη θνητότητα στην ομάδα των σηπτικών ασθενών [Εικόνα 59-60]. Η εξωκυττάριος HSP72, η κορτιζόλη και η πρωτεϊνική έκφραση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα διαχώριζε με μεγαλύτερη επιτυχία τους σηπτικούς ασθενείς από τους ασθενείς με SIRS όπως καταδεικνύεται από τις τιμές AUROC >0.85, με τα διαχωριστικά όρια και τη θετική και αρνητική προγνωστική αξία να φαίνονται στον Πίνακα 9. Στην ομάδα των σηπτικών ασθενών, η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και η εξωκυττάριος HSP72 ήταν ισχυροί προγνωστικοί δείκτες της θνητότητας με τιμές AUROC >0.95, με τα διαχωριστικά όρια και την θετική και αρνητική προγνωστική αξία να απεικονίζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 9. Ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (καμπύλες ROC, για να προσδιοριστεί το ιδανικό διαχωριστικό όριο και η θετική και αρνητική προγνωστική αξία του hGR, της κορτιζόλης και των HSPs για την πρόβλεψη της σήψης μεταξύ ασθενών ΜΕΘ με μη λοιμώδεις - SIRS ή σήψη (λοιμώξη με SIRS).

PARAMETERS								
Βιοδείκτες	AUROC (95% CI)	P value	Ειδικότητα	Ευαισθησία	J	Cut off	PPV	NPV
eHSP72	0.94 (0.84-1.0)	0.001	0.88	0.79	0.66	0.40	73%	68%
Cortisol	0.90 (0.77-1.0)	0.002	1.00	0.79	0.79	15.7	66%	70%
hGR MFI	0.85 (0.69-1.0)	0.008	0.88	0.79	0.66	2.66	73%	49%
eHSP90α	0.80 (0.62-0.99)	0.02	0.75	0.79	0.54	66.0	72%	56%
hGRα	0.75 (0.52-0.98)	0.05	0.75	0.86	0.61	0.38	66%	67%
mRNA								

AUROC, area under the receiver operating characteristic curve

CI, confidence interval; AUROC (95% CI): διάστημα εμπιστοσύνης

PPV, positive predictive value: θετική προγνωστική αξία

NPV, negative predictive value: αρνητική προγνωστική αξία

eHSP, extracellular heat shock protein: εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ

hGR, human glucocorticoid receptor: ανθρώπινος υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών.

MFI, mean fluorescent intensity: μέση ένταση φθορισμού.

Πίνακας 10. Ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (καμπύλες ROC) για να προσδιοριστεί το ιδανικό διαχωριστικό όριο και η θετική και αρνητική προγνωστική αξία του hGR, της κορτιζόλης και των HSPs για την πρόβλεψη της θνητότητας στην ομάδα των σηπτικών ασθενών.

PARAMETERS								
Βιοδείκτες	AUROC (95% CI)	P value	Ειδικότητα	Ευαισθησία	J	Cut off	PPV	NPV
eHSP72	0.94 (0.84-1.0)	0.001	0.88	0.79	0.66	0.40	73%	68%
Cortisol	0.90 (0.77-1.0)	0.002	1.00	0.79	0.79	15.7	66%	70%
hGR MFI	0.85 (0.69-1.0)	0.008	0.88	0.79	0.66	2.66	73%	49%
eHSP90α	0.80 (0.62-0.99)	0.02	0.75	0.79	0.54	66.0	72%	56%
hGRα	0.75 (0.52-0.98)	0.05	0.75	0.86	0.61	0.38	66%	67%
mRNA								

AUROC, area under the receiver operating characteristic curve

CI, confidence interval; AUROC (95% CI): διάστημα εμπιστοσύνης

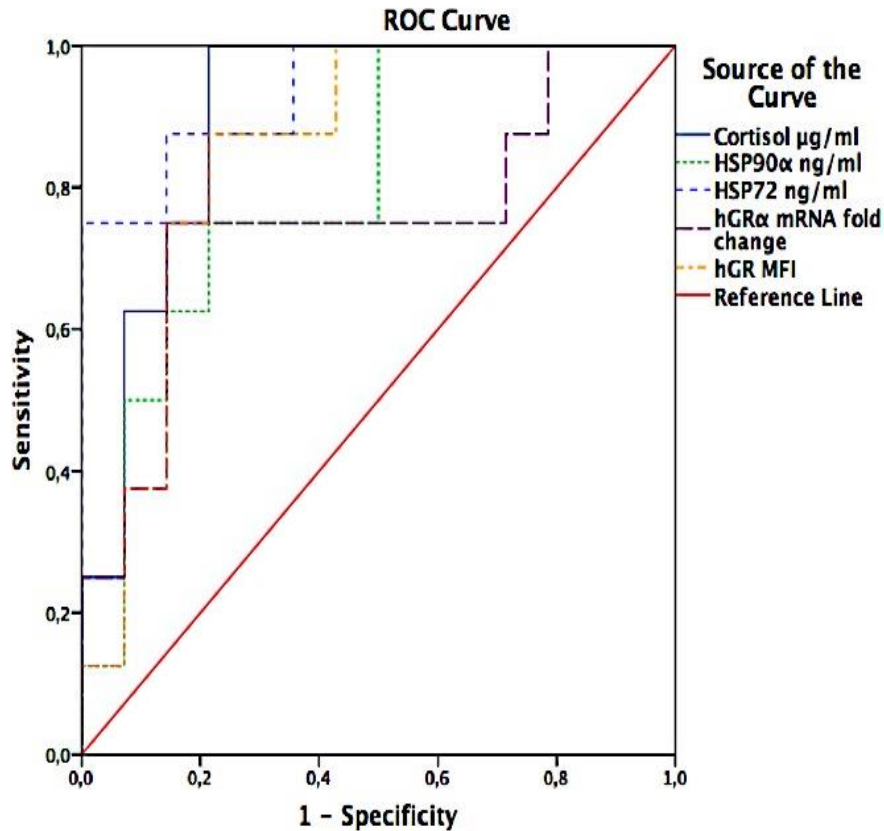
PPV, positive predictive value: θετική προγνωστική αξία

NPV, negative predictive value: αρνητική προγνωστική αξία

eHSP, extracellular heat shock protein: εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ

hGR, human glucocorticoid receptor: ανθρώπινος υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών.

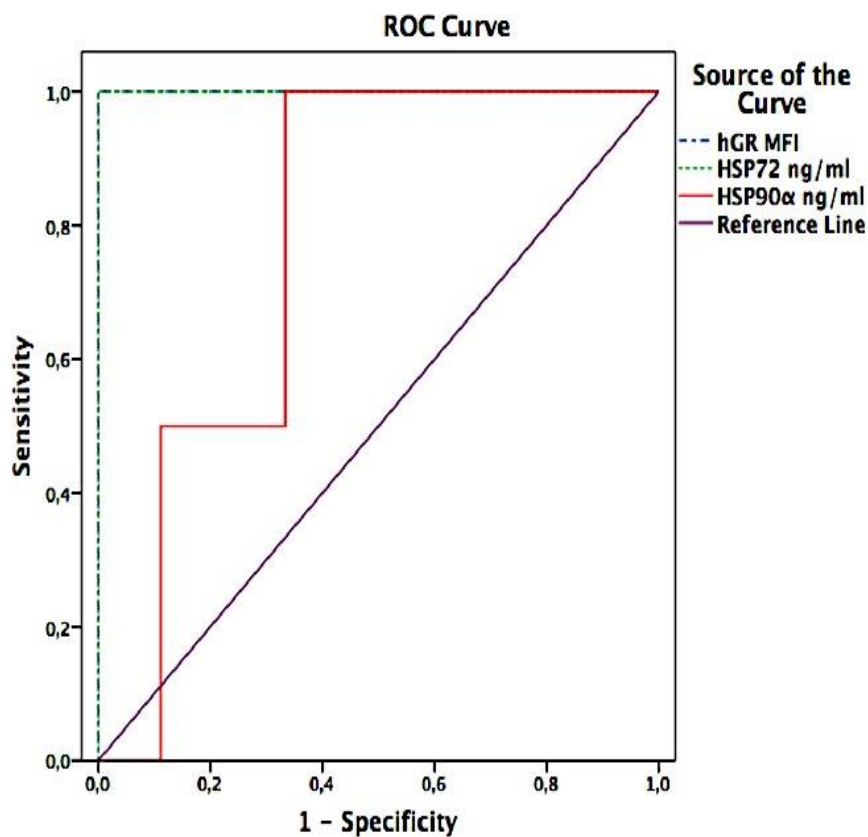
MFI, mean fluorescent intensity: μέση ένταση φθορισμού.



Εικόνα 59.

Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (AUROC) για να διαχωρίσει τους ασθενείς με σήψη από το σύνολο των ασθενών της ΜΕΘ που εισήλθαν στη μελέτη. Η εξωκυττάριος HSP72, η κορτιζόλη και η πρωτεϊνική έκφραση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα διαχώριζε με μεγαλύτερη επιτυχία τους σηπτικούς ασθενείς από τους ασθενείς με SIRS όπως φαίνεται από τις τιμές AUROC >0.85,

AUROC, area under the receiver operating characteristic curve,
 hGR, human glucocorticoid receptor; : ανθρώπινος υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
 MFI, mean fluorescent intensity : μέση ένταση φθορισμού.
 HSP, heat shock protein



Εικόνα 60.

Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (AUROC) για να καθορίσει τους προγνωστικούς δείκτες θνητότητας. Στην ομάδα των σηπτικών ασθενών, η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και η εξωκυττάριος HSP72 ήταν ισχυροί προγνωστικοί δείκτες της θνητότητας με τιμές AUROC >0.95.

AUROC, area under the receiver operating characteristic curve,

hGR, human glucocorticoid receptor;

MFI, mean fluorescent intensity

HSP, heat shock protein

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Πρωτεϊνική και γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας έδειξαν ότι η πρόωμη έκφραση της πρωτεΐνης hGR και η γονιδιακή έκφραση της ισομορφής τύπου α του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών αυξάνονται στατιστικά σημαντικά σε ασθενείς με σήψη, σε σχέση με υγιείς εθελοντές και/ή πολυτραυματίες με SIRS. Επίσης, βρέθηκε ότι η σχετική έκφραση του hGR mRNA και οι μεταβολές στα επίπεδα της πρωτεΐνης hGR συσχετίζονται με παράλληλες μεταβολές στα επίπεδα της κορτιζόλης και των ενδοκυττάρων ή εξωκυττάρων HSP70 ή HSP90α. Φαίνεται πιθανόν, ότι η πρωτεΐνη hGR επάγεται στα μονοκύτταρα σε συνδυασμό με τις HSPs με στόχο να περιορίσει την υπερβολική φλεγμονώδη απάντηση στα πρώιμα στάδια σήψης. Τέλος, για πρώτη φορά δείχθηκε ότι στην οξεία φάση στρες, η πρωτεΐνη hGR έχει την δυνατότητα να προβλέψει τη σήψη και την έκβαση και ότι συσχετίζεται με επαγόμενα από το στρες βιομόρια.

Το εύρημα της αύξησης της πρωτεϊνικής έκφρασης hGR στα μονοκύτταρα, θα μπορούσε να αναπαριστά προσαρμοστικό μηχανισμό, που στόχο έχει να περιορίσει την υπερβολική φλεγμονή στην πρόωμη σήψη. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, έρχονται σε συμφωνία με πειραματικές μελέτες σε σηπτικά ποντίκια, όπου παρατηρείται αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του GR και της δεσμευτικής ικανότητας σε κυκλοφορούντα μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και σπληνοκύτταρα [178]. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν χαμηλά επίπεδα hGRα mRNA σε T-λεμφοκύτταρα ενηλίκων [179] ή ουδετερόφιλα παιδιών [180] και μειωμένη δέσμευση της 3H-δεξαμεθαζόνης [181]. Αξιοσημείωτη είναι, η μελέτη που περιλαμβάνει μικρό αριθμό παιδιών με σήψη ή τραύμα, όπου βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ολικής και κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης hGR, αλλά όχι της πυρηνικής πρωτεΐνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [182]. Προηγηθείσα έρευνα είχε γίνει μόνο στο επίπεδο του mRNA, το οποίο στη μελέτη μας φάνηκε να δημιουργεί ασθενέστερη απάντηση σε σχέση με την πρωτεΐνη. Μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης hGR είχαν βρεθεί στο ήπαρ, πνεύμονες και σπλήνα, αλλά αυξημένα επίπεδα hGRα mRNA και αυξημένη δεσμευτική ικανότητα σε μύες από σηπτικά ποντίκια [183]. Η διαφορά στην επιλογή κυτταρικών υποπληθυσμών και η διαφορετική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στις παραπάνω πειραματικές εργασίες ευθύνονται για τα ποικίλα και πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα στις παραπάνω δημοσιευμένες μελέτες.

Παρά την υπόθεση, που είχε διατυπωθεί ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών είναι περισσότερο αποτελεσματικές σε γυναίκες παρά σε άνδρες [184], δεν βρήκαμε διαφορές ανά φύλο στην έκφραση των GRα mRNA, πρωτεΐνης hGR ή στα επίπεδα κορτιζόλης, ιντερλευκινών ή HSPs. Συμφωνώντας με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, προηγούμενες μελέτες δεν παρατήρησαν συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων GRα mRNA και

βαρύτητας νόσου κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ [180]. Δημιουργώντας καμπύλες χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (καμπύλες ROC) για τις πρωτεΐνες στρες και τις τσαπεροκίνες, αναδείξαμε για πρώτη φορά ότι η πρωτεϊνική έκφραση hGR στα μονοκύτταρα, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), που εκφράζουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα, και η κορτιζόλη μπορούσαν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με σήψη από ένα υποσύνολο ασθενών ΜΕΘ με αποδεκτή θετική και αρνητική προγνωστική αξία. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον περιορισμό από τον σχετικά μικρό αριθμό των ασθενών με σήψη, η πρωτεΐνη hGR και η εξωκυττάριος HSP72 είχαν τη δυνατότητα να προβλέψουν τη θνητότητα στους σηπτικούς ασθενείς. Είναι πιθανόν οι τσαπεροκίνες που εκφράζουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και οι στοχευμένοι ορμονο-εξαρτώμενοι υποδοχείς (hGR) να αναπαριστούν ιδιαίτερα ευαίσθητα βιομέτρημα στην πρόβλεψη μελλοντικών γεγονότων σε σχέση με τα καθοριζόμενα την ίδια στιγμή προγνωστικά σκορ βαρύτητας και σοκ.

Το mRNA του GRα παράγεται με πολύ μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του GR που μεταφράζεται την ίδια στιγμή [185]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι απαιτούνται πολλά χρονοβόρα στάδια έως την παραγωγή του αγγελιοφόρου mRNA, όπως την έναρξη της μεταγραφής, την αφαίρεση του εξωνίου και μετα-μεταγραφικές διαδικασίες που δεν παρατηρούνται στη μετάφραση της πρωτεΐνης. Τα ευρήματά μας αναδεικνύουν μια καλή αναλογία του GR σε πρωτεϊνικό επίπεδο και επίπεδο έκφρασης mRNA, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς, όπου αναφέρεται αναλογία μεταξύ GRα πρωτεΐνης και GRα mRNA στους περισσότερους ιστούς [119]. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα GRα mRNA συσχετίζονται με την αύξηση των θέσεων δέσμευσης της ορμόνης σε σηπτικά κουνέλια [186] και ανθρώπινα λεμφοκύτταρα [187], οδηγώντας σε αυξημένη ικανότητα δέσμευσης και ευαισθησίας στα κορτικοειδή [188]. Η διέγερση των T - λεμφοκυττάρων οδήγησε σε αύξηση του GRα, πιθανότατα καθιστώντας τα λεμφοκύτταρα περισσότερο ευαίσθητα στην κορτιζόλη, αν και η αύξηση αυτή καταστέλλονταν από την υδροκορτιζόνη [179]. Αυτή η δυναμική επίδραση στην έκφραση και τη λειτουργία του GRα, που αναφέρεται στις παραπάνω μελέτες, πιθανώς εξηγεί το γεγονός ότι τα κορτικοειδή είναι αποτελεσματικά μόνο όταν χορηγούνται πρώιμα στην σήψη [189]. Αποτελώντας ειδικό για κάθε ιστό ομοιοστατικό μηχανισμό, η δεσμευτική ικανότητα των ουδετερόφιλων για δέσμευση του GR βρέθηκε μειωμένη σε πειραματικά μοντέλα σήψης [178] και η έκφραση του GRα mRNA μειωμένη σε ουδετερόφιλα σηπτικών παιδιών [180], οδηγώντας σε αυξημένη αντίσταση στα κορτικοειδή των ουδετερόφιλων. Η αντίσταση αυτή σταδιακά επανέρχεται με την αποκατάσταση της υγείας των σηπτικών παιδιών. Εφαρμόζοντας την μέτρηση του hGR mRNA σε ολικό αίμα, είχαμε την δυνατότητα να παρέχουμε μια περισσότερο αντιπροσωπευτική εικόνα της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών χωρίς να παραλείψουμε

την έκφραση σε υπο-πληθυσμούς που θα μπορούσαν να είχαν αποκλειστεί από την πειραματική διαδικασία [190].

Για πρώτη φορά, διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης GR και/ή του GRα mRNA συσχετίζονται με τα επίπεδα των τσαπεροκινών, που εκφράζουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα, τις ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας HSP72 και HSP90α, εκτός από τον άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - επινεφρίδια και τις IL-6, IL-10 και IFN-γ. Επεκτείνοντας τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, που ανέδειξε ανάστροφη συσχέτιση της πρωτεΐνης GR με την νοραδρεναλίνη και το γαλακτικό [189], παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη GR συσχετίζονταν επίσης με την CRP, τα λευκά αιμοσφαίρια, τον λόγο PO₂/FiO₂ και το προγνωστικό σκορ SOFA. Παρά το γεγονός ότι, έχει αναφερθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ υπερθερμίας και του αριθμού των υποδοχέων [191], δεν διαπιστώσαμε σημαντική συσχέτιση μεταξύ hGRα και θερμοκρασίας, γαλακτικού, γλυκόζης, LDH, IL-17 ή προκαλσιτονίνης [180]. Σε πρόσφατη δημοσίευσή μας, αναφέραμε ότι οι εξωκυττάριας HSP90α και HSP72 αυξάνονται, ενώ οι ενδοκυττάριας καταστέλλονται [192]. Τα στοιχεία αυτά στην πρόωμη σήψη πιθανώς υποδηλώνουν ένα βασικό ρόλο των HSP90α και HSP72 στην ενεργοποίηση του hGRα από την κατάσταση ηρεμίας σε κατάσταση αυξημένης συγγένειας για σύνδεση με τον προσδέτη [193]. Οι συσχετίσεις hGRα-κορτιζόλης ή hGRα-ACTH και η ρύθμιση της HSP90α με κερκαδικό ρυθμό ενισχύουν περαιτέρω την παραπάνω υπόθεση [194].

6.2 Εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε επίσης ότι τα επίπεδα των εξωκυττάριας πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSP90α είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με σοβαρή σήψη, σε σχέση με εθελοντές υγιείς ενήλικες και με την ομάδα των πολυτραυματιών με SIRS. Η σημαντική αυτή αύξηση των επιπέδων της HSP90α σε ενήλικες σηπτικούς ασθενείς, δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας.

Αντίστοιχη μελέτη έχει γίνει μόνο σε σηπτικά παιδιά και αναφέρει ότι τα επίπεδα ορού της εξωκυττάριας HSP90α είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε παιδιά με σοβαρή σήψη και σε μικρότερο βαθμό σε παιδιά με σήψη και SIRS [195]. Επιπρόσθετα, η εξωκυττάρια HSP90α συσχετίστηκε με τις IL-6, IL-8, IL-10, τις πρωτεΐνες οξείας φάσης και τη διάρκεια παραμονής στην ΜΕΘ [195]. Η εξωκυττάριας HSP90α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παρουσίαση αντιγόνων στα δενδριτικά κύτταρα μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου 1 [196] και διεγείρει τα μονοκύτταρα [197]. Η χρήση αναστολέων της HSP90α οδήγησε σε αντιφλεγμονώδεις δράσεις μέσω του παράγοντα heat shock factor (HSF)-1 και της αύξησης της HSP70 [198]. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η χορήγηση του αναστολέα της HSP90 17-Dimethylaminoethylamino - 17-demethoxygeldanamycin

(17-DMAG) σε αρουραίους, βελτίωσε την επιβίωση και μείωσε την φλεγμονώδη απάντηση και το οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της σήψης [199].

Η μέτρηση της εξωκυττάριας HSP72 στον ορό ανέδειξε αυξημένα επίπεδα στους σηπτικούς ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μόνο δύο μελέτες έχουν δημοσιευτεί που αναφέρονται στην εξωκυττάρια HSP70 σε σηπτικούς ασθενείς [164], [159]. Τα επίπεδα εξωκυττάριας HSP72 σε παιδιά με σηπτική καταπληξία, ήταν σημαντικά μεγαλύτερα σε σχέση με την HSP72 παιδιών που υποβάλλονταν σε εκλεκτικές χειρουργικές επεμβάσεις, και η αύξηση αυτή συσχετιζόταν με τη θνητότητα [164]. Η δεύτερη εργασία, αναφέρεται σε ανάλυση οξειδωτικών παραμέτρων σε σηπτικά παιδιά και διατυπώνει την άποψη ότι τα επίπεδα της εξωκυττάριας HSP72 τροποποιούνται ανάλογα με το οξειδωτικό στρες [159].

Πέρα από τις ανθρώπινες μελέτες, αρκετές μελέτες σε ζωικά μοντέλα επικεντρώνονται στη μεταβολή των επιπέδων της εξωκυττάριας HSP72 κατά τη διάρκεια της σήψης. Σε ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα μας, εστίασαμε σε δημοσιευμένες εργασίες που αναφέρονται στον προστατευτικό ρόλο της HSP72 σε ανθρώπινες μελέτες, συγκρίνοντάς τις με μελέτες σε πειραματικές συνθήκες σήψης [200]. Παρατηρήσαμε ότι το 50% των ανθρώπινων μελετών ανέφερε προστατευτική επίδραση της εξωκυττάριας HSP72 σε σχέση με το 95.8% των μελετών σε ζώα. Πρόσφατη εργασία, ανέδειξε ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα HSP72 αυξάνονταν σε σηπτικά ποντίκια ανάλογα με την χρονική εξέλιξη της σήψης και η αύξηση αυτή συσχετίζεται θετικά με την θνητότητα [201].

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που σχετίζεται με την απελευθέρωση της HSP72 στον εξωκυττάριο χώρο δεν είναι πλήρως κατανοητός. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι, οι εξωκυττάριας HSPs μπορεί να απελευθερωθούν από κατεστραμμένους ιστούς και νεκρωμένα κύτταρα μετά από τραύμα, επάγοντας παράλληλα ανοσοκαταστολή [202]. Η αύξηση αυτή, σε συνδυασμό με την συσχέτιση που διαπιστώσαμε μεταξύ HSP72 και βαρύτητας νόσου, ενισχύουν περαιτέρω την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ δρουν σαν σήματα κινδύνου που στόχο έχουν να τροποποιήσουν την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στο στρες [203]. Η ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ εξω-κυττάριας HSP72 και HSP90a πιθανότατα οφείλεται σε κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης τους.

Η μελέτη των ενδοκυττάριας πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα, έδειξε ότι υπάρχει διαφορετική έκφραση στην πρώιμη φάση, ανάλογα με τον κυτταρικό υπό-πληθυσμό και την ομάδα μελέτης. Έτσι, στα μονοκύτταρα η HSP90 και η HSP72 δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Στα ουδετερόφιλα, η HSP72 εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα SIRS.

6.3 Άξονας υποθαλάμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια.

Η σωστή λειτουργία του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια (YYE) και η ύπαρξη φυσιολογικής απάντησης στα γλυκοκορτικοειδή, είναι βασικής σημασίας στην άμυνα του ξενιστή έναντι μικροβιακών παραγόντων. Η σημασία της πρωτεΐνης GRα στην επίτευξη της ομοιόστασης, φαίνεται καθαρά από μελέτες σε σηπτικά ποντίκια, τα οποία στερούνταν ενδοθηλιακής πρωτεΐνης GRα και τα οποία εμφάνιζαν αυξημένη θνητότητα, αιμοδυναμική αστάθεια, μειωμένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [120] και αδυναμία να ρυθμίσουν την παραγωγή IL-1β [178]. Τα αυξημένα επίπεδα hGR, κορτιζόλης, εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων HSPs και κυτταροκινών στην σήψη, πιθανώς αναπαριστούν την ένταση ενεργοποίησης του άξονα YYE και της απάντησης του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος. Η υπόθεση ότι η αύξηση αυτή, ίσως οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο, δεν υποστηρίζεται από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, καθώς όχι μόνο δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα LDH, αλλά ταυτόχρονα καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάρων HSP90α και HSP72 στην ομάδα των σηπτικών και των μη επιβιωζόντων.

Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν την απόπτωση, με απευθείας ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων ή γονιδίων σχετιζόμενων με την επιβίωση, ή ακόμη διεγείροντας κυτταρικά βιομόρια τα οποία ενεργοποιούν τον καταρράκτη της απόπτωσης [204]. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδηλώνουν ότι οι υψηλού κινδύνου ασθενείς προετοιμάζουν την απάντηση στον «κίνδυνο» αυξάνοντας τις εξωκυττάριας HSP90α και HSP72 και την κορτιζόλη, σε μια κατάσταση «έτοιμη για πρόσδεση σε αυξημένα επίπεδα hGR». Τα υψηλότερα επίπεδα εξωκυττάριας HSP72 και τα μειωμένα επίπεδα HSP72 στα ουδετερόφιλα σε ασθενείς που λάμβαναν υδροκορτιζόνη, πιθανώς οφείλονται στον μεγαλύτερο βαθμό στρες και φλεγμονής σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Η θετική συσχέτιση της hGR με φλεγμονώδεις βιοδείκτες άλλωστε, σε συνδυασμό με την παράλληλη αύξηση της προλακτίνης και ACTH, ενισχύει την υπόθεση ότι ο οργανισμός αμύνεται καταστέλλοντας την παραγωγή βιοενέργειας. Η αύξηση της κορτιζόλης και της πρωτεΐνης hGR που διαπιστώσαμε στους σηπτικούς ασθενείς της μελέτης μας υποδηλώνει πιθανώς ότι η κορτιζόλη δεν είναι περιοριστικός παράγοντας πρώιμα στη σήψη. Έτσι, η εξωγενής χορήγηση κορτιζόλης πρώιμα στην σήψη θα μπορούσε να καταστείλει την ήδη αυξημένη έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Τελικό αποτέλεσμα, θα ήταν η αύξηση της αντοχής στα γλυκοκορτικοειδή.

Παρά το γεγονός ότι, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση hGR σε T-λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια σηπτικής καταπληξίας, ανεξάρτητα από την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, η δεσμευτική ικανότητα του υποδοχέα βρέθηκε ελαττωμένη σε ουδετερόφιλα ασθενών που λάμβαναν

γλυκοκορτικοειδή [189]. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήσαμε καμία διαφορά στην έκφραση της hGR στα μονοκύτταρα ή στο ολικό αίμα σε ασθενείς που λάμβαναν υδροκορτιζόνη σε δόση στρες και σε αυτούς που δεν λάμβαναν. Η ελαττωμένη ικανότητα δέσμευσης της hGR στα ουδετερόφιλα θα μπορούσε παρ' όλα αυτά να επιβραδύνει την απάντηση στα κορτικοειδή. Αναλογικά, η χρήση γλυκοκορτικοειδών στη σηπτική καταπληξία θα μπορούσε να εξαρτάται από το στάδιο της σήψης, την αντιδραστικότητα του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια και την ειδικότητα του hGR στον προσδέτη [101]. Μη στεροειδικοί εκλεκτικοί τροποποιητές του hGR (Non steroidal selective hGR modulators /Sin EGRAMs), οι οποίοι μπορούν να τροποποιούν συγκεκριμένους μηχανισμούς του hGR και να τροποποιούν το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης του hGRα, ανακτούν συνεχώς έδαφος σήμερα στην έρευνα διερεύνησης των δυνατοτήτων θεραπευτικής παρέμβασης μέσω των υποδοχέων [205].

Η αύξηση της προλακτίνης σε σηπτικούς ασθενείς σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες μελέτης είναι ένα ακόμα αξιοσημείωτο εύρημα. Ο ρόλος της προλακτίνης ως ανοσοτροποποιητική ορμόνη, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πρόσφατη μελέτη, συσχετίζει την έκφραση αυξημένων επιπέδων προλακτίνης στα μονοκύτταρα ογκολογικών ασθενών με καλύτερη επιβίωση [206]. Έχει επίσηςδειχθεί, ότι τα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης αντιδρούν σε στοιχεία του τοιχώματος των μυκήτων αυξάνοντας την παραγωγή προλακτίνης [207]. Αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης μας είναι η σημαντική αύξηση της προλακτίνης στην ομάδα των πολυτραυματιών. Έχει επίσης προηγουμένα αναφερθεί, αύξηση της προλακτίνης σε πολυτραυματίες τις πρώτες ώρες από την εισαγωγή στην ΜΕΘ, με την αύξηση να φθάνει στο μεγαλύτερο επίπεδο την τρίτη ημέρα [208]. Τα ευρήματα της μελέτης μας και η αύξηση της προλακτίνης, αναδεικνύουν ότι ο ρόλος της είναι εξίσου σημαντικός με την κορτιζόλη στην επίτευξη ομοιόστασης. Η παρατηρούμενη αύξηση της προλακτίνης τις πρώτες ώρες, πιθανώς συνεισφέρει στην πρόιμη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρά το γεγονός ότι, η φαρμακευτική αναστολή της προλακτίνης θα μπορούσε να προσφέρει μια καινοτόμο φαρμακευτική παρέμβαση, ο ακριβής ρόλος της προλακτίνης και η συσχέτισή της με την πρωτεΐνη hGR στη σήψη δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

6.4 Περιορισμοί της μελέτης

Το αντίσωμα και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας έδινε τη δυνατότητα προσδιορισμού των ολικών επιπέδων της πρωτεΐνης του hGR χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού των ισομορφών της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, δεν είναι δυνατόν να υπολογίσουμε εάν ένα ποσοστό από τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης hGR που μετρήσαμε αναπαριστούν επίπεδα της ισομορφής β. Καθώς όμως δεν ανιχνεύθηκε hGRβ σε επίπεδο mRNA, ενώ η πρωτεΐνη hGR σχετιζόταν σημαντικά με το hGRα mRNA, είναι πρόδηλο ότι η πρωτεΐνη hGR που μετρήθηκε στη μελέτη μας αναπαριστά κυρίως την ισομορφή α, που άλλωστε εκφράζεται σε εξαιρετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις [180].

Περιορισμό της μελέτης, αποτελεί επίσης το γεγονός ότι δεν υπήρχε διαχρονική καταγραφή αποτελεσμάτων σε βάθος χρόνου και τα απότέλεσματα προέρχονται από ασθενείς ενός μόνο Νοσοκομείου. Ασθενείς συσχετίσεις του hGR με ορισμένους φλεγμονώδεις και ορμονικούς δείκτες και με προγνωστικά σκορ βαρύτητας, αν και στατιστικά σημαντικές, θα πρέπει να αξιολογηθούν με επιφύλαξη λόγω του μικρού αριθμού ασθενών.

Η διαφορά ηλικίας μεταξύ σηπτικών ασθενών και υγιών εθελοντών αποτελεί έναν ακόμα περιορισμό της μελέτης μας. Εντούτοις, η ένταξη σηπτικών ασθενών με τα αυστηρά κριτήρια επιλογής που χρησιμοποιήσαμε αποδείχθηκε αρκετά δύσκολη. Επιπρόσθετα, πρόκειται για μια προοπτική μελέτη με διαδοχικές εισαγωγές της ΜΕΘ όπου η μέση ηλικία των πολυτραυματιών ήταν αρκετά μικρότερη σε σχέση με την ηλικία των σηπτικών, όπως άλλωστε αναμενόταν.

7. Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η πρώιμη έκφραση της πρωτεΐνης hGR και το mRNA hGRα αυξάνονται στατιστικά σημαντικά σε ασθενείς με πρώιμη σήψη, σε σχέση με υγιείς εθελοντές και πολυτραυματίες με SIRS. Αντίστοιχα, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται στις εξωκυττάριας HSP90α και HSP72 σε πρώιμη σήψη, δρώντας σα σήματα κινδύνου στον οργανισμό. Στα πρώτα στάδια της κρίσιμης νόσου, η έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να προβλέψει την έκβαση και την παρουσία σήψης. Πιθανότατα, ο hGR σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ αυξάνονται στα μονοκύτταρα και συντελούν ώστε η δέσμευση της κορτιζόλης να εξισορροπήσει την υπέρμετρα φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στην οξεία φάση της πρώιμης σήψης. Η εξωγενής χορήγηση κορτιζόλης σε αυτό το στάδιο, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, μέσω μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης, αυξάνοντας έτσι την αντίσταση στα κορτικοειδή. Εκτεταμένη έρευνα στο μέλλον, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια περισσότερο εξατομικευμένη προσέγγιση της χρήσης των κορτικοειδών σε σήψη και σηπτικό σοκ, λαμβάνοντας υπ' όψιν, τόσο την έκφραση της ισομορφής α του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και τη δεσμευτική της ικανότητα, όσο και την ισορροπία της απάντησης του ανοσοποιητικού - ορμονολογικού συστήματος.

8. Περίληψη

Εισαγωγή: Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) εκφράζεται υποχρεωτικά σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η έλλειψή του από τους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε χαρακτηριστικά παθολογικούς φαινότυπους. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του GR ελαττώνεται προοδευτικά σε πειραματικά μοντέλα σήψης, καθώς και ότι αυτή η διαδικασία οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα της δεξαμεθαζόνης να μετακινείται προς τον πυρήνα του κυττάρου.

Σκοπός: Να εξετάσουμε εάν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) της ισομορφής α του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGRα) και η πρωτεΐνη hGR είναι ανεπαρκή σε ασθενείς με πρώιμη σήψη (Σ) σε σχέση με ασθενείς με μη-λοιμώδες σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS) και υγιείς εθελοντές (Ε). Να εκτιμήσουμε εάν οι μεταβολές στη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σχετίζονται με μεταβολές στα επίπεδα της κορτιζόλης και εάν συσχετίζονται με τις α) ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) 90α και 72 β) την προλακτίνη, ACTH και τις ιντερλευκίνες γ) την έκβαση.

Μέθοδοι: Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε Πανεπιστημιακή Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και συμμετείχαν 48 διαδοχικοί ασθενείς με πρώιμης έναρξης (<48 ώρες) σήψη (Σ) και 40 διαδοχικοί πολυτραυματίες με πρώιμης έναρξης (<48 ώρες) SIRS. Η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε 35 υγιείς εθελοντές (Ε). Έγινε απομόνωση RNA από ολικό αίμα με TRI Reagent, παρασκευή συμπληρωματικού DNA από RNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, και κατόπιν χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Οι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες hGR και HSPs στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής 4 χρωμάτων. Οι εξωκυττάρια HSPs και οι ιντερλευκίνες ορού υπολογίστηκαν με Elisa.

Αποτελέσματα: Η πρωτεΐνη του hGR βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα Σ σε σχέση με τις ομάδες Ε και SIRS ($p<0,05$), ενώ το hGRα mRNA βρέθηκε αυξημένο στην ομάδα Σ σε σχέση με την ομάδα Ε ($p<0,05$). Σε σηπτικούς, η πρωτεΐνη hGR και η εξωκυττάρια HSP72 ήταν υψηλότερα σε μη επιζώντες σε σχέση με τους επιζώντες ($p<0,05$). Η μέση ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης hGR και η σχετική έκφραση του mRNA hGRα συσχετίζονταν σημαντικά μεταξύ τους ($r_s=0,64$, $p<0,001$). Στα μονοκύτταρα, η έκφραση της πρωτεΐνης hGR συσχετίζονταν θετικά με τις ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια HSPs, την κορτιζόλη και τις ιντερλευκίνες ($p<0,05$). Οι HSPs, η κορτιζόλη και η πρωτεΐνη hGR είχαν τη δυνατότητα διαχωρισμού των σηπτικών από την ομάδα SIRS με μεγάλη πιθανότητα πρόβλεψης (AUROC $>0,85$, $p<0,05$). Σε σηπτικούς ασθενείς, η πρωτεΐνη hGR στα μονοκύτταρα και η εξωκυττάρια HSP72 ήταν ισχυροί προγνωστικοί δείκτες της θνητότητας (AUROC $>0,95$ $p<0,04$).

Συμπέρασμα: Η πρώιμου σταδίου σήψη συνοδεύεται από αυξημένη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του hGR και αυξημένες συγκεντρώσεις κορτιζόλης, υποδηλώνοντας πιθανόν την μη ανάγκη χορήγησης εξωγενών κορτικοειδών. Σε αυτό το στάδιο, η έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να προβλέψει την παρουσία σήψης και την έκβαση και σχετίζεται με επαγόμενα από το στρες βιομόρια και οργανική δυσλειτουργία.

ABSTRACT.

Purpose: To examine if the human glucocorticoid receptor (hGR) isoform- α mRNA and hGR protein expressions are deficient in the acute phase of sepsis (S) compared to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and healthy subjects (H). To evaluate if the hGR α and hGR alterations are associated with cortisol changes, and if they are related to: 1) extracellular and intracellular heat shock proteins (HSP) 72 and 90 α ; 2) ACTH, prolactin, and interleukins (ILs); 3) the outcome.

Methods: Patients consecutively admitted to a University Hospital Intensive Care Unit (ICU) with S (n=48) or SIRS (n=40) were enrolled in the study. Thirty-five H were also included. Total mRNA was isolated from peripheral blood samples and cDNA was prepared. RT-PCR was performed. Intracellular hGR and HSPs expression in monocytes and/or neutrophils was evaluated using 4-colour flow cytometry. Serum prolactin, ACTH and cortisol concentrations were also measured. ELISA was used to evaluate serum ILs and extracellular (e) HSPs (eHSP72, eHSP90 α).

Results: hGR protein was higher in S compared to H and SIRS; hGR α mRNA was higher in S compared to H ($p<0.05$). In sepsis, hGR protein and eHSP72 were higher among non-survivors compared to survivors ($p<0.05$). The hGR MFI and hGR α mRNA fold change were significantly related to each other ($r_s=0.64$, $p<0.001$). Monocyte hGR protein expression was positively correlated to extracellular and intracellular HSPs, cortisol, and ILs and negatively to organ dysfunction ($p<0.05$). HSPs, hGR, and cortisol were able to discriminate sepsis from SIRS (AUROC >0.85 , $p<0.05$). In sepsis, monocyte-hGR protein and eHSP72 were strong predictors of mortality (AUROC >0.95 $p<0.04$).

Conclusions: Acute-phase sepsis is associated with increased hGR expression and cortisol concentrations, possibly implying no need for exogenous steroids. At this stage, hGR is able to predict sepsis and outcome, and is related to stress-activated bio-molecules and organ dysfunction.

Βιβλιογραφία

- [1] S. Geroulanos and E. T. Douka, "Historical perspective of the word 'sepsis,'" *Intensive Care Med.*, vol. 32, no. 12, p. 2077, Dec. 2006.
- [2] D. J. Funk, J. E. Parrillo, and A. Kumar, "Sepsis and septic shock: a history," *Crit. Care Clin.*, vol. 25, no. 1, p. 83–101, viii, Jan. 2009.
- [3] R. C. Bone, C. J. Fisher, T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz, and R. A. Balk, "A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock," *N. Engl. J. Med.*, vol. 317, no. 11, pp. 653–658, Sep. 1987.
- [4] "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis," *Crit. Care Med.*, vol. 20, no. 6, pp. 864–874, Jun. 1992.
- [5] M. Singer *et al.*, "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)," *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 801–810, Feb. 2016.
- [6] J. Whittle and D. Walker, "The new international sepsis guidelines (Sepsis-3): the central message remains," *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.* 2005, vol. 77, no. 4, pp. 208–211, Apr. 2016.
- [7] C. S. Deutschman and K. J. Tracey, "Sepsis: current dogma and new perspectives," *Immunity*, vol. 40, no. 4, pp. 463–475, Apr. 2014.
- [8] J. A. Kempker and G. S. Martin, "The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis," *Clin. Chest Med.*, vol. 37, no. 2, pp. 165–179, Jun. 2016.
- [9] A. Padkin, C. Goldfrad, A. R. Brady, D. Young, N. Black, and K. Rowan, "Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland," *Crit. Care Med.*, vol. 31, no. 9, pp. 2332–2338, Sep. 2003.
- [10] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, B. Vallet, and EPISEPSIS Study Group, "EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units," *Intensive Care Med.*, vol. 30, no. 4, pp. 580–588, Apr. 2004.
- [11] C. Engel *et al.*, "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study," *Intensive Care Med.*, vol. 33, no. 4, pp. 606–618, Apr. 2007.
- [12] J.-L. Vincent *et al.*, "Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit," *Lancet Respir. Med.*, vol. 2, no. 5, pp. 380–386, May 2014.
- [13] G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss, "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 16, pp. 1546–1554, Apr. 2003.
- [14] J.-L. Vincent *et al.*, "Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study," *Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 2, pp. 344–353, Feb. 2006.
- [15] C. Alberti *et al.*, "Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study," *Intensive Care Med.*, vol. 28, no. 2, pp. 108–121, Feb. 2002.
- [16] J.-L. Vincent *et al.*, "International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units," *JAMA*, vol. 302, no. 21, pp. 2323–2329, Dec. 2009.
- [17] D. Armstrong-Briley, N. S. T. Hozhabri, K. Armstrong, J. Puthottile, R. Benavides, and S. Beal, "Comparison of length of stay and outcomes of patients with positive versus negative blood culture results," *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.*, vol. 28, no. 1, pp. 10–13, Jan. 2015.
- [18] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, B. Vallet, and EPISEPSIS Study Group, "EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units," *Intensive Care Med.*, vol. 30, no. 4, pp. 580–588, Apr. 2004.
- [19] D. F. Gaieski, J. M. Edwards, M. J. Kallan, and B. G. Carr, "Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States," *Crit. Care Med.*, vol. 41, no. 5, pp. 1167–1174, May 2013.
- [20] D. Annane and T. Sharshar, "Cognitive decline after sepsis," *Lancet Respir. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 61–69, Jan. 2015.
- [21] C. J. Walsh *et al.*, "Transcriptomic analysis reveals abnormal muscle repair and remodeling in survivors of critical illness with sustained weakness," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 29334, 2016.

- [22] J. Cohen, "The immunopathogenesis of sepsis," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 885–891, Dec. 2002.
- [23] C. Bhan, P. Dipankar, P. Chakraborty, and P. P. Sarangi, "Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis," *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI*, Jul. 2016.
- [24] J. Aman, E. M. Weijers, G. P. van Nieuw Amerongen, A. B. Malik, and V. W. M. van Hinsbergh, "Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 311, no. 2, pp. L453–466, Aug. 2016.
- [25] C. Alfaro *et al.*, "Dendritic cells take up and present antigens from viable and apoptotic polymorphonuclear leukocytes," *PloS One*, vol. 6, no. 12, p. e29300, 2011.
- [26] C.-W. Yang, B. S. I. Strong, M. J. Miller, and E. R. Unanue, "Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, no. 5, pp. 2927–2934, Sep. 2010.
- [27] D. C. Angus and T. van der Poll, "Severe sepsis and septic shock," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 9, pp. 840–851, Aug. 2013.
- [28] R. S. Hotchkiss, G. Monneret, and D. Payen, "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 12, pp. 862–874, Dec. 2013.
- [29] M. Swamydas *et al.*, "CXCR1-mediated neutrophil degranulation and fungal killing promote *Candida* clearance and host survival," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 322, p. 322ra10, Jan. 2016.
- [30] B. Wu, J. Walker, B. Spur, A. Rodriguez, and K. Yin, "Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 94, pp. 55–64, Mar. 2015.
- [31] J. C. Alves-Filho, A. de Freitas, M. Russo, and F. Q. Cunha, "Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis," *Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 2, pp. 461–470, Feb. 2006.
- [32] T. B. Newman, D. Draper, K. M. Puopolo, S. Wi, and G. J. Escobar, "Combining immature and total neutrophil counts to predict early onset sepsis in term and late preterm newborns: use of the I/T2," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 33, no. 8, pp. 798–802, Aug. 2014.
- [33] S. S. Santos, M. K. C. Brunialti, O. Rigato, F. R. Machado, E. Silva, and R. Salomao, "Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes," *Shock Augusta Ga*, vol. 38, no. 1, pp. 18–23, Jul. 2012.
- [34] F. Sônego *et al.*, "Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious," *Front. Immunol.*, vol. 7, p. 155, 2016.
- [35] C. Auffray, M. H. Sieweke, and F. Geissmann, "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 669–692, 2009.
- [36] L. J. Zhou and T. F. Tedder, "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 6, pp. 2588–2592, Mar. 1996.
- [37] B. M. P. Tang, A. S. McLean, I. W. Dawes, S. J. Huang, and R. C. Y. Lin, "Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis," *Crit. Care Med.*, vol. 37, no. 3, pp. 882–888, Mar. 2009.
- [38] I. N. Shalova *et al.*, "Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α ," *Immunity*, vol. 42, no. 3, pp. 484–498, Mar. 2015.
- [39] Y. Zhang *et al.*, "Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 15, no. 1, p. R70, 2011.
- [40] A. M. Drewry, N. Samra, L. P. Skrupky, B. M. Fuller, S. M. Compton, and R. S. Hotchkiss, "Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality," *Shock Augusta Ga*, vol. 42, no. 5, pp. 383–391, Nov. 2014.
- [41] A. M. Drewry, B. M. Fuller, L. P. Skrupky, and R. S. Hotchkiss, "The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia," *Crit. Care Med.*, vol. 43, no. 6, pp. 1165–1169, Jun. 2015.
- [42] G. Monneret *et al.*, "Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis," *Crit. Care Med.*, vol. 31, no. 7, pp. 2068–2071, Jul. 2003.
- [43] H. Huang *et al.*, "High circulating CD39(+) regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients," *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.*, vol. 30, pp. 57–63, Jan. 2015.

- [44] R. de Pablo, J. Monserrat, C. Torrijos, M. Martín, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon, "The predictive role of early activation of natural killer cells in septic shock," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 16, no. 2, p. 413, 2012.
- [45] A. Chalifour *et al.*, "Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production," *Blood*, vol. 104, no. 6, pp. 1778–1783, Sep. 2004.
- [46] M. Nezi, G. Mastorakos, and Z. Mouslech, "Corticotropin Releasing Hormone And The Immune/Inflammatory Response," in *Endotext*, L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik, and M. O. Weickert, Eds. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.
- [47] D. L. Williams *et al.*, "Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality," *Crit. Care Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 1808–1818, Jun. 2003.
- [48] M. Di Gioia and I. Zanoni, "Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response," *Mol. Immunol.*, vol. 63, no. 2, pp. 143–152, Feb. 2015.
- [49] O. Takeuchi and S. Akira, "Pattern recognition receptors and inflammation," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–820, Mar. 2010.
- [50] U. Ohto, K. Fukase, K. Miyake, and T. Shimizu, "Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 19, pp. 7421–7426, May 2012.
- [51] K. Midwood *et al.*, "Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease," *Nat. Med.*, vol. 15, no. 7, pp. 774–780, Jul. 2009.
- [52] L. K. Dubey, J. B. Moeller, A. Schlosser, G. L. Sorensen, and U. Holmskov, "Induction of innate immunity by *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides is enhanced by the composite presentation of chitin and beta-glucan," *Immunobiology*, vol. 219, no. 3, pp. 179–188, Mar. 2014.
- [53] H.-B. Hsiao *et al.*, "Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to the release of danger-associated molecular patterns," *J. Virol.*, vol. 88, no. 20, pp. 11658–11670, Oct. 2014.
- [54] T. Kawai and S. Akira, "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 5, pp. 373–384, May 2010.
- [55] K. Takeda and S. Akira, "Toll-like receptors," *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan AI*, vol. 109, p. 14.12.1-10, 2015.
- [56] M. G. Netea, C. Wijmenga, and L. A. J. O'Neill, "Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 535–542, Jun. 2012.
- [57] Y. Wang *et al.*, "Curcumin Analog L48H37 Prevents Lipopolysaccharide-Induced TLR4 Signaling Pathway Activation and Sepsis via Targeting MD2," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 353, no. 3, pp. 539–550, Jun. 2015.
- [58] C. X. Lima *et al.*, "Therapeutic Effects of Treatment with Anti-TLR2 and Anti-TLR4 Monoclonal Antibodies in Polymicrobial Sepsis," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132336, 2015.
- [59] P. Matzinger, "Tolerance, danger, and the extended family," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, pp. 991–1045, 1994.
- [60] N. Saïd-Sadier and D. M. Ojcius, "Alarmins, inflammasomes and immunity," *Biomed. J.*, vol. 35, no. 6, pp. 437–449, Dec. 2012.
- [61] Q. Zhang *et al.*, "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury," *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 104–107, Mar. 2010.
- [62] T. Sursal *et al.*, "Plasma bacterial and mitochondrial DNA distinguish bacterial sepsis from sterile systemic inflammatory response syndrome and quantify inflammatory tissue injury in nonhuman primates," *Shock Augusta Ga*, vol. 39, no. 1, pp. 55–62, Jan. 2013.
- [63] R. Medzhitov, "Recognition of microorganisms and activation of the immune response," *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819–826, Oct. 2007.
- [64] J.-M. Cavaillon, M. Adib-Conquy, C. Fitting, C. Adrie, and D. Payen, "Cytokine cascade in sepsis," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 35, no. 9, pp. 535–544, 2003.
- [65] H. Chaudhry *et al.*, "Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis," *Vivo Athens Greece*, vol. 27, no. 6, pp. 669–684, Dec. 2013.

- [66] B. Maier *et al.*, "Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma," *Shock Augusta Ga*, vol. 28, no. 6, pp. 668–674, Dec. 2007.
- [67] J. Stensballe, M. Christiansen, E. Tønnesen, K. Espersen, F. K. Lippert, and L. S. Rasmussen, "The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality," *Acta Anaesthesiol. Scand.*, vol. 53, no. 4, pp. 515–521, Apr. 2009.
- [68] A. Gouel-Chéron *et al.*, "Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma," *PloS One*, vol. 7, no. 3, p. e33095, 2012.
- [69] S. Mera *et al.*, "Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis," *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, vol. 119, no. 2, pp. 155–163, Feb. 2011.
- [70] H.-P. Wu *et al.*, "Serial cytokine levels in patients with severe sepsis," *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI*, vol. 58, no. 7, pp. 385–393, Jul. 2009.
- [71] K. R. Jun *et al.*, "Serial changes in serum procalcitonin, interleukin 6, and C-reactive protein levels according to non-specific surgical stimulation," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 53, no. 4, pp. 549–558, Mar. 2015.
- [72] E. D. Murphey, C. Y. Lin, R. W. McGuire, T. Toliver-Kinsky, D. N. Herndon, and E. R. Sherwood, "Diminished bacterial clearance is associated with decreased IL-12 and interferon-gamma production but a sustained proinflammatory response in a murine model of postseptic immunosuppression," *Shock Augusta Ga*, vol. 21, no. 5, pp. 415–425, May 2004.
- [73] L. Wang *et al.*, "Repression of interferon-gamma expression in T cells by Prospero-related homeobox protein," *Cell Res.*, vol. 18, no. 9, pp. 911–920, Sep. 2008.
- [74] D. J. Dries *et al.*, "Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial," *Arch. Surg. Chic. Ill 1960*, vol. 129, no. 10, p. 1031–1041; discussion 1042, Oct. 1994.
- [75] A. Marchant *et al.*, "Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia," *Eur. J. Immunol.*, vol. 24, no. 5, pp. 1167–1171, May 1994.
- [76] G. Friedman, S. Jankowski, A. Marchant, M. Goldman, R. J. Kahn, and J. L. Vincent, "Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock," *J. Crit. Care*, vol. 12, no. 4, pp. 183–187, Dec. 1997.
- [77] Y. Hu, F. Shen, N. K. Crellin, and W. Ouyang, "The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1217, pp. 60–76, Jan. 2011.
- [78] J. M. Reynolds, P. Angkasekwina, and C. Dong, "IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 21, no. 6, pp. 413–423, Dec. 2010.
- [79] A. Freitas *et al.*, "IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, no. 12, pp. 7846–7854, Jun. 2009.
- [80] S. Q. Crome, A. Y. Wang, and M. K. Levings, "Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 159, no. 2, pp. 109–119, Feb. 2010.
- [81] H. Wang *et al.*, "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice," *Science*, vol. 285, no. 5425, pp. 248–251, Jul. 1999.
- [82] J. Sundén-Cullberg *et al.*, "Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock," *Crit. Care Med.*, vol. 33, no. 3, pp. 564–573, Mar. 2005.
- [83] H. E. Harris and A. Raucchi, "Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1," *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 8, pp. 774–778, Aug. 2006.
- [84] S. Kim *et al.*, "Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14," *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. 19, pp. 88–98, 2013.
- [85] M. Huber-Lang, A. Kovtun, and A. Ignatius, "The role of complement in trauma and fracture healing," *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 73–78, Feb. 2013.
- [86] U. Andersson and K. J. Tracey, "HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 139–162, 2011.

- [87] D. Foell, H. Wittkowski, T. Vogl, and J. Roth, "S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 28–37, Jan. 2007.
- [88] G. P. Chrousos, "Stress and disorders of the stress system," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 5, no. 7, pp. 374–381, Jul. 2009.
- [89] G. P. Chrousos, "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 20, pp. 1351–1362, May 1995.
- [90] N. C. Nicolaidis, E. Charmandari, G. P. Chrousos, and T. Kino, "Circadian endocrine rhythms: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its actions," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1318, pp. 71–80, May 2014.
- [91] L. Gagliardi, J. T. Ho, and D. J. Torpy, "Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 24–34, Mar. 2010.
- [92] J. Galon *et al.*, "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 61–71, Jan. 2002.
- [93] A. Mulla and J. C. Buckingham, "Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines," *Baillières Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 4, pp. 503–521, Dec. 1999.
- [94] H. Besedovsky, A. del Rey, E. Sorkin, and C. A. Dinarello, "Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones," *Science*, vol. 233, no. 4764, pp. 652–654, Aug. 1986.
- [95] J. D. Ashwell, F. W. Lu, and M. S. Vacchio, "Glucocorticoids in T cell development and function*," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 309–345, 2000.
- [96] S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann, and C. Libert, "New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation," *Endocrinology*, vol. 154, no. 3, pp. 993–1007, Mar. 2013.
- [97] R. Dumbell, O. Matveeva, and H. Oster, "Circadian Clocks, Stress, and Immunity," *Front. Endocrinol.*, vol. 7, p. 37, 2016.
- [98] Y. Chinenov and I. Rogatsky, "Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 30–42, Sep. 2007.
- [99] T. Homma *et al.*, "Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 31, no. 4, pp. 463–469, Oct. 2004.
- [100] S. K. Agarwal and G. D. Marshall, "Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines," *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 147–155, Mar. 2001.
- [101] J. I. Webster and E. M. Sternberg, "Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products," *J. Endocrinol.*, vol. 181, no. 2, pp. 207–221, May 2004.
- [102] W. Kanczkowski, K. Zacharowski, M. P. Wirth, M. Ehrhart-Bornstein, and S. R. Bornstein, "Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 300, no. 1–2, pp. 57–65, Mar. 2009.
- [103] V. Goffin and P. A. Kelly, "Growth-promoting actions of prolactin, the hormone of lactation," *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM*, vol. 15, no. 6, pp. 787–788, Jun. 2002.
- [104] V. Goffin, N. Binart, P. Touraine, and P. A. Kelly, "Prolactin: the new biology of an old hormone," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 64, pp. 47–67, 2002.
- [105] L. Matera, M. Mori, and A. Galetto, "Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells," *Lupus*, vol. 10, no. 10, pp. 728–734, 2001.
- [106] H. Wu, R. Devi, and W. B. Malarkey, "Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system," *Endocrinology*, vol. 137, no. 1, pp. 349–353, Jan. 1996.
- [107] G. López-Rincón, J. Á. Gutiérrez-Pabello, F. Díaz-Otero, J. F. Muñoz-Valle, A. L. Pereira-Suárez, and C. Estrada-Chávez, "Mycobacterium bovis infection in cattle induces differential expression of prolactin receptor isoforms in macrophages," *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, no. 6, pp. 619–629, Dec. 2013.
- [108] G. López-Rincón *et al.*, "Lipopolysaccharide induces the expression of an autocrine prolactin loop enhancing inflammatory response in monocytes," *J. Inflamm. Lond. Engl.*, vol. 10, no. 1, p. 24, 2013.

- [109] P. E. Scotland *et al.*, "Endogenous prolactin generated during peripheral inflammation contributes to thermal hyperalgesia," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 34, no. 5, pp. 745–754, Sep. 2011.
- [110] R. S. Scotland, M. J. Stables, S. Madalli, P. Watson, and D. W. Gilroy, "Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice," *Blood*, vol. 118, no. 22, pp. 5918–5927, Nov. 2011.
- [111] T. Bouckenooghe *et al.*, "Adipose tissue macrophages (ATM) of obese patients are releasing increased levels of prolactin during an inflammatory challenge: a role for prolactin in diabetes?," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, no. 4, pp. 584–593, Apr. 2014.
- [112] A. Tripathi and A. Sodhi, "Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase signal transduction pathways," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 12, pp. 3185–3194, May 2007.
- [113] R. Oberbeck *et al.*, "Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice," *J. Surg. Res.*, vol. 113, no. 2, pp. 248–256, Aug. 2003.
- [114] D. Lipiner-Friedman *et al.*, "Adrenal function in sepsis: the retrospective Corticus cohort study," *Crit. Care Med.*, vol. 35, no. 4, pp. 1012–1018, Apr. 2007.
- [115] O. Lesur *et al.*, "Proven infection-related sepsis induces a differential stress response early after ICU admission," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 14, no. 4, p. R131, 2010.
- [116] S. R. Bornstein, W. C. Engeland, M. Ehrhart-Bornstein, and J. P. Herman, "Dissociation of ACTH and glucocorticoids," *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, vol. 19, no. 5, pp. 175–180, Jul. 2008.
- [117] E. Boonen *et al.*, "Reduced cortisol metabolism during critical illness," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 16, pp. 1477–1488, Apr. 2013.
- [118] P. E. Marik, "Critical illness-related corticosteroid insufficiency," *Chest*, vol. 135, no. 1, pp. 181–193, Jan. 2009.
- [119] E. H. Stolte, B. M. L. V. van Kemenade, H. F. J. Savelkoul, and G. Flik, "Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity," *J. Endocrinol.*, vol. 190, no. 1, pp. 17–28, Jul. 2006.
- [120] J. E. Goodwin, Y. Feng, H. Velazquez, and W. C. Sessa, "Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 1, pp. 306–311, Jan. 2013.
- [121] E. H. Stolte, B. M. L. V. van Kemenade, H. F. J. Savelkoul, and G. Flik, "Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity," *J. Endocrinol.*, vol. 190, no. 1, pp. 17–28, Jul. 2006.
- [122] R. Kumar and E. B. Thompson, "Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 5, pp. 383–394, Apr. 2005.
- [123] E. S. Dieken and R. L. Miesfeld, "Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 589–597, Feb. 1992.
- [124] S. Vandevyver, L. Dejager, and C. Libert, "Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor," *Endocr. Rev.*, vol. 35, no. 4, pp. 671–693, Aug. 2014.
- [125] C. Beger *et al.*, "Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach," *Br. J. Haematol.*, vol. 122, no. 2, pp. 245–252, Jul. 2003.
- [126] N. L. Krett, S. Pillay, P. A. Moalli, P. R. Greipp, and S. T. Rosen, "A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 13, pp. 2727–2729, Jul. 1995.
- [127] I. Grad and D. Picard, "The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 2–12, Sep. 2007.
- [128] L. J. Terry, E. B. Shows, and S. R. Wenthe, "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport," *Science*, vol. 318, no. 5855, pp. 1412–1416, Nov. 2007.
- [129] I. Rogatsky and L. B. Ivashkiv, "Glucocorticoid modulation of cytokine signaling," *Tissue Antigens*, vol. 68, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2006.
- [130] C. K. Glass and K. Saijo, "Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 365–376, May 2010.

- [131] S. Ogawa *et al.*, "Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors," *Cell*, vol. 122, no. 5, pp. 707–721, Sep. 2005.
- [132] T. H. Leung, A. Hoffmann, and D. Baltimore, "One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers," *Cell*, vol. 118, no. 4, pp. 453–464, Aug. 2004.
- [133] Y. Chinenov *et al.*, "Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 29, pp. 11776–11781, Jul. 2012.
- [134] I. Rogatsky, H. F. Luecke, D. C. Leitman, and K. R. Yamamoto, "Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 26, pp. 16701–16706, Dec. 2002.
- [135] F. L. Groeneweg, H. Karst, E. R. de Kloet, and M. Joëls, "Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response," *J. Endocrinol.*, vol. 209, no. 2, pp. 153–167, May 2011.
- [136] A. C. B. Cato, A. Nestl, and S. Mink, "Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways," *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, vol. 2002, no. 138, p. re9, Jun. 2002.
- [137] S. Vernocchi *et al.*, "Membrane glucocorticoid receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects," *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 12, no. 7, pp. 1764–1779, Jul. 2013.
- [138] A. Hafezi-Moghadam *et al.*, "Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 473–479, May 2002.
- [139] R. A. Samarasinghe, S. F. Witchell, and D. B. DeFranco, "Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling," *Cell Cycle Georget. Tex*, vol. 11, no. 15, pp. 2819–2827, Aug. 2012.
- [140] B. Bartholome *et al.*, "Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 70–80, Jan. 2004.
- [141] S. Yamagata *et al.*, "Non-genomic inhibitory effect of glucocorticoids on activated peripheral blood basophils through suppression of lipid raft formation," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 170, no. 1, pp. 86–93, Oct. 2012.
- [142] B. Hinz and R. Hirschelmann, "Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 10, pp. 1273–1277, Oct. 2000.
- [143] N. C. Nicolaidis, E. Kyratzi, A. Lamprokostopoulou, G. P. Chrousos, and E. Charmandari, "Stress, the stress system and the role of glucocorticoids," *Neuroimmunomodulation*, vol. 22, no. 1–2, pp. 6–19, 2015.
- [144] M. Löwenberg *et al.*, "Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN," *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 10, pp. 1023–1029, Oct. 2006.
- [145] N. Ismaili and M. J. Garabedian, "Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1024, pp. 86–101, Jun. 2004.
- [146] T. Kino *et al.*, "Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress," *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 21, no. 7, pp. 1552–1568, Jul. 2007.
- [147] A. J. Galliher-Beckley and J. A. Cidlowski, "Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease," *IUBMB Life*, vol. 61, no. 10, pp. 979–986, Oct. 2009.
- [148] W. Chen *et al.*, "Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression," *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 22, no. 8, pp. 1754–1766, Aug. 2008.
- [149] K. Ito *et al.*, "Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 1, pp. 7–13, Jan. 2006.
- [150] T. Kino and G. P. Chrousos, "Acetylation-mediated epigenetic regulation of glucocorticoid receptor activity: circadian rhythm-associated alterations of glucocorticoid actions in target tissues," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 336, no. 1–2, pp. 23–30, Apr. 2011.

- [151] E. Charmandari *et al.*, "Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e25612, 2011.
- [152] B. J. Deroo, C. Rentsch, S. Sampath, J. Young, D. B. DeFranco, and T. K. Archer, "Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 12, pp. 4113–4123, Jun. 2002.
- [153] T. Kino, S.-H. Liou, E. Charmandari, and G. P. Chrousos, "Glucocorticoid receptor mutants demonstrate increased motility inside the nucleus of living cells: time of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) is an integrated measure of receptor function," *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. 10, no. 7–12, pp. 80–88, Dec. 2004.
- [154] Y. Le Dren, N. Mincheneau, P. Le Goff, and D. Michel, "Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation," *Endocrinology*, vol. 143, no. 9, pp. 3482–3489, Sep. 2002.
- [155] S. Tian, H. Poukka, J. J. Palvimo, and O. A. Jänne, "Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor," *Biochem. J.*, vol. 367, no. Pt 3, pp. 907–911, Nov. 2002.
- [156] Y. Le Dren, N. Mincheneau, P. Le Goff, and D. Michel, "Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation," *Endocrinology*, vol. 143, no. 9, pp. 3482–3489, Sep. 2002.
- [157] F. Ritossa, "Discovery of the heat shock response," *Cell Stress Chaperones*, vol. 1, no. 2, pp. 97–98, Jun. 1996.
- [158] C. A. Colaco, C. R. Bailey, K. B. Walker, and J. Keeble, "Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity," *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 461230, 2013.
- [159] D. P. Gelain *et al.*, "Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis," *Shock Augusta Ga*, vol. 35, no. 5, pp. 466–470, May 2011.
- [160] F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl, "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein," *Science*, vol. 295, no. 5561, pp. 1852–1858, Mar. 2002.
- [161] S. Basu, R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, and P. K. Srivastava, "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway," *Int. Immunol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1539–1546, Nov. 2000.
- [162] A. Asea *et al.*, "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 435–442, Apr. 2000.
- [163] A. Asea *et al.*, "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 15028–15034, Apr. 2002.
- [164] R. Aneja, K. Odoms, K. Dunsmore, T. P. Shanley, and H. R. Wong, "Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 177, no. 10, pp. 7184–7192, Nov. 2006.
- [165] H. Chen *et al.*, "Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 13, pp. 3145–3152, May 2006.
- [166] A.-L. Joly, G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli, and C. Garrido, "Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity," *J. Innate Immun.*, vol. 2, no. 3, pp. 238–247, 2010.
- [167] W. Van Molle *et al.*, "HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock," *Immunity*, vol. 16, no. 5, pp. 685–695, May 2002.
- [168] M. T. Ganter *et al.*, "Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 291, no. 3, pp. L354–361, Sep. 2006.
- [169] X. Zhang *et al.*, "Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome," *Cell Stress Chaperones*, vol. 15, no. 5, pp. 675–686, Sep. 2010.
- [170] J.-F. Pittet, H. Lee, D. Morabito, M. B. Howard, W. J. Welch, and R. C. Mackersie, "Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival," *J. Trauma*, vol. 52, no. 4, p. 611–617; discussion 617, Apr. 2002.
- [171] D. P. Gelain *et al.*, "Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis," *Shock Augusta Ga*, vol. 35, no. 5, pp. 466–470, May 2011.

- [172] A. Gupta *et al.*, "Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 4, pp. 2756–2766, Jan. 2013.
- [173] K. A. Borkovich, F. W. Farrelly, D. B. Finkelstein, J. Taulien, and S. Lindquist, "hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 3919–3930, Sep. 1989.
- [174] W. B. Pratt and D. O. Toft, "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones," *Endocr. Rev.*, vol. 18, no. 3, pp. 306–360, Jun. 1997.
- [175] M. Taipale, D. F. Jarosz, and S. Lindquist, "HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 515–528, Jul. 2010.
- [176] M. Brown and C. Wittwer, "Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 8 Pt 2, pp. 1221–1229, Aug. 2000.
- [177] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871–874, Sep. 1971.
- [178] M. Bergquist, P. Jirholt, M. Nurkkala, C. Rylander, G. Hedenstierna, and C. Lindholm, "Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxic shock," *J. Infect.*, vol. 69, no. 2, pp. 113–122, Aug. 2014.
- [179] C. Ledderose *et al.*, "Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124--induced downregulation of glucocorticoid receptor- α ," *Crit. Care Med.*, vol. 40, no. 10, pp. 2745–2753, Oct. 2012.
- [180] E. L. T. van den Akker *et al.*, "Glucocorticoid receptor mRNA levels are selectively decreased in neutrophils of children with sepsis," *Intensive Care Med.*, vol. 35, no. 7, pp. 1247–1254, Jul. 2009.
- [181] S. Siebig *et al.*, "Decreased cytosolic glucocorticoid receptor levels in critically ill patients," *Anaesth. Intensive Care*, vol. 38, no. 1, pp. 133–140, Jan. 2010.
- [182] J. A. Indyk *et al.*, "Reduced glucocorticoid receptor protein expression in children with critical illness," *Horm. Res. Pædiatrics*, vol. 79, pp. 169–178, 2013.
- [183] D. Duma, J. E. Silva-Santos, and J. Assreuy, "Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats," *Crit. Care Med.*, vol. 32, no. 11, pp. 2304–2310, Nov. 2004.
- [184] D. Duma, J. B. Collins, J. W. Chou, and J. A. Cidlowski, "Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence," *Sci. Signal.*, vol. 3, no. 143, p. ra74, 2010.
- [185] C. Vogel and E. M. Marcotte, "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 227–232, Apr. 2012.
- [186] X. Sun, D. R. Fischer, T. A. Pritts, C. J. Wray, and P.-O. Hasselgren, "Expression and binding activity of the glucocorticoid receptor are upregulated in septic muscle," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 282, no. 2, pp. R509–518, Feb. 2002.
- [187] I. A. Goecke *et al.*, "Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines in vitro," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 8, pp. 2115–2123, Mar. 2007.
- [188] G. J. Molijn *et al.*, "Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 80, no. 6, pp. 1799–1803, Jun. 1995.
- [189] M. Bergquist, C. Lindholm, M. Strinnholm, G. Hedenstierna, and C. Rylander, "Impairment of neutrophilic glucocorticoid receptor function in patients treated with steroids for septic shock," *Intensive Care Med. Exp.*, vol. 3, no. 1, p. 59, Dec. 2015.
- [190] H. R. Wong, "Clinical review: sepsis and septic shock--the potential of gene arrays," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 16, no. 1, p. 204, Feb. 2012.
- [191] G. J. Molijn *et al.*, "Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leucocyte in patients with sepsis or septic shock," *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 43, no. 2, pp. 197–203, Aug. 1995.
- [192] K. Vardas *et al.*, "Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90 α in severe sepsis and SIRS," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 803561, 2014.

- [193] E. Kirschke, D. Goswami, D. Southworth, P. R. Griffin, and D. A. Agard, "Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles," *Cell*, vol. 157, no. 7, pp. 1685–1697, Jun. 2014.
- [194] B. L. Conway-Campbell *et al.*, "The HSP90 molecular chaperone cycle regulates cyclical transcriptional dynamics of the glucocorticoid receptor and its coregulatory molecules CBP/p300 during ultradian ligand treatment," *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 25, no. 6, pp. 944–954, Jun. 2011.
- [195] M.-D. Fitrolaki, H. Dimitriou, M. Venihaki, M. Katrinaki, S. Ilija, and G. Briassoulis, "Increased extracellular heat shock protein 90 α in severe sepsis and SIRS associated with multiple organ failure and related to acute inflammatory-metabolic stress response in children," *Medicine (Baltimore)*, vol. 95, no. 35, p. e4651, Aug. 2016.
- [196] J. Oura *et al.*, "Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells," *Int. Immunol.*, vol. 23, no. 4, pp. 223–237, Apr. 2011.
- [197] P. Cecchini *et al.*, "The soluble recombinant *Neisseria meningitidis* adhesin NadA(Δ 351-405) stimulates human monocytes by binding to extracellular Hsp90," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e25089, 2011.
- [198] A. Ambade, D. Catalano, A. Lim, and P. Mandrekar, "Inhibition of heat shock protein (molecular weight 90 kDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice," *Hepatology Baltim. Md*, vol. 55, no. 5, pp. 1585–1595, May 2012.
- [199] Y.-L. Wang *et al.*, "17-DMAG, an HSP90 Inhibitor, Ameliorates Multiple Organ Dysfunction Syndrome via Induction of HSP70 in Endotoxemic Rats," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, p. e0155583, 2016.
- [200] G. Briassoulis *et al.*, "Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies--a hypothetical 'comparative' study," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 101023, 2014.
- [201] T.-N. Tsai *et al.*, "Release of endogenous heat shock protein 72 on the survival of sepsis in rats," *J. Surg. Res.*, vol. 198, no. 1, pp. 165–174, Sep. 2015.
- [202] S. B. Flohé, J. M. Bangen, S. Flohé, H. Agrawal, K. Bergmann, and F. U. Schade, "Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins," *Shock Augusta Ga*, vol. 27, no. 5, pp. 494–502, May 2007.
- [203] A. De Maio, "Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa," *Cell Stress Chaperones*, vol. 16, no. 3, pp. 235–249, May 2011.
- [204] S. Schmidt, J. Rainer, C. Ploner, E. Presul, S. Riml, and R. Kofler, "Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance," *Cell Death Differ.*, vol. 11 Suppl 1, pp. S45-55, Jul. 2004.
- [205] N. Sundahl, J. Bridelance, C. Libert, K. De Bosscher, and I. M. Beck, "Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds," *Pharmacol. Ther.*, vol. 152, pp. 28–41, Aug. 2015.
- [206] P. Cejková *et al.*, "Monitoring of the course of sepsis in hematological patients by extrapituitary prolactin expression in peripheral blood monocytes," *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, vol. 61, no. 5, pp. 481–488, 2012.
- [207] K. F. Breuel *et al.*, "Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: implications for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections," *Neuroimmunomodulation*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [208] A. Galusova *et al.*, "Dynamic neuroendocrine changes in critically ill patients with polytrauma," *Neuro Endocrinol. Lett.*, vol. 36, no. 5, pp. 498–503, 2015.


Ξενόγλωσσες Δημοσιεύσεις

RESEARCH

Open Access



Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality

Konstantinos Vardas^{1,2}, Stavroula Ili², Amalia Sertedaki³, Evangelia Charmandari³, Efrossini Briassoulis⁴, Dimitris Goukos⁴, Kleovoulos Apostolou¹, Katerina Psarra⁵, Efthimia Botoula⁶, Stylianos Tsagarakis⁶, Eleni Magira¹, Christina Routsis¹, Constantine A. Stratakis⁷, Serafim Nanas¹ and George Briassoulis^{2*} 

* Correspondence:

ggbriass@otenet.gr

²Pediatric Intensive Care Unit, University Hospital, University of Crete, 71500 Heraklion, Crete, Greece

Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Background: The purposes of this study are to examine if the human glucocorticoid receptor (hGR) isoform- α mRNA and hGR protein expressions are deficient in the acute phase of sepsis (S) compared to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and healthy subjects (H) and to evaluate if the hGR α and hGR alterations are associated with cortisol changes and if they are related to (1) extracellular and intracellular heat shock proteins (HSP) 72 and 90 α ; (2) ACTH, prolactin, and interleukins (ILs); and (3) outcome.

Methods: Patients consecutively admitted to a university hospital intensive care unit (ICU) with S ($n = 48$) or SIRS ($n = 40$) were enrolled in the study. Thirty-five H were also included. Total mRNA was isolated from peripheral blood samples and cDNA was prepared. RT-PCR was performed. Intracellular hGR and HSP expression in monocytes and/or neutrophils was evaluated using four-colour flow cytometry. Serum prolactin, ACTH, and cortisol concentrations were also measured. ELISA was used to evaluate serum ILs and extracellular (e) HSPs (eHSP72, eHSP90 α).

Results: hGR protein was higher in S compared to H and SIRS; hGR α mRNA was higher in S compared to H ($p < 0.05$). In sepsis, hGR protein and eHSP72 were higher among non-survivors compared to survivors ($p < 0.05$). The hGR MFI and hGR α mRNA fold changes were significantly related to each other ($r_s = 0.64$, $p < 0.001$). Monocyte hGR protein expression was positively correlated with extracellular and intracellular HSPs, cortisol, and ILs and negatively to organ dysfunction ($p < 0.05$). HSPs, hGR, and cortisol were able to discriminate sepsis from SIRS (AUROC > 0.85 , $p < 0.05$). In sepsis, monocyte-hGR protein and eHSP72 were strong predictors of mortality (AUROC > 0.95 , $p < 0.04$).

Conclusions: Acute-phase sepsis is associated with increased hGR expression and cortisol concentrations, possibly implying no need for exogenous steroids. At this stage, hGR is able to predict sepsis and outcome and is related to stress-activated bio-molecules and organ dysfunction.

Keywords: Glucocorticoid receptor (GR), Cortisol, Heat shock protein 72, HSP90 α , Sepsis, SIRS



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Background

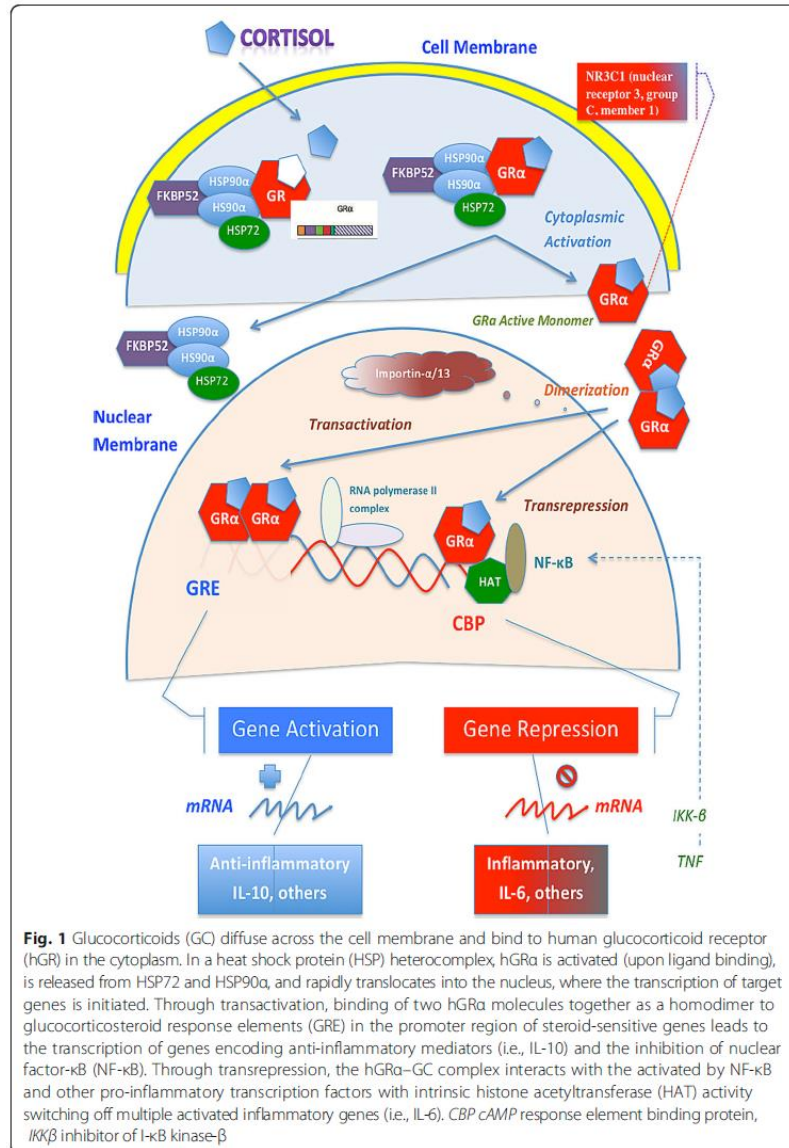
Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [1]. The activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis results in increased cortisol concentrations driven by increased secretion of ACTH [2]. Also, decreased activity of the cortisol metabolizing enzymes impairs cortisol clearance, enhances hypercortisolism, and suppresses ACTH secretion by feedback inhibition [3].

In humans, glucocorticoids (GCs) exert their effects through binding to their cognate receptor, the glucocorticoid receptor, a ligand-dependent transcription factor [4]. The human glucocorticoid receptor (hGR) is encoded by the *NR3C1* gene, which is located on the long arm of chromosome 5 (5q31.3) and is composed of ten exons. Alternative splicing of exon nine generates two highly homologous receptor isoforms, hGR α , and hGR β . The residing in the cytoplasm hGR α functions as a ligand-dependent transcription factor [4]. The hGR β does not bind glucocorticoid agonists and exerts a dominant negative effect on the transcriptional activity of hGR α [5].

In the absence of ligand, the hGR α resides mostly in the cytoplasm of cells as part of a hetero-oligomeric complex, which contains chaperone heat shock proteins (HSPs) 90 and 70. HSP90 regulates ligand binding, as well as cytoplasmic retention of hGR α by exposing the ligand-binding site and masking the two nuclear localization sequences [4]. HSP90 α and HSP72 work together as the only two essential components of the five-protein system for allowing hGR α to bind the incoming steroid hormone by enhancing its affinity for the ligand [6]. Upon ligand binding and phosphorylation, the hGR α dissociates from HSPs and translocates into the nucleus. Nuclear hGR α binds to glucocorticoid response elements (GREs) of target genes and upregulates or downregulates their expression, depending on GRE sequence and promoter context [4] (Fig. 1).

GCs downregulate the expression of their receptor through transcriptional, post-transcriptional, and posttranslational mechanisms [7]. Thus, treatment with GCs activates a negative feedback loop by inducing a specific critical suppressor of *NR3C1* gene, the microRNA-124, thereby impeding the hGR α upregulation and shifting the hGR α :hGR β ratio toward hGR β . Such a shift limits or negatively impacts the GC anti-inflammatory effects by aggravating the GC resistance [8]. Septic serum induces the expression of not only hGR α but also of hGR β in both T and B cells in culture, supporting a possible GC resistance of specific cell subpopulations in sepsis [9]. In pediatric sepsis, however, hGR β mRNA levels did not change significantly during sepsis, verifying inconsistency with results of hGR β [10]. By investigating hGR α mRNA expression rather than protein levels [8], these studies produced inconsistent results about the hGR α expression and function in critical illness.

To the best of our knowledge, the assessment of both protein and mRNA hGR α expression in sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in relation to their hetero-oligomeric HSPs parts, and the stress-induced inflammatory response has not been investigated previously. In this study, we assessed the hGR protein expression in monocytes and the hGR α mRNA in whole blood in intensive care unit (ICU) patients with early-onset sepsis (S) compared to SIRS or healthy



control subjects (H). We examined the hypothesis that the hormonal-innate immune stress-responding pairs of hGR-cortisol and hGR-HSPs are adequately expressed in the acute phase of sepsis. We also examined the hypothesis that the hGR mRNA fold change and protein expression alterations are associated with simultaneous cortisol, extracellular or intracellular HSP72 or HSP90 α changes, or with stress-activated bio-molecules and organ dysfunction. Finally, we evaluated the ability of the hGR alterations to predict sepsis or outcome.

Methods

Patients

The study was approved by the institutional review board of Evangelismos Hospital and was performed during a 24-month period between September 2013 and September 2015. Written informed consent was obtained from the relatives of patients admitted to the ICU. Patients aged 18–75 years consecutively admitted with early-onset (<24 h) sepsis/septic shock or SIRS were eligible for enrollment. The sepsis group (S) included patients ($n = 48$) with an identified source of infection and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) [11] score >2 , according to the updated Sepsis-3 definition [12]. Of those, 59.5% fulfilled the septic shock criteria (need for inotropic support to maintain MAP >65 mmHg and lactate levels >2 mmol/L). The non-infectious SIRS group included trauma patients ($n = 40$) who met at least two of the four conventional criteria for SIRS [13] and represented the first control group (ICU control). The H group included healthy volunteers ($n = 35$), representing the second control group (healthy individuals). Exclusion criteria were (a) malignancy, (b) autoimmune diseases, (c) prior use of corticoids, (d) immune deficiency disorders, and (e) late sepsis or SIRS >48 h after admission. Acute Physiology and Chronic Evaluation-II (APACHE II) [14], multiple organ dysfunction (MODS) [15], Simplified Acute Physiology Score-III (SAPS III) [16], and SOFA scores were recorded on admission. Blood samples were obtained at 8 am because of a peripheral CLOCK-mediated circadian acetylation of the human GR counter-regulating the actions of diurnally fluctuating cortisol [17]. Blood gas values and clinical laboratory data were obtained from laboratory records.

Laboratory assays

RNA isolation, reverse transcription and RT-PCR for GR α (NR3C1)

Total RNA was isolated from peripheral blood employing the TRIzol Reagent (Ambion by Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA (1 μ g) was DNase treated using RQ1 RNase-free DNase (Promega) and reverse transcription was carried employing the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science). Duplicate samples of the cDNA underwent employing primers and TaqMan probes designed by TIB MOLBIOL and the LightCycler 480 Probes Master Kit (Roche) on a LightCycler 480 System (Roche). The reference gene used in this study was the RPLP0. Repeated trials for hGR β detection in samples of all groups were mostly unsuccessful, so that only hGR α mRNA was measured. Standard curves were constructed using triplicate samples of a standard RNA sample for hGR α and RPLP0. The sequence of the primers and probes of the target and the reference gene were:

hNR3C1a S 5'-TATgCATgAAgTggTTgAAAATCTCC-3'(exon 9)
 hNR3C1a A 5'-ggTATCTgATTggTgATgATTTCAGC-3' (exon 9)
 hNR3C1 FAM-CATCTCggggAATCAATACTCATggTCTT-BBQ (exon 9)
 RPLP0-F 5'-CTCTGGAGAACTGCTGCCTCATA-3', (exon 4)
 RPLP0-R 5'-GACTTCACATGGGGCAATGG-3', (exon 5)
 RPLP0 FAM-AGGACCTCACTGAGATCAGGGACATGT-BBQ (exon 4-5)

Data analysis was performed using the Advanced Relative Quantification software of the LightCycler 480.

Flow cytometry for human GR, HSP72, and HSP90α

The monocytes and neutrophils protein expression was evaluated by flow cytometry. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated blood (100 μL) was used for flow cytometric analysis of fresh peripheral blood monocyte (m) and neutrophil (n) HSP72 and HSP90α, and monocytes hGRα protein expressed as mean fluorescence intensity (MFI) were determined after staining surface antigens CD33 and CD45 with 5 μL monoclonal antibodies CD33-PE/Cy5 and CD45 PE/Cy7 (BioLegend, San Diego, USA) followed by HSP72, HSP90α, and hGR intracellular staining with 5 μL HSP72-FITC, 5 μL HSP90α-PE, or 10 μL anti-hGR-FITC monoclonal antibodies, respectively (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA). Anti-hGRα antibodies conjugated to any fluorescence were not commercially available. Additionally, although hGR antibody detects all protein isoforms, hGRα is represented in almost 99% of hGR protein [10]. Non-detection of hGRβ protein with flow cytometry would also be expected when it couldn't be detected on RNA level. Isotype controls were used to check if blocking was needed. Assays were performed according to the manufacturer's instructions using Flow Cytometer FC-500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

ACTH cortisol and prolactin

During the first 48 h after admission to ICU, blood samples for determination of ACTH cortisol and prolactin were collected at 08:00 h. Plasma ACTH was measured using the Immulite 2000 Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), while serum cortisol and prolactin concentrations were determined using the ADVIA Centaur Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Cytokines and extracellular heat shock proteins

Serum cytokine concentrations of IL-6, IL-10, IL-17, and interferon (IFN)-γ were measured by ELISA according to the instructions of the manufacturer. Extracellular plasma levels of HSPs (eHSP72 and eHSP90α) were analyzed by ELISA assay according to the manufacturers' instructions (Invitrogen Carlsbad, CA, USA and Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA, respectively). Inter- and intra-assay confidence intervals (CI) for each analyte were: IL-6:6.2, 7.8; IL-10:3.25, 2.75 IL-17:3.7 and in process, IFN-γ:3.5, 7.3, HSP72:7.1, 15.2, HSP90α < 10. Sensitivities of assays: IL-6 < 2 pg/mL, IL-10 < 1 pg/mL, IL-17 = 2 pg/mL, IFN-γ = 0.03 IU/mL, HSP72 = 90 pg/mL, and HSP90α = 50 pg/mL.

Statistical analysis

The one-sample Kolmogorov–Smirnov test was used to determine the data distribution from measured variables. Data are expressed as median values with range for continuous parameters and as frequencies for categorical variables. The Kruskal–Wallis independent samples test was used to perform comparisons among groups, as appropriate. We ran multiple comparison analyses using post hoc Dunn's pairwise tests with Bonferroni corrections for the Kruskal–Wallis H test; the χ^2 test statistic (H^2) was adopted to calculate the effect size ($w^2 = H^2/(n - 1)$) to avoid the inflation of overall type I error. Between-group comparisons were conducted using the χ^2 test for categorical parameters and Spearman's rank correlation coefficient for correlation

between two continuous variables. The effect size for χ^2 test was measured using the Cramer's V ($V = \sqrt{\chi^2/n.d.f}$) goodness of fit. To evaluate predictive values, we calculated the areas under the receiver operating characteristic curves (AUROC) for variables significantly differing between S and SIRS groups or between survival and non-survival sub-cohorts for the sepsis group. For the predictive values of sepsis or mortality we used biomarkers significantly related to them in bivariate correlations, as appropriate. We consider an AUROC >0.80 as clinically relevant whereas the optimum cutoff value was calculated by the highest sensitivity and specificity combined (Youden index approach). The positive and negative predictive values were also calculated. A two-sided significance level of 0.05 was used for statistical inference. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics (version 22.0; Chicago, IL).

Results

Group differences

Monocytes hGR protein expression was higher in S compared to H and SIRS (Kruskal–Wallis Test, pairwise comparisons); hGR α mRNA was higher in S compared to H (Table 1). Groups also differed regarding severity of illness, hormonal, inflammatory, intracellular, and extracellular innate immune response. The proportions of variability (effect size) in the ranked dependent variables accounted for by grouping variables were >0.20 (medium per Cohen), indicating a fairly strong relationship between sepsis and the expression levels of hGR protein, cortisol, extracellular HSP72 and 90 α , SAPS-III, IL-6, procalcitonin (PCT), age, sex, and mortality (Table 1).

None of the patients had received steroids the last month before admission (exclusion criteria). Fifteen S patients had been started on a stress-dose of hydrocortisone before blood sampling because of catecholamine resistant shock (31%). Neither hGR mRNA nor MFI differed between the steroid and non-steroid group. Although HSP90 α did not differ between groups, eHSP72 was higher and nHSP72 was lower in the group receiving hydrocortisone (stress dose). Prolactin concentrations were higher but ACTH were lower in females compared to males ($p < 0.001$). Cortisol, hGR, hGR α mRNA, HSPs, and ILs did not differ between males and females.

Monocytes hGR bivariate correlations

The hGR MFI and hGR α mRNA fold change were significantly related to each other ($r_s = 0.64$, $p < 0.001$), even when the hGR protein expression was corrected by the percentages of WBC monocytes ($r_s = 0.59$, $p < 0.01$). The expression of hGR protein in monocytes was related to eHSP90 α ($r_s = 0.33$, $p < 0.05$), eHSP72 ($r_s = 0.41$, $p < 0.02$), mHSP90 α ($r_s = 0.60$, $p < 0.001$), nHSP90 α ($r_s = 0.56$, $p < 0.001$), mHSP72 ($r_s = 0.41$, $p < 0.02$), cortisol ($r_s = 0.38$, $p < 0.03$), IL-6 ($r_s = 0.50$, $p < 0.003$), and IL-10 ($r_s = 0.40$, $p < 0.025$) (Fig. 2a–j). hGR MFI was also negatively related to PO₂ ($r_s = -0.72$, $p < 0.02$), PO₂/FiO₂ ($r_s = -0.76$, $p < 0.005$), and albumin ($r_s = -0.77$, $p < 0.01$) and positively to MODS ($r_s = 0.61$, $p < 0.01$) and SOFA ($r_s = 0.56$, $p < 0.03$). hGR α mRNA was related to eHSP72 ($r_s = 0.34$, $p < 0.02$), ACTH ($r_s = 0.36$, $p < 0.005$), IFN- γ ($r_s = 0.42$, $p = 0.001$), C-reactive protein (CRP) ($r_s = 0.25$, $p < 0.05$), and WBC ($r_s = 0.38$, $p < 0.002$). No significant associations were found between hGR α and APACHE II, SAPS III, temperature, PCT, IL-17, lactate, LDH, or glucose.

Table 1 Baseline characteristics at study enrollment and group differences

	Healthy subjects (n = 35)	SIRS (n = 40)	Sepsis (n = 48) ^d	Statistic value χ^2 or H ²	Effect size (w ² or V ²) ^e	P value ^{***}
Age (years) ^a	35 (28–50) ^a	41 (52–53) ^c	58 (44–69) ^{a, c}	34	0.29	<0.001
Gender (male/female)	19/16	31/9	28/20	5.2	0.21	0.07
Mortality in ICU (died/survived (%))	0/35	5/35 (12.5%)	21/27 (43.8%)	10.2	0.34	0.001
Mortality in hospital (died/survived (%))	0/35	6/34 (15.8%)	29/19 (60.4%)	17.5	0.45	<0.001
LOS (days)	NA	15.5 (7–28.5)	18.5 (9.2–36.8)	2	0.03	0.16
APACHE II	NA	15 (10–18) ^c	21 (16–27) ^c	15	0.19	<0.001
SOFA	NA	9 (7–11) ^c	11 (9–13) ^c	11	0.14	0.001
SAPS III	NA	41 (43–58) ^c	41 (61–78) ^c	32	0.44	<0.001
CRP (mg/dl)	NA	7.1 (1.05–15) ^c	21 (8.8–27) ^c	10.5	0.15	0.001
PCT (ng/ml)	NA	0.9 (0.5–1.8) ^c	5.2 (1–34) ^c	7	0.23	0.008
Lactate	NA	2.4 (1.4–4.2)	2.8 (1.3–5)	0.23	0.00	0.63
Glucose (mg/dl)	NA	154 (128–189) ^c	219 (145–299) ^f	8.6	0.12	0.003
Albumin (g/dl)	NA	3 (2.3–3.4) ^f	2.5 (2.1–2.9) ^c	6.3	0.09	0.012
WBC (K μ l)	NA	11.4 (7.3–15.5)	10.9 (2.6–19.9)	0.12	0.00	0.91
hGR α mRNA (fold change)	0.50 (0.12–0.9) ^a	0.64 (0.32–0.77)	0.74 (0.52–1.23) ^a	8.3	0.08	0.016
hGR (MFI)	0.95 (0.76–1.9) ^a	1.1 (0.43–2.5) ^c	3.3 (1.6–4.6) ^{a, c}	9.6	0.28	0.008
Prolactin (ng/ml)	7.5 (5–10) ^{a, b}	18.3 (11–25) ^b	15.4 (9–32) ^a	20.4	0.17	<0.001
Cortisol (μ g/dl)	12.3 (9–15) ^a	16.2 (11–23) ^f	32.8 (21–67) ^{a, c}	38.6	0.33	<0.001
ACTH (pg/ml)	17.5 (13–33) ^b	10 (6–19) ^{b, c}	18.6 (10–38) ^f	10.4	0.09	<0.005
eHSP90 α (ng/ml)	10.5 (1.2–2.3) ^{a, b, c}	32 (22–57) ^{b, c}	71 (31–124) ^{a, c}	39.5	0.33	<0.001
eHSP72 (ng/ml)	0.26 (0.14–0.41) ^a	0.29 (0.19–0.49) ^c	0.95 (0.41–2.5) ^{a, c}	32	0.29	<0.001
mHSP90 α (MFI)	24 (12–82)	36 (10.5–64)	33 (7.6–56)	0.07	0.00	0.96
mHSP72 (MFI)	19.6 (13–32)	22.8 (11–52)	18 (11.7–30.7)	0.84	0.01	0.65

Table 1 Baseline characteristics at study enrollment and group differences (Continued)

nHSP90α (MFI)	11 (5.4–25)	17 (4.8–25)	18.3 (6.8–38)	3.5	0.03	0.17
nHSP72 (MFI)	77 (44–110) ^a	75 (28–154) ^c	40 (25–65) ^{a, c}	13.7	0.12	0.001
IL-6 (pg/ml)	1.4 (0.98–2.5) ^{a, b}	77 (21–213) ^b	203 (60–539) ^a	72	0.60	<0.001
IL-10 (ng/ml)	0.01 (0.1–9.5) ^a	4.9 (0.1–11) ^c	48 (0.1–58) ^{a, c}	15.6	0.13	<0.001
IL-17 (ng/ml)	0.2 (0.2–33)	0.2 (0.2–64)	0.2 (0.2–7.8)	0.05	0.00	0.98
IFN-γ (pg/ml)	6.2 (0.44–9.8)	4.7 (0.13–7.8) ^c	9.7 (4–17) ^c	12	0.10	0.03

APACHE Acute Physiology and Chronic Evaluation, CRP C-reactive protein, KGRα human glucocorticoid receptor α-isoform, eHSP extracellular heat shock protein, nHSP neutrophil-HSP, mHSP monocyte-HSP, IFN-γ Interferon gamma, IL Interleukin, MFI mean fluorescence intensity, PCT procalcitonin, SAPS II Simplified Acute Physiology Score, SIRS systematic inflammatory response syndrome, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, WBC white blood cells

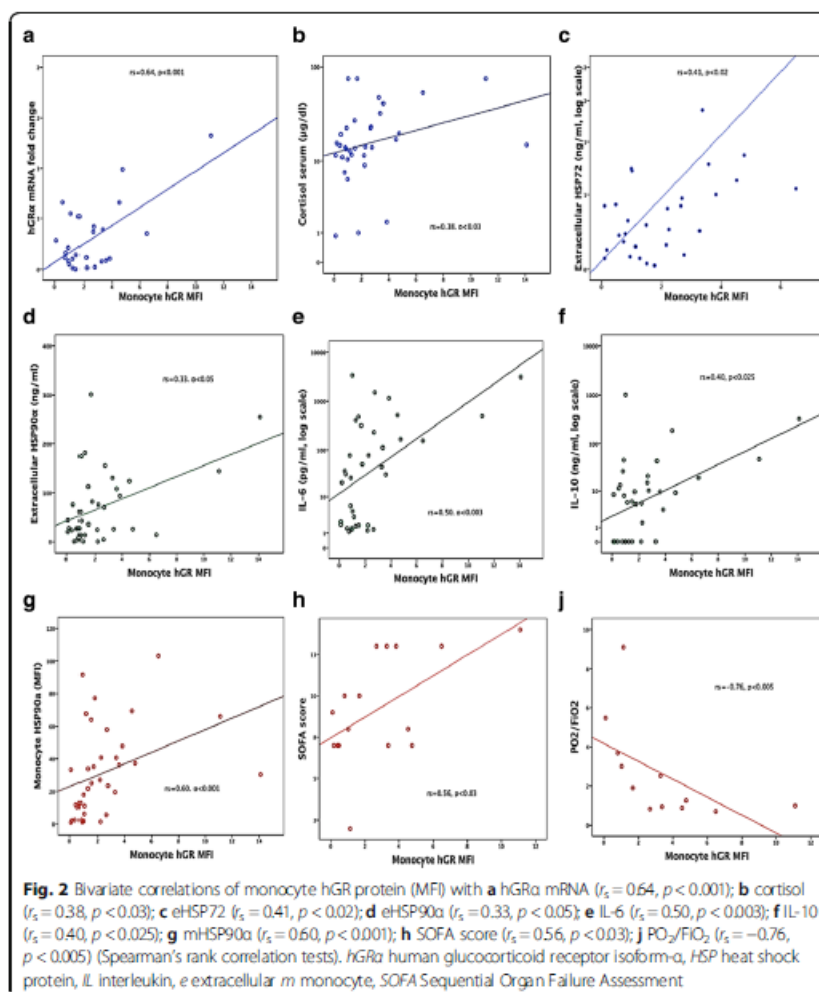
**Per Cohen for $df = 2$, the effect size should be viewed as small 0.07, medium 0.21, and large 0.35

***Asymptomatic significance (two-sided test) using the independent samples Kruskal-Wallis test; a p value <0.05 was considered statistically significant

^a–^dDunn-Bonferroni multiple comparisons (all pairwise); ^a $p < 0.05$ between healthy subjects and S groups; ^b $p < 0.05$ between healthy subjects and SIRS groups; ^c $p < 0.05$ between S and SIRS groups

^eSeptic shock, $n = 25$ (60%)

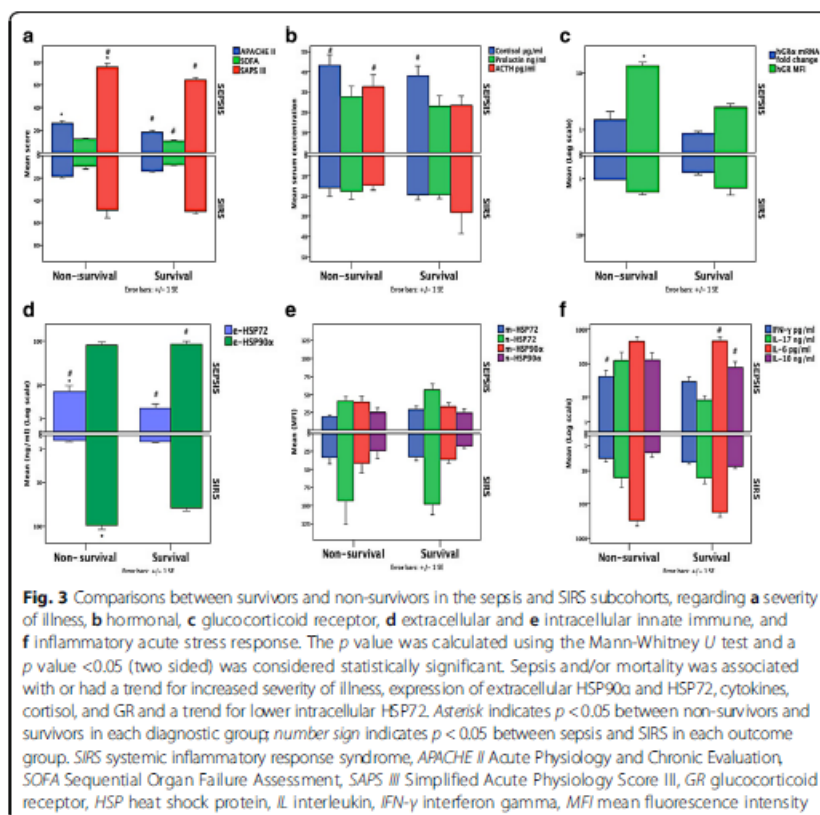
^fData are expressed as median (IQR, interquartile range)



Mortality

More patients with sepsis died compared to those with SIRS (43.8 vs. 12.5%, $p = 0.001$) (Table 1). Within the sepsis group, more patients with septic shock showed a trend to die compared to those without (56 vs. 29%, $p = 0.08$). In sepsis group, APACHE II ($p < 0.001$), SAPS III ($p < 0.02$), hGR protein expression in monocytes ($p < 0.04$), and eHSP72 ($p < 0.05$) were higher among non-survivors compared to survivors. In SIRS, eHSP90 α levels ($p < 0.02$) were higher among non-survivors (Fig. 3a–f).

Regarding survivors, when septic and SIRS patients were compared, APACHE II ($p < 0.03$), SOFA ($p < 0.03$), SAPS III ($p < 0.001$), cortisol ($p = 0.001$), eHSP72 ($p < 0.001$), eHSP90 α ($p < 0.02$), IL-6 ($p = 0.005$), and IL-10 ($p < 0.01$) were higher among septic compared to SIRS survivors. Regarding non-survivors, SAPS III ($p < 0.01$), cortisol ($p < 0.02$), ACTH ($p < 0.04$), eHSP72 ($p < 0.05$), and IFN- γ ($p < 0.02$) were higher among septic compared to SIRS patients (Fig. 3a–f).



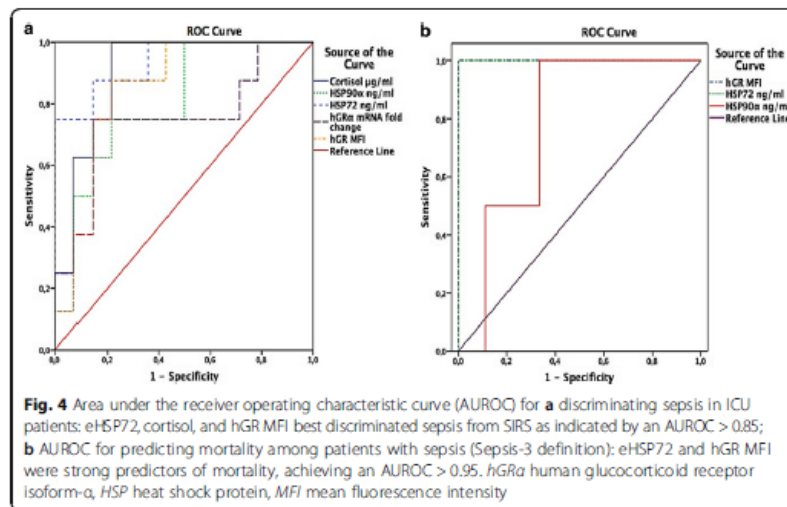
Intracellular mHSP72 and nHSP72 were non-significantly decreased in sepsis compared to SIRS, especially among non-survivors. In the septic shock subcohort nHSP72 and nHSP90α were more repressed compared to non-septic shock ($p < 0.05$), the hGRα mRNA showing a similar trend.

hGR predictive values

We generated ROC curves for hGR, stress-proteins (HSPs) expressing innate immunity, and cortisol with the best *p* values for discriminating sepsis among ICU patients (Fig. 4a) or predicting mortality in the subpopulation of Sepsis-3 patients (Fig. 4b). Extracellular HSP72, cortisol, and hGR protein expression in monocyte best-discriminated sepsis from SIRS as indicated by an AUROC > 0.85 with cutoff values and positive and negative predictive values presented in Table 2. In the sepsis group only, monocyte-hGR protein expression and eHSP72 were strong predictors of mortality, achieving an AUROC > 0.95 with cutoff values and positive and negative predictive values presented in Table 3.

Discussion

In this study, we showed that early expression of hGRα mRNA or hGR protein expression in monocytes is significantly higher in patients with sepsis compared to healthy



controls and/or patients with SIRS. Furthermore, we verified the hypothesis that the hormonal-innate immune stress-responding pairs of hGR-cortisol and hGR-HSPs are adequately expressed in the early phase of sepsis. We also showed that the hGR mRNA fold change and protein expression alterations are associated with simultaneous cortisol and extracellular or intracellular HSP72 or HSP90α changes. It is possible that hGR is induced in monocytes, in association with the HSPs, to counter-balance the acute inflammatory response early in sepsis. We finally showed that in the acute phase of stress, hGR is able to predict sepsis and outcome and is related with stress-activated bio-molecules and organ dysfunction.

Our finding of upregulation of monocyte hGR expression could represent an adaptive response aiming at dampening the aggressive inflammation in early sepsis. This is in agreement with experimental studies showing increased hGR protein expression and binding capacity in circulating lymphocytes, monocytes, and splenocytes in murine endotoxic shock [18]. Earlier studies had shown lower hGRα mRNA trends in sepsis either in adult T lymphocytes [8] or in neutrophils from children [10] and decreased

Table 2 Receiver operating characteristic curve analysis to determine the optimum cutoff values and the positive and negative predictive values of hGR, cortisol, and HSPs for the prediction of sepsis in ICU patients

Biomarkers	Parameters							
	AUROC (95% CI)	P value	Sensitivity	Specificity	J	Cutoff	PPV (%)	NPV (%)
eHSP72	0.94 (0.84–1.0)	0.001	0.88	0.79	0.66	0.40	73	68
Cortisol	0.90 (0.77–1.0)	0.002	1.00	0.79	0.79	15.7	66	70
hGR MFI	0.85 (0.69–1.0)	0.008	0.88	0.79	0.66	2.66	73	49
eHSP90α	0.80 (0.62–0.99)	0.02	0.75	0.79	0.54	66.0	72	56
hGRα mRNA	0.75 (0.52–0.98)	0.05	0.75	0.86	0.61	0.38	66	67

Abbreviations: AUROC area under the receiver operating characteristic curve, CI confidence interval, J Youden's index, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, eHSP extracellular heat shock protein, hGR human glucocorticoid receptor, MFI mean fluorescent intensity

Table 3 Receiver operating characteristic curve analysis to determine the optimum cutoff values and the positive and negative predictive values of hGR, cortisol, and HSPs for the prediction of mortality in ICU patients with Sepsis-3

Biomarkers	Parameters							
	AUROC (95% CI)	P value	Sensitivity	Specificity	J	Cutoff	PPV (%)	NPV (%)
hGR MFI	1.00 (1.00–1.00)	0.034	1.00	0.89	0.89	4.64	66	58
eHSP72	1.00 (1.00–1.00)	0.034	1.00	0.89	0.89	2.1	53	61
eHSP90α	0.79 (0.49–1.00)	0.23	1.00	0.67	0.67	137.6	44	56

Abbreviations: AUROC area under the receiver operating characteristic curve, CI confidence interval, J Youden's index, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, eHSP extracellular heat shock protein, hGR human glucocorticoid receptor, MFI mean fluorescent intensity

³H-dexamethasone binding [19]. Importantly, total and cytoplasmic, but not nuclear, hGR protein levels were lower in PBMCs from small groups ($n = 6-7$) of children with sepsis or trauma compared to controls [20]. Earlier research was only done on mRNA, which in our study was shown to produce weaker response compared to protein. Downregulated hGRα in the liver, lung, and spleen but upregulated hGRα mRNA and binding activity have been reported in muscle in endotoxemic rats [21]. Inconsistency in selecting cell subpopulations or methods with different sensitivity in expressing or measuring hGRα might have produced such opposing results.

Although the anti-inflammatory GC actions have been suggested to be more effective in males than in females [22], we did not find any sex-specific influence on hGRα mRNA and hGR-protein expressions, or on serum cortisol, HSP, and ILs concentrations. Similar to our results, others have also observed that there is no correlation between hGRα mRNA levels and admission severity of illness [10]. By generating ROC curves for stress proteins and chaperones, we showed that hGR protein expression in monocytes, stress-proteins (HSPs) expressing innate immunity, and cortisol could discriminate sepsis among ICU patients with acceptable positive and negative predictive values. Acknowledging the limitation of the small sepsis-3 sample, high levels of hGR and eHSP72 were also able to predict mortality among septic patients. These chaperokines (HSPs), expressing innate-immunity, and targeted hormone-response receptors (hGR), seem to represent more sensitive biomarkers in predicting future events than simultaneously calculated or defined severity of illness scores and shock.

hGRα mRNA is produced much more slowly compared to corresponding hGR protein expression, translated at the same time [23]. This is because of several time-consuming steps at RNA processing not required for protein translation. Our finding, showing a good correlation of hGR protein in monocytes with hGRα mRNA, is consistent with reports in other human cells and tissues showing that hGR protein in most cells matches up well with hGRα mRNA levels [24]. Additionally, elevated hGRα mRNA levels correlate with the number of hormone binding sites in septic rats [25] and human lymphocytes [26], leading to increased hGRα binding activity and GC sensitivity [27]. Stimulation of T-cells upregulated the hGRα, possibly rendering T-cells more sensitive to GC, although such a T-cell response was hindered by hydrocortisone [8]. Such a dynamic impact on the expression and function of hGRα might possibly explain why GC are beneficial only when administered early in sepsis [28]. Representing a tissue-specific adaptation,

neutrophil hGR α -binding capacity was decreased in murine sepsis [18] and neutrophil hGR α mRNA was decreased in septic children, leading to increased cortisol resistance of neutrophils, gradually normalized after recovery [10]. This is of particular importance since the prone to apoptosis during sepsis lymphocytes present opposing hGR α mRNA regulation from that of the prone to proliferation neutrophils. By adopting a whole-blood mRNA approach, we were able to provide a more comprehensive picture without missing hGR expression signatures from subpopulations that would potentially have been excluded from the experimental approach [29].

We showed for the first time that hGR protein and/or hGR α mRNA is associated with the cell chaperokines expressing innate immunity, extracellular and intracellular HSP72, and HSP90 α , besides HPA, IL-6, IL-10, and IFN- γ . Expanding results of previous studies, showing an inverse hGR correlation to noradrenaline and lactate [28], we found that the hGR was also related with CRP, WBC, low PO₂/FIO₂, MODS, and SOFA scores. Although a negative correlation between hyperthermia and the number of receptors has been previously suggested [30], we could not find any relation between hGR α and temperature, lactate, glucose, LDH, IL-17, or PCT. In vitro, only heat shock induced mHSP72 and HSP72 mRNA but not lipopolysaccharide [31]. Our findings are in agreement with those of a recent study showing that in sepsis extracellular HSP72 and HSP90 α are increased, while intracellular HSPs are repressed [32]. These data probably imply a key role for the HSP72 and HSP90 α early in sepsis in converting the hGR α to the steroid-binding state [6]. The hGR α -cortisol or ACTH relations and the HSP90 α time-regulation by the pattern of the pulsatile hormones, further support such a possibility [33].

The increased prolactin concentrations in our septic patients, have been previously shown to inhibit cellular immune functions in septic mice, decreasing survival [34], and to play a role in the acute stress response in sepsis [32]. Generation of cardiotoxic sub-fragments of prolactin caused by oxidative stress has been implicated in peripartum cardiomyopathy in women [35]. Although pharmacological blockade of prolactin might offer an innovative therapeutic intervention, the exact role of prolactin and its relation to hGR α in sepsis have still to be delineated.

The antibody and methodology used in our study allowed us to measure total hGR levels without distinction of isoforms, which constitutes a limitation of the current study. It is not possible to speculate if the higher hGR protein levels represent proportionally higher hGR β levels, although we could not detect hGR β on RNA level. The correlation of hGR protein with hGR α mRNA suggests that hGR is mainly representing hGR α , reportedly expressed in extremely higher concentrations than hGR β [10]. Weak correlations of hGR with some inflammatory, hormonal, or organ failure indices, although significant, should be interpreted with caution, probably attributed to the small sample numbers. Limitations of this study are also the lack of longitudinal data and the weakness of a single-center study. An intact HPA axis and GC response are critical to the host response to infectious agents. Also, infectious agents may directly modulate GR functioning [36]. The importance of GR α functioning is clearly shown in septic mice lacking endothelial GR α demonstrating increased mortality, hemodynamic instability, pro-inflammatory cytokine production [37], and inability to downregulate IL-1 β [18]. Our finding of

increased levels of hGR, cortisol, extracellular HSPs, and cytokines in sepsis, especially among non-survivors, probably reflects the intensity of the activation of the HPA axis and acute stress inflammatory and innate-immune response. This increase might not have been attributed to the cell death, not only since the increased hGR levels were unrelated to LDH levels but also because the simultaneously measured abundant intracellular HSP72 and 90 proteins were repressed rather than increased in the sepsis group and among non-survivors.

GCs may induce apoptosis by directly regulating typical apoptosis or survival genes or by inducing cellular distress that triggers the apoptotic cascade [38]. Results of this study indicate that the high-risk patient prepares himself to respond to the “danger” by increasing the eHSP72, eHSP90 α , and cortisol levels in a “ready to bind to an enhanced hGR” state. The higher eHSP72 and lower nHSP72 we found in patients receiving hydrocortisone might probably indicate a higher degree of stress and inflammation in this group. The positive relations of the hGR to the inflammatory biomarkers further support this, along with the simultaneous enhanced ACTH and prolactin, and the organ dysfunction or failure development, when the cell defending itself represses its bioenergetics. Results of this study, showing that cortisol and hGR are increased in the acute phase of sepsis, might indicate that cortisol is not “a limiting factor” early in sepsis. Thus, exogenous cortisol early in sepsis might repress the already enhanced hGR expression through a negative feedback mechanism, increasing the GC resistance. Although an increased hGR expression has also been shown in T lymphocytes during septic shock, regardless of GC treatment, hGR binding capacity was decreased in neutrophils in GC-treated patients [28]. We did not find any monocyte or whole blood hGR difference between patients started on stress hydrocortisone and those not receiving GCs. The decreased neutrophil capacity to bind hGR α in sepsis, however, might impede the response to GC treatment. Accordingly, the use of GCs in septic shock may be dependent on the stage of the sepsis, the reactivity of the HPA axis, and the sensitivity of hGR to the ligand [36]. Non-steroidal selective hGR modulators (Sin EGRAMs) that can activate specific hGR mechanisms and thus alter hGR α -mediated gene expression profiles have now gained more interest using mutant hGR research [39].

Conclusions

In conclusion, early expression of hGR α mRNA or hGR α protein is significantly higher in patients with sepsis compared to healthy controls and/or patients with SIRS. Early in critical illness, the hGR expression can predict sepsis and outcome and is related with stress-activated bio-molecules and organ dysfunction. It is possible that the hGR, in association with the HSPs, is induced in monocytes to facilitate the cortisol binding to counter-balance the increased inflammatory response to the acute stress in early sepsis. Exogenous cortisol in the acute phase of sepsis might decrease the hGR expression through a negative feedback mechanism, increasing the GC resistance. Hopefully, smart research might in future lead to a more individualized approach to GC treatment in sepsis and septic shock, taking into account both the hGR α expression and binding capacity, as well as the balance of the immune-hormonal response.

Publication of clinical datasets

Our dataset contains clinical data, for which we had undertaken an ethical and legal responsibility to respect participants' rights to privacy and to protect their identity. The already received informed consents from participants at the point of recruitment to the trial did not mention any consent for publishing raw data. The institutional review board of Evangelismos Hospital had also demanded all data to be kept privately and not to be distributed. We should have known this possibility to include in our initial project and consent, which, however, we did not know. It is impossible now for the dataset to be considered for publication, because we may compromise anonymity or confidentiality or breach local data protection laws regarding patients' and healthy individuals' data. Patients and controls in an institution in a small period are well known, and it is now impossible to obtain a retrospective consent regarding publication of data.

Abbreviations

AP-1: Activator protein-1; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Evaluation; DBD: DNA-binding domain; GCs: Glucocorticoids; GRE: Glucocorticoid response elements; hGR: Human glucocorticoid receptor; HPA: Hypothalamic-pituitary-adrenal; HSP: Heat shock protein; ICU: Intensive care unit; ILs: Interleukins; LBD: Ligand-binding domain; LOS: Length of stay; NF- κ B: Nuclear factor- κ B; NLS: Nuclear localization sequences; RT-PCR: Real-time PCR; SAPS III: Simplified Acute Physiology Score III; SIRS: Systemic inflammatory response syndrome; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; STATs: Signal transducers and activators of transcription

Acknowledgements

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund (ESF)) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: THALES.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KV and KA have generated, collected, and assembled the data; GB, EC, and CAS conceived and designed the study; AS, KP, DG, EBR, EBO, and ST substantially contributed to the collection and analysis of samples; SI, CR, and EM have substantially contributed to the interpretation of data and revision and editing of the manuscript; KV, SN, and GB organized patient recruitment, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript; all authors edited and approved the final version of the manuscript.

Author details

¹First Critical Care Department, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ²Pediatric Intensive Care Unit, University Hospital, University of Crete, 71500 Heraklion, Crete, Greece. ³Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, First Department of Pediatrics, 'Aghia Sophia' Children's Hospital and Division of Endocrinology and Metabolism, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ⁴First Department of Internal Medicine-Propaedeutic, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ⁵Immunology-Histocompatibility Department, Evangelismos Hospital, Athens, Greece. ⁶Department of Endocrinology-Diabetes, Evangelismos Hospital, Athens, Greece. ⁷Section on Endocrinology and Genetics, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

Received: 28 December 2016 Accepted: 9 February 2017

Published online: 21 February 2017

References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287
2. Peeters RP, Hagendorf A, Vanhorebeek I et al (2009) Tissue mRNA expression of the glucocorticoid receptor and its splice variants in fatal critical illness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71:145–153. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03443.x
3. Boonen E, Van den Berghe G (2014) Cortisol metabolism in critical illness: implications for clinical care. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21:185–192. doi:10.1097/MED.0000000000000066
4. Nicolaidis NC, Galata Z, Kiro T et al (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75:1–12. doi:10.1016/j.steroids.2009.09.002
5. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR et al (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274:27857–27866
6. Kirschke E, Goswami D, Southworth D et al (2014) Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157:1685–1697. doi:10.1016/j.cell.2014.04.038

7. Okret S, Dong Y, Brönnegård M, Gustafsson JA (1991) Regulation of glucocorticoid receptor expression. *Biochimie* 73:51–59
8. Ledderose C, Möhnle P, Limbeck E et al (2012) Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124-induced downregulation of glucocorticoid receptor-α. *Crit Care Med* 40:2745–2753. doi:10.1097/CCM.0b013e31825b8ebc
9. Guerrero J, Gatica HA, Rodríguez M et al (2013) Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression of glucocorticoid isoforms receptors: a prospective cohort study and in vitro experimental assay. *Crit Care Lond Engl* 17:R107. doi:10.1186/cc12774
10. van den Akker ELT, Koper JW, Joosten K et al (2009) Glucocorticoid receptor mRNA levels are selectively decreased in neutrophils of children with sepsis. *Intensive Care Med* 35:1247–1254. doi:10.1007/s00134-009-1468-6
11. Vincent JL, Moreno R, Takala J et al (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22:707–710
12. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML et al (2016) Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:775–787. doi:10.1001/jama.2016.0289
13. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D et al (2015) Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* 372:1629–1638. doi:10.1056/NEJMoa1415236
14. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13:818–829
15. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV et al (1995) Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 23:1638–1652
16. Moreno RP, Metnitz PGH, Metnitz B et al (2008) Modeling in-hospital patient survival during the first 28 days after intensive care unit admission: a prognostic model for clinical trials in general critically ill patients. *J Crit Care* 23: 339–348. doi:10.1016/j.jccr.2007.11.004
17. Charmandari E, Chrousos GP, Lambrou GI et al (2011) Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. *PLoS One* 6, e25612. doi:10.1371/journal.pone.0025612
18. Bergquist M, Jirholt P, Nurkka M et al (2014) Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxemic shock. *J Infect* 69:113–122. doi:10.1016/j.jimf.2014.03.011
19. Siebig S, Meinel A, Rogler G et al (2010) Decreased cytosolic glucocorticoid receptor levels in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care* 38:133–140
20. Indyk JA, Candido-Vitto C, Wolf IM et al (2013) Reduced glucocorticoid receptor protein expression in children with critical illness. *Horm Res Paediatrics* 79:169–178. doi:10.1159/000348290
21. Duma D, Silva-Santos JE, Asseury J (2004) Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. *Crit Care Med* 32:2304–2310
22. Duma D, Collins JB, Chou JW, Cidlowski JA (2010) Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence. *Sci Signal* 3:ra74. doi:10.1126/scisignal.2001077
23. Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13:227–232. doi:10.1038/nrg3185
24. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J et al (2002) Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1324–C1331. doi:10.1152/ajpcell.00363.2001
25. Sun X, Fischer DR, Pritts TA et al (2002) Expression and binding activity of the glucocorticoid receptor are upregulated in septic muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R509–R518. doi:10.1152/ajpregu.00509.2001
26. Goedeke IA, Alvarez C, Henríquez J et al (2007) Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines in vitro. *Mol Immunol* 44:2115–2123. doi:10.1016/j.molimm.2006.07.303
27. Molijn GJ, Spek JJ, van Uffelen JC et al (1995) Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1799–1803. doi:10.1210/jcem.80.6.775626
28. Bergquist M, Lindholm C, Strinnholm M et al (2015) Impairment of neutrophilic glucocorticoid receptor function in patients treated with steroids for septic shock. *Intensive Care Med Exp* 3:59. doi:10.1186/s40635-015-0059-9
29. Wong HR (2012) Clinical review: sepsis and septic shock—the potential of gene arrays. *Crit Care Lond Engl* 16:204. doi:10.1186/cc10537
30. Molijn GJ, Koper JW, van Uffelen CJ et al (1995) Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leukocyte in patients with sepsis or septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:197–203
31. Briassoulis E, Tzanoudaki M, Goukos D et al (2015) Glutamine may repress the weak LPS and enhance the strong heat shock induction of monocyte and lymphocyte HSP72 proteins but may not modulate the HSP72 mRNA in patients with sepsis or trauma. *BioMed Res Int* 2015:806042. doi:10.1155/2015/806042
32. Vardas K, Apostolou K, Briassoulis E et al (2014) Early response roles for prolactin, cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90α in severe sepsis and SIRS. *BioMed Res Int* 2014:803561. doi:10.1155/2014/803561
33. Conway-Campbell BL, George CL, Pooley JR et al (2011) The HSP90 molecular chaperone cycle regulates cyclical transcriptional dynamics of the glucocorticoid receptor and its coregulatory molecules CBP/p300 during ultradian ligand treatment. *Mol Endocrinol Baltim Md* 25:944–954. doi:10.1210/me.2010-0073
34. Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K et al (2003) Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. *J Surg Res* 113:248–256
35. Silwa K, Hilfiker-Kleiner D, Petrie MC et al (2010) Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 12:767–778. doi:10.1093/eurjhf/hfq120
36. Webster JL, Sternberg EM (2004) Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J Endocrinol* 181:207–221

37. Goodwin JE, Feng Y, Velazquez H, Sessa WC (2013) Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:306–311. doi:10.1073/pnas.1210200110
38. Schmidt S, Rainer J, Ploner C et al (2004) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 11(Suppl 1):S45–S55. doi:10.1038/sj.cdd.4401456
39. Sundahl N, Bridelance J, Libert C et al (2015) Selective glucocorticoid receptor modulation: new directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther* 152:28–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.001

Research Article

Early Response Roles for Prolactin Cortisol and Circulating and Cellular Levels of Heat Shock Proteins 72 and 90 α in Severe Sepsis and SIRS

K. Vardas,¹ K. Apostolou,¹ E. Briassoulis,² D. Goukos,² K. Psarra,³ E. Botoula,⁴ S. Tsagarakis,⁴ E. Magira,¹ C. Routsis,¹ S. Nanas,¹ and G. Briassoulis⁵

¹ First Critical Care Department, Evangelismos Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Ipsilantou 45, 10676 Athens, Greece

² 1st Department of Propaedeutic Internal Medicine, Laiko University General Hospital, University of Athens, 17 Agiou Thoma, 115 27 Athens, Greece

³ Immunology-Histocompatibility Department, Evangelismos Hospital, Ipsilantou 45, 10676 Athens, Greece

⁴ Department of Endocrinology and Diabetes, Evangelismos Hospital, Ipsilantou 45, 10676 Athens, Greece

⁵ Pediatric Intensive Care Unit, School of Health Sciences, University Hospital, University of Crete, 71110 Heraklion, Greece

Correspondence should be addressed to G. Briassoulis; ggbriass@otenet.gr

Received 7 March 2014; Accepted 24 July 2014; Published 27 August 2014

Academic Editor: Baoli Cheng

Copyright © 2014 K. Vardas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objective. To evaluate the early heat shock protein (HSP) and hormonal stress response of intensive care unit (ICU) patients with severe sepsis/septic shock (SS) or systemic inflammatory response syndrome (SIRS) compared to healthy subjects (H). **Methods.** Patients with early (first 48 hrs) SS ($n = 29$) or SIRS ($n = 29$) admitted to a university ICU and 16 H were enrolled in the study. Serum prolactin, cortisol, and plasma ACTH were determined using immunoassay analyzers. ELISA was used to evaluate extracellular HSPs (eHSP90 α , eHSP72) and interleukins. Mean fluorescence intensity (MFI) values for intracellular HSPs (iHSP72, iHSP90 α) were measured using 4-colour flow-cytometry. **Results.** Prolactin, cortisol, and eHSP90 α levels were significantly increased in SS patients compared to SIRS and H ($P < 0.003$). ACTH and eHSP72 were significantly higher in SS and SIRS compared to H ($P < 0.005$). SS monocytes expressed lower iHSP72 MFI levels compared to H ($P = 0.03$). Prolactin was related with SAPS III and APACHE II scores and cortisol with eHSP90 α , IL-6, and lactate ($P < 0.05$). In SS and SIRS eHSP90 α was related with eHSP72, IL-6, and IL-10. **Conclusion.** Prolactin, apart from cortisol, may have a role in the acute stress response in severe sepsis. In this early-onset inflammatory process, cortisol relates to eHSP90 α , monocytes suppress iHSP72, and plasma eHSP72 increases.

1. Introduction

Severe sepsis and septic shock are leading causes of death in intensive care units (ICU) worldwide and despite efforts in understanding their pathophysiology and implementing effective treatment, their annual incidence has been projected to increase by 1.5% per year [1]. Sepsis is accompanied by major changes in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis through multiple interactions between the autonomous nervous system and immune systems [2]. During early sepsis, initial activation of the pituitary adrenal axis depends on activation of hypothalamus and pituitary by cytokines, while

in late sepsis a shift from neuroendocrine to local adrenal regulation of glucocorticoid production has been proposed [3]. The initial release of cytokines from immune cells participates in homeostasis of the body by acting as paracrine, autocrine, and hormonal agents and elevating corticotropin releasing hormone levels (CRH) [3]. Except for CRH, septic patients have increased ACTH, growth hormone, and prolactin levels in the early stage of sepsis [2].

The association of prolactin with modulation of the immune system during sepsis has been studied in septic mice, where administration of prolactin was associated with decreased survival and alterations in immune response [4].

It has been found that prolactin serum levels in critical ill children are usually low early after pediatric intensive care admission [5]. The role of prolactin as an early acute stress in adult ICU sepsis and trauma patients has not been elucidated yet [6]. In an animal model, a possible relationship between heat shock proteins (HSPs) and prolactin receptors has been previously reported [7].

Intracellular HSPs (iHSPs) are high evolutionary conservative proteins that play an important role in regulating host response against infections, thermal injury, oxidative damage, and hypoxia [8]. Particularly, the major heat shock proteins iHSP70 and iHSP90 α confer tolerance to sepsis by maintaining the conformational homeostasis, exerting anti-apoptotic effects, and mediating LPS-signaling as a part of the LPS receptor cluster [9]. However, although animal studies have demonstrated a protective effect of iHSP72 in sepsis, human studies are inconclusive showing either protection or relation to mortality and infections [10]. To add more questions about the extracellular HSPs (eHSPs) function and their role in sepsis [11, 12], eHSP90 α levels were recently shown to decline in controls and remain increased in septic patients, contrasting eHSP72, which increased over time in both groups [13]. Thus, the involvement of extracellular bound HSPs as signals for activation of the immune system and especially macrophages [14] raises interest about the role of these proteins in sepsis. Apart from septic patients, serum levels of eHSP72 measured early after injury in trauma patients correlated with survival, with significantly higher levels in trauma patients who survived compared to nonsurvivors [15].

In this study, we evaluated the early (first 48 hours) serum levels of prolactin, cortisol, and interleukins and plasma levels of ACTH, eHSP90 α , and eHSP72 and measured mean fluorescence intensity (MFI) of iHSP72 and iHSP90 α in ICU patients with severe sepsis and septic shock (SS) or systemic inflammatory response syndrome (SIRS) compared to healthy control subjects (H). We also correlated their expression with interleukins (ILs), severity scoring systems, clinical and laboratory data, and outcome.

2. Materials and Methods

2.1. Patients. The study was approved by the institutional review board of Evangelismos Hospital and was performed during a 14-month period between October 2012 and December 2013. Informed consent form was obtained from the relatives of patients admitted to the ICU. Consecutively admitted patients >18 years and <75 years with early (<48 h) severe sepsis, septic shock, or SIRS admitted to the ICU were eligible for enrolment and were divided in two groups. The SIRS group included trauma patients ($n = 29$) who met at least two of the four conventional criteria for SIRS. The severe sepsis or septic shock group (SS) included patients ($n = 29$) with an identified source of infection. Sepsis, severe sepsis, septic shock, and SIRS were defined according to the Surviving Sepsis Campaign Guidelines [16]. The third group included healthy volunteers (H) ($n = 16$) matched for age and sex to the ICU patients. Exclusion criteria were (a) malignancy, (b) autoimmune diseases, (c) prior use of corticoids,

(d) immunosuppressive illness, and (e) late sepsis or SIRS 48 h after admission. Acute physiology and chronic evaluation (APACHE II) [17], sequential organ failure assessment (SOFA) [18], and simplified acute physiology score III (SAPS III) [19] scores were recorded on admission. Demographics, date of hospital, and ICU admission, ICU and in-hospital mortality, length of stay, and laboratory tests were also recorded for all patients.

2.2. Laboratory Assays

2.2.1. Prolactin, Cortisol, and ACTH. Blood was drawn between 8 and 9 a.m in the first 48 h after ICU admission. For ACTH measurement, blood was collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containing tube, immediately centrifuged at 4°C, plasma-pooled, and finally stored at -80°C until measurement. For cortisol and prolactin measurement blood was collected in tubes containing clot and gel for serum separation and centrifuged at 4°C and serum was also stored at -80°C until measurement. Serum cortisol and prolactin levels were determined using the ADVIA Centaur Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) while plasma ACTH was measured using the Immulite 2000 Immunoassay Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

2.2.2. Cytokines and Extracellular Heat Shock Proteins. Cytokine levels of serum IL-6, IL-10, IL-17, and IFN- γ were measured by ELISA as mentioned by the kit instructions and extracellular plasma levels of HSPs (eHSP72 and eHSP90 α) were analyzed by ELISA assay according to the manufacturers' instructions (Invitrogen Carlsbad, CA, USA, and Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA, resp.). The inter- and intra-assay CV for each analyte were as follows: 6.2 and 7.8 for IL-6, 3.25 and 2.75 for IL-10, 3.7 and in process for IL-17, 3.5 and 7.3 for IFN- γ , 7.1 and 15.2 for hsp72, and <10 for hsp90 α . The sensitivities of the assays were <2 pg/mL for IL-6, <1 pg/mL for IL-10, 2 pg/mL for IL-17, 0.03 IU/mL for IFN- γ , 90 pg/mL for hsp72, and 50 pg/mL for hsp90 α .

2.2.3. Intracellular HSPs. EDTA-anticoagulated blood (100 μ L) was used for flow cytometric analysis of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Monocytes iHSP72 and iHSP90 α expressed as mean fluorescence intensity (MFI) were determined after staining with 5 μ L surface antigens CD33-PE/Cy5 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and 5 μ L CD45 PE/Cy7 (BioLegend, San Diego, USA) followed by either 5 μ L HSP72-FITC (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) or 5 μ L HSP90 α -PE (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) intracellular staining. Assays were performed according to the manufacturer's instructions using 4-colour flow cytometry FC-500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

2.2.4. Statistical Analysis. All results are presented as means \pm standard deviation. The results were analyzed using SPSS software (version 21.0, SPSS, Chicago, Ill). Group comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test. The variables

TABLE 1: Demographic characteristics and severity scores by group (healthy subjects $n = 16$, SIRS $n = 29$, severe sepsis $n = 29$)^{**}.

	Healthy subjects	SIRS	Severe sepsis	<i>P</i> value [*]
Age (years)	47.3 ± 9.7	42.5 ± 13.0	54.7 ± 14.5 ^{ab}	0.003
Gender (male/female)	10 M/6 F	24 M/5 F	17 M/12 F	0.118
APACHE II		15.0 ± 5.4	22.0 ± 9.7 ^b	0.007
SOFA		8.0 ± 3.0	11.0 ± 4.0 ^b	0.006
SAPS III		50.0 ± 10.0	68.0 ± 14.0 ^b	0.0001

APACHE: acute physiology and chronic evaluation; SOFA: sequential organ failure assessment; SAPS III: simplified acute physiology score; SIRS: systematic inflammatory response syndrome, ^a $P < 0.05$ between healthy subjects and severe sepsis groups, and ^b $P < 0.05$ between SIRS and severe sepsis group.

^{*}The *P* value was calculated using the Kruskal-Wallis test and a *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

^{**}Data are expressed as means ± SD (standard deviation).

TABLE 2: Hormonal, cytokine, and heat shock protein measurements by group (healthy subjects $n = 16$, SIRS $n = 29$, severe sepsis $n = 29$)^{**}.

	Healthy subjects	SIRS	Severe sepsis	<i>P</i> value [*]
Prolactin (ng/mL)	5.97 ± 2.80	18.26 ± 10.64 ^a	23.17 ± 18.38 ^b	0.003
Cortisol (μg/dL)	12.07 ± 5.03	21.74 ± 16.09 ^a	39.64 ± 23.52 ^{bc}	0.000
ACTH (pg/mL)	25.97 ± 19.05	30.71 ± 69.54 ^a	31.26 ± 25.18 ^c	0.002
eHSP90α (ng/mL)	21.50 ± 10.08	58.70 ± 44.3 ^a	81.89 ± 41.81 ^{bc}	0.003
eHSP72 (ng/mL)	0.07 ± 0.06	0.35 ± 0.26 ^a	1.43 ± 2.76 ^b	0.005
iHSP90α (MFI)	49.73 ± 30.87	41.20 ± 31.62	37.36 ± 28.96	0.490
iHSP72 (MFI)	38.08 ± 24.76	36.65 ± 31.38	24.66 ± 21.15 ^b	0.093
IL-6 (pg/mL)	1.70 ± 1.50	188.10 ± 203.92 ^a	358.49 ± 377.40 ^b	0.001
IL-10 (ng/mL)	0.01 ± 0.001	5.16 ± 7.10	35.29 ± 60.60 ^b	0.037
IL-17 (ng/mL)	9.75 ± 16.65	20.86 ± 60.96	25.14 ± 93.56	0.969
IFN-γ (pg/mL)	0.52 ± 1.07	0.19 ± 0.10	0.92 ± 1.89 ^c	0.070

eHSP: extracellular heat shock protein; iHSP: intracellular heat shock protein; IL: interleukins; IFN-γ: interferon gamma.

^a $P < 0.05$ between healthy subjects and SIRS groups.

^b $P < 0.05$ between healthy subjects and severe sepsis groups.

^c $P < 0.05$ between SIRS and severe sepsis group.

^{*}The *P* value was calculated using the Kruskal-Wallis test and a *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

^{**}Data are expressed as means ± SD (standard deviation).

that showed differences among groups were compared group by group by the Mann-Whitney test. Paired differences for continuous variables in the same subjects were analyzed using the Wilcoxon signed-rank test. The correlation between variables was analyzed by the Spearman correlation test. The level of significance between groups was set on $P < 0.05$.

3. Results

Anthropometric characteristics and severity scores of the (H), (SIRS), and (SS) groups are summarized in Table 1. Hormonal profile, extracellular heat shock protein and cytokine measurements, and mean fluorescence intensity of heat shock proteins in monocytes are summarized in Table 2.

Prolactin, cortisol, and ACTH levels differed significantly between groups (Figure 1). Prolactin was correlated with SAPS III ($r = 0.42$, $P = 0.004$) and APACHE II ($r = 0.3$, $P = 0.04$) scores; cortisol was correlated with eHSP90α ($r = 0.47$, $P = 0.013$), IL-6 ($r = 0.25$, $P = 0.05$), and maximum admission day lactate ($r = 0.30$, $P = 0.03$) and negatively with HCO₃ ($r = -0.50$, $P = 0.001$).

The eHSP90α levels in the SS group were increased in comparison to the H and SIRS groups. The eHSP72 levels in

the SS group were increased compared to H (Figure 2). Both eHSP90α and eHSP72 were significantly increased in SIRS compared to H ($P < 0.02$).

Extracellular HSP72 in the SS and SIRS groups correlated with the severity of illness scores (Figure 3): APACHE II ($r = 0.45$, $P = 0.034$), SOFA ($r = 0.6$, $P = 0.002$), and SAPS III ($r = 0.5$, $P = 0.004$). There was a positive correlation of eHSP72 and eHSP90α levels in all groups (Table 3). The eHSP90α levels showed a positive correlation with IL-6 and IL-10 but not with IL-17 or IF-γ. Also, eHSP72 levels were only correlated with IL-10 (Table 3).

Septic monocytes expressed significantly lower iHSP72 MFI levels compared to the H group (Table 2). Although a positive correlation of iHSP90α with iHSP72 monocyte levels was found in the SS and SIRS groups, only iHSP72 correlated negatively with severity of illness scores: Apache II ($r = -0.32$, $P = 0.004$), SOFA ($r = -0.32$, $P = 0.017$), and SAPS III ($r = -0.34$, $P = 0.012$).

4. Discussion

In this study we evaluated the early inflammatory and hormonal stress response in SS and SIRS patients in an

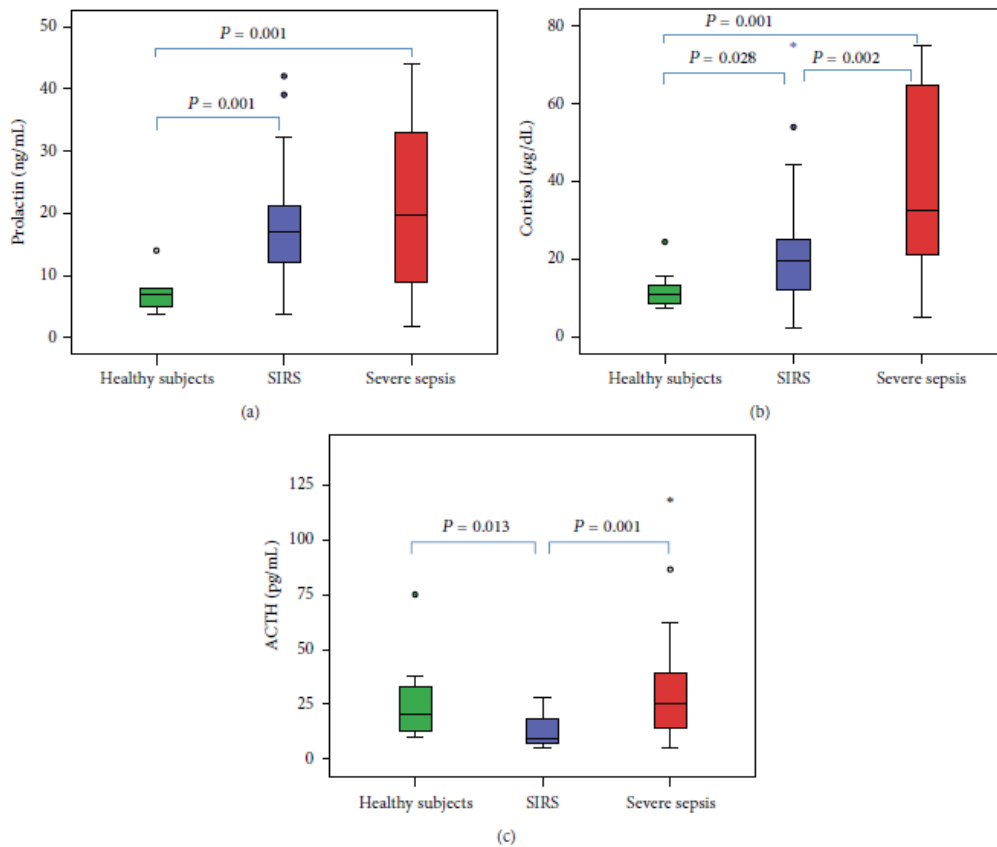


FIGURE 1: Blood concentrations of (a) prolactin; (b) cortisol; and (c) ACTH for the first 48 hours of ICU admission. The P value was calculated using the Mann-Whitney U test and a P value <0.05 (two sided) was considered statistically significant. The box-whisker plots show the median (horizontal line within the box) and the 10th and 90th percentiles (whiskers). The box length is the interquartile range. Solid circles represent outliers and stars extremes.

ICU setting. We showed that in these critically ill patients prolactin levels, along with cortisol, were significantly higher in SS compared to H and SIRS groups. Hormonal increase was related to the severity of illness but only cortisol, not prolactin, was correlated with eHSP90 α . Thus, our study demonstrated that stress response of prolactin and its relation to the severity of sepsis might not have been induced through the iHSP72 or iHSP90 α "danger signal" pathways.

Patients suffering early sepsis induce elevation of baseline cortisol levels and decrease in blood cortisol to ACTH ratio compared to nonseptic patients admitted to the ICU [20]. Plasma ACTH and prolactin are increased within the few minutes following the insult of a pathogen [2]. Our findings of significantly increased ACTH, cortisol, and prolactin levels in severe sepsis and septic shock also support the hypothesis that prolactin, apart from cortisol, may have a role in the acute stress hormonal response in the early-onset inflammatory process. It has been previously suggested that, with nitric

oxide as a key mediator, sepsis elicits a very reproducible pattern of pituitary hormone secretion, with plasma ACTH and prolactin increasing within a few minutes following the insult and with a rapid inhibition of secretion of luteinizing and thyroid-stimulatory hormone [2]. This is further supported by a strongly positive relationship of prolactin with the evaluated in this study's severity scoring systems.

Cortisol and ACTH levels have extensively been studied in a critical ill setting. On the contrary, prolactin's role as an immunomodulator in septic patients needs to be further elucidated. A recent study has suggested an association of increased prolactin mRNA expression in monocytes with better outcome in hemato-oncological septic patients [21]. It has been also found that anterior pituitary cells recognize and respond to fungal cell wall glucans by appropriately stimulating the secretion of prolactin, a hormone that plays an important role in the response to fungal infection [22]. In addition, the increased prolactin levels in our trauma patients might

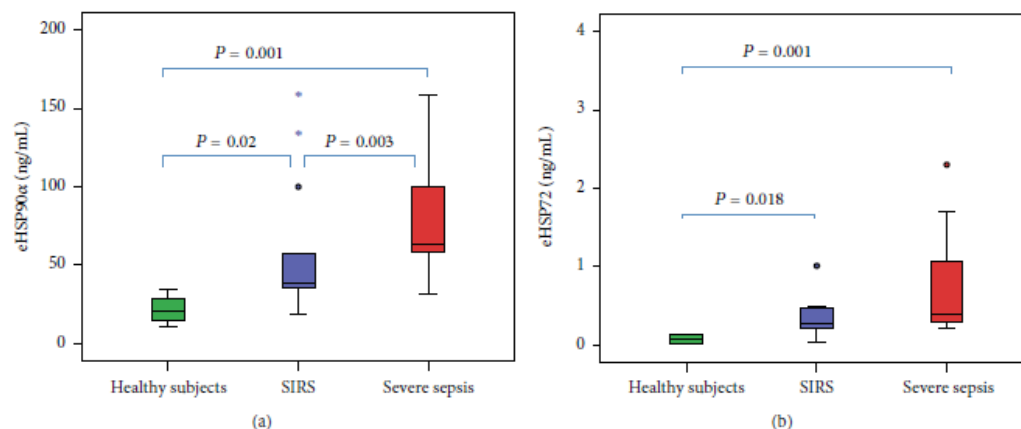


FIGURE 2: Extracellular heat shock protein (eHSP) levels of (a) eHSP90α and (b) eHSP72 in healthy subjects, SIRS, and severe sepsis patients. The *P* value was calculated using the Mann-Whitney *U* test and a *P* value <0.05 (two sided) was considered statistically significant. The box-whisker plots show the median (horizontal line within the box) and the 10th and 90th percentiles (whiskers). The box length is the interquartile range. Solid circles represent outliers and stars extremes.

TABLE 3: Pearson's coefficient correlations of hormones, extracellular heat shock proteins, and interleukins.

Prolactin		Prolactin	Cortisol	ACTH	eHSP90α	eHSP72	IL-6	IL-10	IL-17
Cortisol	<i>r</i>	0.24							
	<i>p</i>	0.05							
ACTH	<i>r</i>	-0.1	0.05						
	<i>p</i>	0.3	0.68						
eHSP90α	<i>r</i>	0.09	0.47	0.02					
	<i>p</i>	0.62	0.013	0.9					
eHSP72	<i>r</i>	0.35	0.26	-0.02	0.553				
	<i>p</i>	0.08	0.23	0.95	0.002				
IL-6	<i>r</i>	0.08	0.24	0.02	0.5	-0.01			
	<i>p</i>	0.5	0.05	0.8	0.007	0.9			
IL-10	<i>r</i>	0.16	0.2	-0.07	0.6	0.7	0.27		
	<i>p</i>	0.3	0.2	0.60	0.001	0.000	0.06		
IL-17	<i>r</i>	-0.11	0.02	-0.080	-0.136	-0.007	-0.4	-0.08	
	<i>p</i>	0.48	0.90	0.596	0.467	0.97	0.3	0.58	
IFN-γ	<i>r</i>	-0.07	0.195	-0.05	0.04	-0.067	0.08	0.45	-0.05
	<i>p</i>	0.58	0.125	0.69	0.84	0.733	0.5	0.02	0.7

eHSP: extracellular heat shock protein; iHSP: intracellular heat shock protein; IL: interleukins; IFN-γ: interferon gamma.

further suggest that the prolactin's response role is equally important to that of cortisol in homeostasis not only in infectious but also in noninfectious SIRS.

Although none of the eHSPs correlated with prolactin levels, cortisol was correlated with eHSP90α. It has been previously shown that eHSP90α plays a crucial role in antigen presenting in dendritic cells through the major histocompatibility complex (MHC) type 1 [23] and stimulates monocytes [24]. To the best of our knowledge, this is the first time that a significant early increase of plasma eHSP90α is shown in septic patients compared to healthy subjects and severely injured patients. In addition, the strong correlation of eHSP90α with

eHSP72 found in our study might further suggest a common pathophysiologic mechanism of their expression. Thus, extracellular levels of both HSPs were significantly elevated in severely septic patients as compared to healthy volunteers; moreover, eHSP90α levels of SS were higher when compared to trauma (SIRS) patients. Importantly, in both SS and SIRS groups, eHSP72 levels correlated with the severity of illness, further supporting the hypothesis that eHSPs may act as danger signals to modulate the immune system [8].

Increased eHSP72 levels have been found in inflammatory myopathy [25], lung injury [26], acute coronary syndrome and stable angina [27], trauma [15], inflammation,

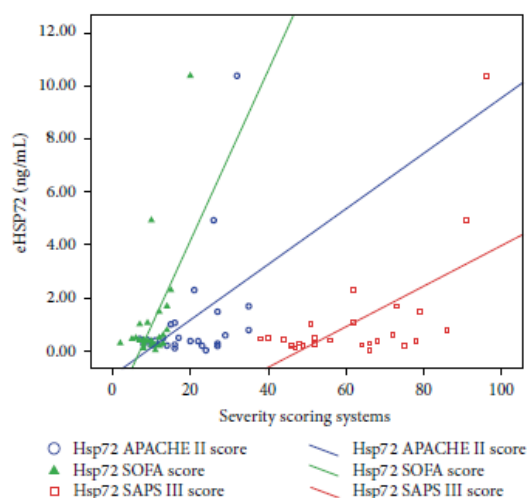


FIGURE 3: Extracellular heat shock protein (eHSP) levels of eHSP72 in SIRS and sepsis correlated with severity of illness scores APACHE II ($r = 0.45$, $P = 0.034$), SOFA ($r = 0.6$, $P = 0.002$), and SAPS III ($r = 0.5$, $P = 0.004$).

and sepsis [12]. Only two *in vivo* studies of eHSP72 and none of eHSP90 α were identified in a PubMed database research in human severe sepsis (1992–2012) [12, 28]. Wheeler et al. [28] found that serum levels of eHSP72 in children with septic shock were significantly elevated as compared to noncritically ill children undergoing elective surgical procedures and that the increase was related to mortality. Analysis of oxidative parameters in septic patients by Gelain et al. revealed that serum levels of eHSP72 were modulated according to oxidative stress [12]. In our study we further showed a significant early increase of eHSP72 in both septic and traumatic adult patients compared to controls.

It has been suggested that stimulation of toll-like receptors (TLR)-dependent signaling pathways by lipopolysaccharides (LPS) increases iHSP72 expression and its release in the extracellular environment both in *in vitro* cell cultures and *in vivo* [29]. The release of eHSPs appears to be a very complex phenomenon encompassing different alternative pathways containing nonconsensus secretory signals [30]. Proposed mechanisms for their release are translocation across the plasma membrane, release associated with lipid vesicles, passive release after cell death by necrosis via extracellular vesicles [11], and through nonclassical exosomal nonsecretory pathways [31]. Although in septic patients stimulation of LPS pathways has been proposed to explain the extracellular release of eHSPs, it might not clarify the increased eHSPs levels in our SIRS patients. Instead, it has been hypothesized that eHSPs may be released from damaged tissue and necrotic cells after trauma contributing to trauma induced immunosuppression [32].

In severe sepsis, in contrast to the extracellular monocyte-HSPs, intracellular monocyte-HSPs had a tendency to decrease in comparison to control subjects. These findings

are in accordance with those of another prospective observational study in patients with severe sepsis demonstrating a reduced iHSP72 expression in PBMCs and a LPS dose-dependent inhibition of its expression [33]. In patients with inflammation, however, iHSPs were found increased compared to healthy control subjects [34]. Although SIRS was shown to increase iHSP72 and iHSP90 α expression in monocytes indicating a protective function of iHSPs during the acute phase of stress, the downregulation of iHSP-positive cells in SS seems to be a result of (mal-)adaptation mechanism to severity of illness [35]. Preliminary data showed that iHSP72 and iHSP90 α monocyte expressions follow different longitudinal courses in SS, not related to the metabolic response to stress [36].

The main limitations of our study are the small number of patients and an age difference among groups. Enrollment of septic patients has been proven to be difficult since most of them met exclusion criteria (immunosuppression, cancer). In addition, since that was a prospective study with consecutively admitted patients in ICU, the mean age of trauma patients was, as expected, lower than the mean age of septic patients. The mean age of healthy subjects, however, was matched with the mean age of ICU patients included in our study. Finally, we did not find any correlation between hormones and age, so that the importance of the age difference might not have significantly influenced results.

5. Conclusions

Prolactin, apart from cortisol, may have an early role in the acute stress hormonal response in severe sepsis and septic shock. Extracellular levels of HSP72 and HSP90 α are significantly elevated in septic patients as compared to healthy volunteers supporting the hypothesis that eHSPs may act as danger signals to activate the immune system. Simultaneously, however, monocytes suppress iHSP72 expression early in septic patients. To the best of our knowledge, this is the first time that a significant early increase of plasma eHSP90 α is shown in septic patients compared to healthy subjects and severely injured patients and that this increase is related to increased cortisol levels.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This research has been cofinanced by the European Union (European Social Fund (ESF)) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) Research Funding Program: THALES.

References

- [1] D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky, “Epidemiology of severe sepsis in the

- United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care," *Critical Care Medicine*, vol. 29, no. 7, pp. 1303–1310, 2001.
- [2] V. Maxime, S. Siami, and D. Annane, "Metabolism modulators in sepsis: the abnormal pituitary response," *Critical Care Medicine*, vol. 35, no. 9, pp. S596–S601, 2007.
- [3] W. Kanczkowski, V. Alexaki, N. Tran et al., "Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 36, pp. 14801–14806, 2013.
- [4] R. Oberbeck, D. Schmitz, K. Wilsenack et al., "Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice," *Journal of Surgical Research*, vol. 113, no. 2, pp. 248–256, 2003.
- [5] S. M. Heidemann, R. Holubkov, K. L. Meert et al., "Baseline serum concentrations of zinc, selenium, and prolactin in critically ill children," *Pediatric Critical Care Medicine*, vol. 14, no. 4, pp. e202–e206, 2013.
- [6] L. A. Dossett, B. R. Swenson, H. L. Evans, H. Bonatti, R. G. Sawyer, and A. K. May, "Serum estradiol concentration as a predictor of death in critically ill and injured adults," *Surgical Infections*, vol. 9, no. 1, pp. 41–48, 2008.
- [7] B. Saribek, Y. Jin, M. Saigo, K. Eto, and S. Abe, "HSP90 β is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 349, no. 4, pp. 1190–1197, 2006.
- [8] K. W. McConnell, A. C. Fox, A. T. Clark et al., "The role of heat shock protein 70 in mediating age-dependent mortality in sepsis," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 6, pp. 3718–3725, 2011.
- [9] A. Ambade, D. Catalano, A. Lim, and P. Mandrekar, "Inhibition of heat shock protein (molecular weight 90 kDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice," *Hepatology*, vol. 55, no. 5, pp. 1585–1595, 2012.
- [10] G. Briassoulis, E. Briassouli, D. M. Fitrolaki et al., "Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies—A Hypothetical "Comparative" study," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 101023, 17 pages, 2014.
- [11] A. De Maio and D. Vazquez, "Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function," *Shock*, vol. 40, no. 4, pp. 239–246, 2013.
- [12] D. P. Gelain, M. A. De Bittencourt Pasquali, C. M. Comim et al., "Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis," *Shock*, vol. 35, no. 5, pp. 466–470, 2011.
- [13] E. Briassouli, D. Goukos, G. Daikos et al., "Glutamine suppresses Hsp72 not Hsp90 α and is not inducing Th1, Th2, or Th17 cytokine responses in human septic PBMCs," *Nutrition*, 2014.
- [14] V. L. Vega, M. Rodriguez-Silva, T. Frey et al., "Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 6, pp. 4299–4307, 2008.
- [15] J. Pittet, H. Lee, D. Morabito, M. B. Howard, W. J. Welch, and R. C. Mackerse, "Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival," *The Journal of Trauma*, vol. 52, no. 4, pp. 611–617, 2002.
- [16] R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes et al., "Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup," *Intensive Care Medicine*, vol. 41, no. 2, pp. 580–637, 2013.
- [17] W. A. Knaus, E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman, "APACHE II: a severity of disease classification system," *Critical Care Medicine*, vol. 13, no. 10, pp. 818–829, 1985.
- [18] J.-L. Vincent, R. Moreno, J. Takala et al., "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure," *Intensive Care Medicine*, vol. 22, no. 7, pp. 707–710, 1996.
- [19] R. P. Moreno, P. G. H. Metnitz, B. Metnitz, P. Bauer, S. Afonso de Carvalho, and A. Hoeftl, "Modeling in-hospital patient survival during the first 28 days after intensive care unit admission. A prognostic model for clinical trials in general critically ill patients," *The Journal of Critical Care*, vol. 23, no. 3, pp. 339–348, 2008.
- [20] O. Lesur, J. Roussy, F. Chagnon et al., "Proven infection-related sepsis induces a differential stress response early after ICU admission," *Critical Care*, vol. 14, no. 4, article R131, 2010.
- [21] P. Cejková, V. Chromá, M. Cerná et al., "Monitoring of the course of sepsis in hematological patients by extrapituitary prolactin expression in peripheral blood monocytes," *Physiological Research*, vol. 61, no. 5, pp. 481–488, 2012.
- [22] K. F. Breuel, P. Kougias, P. J. Rice et al., "Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: implications for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections," *NeuroImmunoModulation*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [23] J. Oura, Y. Tamura, K. Kamiguchi et al., "Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells," *International Immunology*, vol. 23, no. 4, pp. 223–237, 2011.
- [24] P. Cecchini, R. Tavano, P. Polverino de Laureto et al., "The soluble recombinant *Neisseria meningitidis* adhesin NadA δ 351–405 stimulates human monocytes by binding to extracellular Hsp90," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9, Article ID e25089, 2011.
- [25] T. Svitalkova, M. Remakova, L. Plestilova et al., "Plasma level of HSP70 protein is increased in czech patients with idiopathic inflammatory myopathy," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 1, no. 73, supplement 1, p. A54, 2014.
- [26] M. T. Ganter, L. B. Ware, M. Howard et al., "Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury," *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 291, no. 3, pp. L354–L361, 2006.
- [27] X. Zhang, Z. Xu, L. Zhou et al., "Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 15, no. 5, pp. 675–686, 2010.
- [28] D. S. Wheeler, L. E. Fisher Jr., J. D. Catravas, B. R. Jacobs, J. A. Carcillo, and H. R. Wong, "Extracellular hsp70 levels in children with septic shock," *Pediatric Critical Care Medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 308–311, 2005.
- [29] A. Gupta, Z. A. Cooper, M. E. Tulapurkar et al., "Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 4, pp. 2756–2766, 2013.
- [30] A. de Maio, "Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage: It is never

- known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 16, no. 3, pp. 235–249, 2011.
- [31] W. Li, D. Sahu, and F. Tsen, "Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1823, no. 3, pp. 730–741, 2012.
- [32] S. B. Flohé, J. M. Bangen, S. Flohé, H. Agrawal, K. Bergmann, and F. U. Schade, "Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: Potential involvement of extracellular heat-shock proteins," *Shock*, vol. 27, no. 5, pp. 494–502, 2007.
- [33] S. Schroeder, J. Bischoff, L. E. Lehmann et al., "Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (HSP70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis," *Intensive Care Medicine*, vol. 25, no. 1, pp. 52–57, 1999.
- [34] R. Njemini, I. Bautmans, M. Lambert, C. Demanet, and T. Mets, "Heat shock proteins and chemokine/cytokine secretion profile in ageing and inflammation," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 128, no. 7-8, pp. 450–454, 2007.
- [35] K. T. Apostolou, K. Psara, E. Briassouli et al., "Heat shock protein 72 and 90 intracellular monocyte expression in patients with sepsis or sirs: preliminary data," *Intensive Care Medicine*, vol. 39, supplement 2, p. S240, 2013.
- [36] T. Tavladaki, A. M. Spanaki, H. Dimitriou et al., "Expression of intracellular HSPs in neutrophil and monocyte subjects during acute phase of stress in critical ill patients: preliminary data," *Intensive Care Medicine*, vol. 39, supplement 2, pp. S240–S241, 2013.