



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

HELLENIC REPUBLIC
UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΕΠΕΙΓΟΥΣΑ ΚΑΙ ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΑΙΔΩΝ ΕΦΗΒΩΝ ΚΑΙ ΝΕΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης και
συσχέτισή τους με δείκτες βαρύτητας και έκβασης
σε ασθενείς με σήψη

ΤΖΕΡΜΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Ειδικευόμενη Νοσηλεύτρια Καρδιολογίας

ΑΜ:1130128

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2024



UNIVERSITY OF CRETE - SCHOOL OF MEDICINE

POSTGRADUATE STUDY PROGRAM

Master of Science (MSc)



Emergencies and Intensive Care in Children Adolescents and Young Adults

DIPLOMA THESIS

Expression of necroptosis proteins and correlation with
severity of illness and outcome markers in sepsis
patients

TZERMIA KONSTANTINA

Specialty Cardiology Nurse

ID Number: 1130128

Heraklion, February 2024

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

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

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Ηλία Σταυρούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παιδων,

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κονδύλη Ευμορφία, Καθηγήτρια Εντατικής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

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

Ηλία Σταυρούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παιδων,

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κονδύλη Ευμορφία, Καθηγήτρια Εντατικής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επείγουσα και Εντατική Θεραπεία Παιδιών, Εφήβων και Νέων» της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ομότιμο καθηγητή Εντατικής Θεραπείας Παίδων του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Μπριασούλη Γεώργιο για την επιστημονική καθοδήγηση και συμβουλευτική σε όλα τα πεδία μελέτης, καθώς και για την αμέριστη κατανόησή και συμπαράσταση του καθ' όλη τη πορεία της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επίκουρη καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Παίδων του Πανεπιστημίου Κρήτης και Διευθύντρια της ΜΕΘ Παίδων ΠαΓΝΗ, κα Ηλία Σταυρούλα για την πολύτιμη καθοδήγηση και σημαντική βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και για την άδεια που μου παραχώρησε για την εκπόνηση της μελέτης στον χώρο της ΜΕΘ Παίδων.

Οφείλω επιπλέον να ευχαριστήσω τον Διευθυντή της Καρδιολογικής κλινικής του ΠαΓΝΗ και Κοσμήτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης , κ. Κοχιαδάκη Γεώργιο , που μου επέτρεψε να εκπονήσω μέρος της διπλωματικής μου εργασίας στον χώρο της Μονάδας Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιοπαθών του ΠαΓΝΗ .

Ευχαριστώ πολύ την καθηγήτρια Εντατικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και διευθύντρια της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του ΠαΓΝΗ, κα Κονδύλη Ευμορφία, μέλος της Τριμελούς Επιτροπής αξιολόγησης της παρούσας εργασίας, η οποία μου επέτρεψε την εκπόνηση μέρους της μελέτης στους χώρους της ΜΕΘ ΠαΓΝΗ.

Προσωπικές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην επιμελήτρια Β' της ΜΕΘ Παίδων του ΠαΓΝΗ, κα Μηλιαράκη Μαριάννα καθώς και στην ειδικευόμενη Παιδιατρικής του Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου , κα Μπαστάκη Πόπη για την ουσιαστική συμβολή στη ολοκλήρωση αυτής της ερευνητικής προσπάθειας. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήταν ανέφικτη δίχως τη βοήθεια και την καθοδήγηση τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και διευθύντρια του Εργαστηρίου Αιματολογίας του ΠαΓΝΗ, κα Καλπαδάκη Χριστίνα για την εμπιστοσύνη που μου

έδειξε επιτρέποντάς μου να διεκπεραιώσω ένα σημαντικό μέρος της μελέτης στο Αιματολογικό Εργαστήριο του ΠαΓΝΗ.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Διευθυντές, Επιμελητές, Εξειδικευόμενους, Νοσηλευτές και λοιπό Προσωπικό της ΜΕΘ και ΜΕΘ Παιδών, της Μονάδας Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιοπαθών και του Αιματολογικού Εργαστηρίου του ΠαΓΝΗ για την κατανόηση και βοήθεια τους στην μελέτη αυτή. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την τεχνικό του Αιματολογικού Εργαστηρίου του ΠαΓΝΗ, κα Δαμιανάκη Αθηνά για την πολύτιμη καθοδήγηση της.

Τέλος να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα για την συνεχή και ηθική υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια συγγραφής της μελέτης αυτής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	11
ABSTRACT	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 Σήψη.....	21
1.2 Δεσμίδες μέτρων αντιμετώπισης της σήψης	22
1.2.1 Έγκαιρη αναγνώριση	22
1.3 Παθοφυσιολογία της σήψης	24
1.4 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου	27
1.4.1 Κυτταρική νέκρωση	27
1.4.2 Απόπτωση	27
1.4.3 Νεκρόπτωση.....	29
1.4.4 Πυρόπτωση	30
1.5 Μεσολαβητές κυτταρικού θανάτου.....	32
1.5.1 Receptor interacting protein kinase 1 and 3 (RIPK1 - RIPK3).....	32
1.5.2 Mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)	32
1.5.3 Πρωτεΐνη A20.....	33
1.5.4 Κυτταροκίνες.....	34
1.5.5 Caspase-8.....	36
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	41
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	43
3.1 Είδος μελέτης.....	43

3.2 Πληθυσμός μελέτης	43
3.3 Εργαστηριακές μετρήσεις.....	44
3.4 Φόρμα καταγραφής δεδομένων μελέτης	44
3.5 ELISA	45
3.6 Ηθική και δεοντολογία της έρευνας	48
3.7 Στατιστική μεθοδολογία.....	48
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.1 Δημογραφικά - κλινικά χαρακτηριστικά.....	51
4.2 Εργαστηριακά δεδομένα	51
4.3 Βιοδείκτες νεκρόπτωσης	54
4.4 Εκφραστές διέγερσης νεκρόπτωσης	55
4.5 Φλεγμονώδης διέγερση της νεκρόπτωσης.....	56
4.6 Επιδραστικές πρωτεΐνες του μονοπατιού της νεκρόπτωσης	58
4.7 Συσχετίσεις.....	60
4.8 Ανεξάρτητες συσχετίσεις.....	61
4.9 Προβλεπτικοί παράγοντες νεκρόπτωσης	62
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
6. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
7. ΜΕΛΛΟΝ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	71
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	73
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75
10.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	81

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BE	Έλλειμα Βάσης
ΜΕΘ	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας
ΜΕΘΠ	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδων
ΜΕΠΚ	Μονάδα Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιοπαθών
ΠαΓΝΗ	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
ANOVA	Analysis of Variance
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute Respiratory Distress syndrome
BAK1	BCL2 -Antagonist/Killer 1
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra Large
BID	BH3-interacting domain death agonist
BMI	Body Mass Index
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cFLIP	Cellular FLICE Inhibitory Protein
CiAPS	Cellular inhibitor of Apoptosis Proteins
CRP	C-reactive protein
CYLD	Conserved Cyldromatosis
DAMPS	Damage-associated Molecular Patterns
DIABLO	Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FADD	Fas associated death domain protein

FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
FiO2	Fraction of Inspired Oxygen
FLICE	FADD-like IL-1B Converting Enzyme
gtBID	Granzyme-Truncated BIB
HCO3	Bicarbonate
HRP	Avidin-Horseradish Peroxidase
hs TnI	High Sensitivity troponin I
IAPS	Inhibitors of Apoptosis
ICU	Intensive Care Unit
IL-1a	Interleukin 1a
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-1b	Interleukin 1b
IL-18	Interleukin 18
IkB	Inhibitor of nuclear factor kappa B
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex
MAP	Mean Arterial Pressure
MLKL	Mixed lineage Kinase Domain-like protein
Nec-1	Necrostatin-1
NEMO	Nuclear factor- κ B (NF- κ B) Essential Modulator
NF- κ B	Nuclear Factor-kappaB
NK-celles	Natural Killer celles
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Patterns

PaO ₂ /FiO ₂ Oxygen	Ratio of Arterial Oxygen Partial Pressure to Fractional Inspired
PELOD	Pediatric Logistic Organ Dysfunction
PLT	Platelet Count Test
PO ₂	Partial Pressure of Oxygen
PCO ₂	Partial Pressure of Carbon Dioxide
PRRS	Pattern Recognition Receptors
PRISM	Pediatric Risk of Mortality
qSOFA	quick Sepsis Related Organ Failure Assessment
RIPK1	Receptor-interacting Serine/Threonine-Protein kinase 1
RIPK3	Receptor-interacting Serine/Threonine-Protein kinase 3
ROC	Receiver Operating Characteristic
SGOT	Serum Glytamic-Oxaloacetin Transaminase
SGPT	Serum Glutamic Pyruvic Transaminase
SIRS	Systematic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SpO ₂	Oxygen Saturation
Tbid	Truncated BID
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor Alpfa Induced Protein 3
TNF-a	Tumor Necrosis Factor- A
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRAF-2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF-5	TNF receptor-associated factor 5
TRADD	TNFR-1 associated death domain protein
WBC	White blood cells

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Η σήψη ορίζεται ως ένα απειλητικό για τη ζωή σύνδρομο δυσλειτουργίας οργάνων που προκαλείται από απορυθμισμένη απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση. Η νεκρόπτωση, που αποτελεί έναν προγραμματισμένο μηχανισμό κυτταρικού θανάτου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την σηπτική διαδικασία. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από τις Receptor-Interacting Protein Kinases 1 και 3 που αλληλοεπιδρούν με τον υποδοχέα (RIPK1 και RIPK3) και από την Mixed-Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase (MLKL).

Σκοπός

Κύριος σκοπός της μελέτης είναι να ερευνηθεί την έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης και της αποπτωτικής κασπάσης 8, σε ασθενείς με σήψη, συγκριτικά με ασθενείς με τραύμα ή καρδιακή νόσο και υγιείς μάρτυρες. Δευτερεύοντες στόχοι της έρευνας είναι να συγκριθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών με κλινικούς και εργαστηριακούς δείκτες βαρύτητας νόσου και έκβασης καθώς και να συγκριθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων και αναλύσεων μεταξύ παιδιών και ενηλίκων .

Μεθοδολογία

Πρόκειται για μία προοπτική μονοκεντρική μελέτη μέτρησης των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης σε παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς με σήψη (32 παιδιά και 56 ενήλικες) οι οποίοι νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Καταγράφηκε αν οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια της σήψης ή του SIRS καθώς και λοιποί εργαστηριακοί δείκτες που επιβεβαιώνουν στοιχεία φλεγμονής και λοίμωξης. Η έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης RIPK-1, RIPK-3, MLKL, A20, IL-1b, IL-11 και της αποπτωτικής κασπάσης 8 έγινε με την μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Ως ομάδες ελέγχου επιλέχθηκαν υγιείς ενήλικες και παιδιά (controls). Αποκλείστηκαν ασθενείς με χρόνια νοσήματα, ανοσοανεπάρκειες, κακοήθειες και όσοι λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική και ανοσοτροποποιητική αγωγή. Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι ενδεδειγμένες στατιστικές δοκιμασίες του στατιστικού πακέτου SPSS 29.

Αποτελέσματα

Αναλύθηκαν δεδομένα από 88 ασθενείς, οι οποίοι κατανεμήθηκαν ως εξής όσον αφορά τις ομάδες μελέτης: με σήψη 26.1%, με τραύμα ή χειρουργείο (SIRS) 33%, με καρδιοπάθεια

21.6%, και υγιείς 19.3%. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 56 ενήλικες (63.6%) και 32 παιδιά (36.4%). Οι κύριες πρωτεΐνες εκφραστές της νεκρόπτωσης RIPK-1 και RIPK-3 ήταν αυξημένες σε ασθενείς με σήψη συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, αν και μόνο η RIPK-1 έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα. Αντίθετα, το MLKL δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά είτε παιδιατρικούς είτε ενήλικες ασθενείς. Η κασπάση 8 ήταν μειωμένη σε ασθενείς με σήψη σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες ($p < 0,001$). Οι κύριες φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες που διεγείρονται μέσα από το μονοπάτι της νεκρόπτωσης IL-1b και IL-18 ήταν σημαντικά αυξημένες σε ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς, ιδιαίτερα στην ομάδα της σήψης όσον αφορά την IL-18. Με τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ σχετίζονταν σημαντικά οι ακόλουθοι σχετιζόμενοι με τη νεκρόπτωση βιοδείκτες: RIPK-1 ($r_s = 0.5$, $p < 0.001$), IL-1b ($r_s = 0.43$, $p < 0.001$), ($r_s = 0.48$, $p < 0.001$) και αρνητικά η Caspase-8 ($r_s = -0.24$, $p = 0.028$). Η πρωτεΐνη MLKL δεν κατέγραψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς. Οι βιοδείκτες RIPK-1, IL-18 και A20 προέβλεπαν καλύτερα την πιθανότητα της διάγνωσης σήψης ή σηπτικού shock στη ΜΕΘ και καταστολή της κασπάσης 8.

Συμπεράσματα

Η έκφραση των πρωτεϊνών RIPK1, RIPK3, IL-1b, IL-18 και A20 παρατηρείται αυξημένη σε ασθενείς με σήψη. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει την άμεση συσχέτιση των βιοδεικτών της νεκρόπτωσης με την σήψη. Η IL-1b αυξημένη στη σήψη στα παιδιά, σε έμφραγμα ή μετεγχειρητικά σε ενήλικες. Επιβεβαιώνεται με αυτόν τον τρόπο ότι οι φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες, IL-1b και IL-18 διεγείρονται μέσα από το μονοπάτι της νεκρόπτωσης. Η κασπάση 8 είναι μειωμένη σε ασθενείς με σήψη και έτσι επιβεβαιώνεται η αναστολή της και ενεργοποίηση της νεκρόπτωσης σε ασθενείς με σήψη. Σημαντική προβλεπτική ικανότητα για τη διάγνωση της σήψης ή του σηπτικού σοκ αποδεικνύεται πως εκφράζουν οι RIPK-1, IL-18 και A20 ενώ με τη διάρκεια νοσηλείας συσχετίζεται θετικά η RIPK-1 και αρνητικά η Caspase-8. Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα μας οδηγούν να συμπεράνουμε τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η νεκρόπτωση ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στην σήψη ενώ η περαιτέρω έρευνα του ενδέχεται να προσθέσει πιθανές θεραπευτικές παρεμβάσεις στην σήψη .

ABSTRACT

Background

Sepsis is defined as a life-threatening syndrome of organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Necroptosis, which is a programmed mechanism of cell death, plays an important role in the septic process. This process is controlled by Receptor-Interacting Protein Kinases 1 and 3 that interact with receptors 1 and 3 (RIPK1 and RIPK3) and by Mixed-Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase (MLKL)

Objective

The study's main aim is to investigate the expression of necroptosis and apoptotic caspase 8 proteins in patients with sepsis, compared to patients with trauma or heart disease and healthy controls. In addition, to compare the results of these measurements with clinical and laboratory markers of disease severity and outcome, and to compare the results of measurements and analyses between children and adults.

Methods

This is a prospective single-centre study measuring necroptosis proteins in pediatric and adult sepsis patients (32 children and 56 adults) hospitalized in intensive care units. We recorded whether patients met the criteria for sepsis or SIRS and other laboratory markers confirming evidence of inflammation and infection. The expression of necroptosis and apoptotic caspase 8 proteins was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Healthy adults and children (controls) were selected as control groups. Patients with chronic diseases, immunodeficiencies, malignancies and those receiving immunosuppressive and immunomodulatory treatment were excluded. The appropriate statistical tests of the SPSS 26 statistical package were used for statistical analysis of the data.

Results

Data from 88 patients were analyzed, distributed as follows in terms of study groups: with sepsis 26.1%, with trauma or surgery (SIRS) 33%, with heart disease 21.6%, and healthy 19.3%. Fifty-six adults (63.6%) and 32 children (36.4%) were included in the study. The major necroptosis expressing proteins RIPK-1 and RIPK-3 were increased in patients with sepsis compared to the other groups, although only RIPK-1 reached statistical significance; in contrast, MLKL showed no significant difference in either pediatric or adult patients. Caspase

8 was decreased in sepsis patients compared to the other groups ($p < 0.001$). The major inflammatory interleukins stimulated through the necroptosis pathway IL-1b, and IL-18 were significantly increased in patients compared to healthy subjects, especially in the sepsis group concerning the IL-18. The following necroptosis-related biomarkers were significantly associated with the duration of ICU hospitalization; RIPK-1 ($r_s = 0.5$, $p < 0.001$), IL-1b ($r_s = 0.43$, $p < 0.001$), ($r_s = 0.48$, $p < 0.001$) and negatively caspase-8 ($r_s = -0.24$, $p = 0.028$); MLKL protein did not register a significant difference between groups in adult and pediatric patients. Biomarkers RIPK-1, IL-18 and A20 best predicted the probability of a diagnosis of sepsis or septic shock in the ICU and suppression of caspase 8.

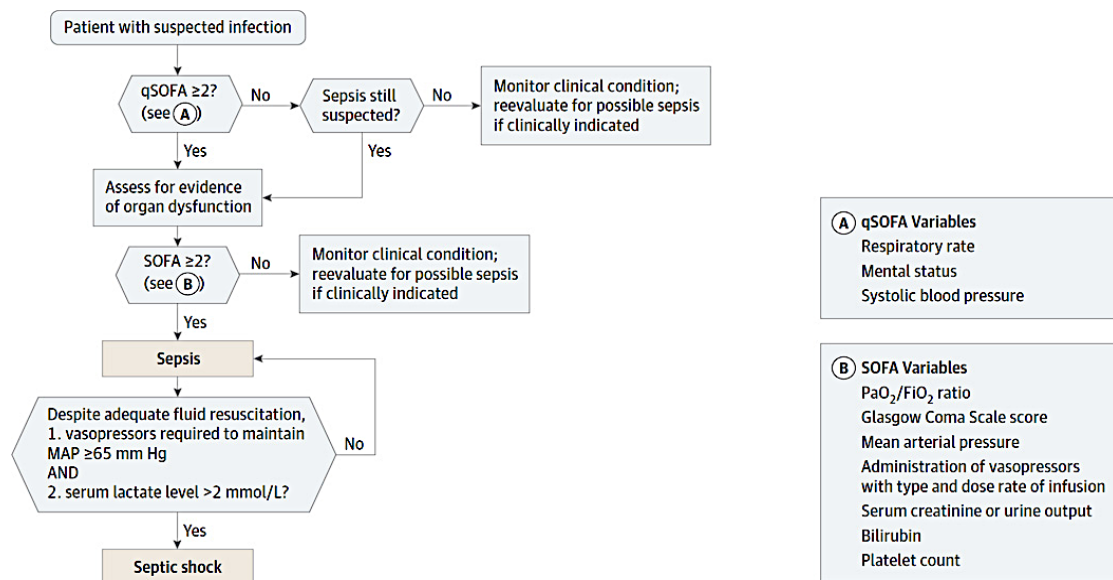
Conclusion The expression of RIPK1, RIPK3, IL-1b, IL-18 and A20 proteins is increased in patients with sepsis. This fact demonstrates the direct correlation of biomarkers of necroptosis with sepsis. IL-1b increased in sepsis in children, in infarction or postoperatively in adults. This confirms that the inflammatory interleukins, IL-1b and IL-18 are stimulated through the necroptosis pathway. Caspase 8 is decreased in patients with sepsis; thus, its inhibition and activation of necroptosis in patients with sepsis is confirmed. Significant predictive ability for the diagnosis of sepsis or septic shock is shown to be expressed by RIPK-1, IL-18 and A20, while RIPK-1 is positively correlated with the duration of hospitalization and caspase-8 negatively correlated with the duration of hospitalization. Collectively, these results lead us to conclude the important role of necroptosis as a mechanism of cell death in sepsis and its further investigation may add potential therapeutic interventions in sepsis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σήψη

Η σήψη ορίζεται ως ένα απειλητικό για τη ζωή σύνδρομο δυσλειτουργίας οργάνων που προκαλείται από απορυθμισμένη απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση (1). Η σήψη συμβάλλει σημαντικά στη θνησιμότητα. Πριν από την έναρξη της πανδημίας COVID-19 το 2020, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) εκτιμούσε ότι 1,7 εκατομμύρια ενήλικες στην Αμερική αναπτύσσουν σήψη ετησίως και ότι σχεδόν 270.000 πεθαίνουν από τη σήψη (2). Η σήψη αποτελεί μέχρι και σήμερα την κύρια αιτία θανάτου μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών, επηρεάζοντας έως και 6% όλων των εισαγωγών και προκαλώντας ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα μεγαλύτερη από 15% (3). Η έγκαιρη ανίχνευση της σήψης έχει τη δυνατότητα να μειώσει τη θνησιμότητα διευκολύνοντας την έγκαιρη εφαρμογή των τεκμηριωμένων παρεμβάσεων. Στην [Εικόνα 1](#) παρουσιάζονται τα κλινικά κριτήρια αναγνώρισης των ασθενών με σήψη ή σηπτικό σοκ σε ενήλικες (4).



Εικόνα 1 Κλινικά κριτήρια αναγνώρισης ασθενών με σήψη και σηπτικού σοκ. Singer et, al (3)

Η σήψη στα παιδιά ορίζεται με την ύπαρξη δύο ή περισσότερων κριτηρίων του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) και με την ταυτόχρονη παρουσία επιβεβαιωμένης ή υποπτευόμενης λοίμωξης. Επιπροσθέτως στα κριτήρια αναγνώρισης της σήψης στα παιδιά προστίθενται η καρδιαγγειακή οργανική δυσλειτουργία ή οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή δύο ή παραπάνω άλλες οργανικές(5). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα κριτήρια του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης .

Πίνακας 1 Κριτήρια Συνδρόμου Συστηματικής Φλεγμονώδους Απόκρισης. Chakraborty et, al.(6)

Πίνακας 1. Κριτήρια Συνδρόμου Συστηματικής Φλεγμονώδους Απόκρισης	
Θερμοκρασία	>38° C ή <36° C
Καρδιακός Ρυθμός	>90 σφύξεις/λεπτό
Αναπνευστικός Ρυθμός	20 αναπνοές/λεπτό ή PaCO ₂ < 32 mmHg
Λευκοκύτταρα	>12,000 ή <4,000 κύτταρα/mm ³ ή >10% ανώριμες (band) μορφές
Η διάγνωση του συνδρόμου χρειάζεται την παρουσία δύο ή περισσότερων κριτηρίων από τα παραπάνω	

1.2 Δεσμίδες μέτρων αντιμετώπισης της σήψης

Η σήψη παραμένει μια σοβαρή ασθένεια με υψηλή θνητότητα και νοσηρότητα γεγονός που καθιστά απαραίτητη την έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση της. Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν την άμεση αντιμετώπιση της σήψης με την εφαρμογή μια δεσμίδας μέτρων εντός μίας ώρας από την εμφάνιση της (7).

1.2.1 Έγκαιρη αναγνώριση

Η έγκαιρη αναγνώριση της σήψης μπορεί να είναι δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου στο κλινικό πλαίσιο και της ετερογένειας του σηπτικού πληθυσμού (8).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η έγκαιρη αναγνώριση και η έγκαιρη φροντίδα των ασθενών έχει τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στη μείωση της θνησιμότητας. Μέχρι πρόσφατα, η σήψη οριζόταν ως ένα κλινικό σύνδρομο που εκδηλώνεται ως σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) στη μόλυνση. Ωστόσο, δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κλινικοί, απεικονιστικοί ή βιοχημικοί δείκτες που να υποδεικνύουν αυτήν την κατάσταση (9). Οι τελευταίες ενημερωμένες οδηγίες της καμπάνιας Surviving Sepsis Campaign οι οποίες δημοσιεύθηκαν το 2021 περιλαμβάνουν συστάσεις για τη χρήση προγραμμάτων και εργαλείων έγκαιρης ανίχνευσης της σήψης όπως τη βαθμολογία Γρήγορης Διαδοχικής Εκτίμησης Οργανικής Ανεπάρκειας (qSOFA) (11).

Το quick SOFA score αποτελεί ένα κλινικό μοντέλο το οποίο εστιάζει σε απλά παρακλινικά κριτήρια προκειμένου να ταυτοποιηθούν γρήγορα ενήλικες ασθενείς με υποψία λοίμωξης και πιθανά δυσμενή πρόγνωση. Απαιτείται η συνύπαρξη τουλάχιστον δύο κριτηρίων του (10). Η βαθμολογία q-SOFA ορίστηκε ως θετική για σηψαιμία εάν ισχύουν δύο ή περισσότερα από τα ακόλουθα : Κλίμακα Γλασκόβης <15, συστολική αρτηριακή πίεση ≤ 100 mmHg, Αναπνευστικός ρυθμός ≥ 22 αναπνοές ανά λεπτό (11).

Η βαθμολογία SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) σχεδιάστηκε για να περιγράψει τον βαθμό δυσλειτουργίας και ανεπάρκειας των οργάνων που σχετίζεται με την σήψη(12). Το υψηλό SOFA score σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα. Μέσω του score βαθμολογούνται οι διαταραχές κατά συστήματα και υπολογίζονται οι κλινικές παρεμβάσεις. Οι παράμετροι που συνθέτουν το SOFA score ανατρέχουν ανά σύστημα και συγκεκριμένα για το αναπνευστικό σύστημα υπολογίζεται ο λόγος της μερικής πίεσης οξυγόνου προς το κλασματικό εισπνεόμενο οξυγόνο (PaO_2/FiO_2), για τον πηκτικό μηχανισμό υπολογίζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων, για την ηπατική λειτουργία μετράτε η ολική χολερυθρίνη ενώ για το καρδιαγγειακό σύστημα υπολογίζεται η μέση αρτηριακή πίεση και η χρήση ή μη ινóτροπων και αγγειοσυσπαστικών παραγόντων. Επιπλέον εκτιμάται το κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της κλίμακας Γλασκόβης (Glasgow Coma Scale) και η νεφρική λειτουργία από την τιμή της κρεατινίνης στον ορό του αίματος και την παραγωγή των ούρων(12).

Όσον αφορά τους παιδιατρικούς ασθενείς, η σήψη στα παιδιά έως πρόσφατα οριζόταν ως εξής: 1) η ύπαρξη τουλάχιστον 2 κριτηρίων SIRS, 2) δευτεροπαθώς από κάποιο ταυτοποιημένο λοιμογόνο παράγοντα, είτε και με μόνη την κλινική ένδειξη λοίμωξης μη ταυτοποιήσιμης με μικροβιολογικές τεχνικές, και 3) καρδιαγγειακή δυσλειτουργία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή πολυοργανικής δυσλειτουργίας με συμμετοχή τουλάχιστον 2 συστημάτων, στην περίπτωση μη καρδιαγγειακής οργανικής δυσλειτουργίας.

Ωστόσο, σε μια πρόσφατη προσπάθεια, οι οδηγίες του Surviving Sepsis Campaign για την αντιμετώπιση της παιδιατρικής σηπτικής κατάστασης επικαιροποιήθηκαν, με στόχο την εναρμόνισή τους με τις αντίστοιχες οδηγίες των ενηλίκων (13), ενώ και το SOFA score έχει προσαρμοστεί στα κλινικά δεδομένα των παιδιατρικών ασθενών (14).1.2.2 Επείγουσα θεραπεία και αναζωογόνηση

Πρωταρχική σημασία στη διαχείριση ασθενών με σήψη είναι η ιδέα ότι η σήψη είναι μια επείγουσα ιατρική κατάσταση. Όπως και με το πολυτραύμα, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό επεισόδιο, η έγκαιρη αναγνώριση και η κατάλληλη άμεση αντιμετώπιση τις πρώτες ώρες μετά την ανάπτυξη της σήψης βελτιώνει την έκβαση (15,16). Οι κατευθυντήριες οδηγίες αναφέρουν ότι οι ασθενείς με σήψη χρειάζονται επείγουσα αξιολόγηση και θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής αναζωογόνησης υγρών, ενώ επιδιώκεται έλεγχος της εστίας της σήψης, λήψη περαιτέρω εργαστηριακών αποτελεσμάτων και επίτευξη ακριβέστερων μετρήσεων της αιμοδυναμικής κατάστασης (17). Η δέσμη 1 ώρας για την αντιμετώπιση της σήψης αποτελείται από τα ακόλουθα πέντε στοιχεία: μέτρηση του επιπέδου γαλακτικού, λήψη αιμοκαλλιέργειας πριν από τη χορήγηση αντιβιοτικών, χορήγηση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, έναρξη ταχείας χορήγησης 30 mL/kg κρυσταλλοειδούς υγρού παρουσία υπότασης ή γαλακτικού ≥ 4 mmol/ και χορήγηση αγγειοσυσπαστικών, εάν ο ασθενής είναι υποτασικός κατά τη διάρκεια ή μετά την αναζωογόνηση υγρών για διατήρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης (MAP) ≥ 65 mmHg εντός 1 ώρας από την αναγνώριση της σήψης (7).

1.3 Παθοφυσιολογία της σήψης

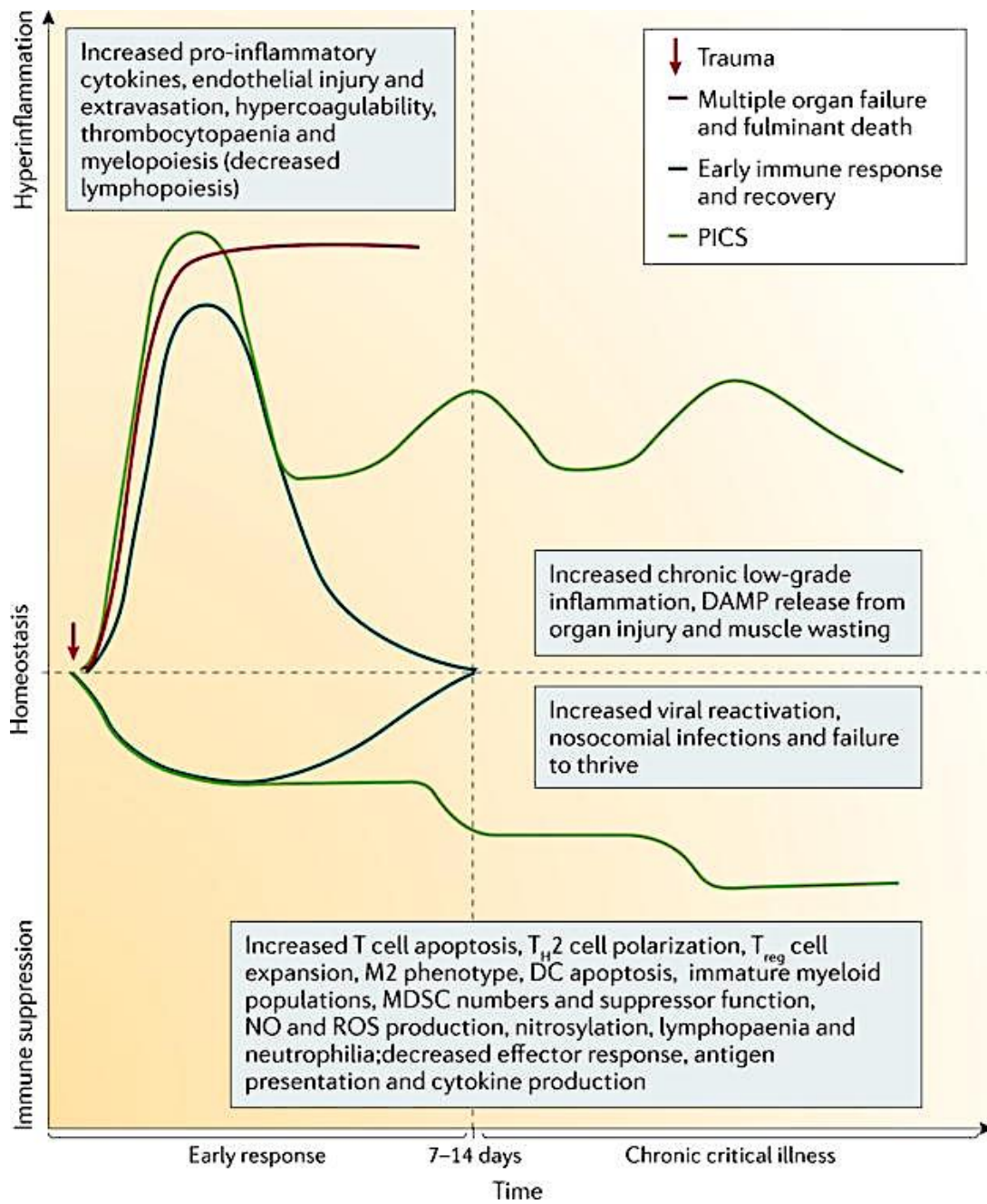
Στο πρώιμο στάδιο της σήψης, παθογόνοι μικροοργανισμοί ή προϊόντα τους (τοξίνες) εισέρχονται στην κυκλοφορία ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο διεγείρει την απελευθέρωση μεγάλου αριθμού προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (18). Η υπερβολική φλεγμονώδης αντίδραση (cytokine storm) πυροδοτεί έναν αριθμό μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η απόπτωση, η πυρόπτωση, η φερρόπτωση και η νεκρόπτωση (19).

Η παθοφυσιολογία της σήψης έχει εξηγηθεί ως μια υπερβολική, συστηματική προφλεγμονώδης απόκριση στη μόλυνση, ακολουθούμενη από μια ανοσοκατασταλτική φάση που χαρακτηρίζεται από ανοσοπαράλυση, λεμφοπενία και δευτερογενή μόλυνση. Οι

ασθενείς που επιβιώνουν από την αρχική φάση συχνά αναπτύσσουν νοσοκομειακές λοιμώξεις, οι οποίες συνήθως δεν αποτελούν απειλή για τον οργανισμό σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς. Στις περιπτώσεις αυτές, η αρχική υπερφλεγμονώδης φάση της σήψης εξελίσσεται σε υποφλεγμονώδη κατάσταση και αναστέλλει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα (20). Το έναυσμα για την εκκίνηση της φλεγμονώδους αντίδρασης αποτελεί η αναγνώριση παθογόνων, μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αναγνώρισης (pattern recognition receptors- PRRs), σχετιζόμενων με παθογόνα μοριακών αλληλουχιών (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), ή καταστάσεων που προκαλούν ιστική βλάβη (damage-associated molecular patterns- DAMPs) (21).

Τις πρώτες ώρες από την έναρξη του σηπτικού συνδρόμου παρατηρείται υψηλή παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και συγκεκριμένα, του παράγοντα νεκρώσεως των όγκων-α (TNFα) και των ιντερλευκινών 1β, -6, -8 (IL-1β, IL-6, IL-8), που σταδιακά ελαττώνονται την τρίτη ημέρα, οπότε και παρατηρείται σημαντική παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων, με κυριότερους την ιντερλευκίνη-10 (IL-10) και τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1α (IL-1a). Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δρουν επί των ουδετερόφιλων, ενώ παράλληλα διεγείρουν και την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οπότε και επάγεται έντονη περιφερική αγγειοδιαστολή (20).

Στην [Εικόνα 2](#) παρουσιάζεται σχηματικά η παθοφυσιολογία της σήψης. Εστιάζοντας στο κυτταρικό επίπεδο, η σήψη είναι μια φλεγμονώδης ασθένεια που προκαλείται από έμφυτη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού (22).



Εικόνα 2 Διάγραμμα παθοφυσιολογίας της σήψης. Hotchkiss et,al (22)

1.4 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

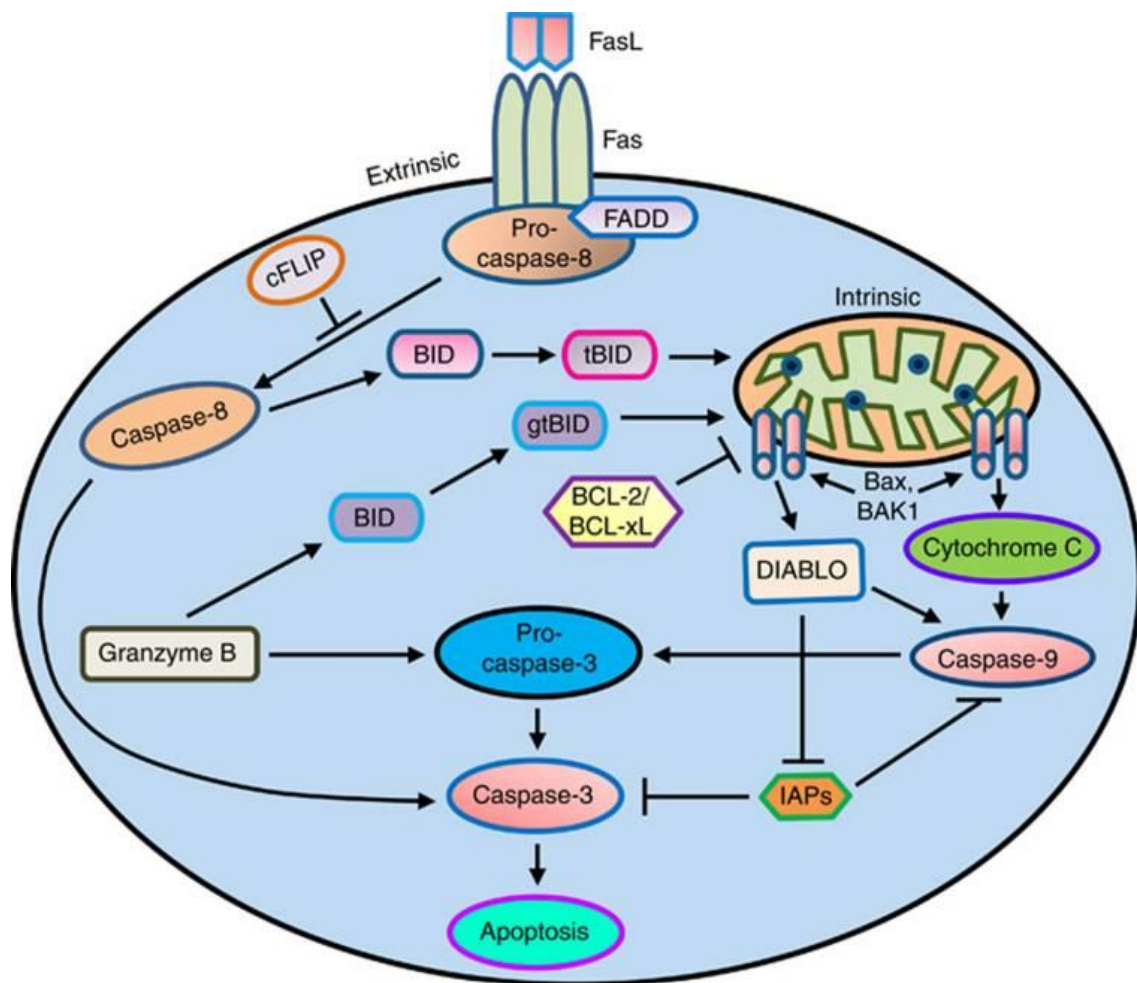
1.4.1 Κυτταρική νέκρωση

Ο κυτταρικός θάνατος έχει φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες. Πολλές φυσιολογικές διεργασίες απαιτούν κυτταρικό θάνατο για τη λειτουργία τους. Η διάρκεια ζωής των κυττάρων μπορεί να κυμαίνεται από μερικές ημέρες έως πολλά χρόνια, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Τα κύτταρα όταν πεθαίνουν απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα (23). Αυτός ο μηχανισμός εκκαθάρισης νεκρών κυττάρων λειτουργεί ομαλά υπό κανονικές συνθήκες, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα των φαγοκυτταρικών διεργασιών. Ωστόσο, αυτό το σύστημα μπορεί να κατακλυστεί όταν μεγάλος αριθμός κυττάρων πεθαίνουν απότομα και συσσωρεύονται, όπως κατά τη διάρκεια μόλυνσης, χρόνιας φλεγμονής και βλάβης ιστών. Ο ξαφνικός και απεριόριστος κυτταρικός θάνατος έχει ως αποτέλεσμα μαζική απελευθέρωση κυτταρικού περιεχομένου στον εξωκυτταρικό χώρο. Τα απελευθερωμένα μόρια λειτουργούν ως σήματα βλάβης, γνωστά ως μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τον κίνδυνο, Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs). Η παρουσία DAMPs στον εξωκυτταρικό χώρο προκαλεί μια ισχυρή ανοσολογική απόκριση που στρατολογεί επιπλέον φαγοκύτταρα και άλλα ανοσοκύτταρα για να καθαρίσει την απειλή και να προωθήσει την επισκευή των ιστών (23). Κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, η παρουσία μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με παθογόνα, γνωστά ως Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) προκαλεί ειδικές αντιμικροβιακές ανοσολογικές αποκρίσεις για τον έλεγχο της λοίμωξης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τον θάνατό τους για να προσαρμόσουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, αλλάζοντας έτσι την επίδραση που θα έχει ο θάνατός τους στο περιβάλλον. Οι καλύτερα μελετημένες μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση, η νεκρόπτωση και η πυρόπτωση (23).

1.4.2 Απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί μία ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου που ασκεί την δράση της μέσω των κασπασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εκτέλεση της κυτταρικής καταστροφής (24). Η κασπάση-8 έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής απόπτωσης και του πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποιημένη κασπάση 8

πυροδοτεί την απόπτωση είτε άμεσα με την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7, είτε ενεργοποιεί το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι. Το ενδογενές ή μιτοχondριακό αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιείται επίσης από διάφορα κυτταρικά σήματα που οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και στην περαιτέρω ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Η ενεργοποιημένη κασπάση 9 ενισχύει και αυτή την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών οδηγώντας στην απόπτωση του κυττάρου. Στην [Εικόνα 3](#) παρουσιάζεται ο μηχανισμός της απόπτωσης.



Εικόνα 3 Μηχανισμός απόπτωσης Aziz et, al (25). Fas = Fas-associated death domain protein FADD = FAS-associated death domain, Extrinsic, intrinsic = death-pathways, Granzyme B = a cytotoxic cell proteinase-1, which directly cleaves and activates pro-caspase-3, BID = a novel pro-apoptosis Bcl-2 family protein that is activated by Caspase 8 in response to Fas/TNF-R1 death receptor activation, IAPs = Inhibitors of apoptosis proteins, Bcl-2 family = proteins consisted of both antiapoptosis and pro-apoptosis members that regulate apoptosis typically at the mitochondrial level, Bax and Bak = members of the Bcl-2 family and core regulators of the intrinsic pathway of apoptosis, DIABLO = proapoptogenic mitochondrial protein.

1.4.3 Νεκρόπτωση

Η νεκρόπτωση είναι μια ρυθμιζόμενη νέκρωση που προκαλείται από υποδοχείς θανάτου. Χαρακτηρίζεται από οίδημα του κυττάρου που οδηγεί σε καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης (26). Ο όρος νεκρόπτωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2018, σε σχέση με έναν τύπο προγραμματισμένης νέκρωσης που δεν προκαλείται από κασπάσες και διέπεται κυρίως από τρεις πρωτεϊνικές κινάσες που αλληλοεπιδρούν με υποδοχείς: Receptor interacting protein kinase 1 and 3 (RIPK1 και RIPK3) και Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL) (27).

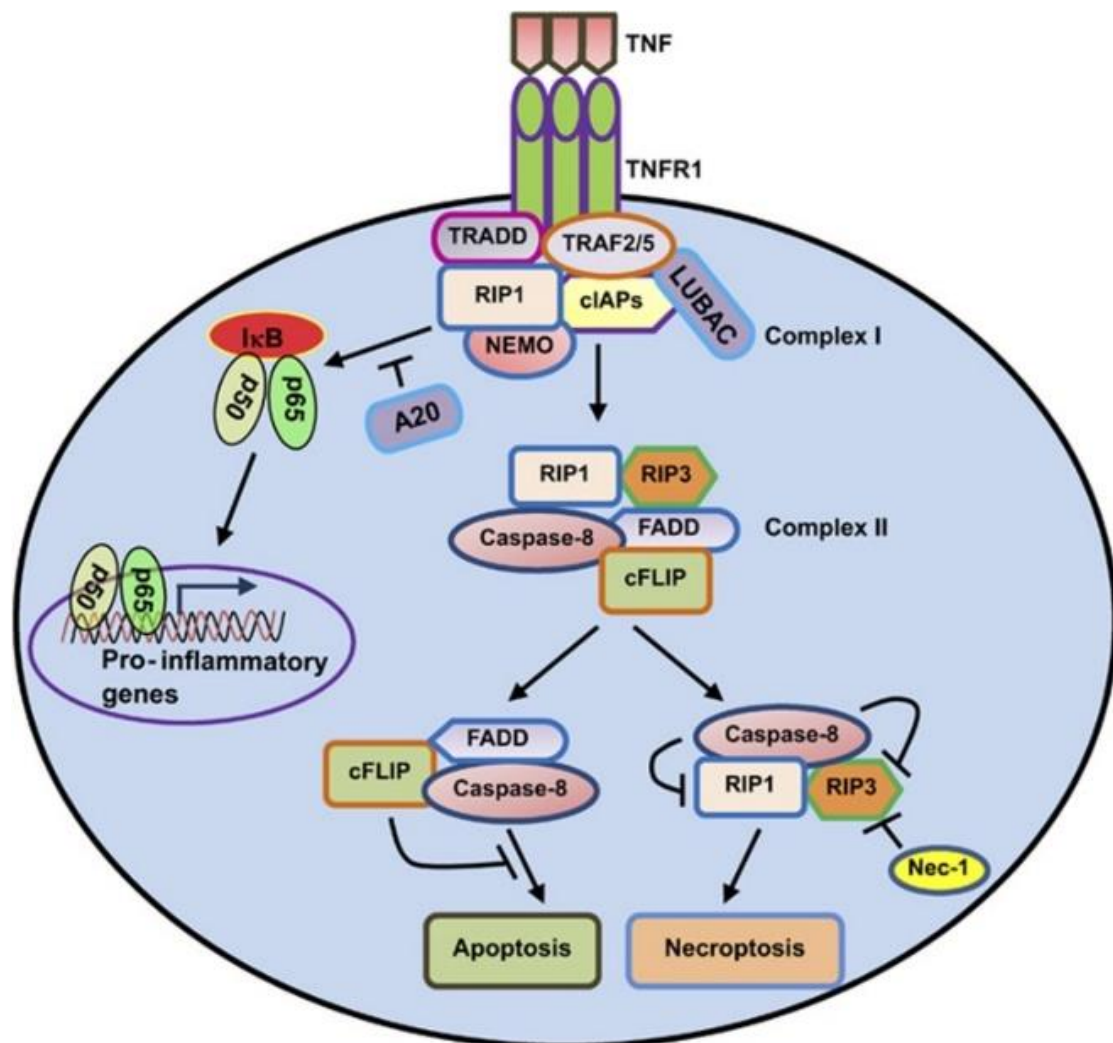
Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος που οδηγεί σε νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο ξεκινά από τη δέσμευση του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) στον υποδοχέα TNFR1, οι υποδοχείς του οποίου ενεργοποιούνται από τον TNF-α. Η απολίνωση του TNFR1 πυροδοτεί τη συγκρότηση του συμπλέγματος I που αποτελείται από TRADD, RIPK1, TRAF2/5, cIAP1/2 και LUBAC (28). Βέβαια, η κυτταρική επιβίωση, η απόπτωση και η νεκρόπτωση είναι όλες πιθανές συνέπειες του σχηματισμού συμπλόκου I, οι οποίες ρυθμίζονται από διαφορετικά σύμπλοκα σηματοδότησης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται το σύμπλεγμα I το οποίο ενεργοποιεί το NF-κB (29).

Η αποουβικουϊτινίωση του RIPK1 με κυλινδρομάτωση (CYLD) και το ένζυμο επεξεργασίας ουβικουϊτίνης A20 μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση του RIPK1 από το σύμπλεγμα I. Στη συνέχεια, το εναπομείναν σύμπλοκο προσλαμβάνει TNFR-1 associated death domain protein (TRADD), Fas associated death domain protein (FADD) και κασπάση-8 και σχηματίζει το σύμπλοκο IIa (αποτελούμενο από TRADD, συνδεδεμένο με FADD, RIPK1 και κασπάση-8, το οποίο ενεργοποιεί την απόπτωση. Ταυτόχρονα, η αποουβικουϊτινίωση έχει επίσης ως αποτέλεσμα το σύμπλοκο I που μετασχηματίζεται σε σύμπλοκο IIb για να επάγει τη νεκρόπτωση, η οποία αποτελείται από RIPK1, RIPK3, πρωτεΐνη επικράτειας θανάτου που σχετίζεται με Fas (FADD) και κασπάση-8 (30).

Γίνεται κατανοητό ότι η ανάπτυξη της νεκρόπτωσης επάγεται από ανοσολογικούς μεσολαβητές όπως οι Fas, TNF, και LPS, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της RIPK3, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την MLKL μέσω φωσφορυλίωσης. Τα φωσφορυλιωμένα MLKL μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και διαταράσσουν την κυτταρική ακεραιότητα. (31). Η νεκρόπτωση περιορίζεται σε ορισμένους τύπους ιστών που εκφράζουν RIPK3/MLKL

ενώ επίσης και η έκφραση της MLKL είναι απαραίτητη για την επαγωγή νεκρόπτωσης (32).

Στην [Εικόνα 4](#) παρουσιάζεται αναλυτικά ο μηχανισμός της νεκρόπτωσης.

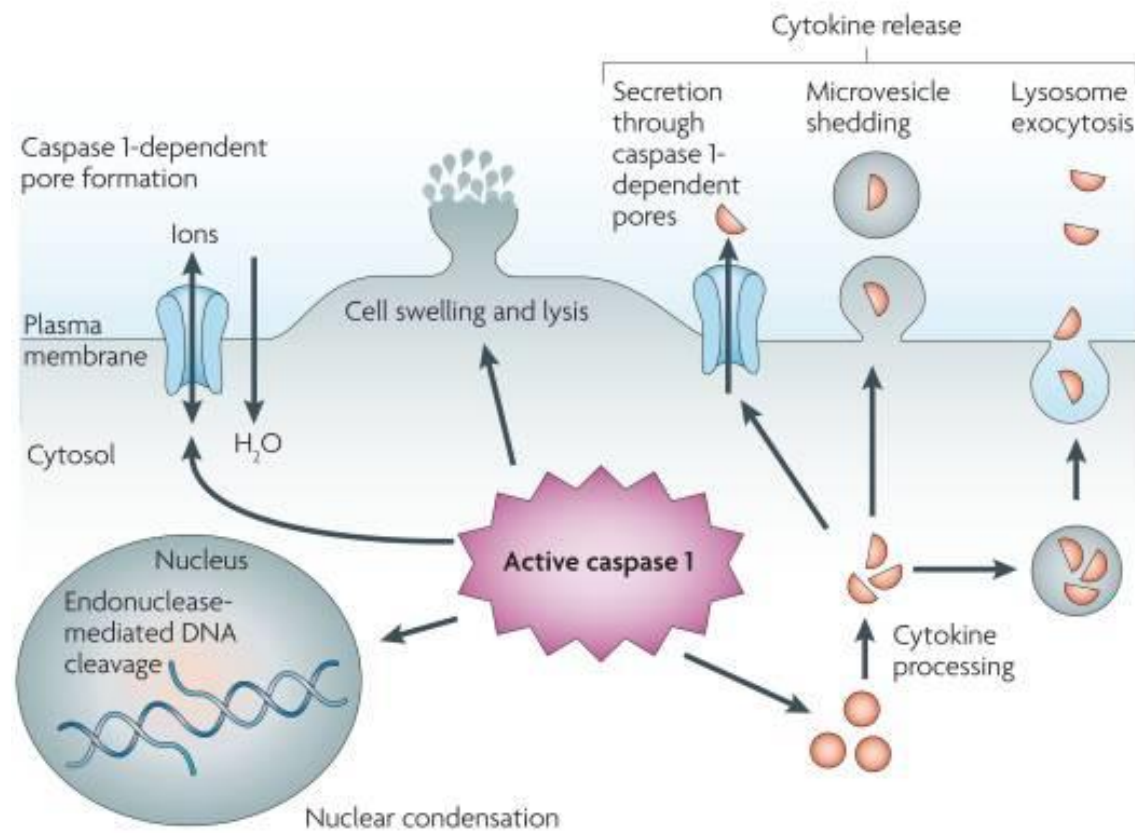


Εικόνα 4 Μηχανισμός νεκρόπτωσης. Aziz et, al (25) *TNF= Tumor necrosis factor binding to its trimeric receptor, TNFR1= TNF receptor-1 leads to a conformational change to generate TNFR complex I, TRADD= TNF receptor-associated death domain, RIP1/RIP3= receptor-interacting protein 1 and 3, cIAPs = cellular inhibitor of apoptosis proteins, TRAF2 and TRAF5=TNF receptor-associated factor 2 and 5, LUBAC= linear ubiquitin chain assembly complex promotes the recruitment and ubiquitination of the IKK-complex component, NEMO = Nuclear factor- κ B (NF- κ B) Essential Modulator, NF- κ B= Nuclear Factor-kappaB, cIAPs= Cellular inhibitor of Apoptosis Proteins, Nec-1 = Necrostatin-1 has been named for its ability to block necroptosis. Nec-1 is an allosteric inhibitor of RIP1 kinase activity*

1.4.4 Πυρόπτωσηση

Η πυρόπτωσηση είναι μια μορφή προγραμματισμένου λυτικού κυτταρικού θανάτου που σχετίζεται με αντιμικροβιακές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Η πυρόπτωσηση χαρακτηρίζεται από ταχεία ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και απελευθέρωση

προφλεγμονώδους ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Χαρακτηριστικό της πυρόπτωσης αποτελεί η εξάρτηση της από την κασπάση 1 η οποία και μεσολαβεί σε αυτήν την περίπτωση του κυτταρικού θανάτου (33). Στην [Εικόνα 5](#) παρουσιάζεται ο μηχανισμός της πυρόπτωσης.



Εικόνα 5 Μηχανισμός πυρόπτωσης. Bergsbaken T. et, al (33)

1.5 Μεσολαβητές κυτταρικού θανάτου

Ενώ η οδός κυτταρικού θανάτου της απόπτωσης τυπικά επιτρέπει στα κύτταρα να υποστούν θάνατο με ανοσολογικά σιωπηλό τρόπο, ο κυτταρικός θάνατος από νεκρόπτωση προκαλεί κυτταρική λύση και απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών που είναι γνωστό ότι προκαλούν μια ανοσοαπόκριση. Την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε ταχεία πρόοδος στην κατανόησή μας για τους μοριακούς μηχανισμούς που κρύβονται πίσω από τον νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο (34).

1.5.1 Receptor interacting protein kinase 1 and 3 (RIPK1- RIPK3)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες 1 και 3 που αλληλοεπιδρούν με υποδοχείς RIPK1 και RIPK3 είναι βασικοί πρωταγωνιστές στη ρύθμιση της μοίρας των κυττάρων και στην απόφαση μεταξύ της επαγόμενης από τον TNF κυτταρικής επιβίωσης και του κυτταρικού θανάτου (35).

Η RIPK1 είναι ένα βασικό σηματοδοτικό μόριο που ελέγχει τον κυτταρικό θάνατο και τη φλεγμονή τόσο μέσω των λειτουργιών του ικρίωματος όσο και της κινάσης. Η RIPK1 μπορεί να ενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κΒ που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων (36). Εναλλακτικά, μπορεί να σχηματίσει ένα κυτταροπλασματικό σύμπλεγμα που εμπλέκει την περιοχή θανάτου που σχετίζεται με Fas (FADD) και την κασπάση-8 για την έναρξη της απόπτωσης (37).

Σε άλλες περιπτώσεις, η RIPK1 μπορεί να συσχετιστεί με τη RIPK3 μέσω των ομοτυπικών μοτίβων αλληλεπίδρασης RIP για να σχηματίσει ένα νεκρόσωμα και να προκαλέσει νεκρόπτωση. Πολυάριθμα χαρακτηριστικά διακρίνουν τις δύο οδούς κυτταρικού θανάτου, την απόπτωση έναντι της νεκρόπτωσης, συμπεριλαμβανομένης της εμπλοκής των δραστηριοτήτων κινάσης των RIPK1 και RIPK3 στο σχηματισμό νεκροσωμάτων (38).

1.5.2 Mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)

Περισσότερες από 500 πρωτεϊνικές κινάσες έχουν ταυτοποιηθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με περίπου το 10% από αυτές να είναι ενζυμικά ανενεργείς και να έχουν ταξινομηθεί ως

ψευδοκινάσες (39). Η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών είναι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, η οποία είναι σημαντική στην κυτταρική ομοίωση (40). Η ψευδοκινάση mixed lineage kinase domain-like (MLKL) είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο MLKL. Η MLKL ανήκει στην υπερικογένεια της πρωτεϊνικής κινάσης. Αν και περιέχει μια περιοχή που μοιάζει με πρωτεϊνική κινάση, θεωρείται ότι είναι ανενεργή επειδή στερείται πολλών καταλοίπων που απαιτούνται για την εν λόγω δραστηριότητα (41).

Η MLKL διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εκτέλεση της νεκρόπτωσης. Η ενδομοριακή φωσφορυλίωση της RIPK1/RIPK3 προάγει τη στρατολόγηση της MLKL, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από την RIPK3 (32). Η φωσφορυλιωμένη μορφή της MLKL μετακινείται προς την πλασματική μεμβράνη για να ολιγομεριστεί και να επάγει το σχηματισμό μεμβρανικών πόρων. Οι πόροι έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της ακεραιότητας της μεμβράνης και οδηγούν σε νεκρόπτωση (32). Αξίζει να αναφερθεί ότι η MLKL χρησιμεύει ως δείκτης για τα κύτταρα που υφίστανται νεκρόπτωση. Ως αποτέλεσμα, τα αντισώματα έναντι της MLKL μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση νεκροπρωτικού κυτταρικού θανάτου (40).

1.5.3 Πρωτεΐνη A20

Η πρωτεΐνη A20, επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη 3 επαγόμενη από TNF-άλφα (TNFAIP3), είναι ένας βασικός ρυθμιστής των ανοσολογικών αποκρίσεων που εμπλέκονται τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία (42). Δομικά αποτελείται από μια N-τελική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου υπεύθυνη για τη δραστηριότητα επεξεργασίας ουβικουΐτινης και μια C-τελική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου τύπου A20 που αλληλοεπιδρά με διάφορα σηματοδοτικά μόρια (43). Η A20 δρα ως ρυθμιστής αρνητικής ανατροφοδότησης των προφλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στη νεκρόπτωση.

Η πρωτεΐνη A20 ασκεί τον ρυθμιστικό της ρόλο στον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω διαφόρων μηχανισμών. Πρώτον, ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση της RIPK1, αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό του συμπλόκου του νεκροσώματος και την επακόλουθη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης με τη μεσολάβηση της MLKL (44). Δεύτερον, η A20 αναστέλλει την RIPK1 και τον παράγοντα 2 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TRAF2) (45).

Αυτό αποτρέπει την υπερβολική φλεγμονή και διασφαλίζει τις κατάλληλες κυτταρικές αποκρίσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα. Τέλος, το A20 μπορεί επίσης να αναστείλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, η οποία αποτελεί βασικό βήμα στην επαγωγή της απόπτωσης κατά την αναστολή της νεκρόπτωσης (42).

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης A20 ρυθμίζονται στενά για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Πολλαπλοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφρασή της, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφικής ρύθμισης μέσω της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα-kappa B (NF-κB) Η απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβαλλόμενα επίπεδα έκφρασης της A20 που οδηγούν σε ανώμαλο νεκροληπτικό κυτταρικό θάνατο (46).

Η απορυθμισμένη έκφραση ή λειτουργία της πρωτεΐνης A20 έχει ενοχοποιηθεί για πολυάριθμες ασθένειες που σχετίζονται με μη φυσιολογικές διαδικασίες κυτταρικού θανάτου. Ασθένειες που οφείλονται στη φλεγμονή, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, έχουν παρουσιάσει μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της A20 (47). Επιπλέον, ελλείψεις στην έκφραση της A20 έχουν παρατηρηθεί σε αυτοάνοσες διαταραχές όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, συμβάλλοντας στη διαιώνιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Επιπλέον, η απορρύθμιση της A20 έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου, αναδεικνύοντας τη σημασία της ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου (48).

1.5.4 Κυτταροκίνες

Η οικογένεια των κυτταροκινών της ομάδας της ιντερλευκίνης -1 (IL-1) αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή της φυσικής και επίκτητης ανοσίας και διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή μπροστά σε μία λοίμωξη και στο φλεγμονώδες τραύμα. Η οικογένεια περιλαμβάνει την IL-1β, την IL-18, την IL-33, την IL-36 και την IL-37, από τις οποίες η IL-1β και η IL-18 εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απάντηση και έχουν αποδειχτεί ως οι πιο σημαντικές ιντερλευκίνες οι οποίες διεγείρουν το μονοπάτι ενός μηχανισμού κυτταρικής νέκρωσης, την πυρόπτωση. Η IL-1β παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα του αίματος, τα ουδετερόφιλα, τα B λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK cells) (49).

Περνώντας στην έννοια των κυτταροκινών, πρόκειται για μικρές διαλυτές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων και δρουν ως σήματα επικοινωνίας μεταξύ των

κυττάρων κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αποκρίσεων και άλλων φυσιολογικών λειτουργιών. Αυτά τα σηματοδοτικά μόρια μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες με βάση τις βιολογικές τους δραστηριότητες, όπως οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. ο TNF- α , η IL-1, οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. IL-10), οι χημειοκίνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες κυτταρικής μετανάστευσης ή οι αυξητικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τις διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή διαφοροποίησης (50).

Οι κυτταροκίνες συμμετέχουν στην έναρξη, τη ρύθμιση ή την ενίσχυση των νεκρωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, ο TNF- α , μια πρωτότυπη προφλεγμονώδης κυτταροκίνη γνωστή για τη συμμετοχή της σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, έχει εμπλακεί στην επαγωγή της νεκρόπτωσης (51). Προσδένεται στον υποδοχέα της και πυροδοτεί μεταγενέστερα σηματοδοτικά γεγονότα που οδηγούν στην ενεργοποίηση της RIPK1 και στη συνέχεια στη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην εκτέλεση της νεκρόπτωσης. Η IL-1 β έχει επίσης αποδειχθεί ότι προάγει τη νεκρόπτωση μέσω του ίδιου μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν οι RIPK1 και MLKL (52).

Επιπλέον, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των κυτταροκινών και των βασικών συστατικών που εμπλέκονται στη νεκρόπτωση, όπως οι RIPKs ή MLKL. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε πολύπλοκους βρόχους ανατροφοδότησης και διασταύρωσης που ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και θανάτου. Για παράδειγμα, η νεκροπρωτική σηματοδότηση που προκαλείται από τον TNF- α μπορεί να ρυθμίζεται αρνητικά από τη μεσολαβούμενη από την κασπάση-8 διάσπαση της RIPK1 ή από τους κυτταρικούς αναστολείς των πρωτεϊνών απόπτωσης (cIAPs) μέσω της εξαρτώμενης από την ουβικουιτίνη διαμόρφωση της δραστηριότητας της RIPK1 (51).

Οι επιπτώσεις της απορυθμισμένης σηματοδότησης των κυτταροκινών σε ασθένειες που σχετίζονται με ανώμαλη νεκρόπτωση έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου είναι μια τέτοια πάθηση όπου οι δυσ-ρυθμισμένες ανοσολογικές αποκρίσεις και οι ανισορροπίες των κυτταροκινών συμβάλλουν σε ιστική βλάβη μέσω ενισχυμένου νεκροπρωτικού κυτταρικού θανάτου (53). Ομοίως, νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως ο νευροπαθητικός πόνος έχουν συνδεθεί με μη φυσιολογική ενεργοποίηση κυτταροκινών όπως ο TNF- α που οδηγεί σε αυξημένο νευρωνικό θάνατο μέσω του μονοπατιού TNF- α της-νεκρόπτωσης. Η κατανόηση αυτών των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτταροκινών και των νεκρωτικών μονοπατιών παρέχει πληροφορίες για πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν σε μονοπάτια που μεσολαβούνται από

κυτταροκίνες για τη ρύθμιση του θανάτου των νεκρωτικών κυττάρων και τον μετριασμό της εξέλιξης της νόσου (54).

1.5.5 Caspase-8

Η κασπάση-8 είναι η κασπάση εκκίνησης της εξωγενούς απόπτωσης και περιορίζει τη νεκρόπτωση που διαμεσολαβείται από την RIPK3 και την MLKL (55). Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η κασπάση 8 αποτελείται από δύο υπομονάδες που σχηματίζουν ένα ενζυμικά ενεργό ετεροτετραμερές. Λειτουργεί ως εκκινητική κασπάση σε καταρράκτες αποπτωτικής σηματοδότησης, διασπώντας τις κασπάσες-εκτελεστές που ακολουθούν για την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συμμετοχή της στην ενεργοποίηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω πυροπρωτοπαθών οδών (55).

Η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 μπορεί να συμβεί μέσω δύο κύριων οδών: της εξωγενούς οδού που ενεργοποιείται από αλληλεπιδράσεις συνδέτη-υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη ή μέσω ενδογενών ερεθισμάτων, όπως η βλάβη του DNA εντός των μιτοχονδρίων (56). Και στις δύο περιπτώσεις, η στρατολόγηση σε συγκεκριμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα οδηγεί σε αυτοενεργοποίηση μέσω πρωτεολυτικών γεγονότων διάσπασης (56). Επιπλέον, η δραστηριότητα της κασπάσης 8 ρυθμίζεται στενά από διάφορους παράγοντες, όπως οι κυτταρικές ανασταλτικές πρωτεΐνες τύπου FLICE (c-FLIP) και οι κυτταρικοί αναστολείς των πρωτεϊνών απόπτωσης (IAPs), οι οποίοι μπορούν να διαμορφώσουν τη λειτουργία της και να αποτρέψουν τον ανεπιθύμητο κυτταρικό θάνατο (55).

Η κασπάση 8 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της νεκροπρωτικής σηματοδότησης. Σε ορισμένα πλαίσια, η κασπάση 8 μπορεί να αναστείλει ή να καταστείλει τη φωσφορυλίωση της MLKL που μεσολαβεί από την RIPK3, αποτρέποντας έτσι τον νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο (56). Ωστόσο, υπό συνθήκες όπου η δραστηριότητα της κασπάσης 8 είναι μειωμένη ή μπλοκαρισμένη, η νεκρόπτωση μπορεί να συμβεί ως εναλλακτική οδός κυτταρικού θανάτου (57).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της κασπάσης 8 και της νεκρόπτωσης έχει παρατηρηθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson, η δυσλειτουργία της κασπάσης 8 και η ενεργοποίηση της νεκροπρωτικής σηματοδότησης έχει ενοχοποιηθεί για τον θάνατο των νευρικών κυττάρων (57). Επιπροσθέτως, τα καρκινικά κύτταρα συχνά παρουσιάζουν μεταβαλλόμενα επίπεδα έκφρασης ή δραστηριότητας της κασπάσης 8, οδηγώντας σε αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση και σε πιθανή στροφή προς τον νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο (55).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κύριος σκοπός της μελέτης είναι να ανιχνεύσει την έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης σε ασθενείς με σήψη, συγκριτικά με ασθενείς με τραύμα ή καρδιακή νόσο και υγιείς μάρτυρες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεσολαβητών της νεκρόπτωσης θα γίνει μέσω της μεθόδου της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA), με τη χρήση ειδικών εμπορικών σκευασμάτων για τα εξής πρωτεϊνικά μόρια: RIPK-1,-3, MLKL, A20, IL-1β, IL-18. Με την χρήση της ίδιας μεθόδου ακόμα θα μετρηθεί και η εξωκυττάρια έκφραση της κασπάσης 8.

Δευτερεύοντες στόχοι της μελέτης είναι :

- A) Να συγκριθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών με κλινικούς και εργαστηριακούς δείκτες βαρύτητας νόσου και έκβασης αλλά και με βιομόρια φλεγμονής.
- B) Να συγκριθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων και αναλύσεων μεταξύ των δυο ηλικιακών ομάδων (παιδιών και ενηλίκων).

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Είδος μελέτης

Πρόκειται για μία προοπτική μονοκεντρική μελέτη μέτρησης των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης σε παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς με σήψη οι οποίοι νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας, συγκριτικά με ασθενείς με τραύμα, καρδιοπαθείς και υγιείς και συσχετίσή τους με εργαστηριακούς και κλινικούς δείκτες βαρύτητας και έκβασης της νόσου.

3.2 Πληθυσμός μελέτης

Η μελέτη περιλαμβάνει παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς (μετεγχειρητικούς ή τραυματίες) με σήψη ή μη μολυσματική φλεγμονή (SIRS) που εισήχθησαν στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), στη μονάδα εντατικής παρακολούθησης καρδιοπαθών (ΜΕΠΚ) και στη ΜΕΘ παιδών (ΜΕΘΠ) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου (ΠαΓΝΗ). Η χρονική περίοδος συλλογής των δεδομένων διήρκησε 6 μήνες (Ιούνιος 2022- Νοέμβριος 2022). Ως ομάδες ελέγχου επιλέχθηκαν υγιείς ενήλικες και παιδιά (controls). Ασθενείς με χρόνια νοσήματα αποκλείστηκαν από τη μελέτη, όπως και ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, κακοήθεια, χρόνια ανοσοκατασταλτική ή ανοσοτροποποιητική θεραπεία.

Τα ιατρικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα συλλέχθηκαν μέσω των ιατρικών φακέλων (επίσημα χειρόγραφα αρχεία) και μέσω των φακέλων ασθενών (χειρόγραφα επίσημα έγγραφα ή ηλεκτρονικοί φάκελοι ασθενών). Ειδικότερα, καταγράφηκε αν οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια της σήψης ή του SIRS, ο δείκτης σοβαρότητας (SOFA) και τα εργαστηριακά δεδομένα. Ακόμα έγινε καταγραφή των δεικτών βαρύτητας της νόσου (SOFA score, qSOFA, APACHE score, PRISM, PeLOD) καθώς και λοιπών εργαστηριακών δεικτών που επιβεβαιώνουν στοιχεία φλεγμονής και λοίμωξης.

Τα δείγματα ελήφθησαν από τους ασθενείς κατόπιν συγκατάθεσης των γονέων τους, εφόσον ήταν παιδιά, καθώς και συγκατάθεσης των ιδίων ή των συγγενών τους εφόσον δεν βρίσκονταν σε θέση να υπογράψουν.

3.3 Εργαστηριακές μετρήσεις

Για το εργαστηριακό μέρος της μελέτης, η συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων ολικού αίματος έγινε μέσα στις πρώτες 24 ώρες από την τεκμηρίωση της σήψης ή του SIRS στις ΜΕΘ.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης των μεσολαβητών της νεκρόπτωσης και της αποπτωτικής κασπάσης 8 έγινε με την χρήση της μεθόδου της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) με τη χρήση ειδικών εμπορικών σκευασμάτων για τα πρωτεϊνικά μόρια: RIPK-1,-3, MLKL, A20, IL-1β, IL-18, και Caspase 8.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στην ομάδα σήψης συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των ομάδων ελέγχου 1) μη λοιμώδους φλεγμονής και 2) υγιείς μάρτυρες στις δύο ηλικιακές ομάδες και με κλινικά δεδομένα βαρύτητας της νόσου και έκβασης.

3.4 Φόρμα καταγραφής δεδομένων μελέτης

Για τις ανάγκες της ορθής εκπόνησης της μελέτης δημιουργήθηκε μία φόρμα καταγραφής των δεδομένων στην οποία καταγράφονταν πληροφορίες των συμμετεχόντων της έρευνας. Για τον κάθε ασθενή συλλέχθηκαν κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα σχετιζόμενα με τη νοσηλεία τους, που επιβεβαίωναν την σήψη ή το SIRS κατά την εισαγωγή τους στις ΜΕΘ. Επίσης, έγινε καταγραφή των δεδομένων που προέκυψαν απ' την ανάλυση των δειγμάτων τους με την μέθοδο ELISA ([Παράρτημα Α](#)).

Καταγράφηκαν η κατηγορία του ασθενή (ενήλικας ή παιδί), κλινική νοσηλείας (ΜΕΘ ΠαΓΝΗ, ΜΕΘ Παίδων ΠαΓΝΗ, ΜΕΠΚ), τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών (φύλο, δείκτης μάζας σώματος, συννοσηρότητες, χρόνια φαρμακευτική αγωγή, ηλικία, ημερομηνία εισαγωγής και η ημερομηνία εξόδου) καθώς και η πορεία νόσου (έκβαση (επιβίωση ή θάνατος), μηχανικός αερισμός και η διάρκεια του μηχανικού αερισμού). Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν τα σκορ SIRS

(Systemic Inflammatory Response Syndrome), το quick SOFA score (quick Sequential Organ Failure Assessment score), το SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment score), το APACHE II score (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score) και το PRISM score (Pediatric RISK of Mortality) και PELOD-2 score (Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score) στους παιδιατρικούς ασθενείς.

Οι εργαστηριακοί δείκτες των ασθενών που συλλέχθηκαν ήταν η θερμοκρασία, το ποσοστό κορεσμού του οξυγόνου αίματος (SpO_2), το κλάσμα του εισπνεόμενου οξυγόνου (FiO_2), ο λόγος μερικής πίεσης οξυγόνου στο αίμα προς το κλάσμα του εισπνεόμενου οξυγόνου (PaO_2/FiO_2). Καταγράφηκαν τα στοιχεία της οξεοβασικής ισορροπίας των ασθενών που προέκυψαν από μετρήσεις του αρτηριακού αίματος όπως η ενεργός οξύτητα ή pH (H_3O^+), η μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα (PCO_2), το διττανθρακικό νάτριο (HCO_3^-) και ο προσδιορισμός του ελλείματος βάσεως (BE). Ακόμα σημειώθηκε εάν οι συμμετέχοντες παρουσίαζαν σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσφορίας (ARDS) ή όχι. Από τις εργαστηριακές εξετάσεις αίματος των ασθενών σημειώθηκαν παράμετροι όπως ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ($WBC 10^3/uL$) και ο αριθμός των αιμοπεταλίων ($PLT 10^3/uL$). Στον ορό του αίματος των ασθενών μετρήθηκαν δείκτες όπως η τροπονίνη I υψηλής ευαισθησίας (hs - TnI 0-0,04 pg/mL), η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP mg/dL), η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (SGOT u/L), η πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT u/L), η ολική χολερυθρίνη (mg/dL), η κρεατινίνη (mg/dL) και η ουρία (mg/dL). Επίσης σημειώθηκαν τα αποτελέσματα από τις καλλιέργειες των βιολογικών υγρών των ασθενών, εφόσον πραγματοποιήθηκαν (καλλιέργειες αίματος και ούρων).

3.5 ELISA

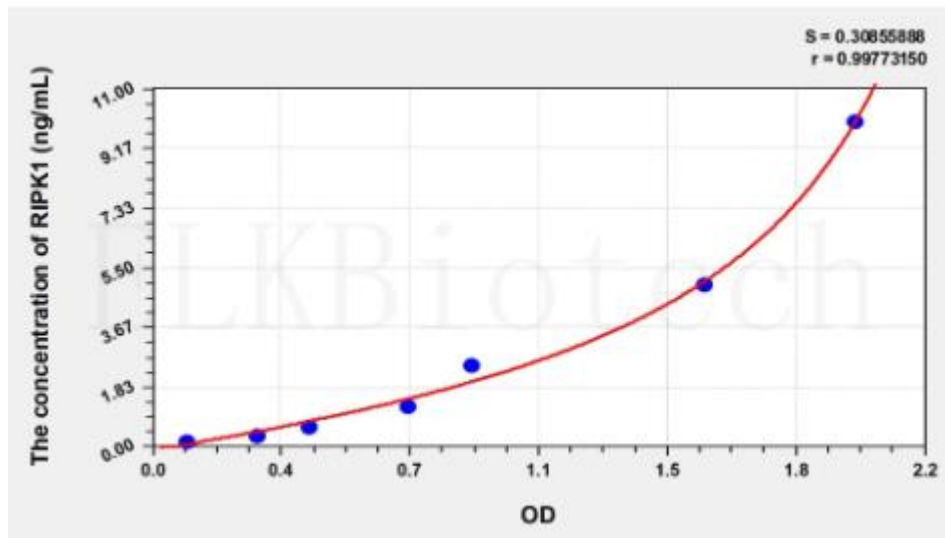
Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης καθώς και της αποπτωτικής κασπάσης 8 έγινε με τη μέθοδο sandwich ELISA

Με τη μέθοδο ELISA ποσοτικοποιούνται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης και της κασπάσης 8 στον ορό, αφού φωτομετρηθούν στο μήκος κύματος εκπομπής χρωμοφόρου (Avidin-Horseradish Peroxidase, HRP) στα 450nm. Αρχικά, ειδικό αντίσωμα έναντι της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου βρίσκεται προσκολλημένο σε πλάκα 96 θέσεων. Προστίθεται ο ορός και στη συνέχεια ενσωματώνεται το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης.

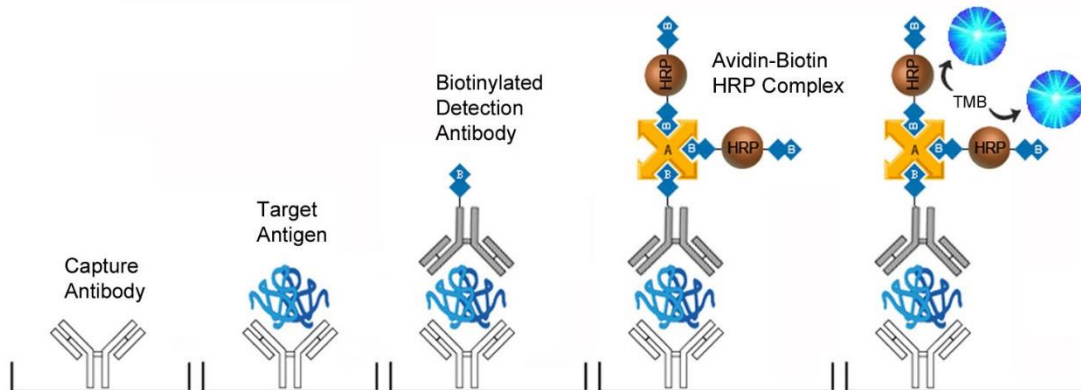
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης και της κασπάσης 8 έγινε σε δείγμα ορού των συμμετεχόντων στη μελέτη με τη μέθοδο ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (sandwich enzymelinked immunosorbent assay- ELISA), με συσκευασίες του εμπορίου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (ELK Biotechnology, USA).

Ειδικότερα, ορός του κάθε δείγματος προστίθεται σε ειδικά βοθρία, προ-επικαλυμμένα με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για τις πρωτεΐνες της νεκρόπτωσης και την κασπάση 8. Εν συνεχεία, ειδικό βιοτινυλιωμένο αντίσωμα με την υπεροξειδάση Avidin-Horseradish Peroxidase HRP προστίθεται στα βοθρία για επώαση υπό ανάδευση. Ακολουθεί πλύση για την απομάκρυνση οποιουδήποτε μη ειδικά συνδεδεμένου αντιδραστηρίου και προστίθεται το διάλυμα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μπλε χρώματος. Με την προσθήκη διαλύματος διακοπής αντίδρασης (stop solution) αναπτύσσεται κίτρινο χρώμα στα βοθρία, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της εκάστοτε πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε στα 450nm, σε φωτόμετρο ειδικό για μικροπλάκα.

Οι ευαισθησίες των ανιχνεύσεων ήταν 0.063 ng/ml για την πρωτεΐνη RIPK1, 0.122 ng/ml για την RIPK3 και την MLKL, 5.9 pg/ml για την IL- 18, 5.8 pg/ml για την IL -1b , 0.17 ng/ml για την A20 και 0.244 ng/ml για την κασπάση 8. Η οπτική πυκνότητα του κάθε δείγματος οδήγησε στην ποσοτικοποίηση της κάθε πρωτεΐνης, με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (standard curve) του κατασκευαστή (Εικόνα 6). Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο του κατασκευαστή έχει ως εξής: Αρχικά, προκειμένου να σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης του μορίου προστέθηκαν στην πλάκα γνωστές συγκεντρώσεις της εκάστοτε πρωτεΐνης. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (σε pg/ml και σε ng/ml αναλόγως την πρωτεΐνη μέτρησης): 10, 20, 40 και 1000 εις διπλούν. Εν συνεχεία, προστέθηκε στα υπόλοιπα πηγάδια της πλάκας ορός 100 μl ανά πηγάδι και η πλάκα επώασθη για 90 λεπτά στους 37° C. Κατόπιν, το υγρό απορρίφθηκε και προστέθηκε το διάλυμα με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, 100μl ανά πηγάδι με ανάδευση. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37° C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το διάλυμα, και έγινε πλύση της πλάκας τρεις φορές. Προστέθηκε το διάλυμα του συνδεδεμένου με ένζυμο αντισώματος (Avidin-Horseradish Peroxidase, HRP) σε ποσότητα 100μl ανά πηγάδι και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37° C. Κατόπιν το υγρό αφαιρέθηκε και έγινε πλύση της πλάκας πέντε φορές. Προστέθηκε το διάλυμα με το υπόστρωμα, 90μl σε κάθε πηγάδι, και έγινε επώαση για 15 λεπτά στους 37° C στο σκοτάδι. Στο τέλος με προσθήκη 5% φωσφορικού οξέος σταμάτησε η αντίδραση και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm (Εικόνα 7).



Εικόνα 6 Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης της Ripk1 στη μέθοδο ELISA



Εικόνα 7 Τα στάδια της μεθόδου sandwich ELISA

3.6 Ηθική και δεοντολογία της έρευνας

Η συλλογή πραγματοποιήθηκε μετά από έγγραφη άδεια από το Διοικητικό Συμβούλιο, Επιστημονικό Συμβούλιο ΠΑΓΝΗ και την Επιτροπή Βιοηθικής (Αρ Πρωτ: 19050 2023, Ημερομηνία: 26/06/2023). Η ενυπόγραφη συγκατάθεση των ασθενών κρίθηκε απαραίτητη, εφόσον πρόκειται για μία προοπτική μονοκεντρική μελέτη καταγραφής, όπως ορίζει ο γενικός κανονισμός προστασίας προσωπικών δεδομένων. Η μελέτη είναι σύμφωνη με τις αρχές του Γενικού Κανονισμού για τη προστασία των προσωπικών δεδομένων και τις ισχύουσες κανονιστικές απαιτήσεις. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν, αποθηκεύτηκαν και φυλάχθηκαν ανώνυμα και κωδικοποιημένα σε ασφαλές μέρος με εχεμύθεια και ευθύνη του κύριου ερευνητή. Η πρόσβαση σε αυτά έγινε με τρόπο που διασφάλιζε το απόρρητο και τη συμμόρφωση με τη νομοθεσία για την προστασία των προσωπικών δεδομένων και μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα και χωρίς καμία δυνατότητα να μπορεί να γίνει ταυτοποίηση με φυσικά πρόσωπα. Κατά την υλοποίηση της παρούσας μελέτης παρατήρησης εξ ορισμού δεν υπήρξε καμία παρέμβαση στο έργο του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού της κλινικής.

3.7 Στατιστική μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκε καταγραφή δεδομένων σε βάση δεδομένων Microsoft Excel. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 29. Οι ποσοτικές μεταβλητές με κανονική κατανομή περιγράφονται με τη μέση τιμή και σταθερή απόκλιση ($\text{mean} \pm \text{Standard Deviation}$) και οι μη κανονικής κατανομής με τη διάμεση τιμή και διατεταρτημοριακό εύρος (median , IQR 25-75%). Οι απόλυτες (n) και σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν δοκιμασίες t-test και ANOVA (παραμετρικές), Mann-Whitney και Kruskal-Wallis (μη παραμετρικές), ενώ για ποιοτικές μεταβλητές ή δοκιμασία χ^2 διορθωμένη κατά Fisher (Fisher exact test). Ο δείκτης συσχέτισης Spearman χρησιμοποιήθηκε για να ερευνηθεί το βαθμό επίδρασης αλλαγών μιας μεταβλητής σε μία άλλη. Η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (backward model, stepwise) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ανεξάρτητων συσχετίσεων. Αναλύσεις ROC χρησιμοποιήθηκαν για την ανάδειξη της

προβλεπτικής ικανότητας των βιοδεικτών της νεκρόπτωσης. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε σε τιμή κριτηρίου p μικρότερη του 0.05.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Δημογραφικά- κλινικά χαρακτηριστικά

Στην προοπτική μονοκεντρική κλινική μελέτη μέτρησης των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης σε παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς συμπεριλήφθηκαν ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύθηκαν στις ΜΕΘ Παιδών και ενηλίκων και στην Μονάδα Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιοπαθών του ΠΑΓΝΗ, καθώς και υγιείς ενήλικες από τον Ιούνιο του 2022 έως τον Νοέμβριο του 2022 και πληρούσαν τα κριτήρια εισόδου στη μελέτη. Οι συνολικά 88 ασθενείς της μελέτης κατανεμήθηκαν ως εξής όσον αφορά τις ομάδες μελέτης: με σήψη 26.1%, με τραύμα ή χειρουργείο (SIRS) 33%, με καρδιοπάθεια 21.6%, και υγιείς 19.3%. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 56 ενήλικες (63.6%) και 32 παιδιά (36.4%). Οι δύο ομάδες διέφεραν ως προς την ηλικία, το βάρος σώματος και το BMI ($p < 0.001$).

Περισσότεροι ασθενείς ήταν υποθρεπτικοί μεταξύ των παιδιών συγκριτικά με τους ενήλικες (18% vs. 3.6%), ενώ περισσότεροι ενήλικες ήταν υπέρβαροι συγκριτικά με τα παιδιά (26.8% vs. 9.4%, $p = 0.02$). Οι ενήλικες ασθενείς είχαν μεγαλύτερα ποσοστά συννοσηρότητας (51.8% vs. 6.3%, $p < 0.001$) και υποστηρίχτηκαν συχνότερα με αγγειοδραστικούς παράγοντες (51.8% vs. 6.3%, $p < 0.001$). Δεν διέφεραν οι δυο ομάδες ως προς την κατανομή στις ομάδες μελέτης, το φύλο, τη βαρύτητα της νόσου, το μηχανικό αερισμό, τη διάρκεια νοσηλείας, και τη θνητότητα. Αναλυτικά, τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον [Πίνακα 2α](#) και στον [Πίνακα 2β](#).

4.2 Εργαστηριακά δεδομένα

Από τον εργαστηριακό έλεγχο οι μόνες σημαντικές διαφορές που καταγράφηκαν μεταξύ των ενηλίκων και παιδιατρικών ασθενών ήταν τα υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης (152 vs. 103 mg/dl, $p < 0.001$), ουρίας (49 vs. 20 mg/dl, $p < 0.001$), και χολερυθρίνης (1.2 vs. 0.5 mg/dl, $p = 0.008$) σε ενήλικες ασθενείς. Τα εργαστηριακά ευρήματα στο σύνολο των ασθενών αποτυπώνονται στον [Πίνακα 3](#).

Πίνακας 2α. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών της μελέτης.

Χαρακτηριστικά Ασθενών	Σύνολο	Ενήλικες	Παιδιά	p-value
Συμμετέχοντες, n (%)	88 (100)	56 (63.6)	32 (36.4)	
Φύλο, n (%)				0.825
Άρρεν	62 (70.5)	39 (69.6)	23 (71.9)	
Θήλυ	26 (29.5)	17 (30.4)	9 (28.1)	
Ηλικία (έτη), mean±SD	33.1±25	47.4±21	8.1±5.5	<0.001
Βάρος Σώματος (kg), mean±SD	56.8±33	70.6±28	32.5±24	<0.001
BMI (kg/m ²), mean±SD	23.3±4.9	25.5±4.3	19.4±2.9	<0.001
BMI nutritional status n (%)				0.02
Υποθρεψία	8 (9.1)	2 (3.6)	6 (18.8)	
Φυσιολογικό βάρος σώματος	55 (62.5)	33 (58.9)	22 (68.8)	
Υπέρβαροι	18 (20.5)	15 (26.8)	3 (9.4)	
Παχύσαρκοι	7 (8)	6 (10.7)	1 (3.1)	
Ομάδα μελέτης, n (%)				0.133
Σήψη, n (%)	23 (26.1)	17 (30.4)	6 (18.8)	
SIRS, n (%)	29 (33)	15 (26.8)	14 (43.8)	
Καρδιοπάθεια, n (%)	19 (21.6)	15 (26.8)	4 (12.5)	
Υγιείς, n (%)	17 (19.3)	9 (16.1)	8 (25)	
Θερμοκρασία (° C), mean±SD	37.9±0.7	37.7±0.6	38.1±0.9	0.072
APACHE II score (%), mean±SD	14.9±9.7	16.2±11	12.6±6.9	0.147
SOFA score ≥2, n (%)	44 (62)	26 (55.3)	18 (75)	0.106
Συννοσηρότητες, n (%)	31 (35.2)	29 (51.8)	2 (6.3)	<0.001
Αντιπροσωπευτική κλινική διάγνωση				
Σήψη/σηπτική καταπληξία,	24±27.3	16±28.6	9±27	
Πνευμονία, n (%)	17 (19.3)	9 (16.1)	8 (25)	
ARDS, n (%)	8 (9.1)	1 (1.8)	7 (21.9)	0.007
Μυοκαρδίτιδα, n (%)	12 (13.6)	8 (14.3)	4 (12.5)	
Έμφραγμα μυοκαρδίου, mean±SD	7 (8)	7 (12.5)	0 (0)	
Κρανιοεγκεφαλική κάκωση,	6 (6.8)	3 (5.4)	3 (9.4)	
Τραύμα/Χειρουργείο, mean±SD	10 (11.4)	9 (16.1)	1 (3.1)	
Θεραπευτικές παρεμβάσεις, n (%)				
Μηχανικός αερισμός, n (%)	37 (52.1)	26 (55.3)	11 (45.8)	0.449
Αγγειοδραστικά, n (%)	49 (69)	40 (85.1)	9 (37.5)	<0.001
Νοσηλεία ΜΕΘ (ημέρες), mean±SD	7.14±7.5	7.37±5.6	6.75±9.9	0.712
Μηχανικός αερισμός (ημέρες),	5.22±7.2	4.20±1.7	6.75±11	0.306
Αγγειοδραστικά (ημέρες), mean±SD	4.1±1.7	4.0±1.7	6.9±11	0.771
Θνητότητα, n (%)	2 (2.8)	1 (2.1)	1 (4.2)	0.623

SIRS = Systematic Inflammatory Response Syndrome, ARDS= Acute respiratory distress syndrome, BMI= Body mass index , APACHE SCORE= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score, SOFA SCORE = Sequential Organ Failure Assessment Score.

Πίνακας 2β. Διαφορές μεταξύ των ομάδων που συμμετείχαν στην μελέτη

Biomolecules	Sepsis	SIRS	Cardiac	Healthy	p-
Συμμετέχοντες, n (%)	23 (100)	29 (63.6)	19 (63.6)	17 (36.4)	
Ηλικία (έτη), mean±SD	47±30	29±26	32±21	23±12	0.012
Βάρος σώματος (kg), mean±SD	52±32	55±37	77±24	43±24	0.011
BMI (score), mean±SD	23±4.6	23±6.5	25±4.2	22±1.7	0.421
Διάρκεια νοσηλείας (έτη), mean±SD	9.7±5.5	9.8±9.6	5.5±4.0	-	0.098

Πίνακας 3. Εργαστηριακά πρώτου εικοσιτετράωρου ασθενών στη ΜΕΘ.

Χαρακτηριστικά Ασθενών	Σύνολο	Ενήλικες	Παιδιά	p-
Συμμετέχοντες, n (%)	88 (100)	56 (63.6)	32 (36.4)	
pH, mean±SD	7.35±0.4	7.34±0.6	7.39±0.1	0.589
PaO ₂ (mmHg), mean±SD	104±38	102±31	109±48	0.418
PaCO ₂ (mmHg), mean±SD	37.2±7.7	37.8±8.5	35.9±6.2	0.369
HCO ₃ ⁻ (mmol/L), mean±SD	22.3±4	22.9±4.3	21.0±3.2	0.068
WBC × 10 ³ (cells/μL), mean±SD	13.5±9.0	14.1±10.4	12.5±5.5	0.476
Θετική κ/α αίματος, n (%)	4 (5.7)	3 (6.4)	1 (1.4)	0.730
CRP (mg/dl), mean±SD	14.2±14	14.6±14	13.3±14	0.731
Procalcitonin (ng/mL), mean±SD	0.7±3.5	0.2±0.1	1.8±6.1	0.074
Lactate (mg/dl), mean±SD	10.3±15	11.4±17	8.0±7.7	0.357
Glucose (mg/dl), mean±SD	135±61	152±68	103±25	<0.001
Urea (mg/dl), mean±SD	39±33	49±36	20±15	<0.001
Creatinine (mg/dl), mean±SD	1.95±6.2	2.5±7.6	0.9±0.9	0.300
SGOT (U/L), mean±SD	85±159	98±189	59±67	0.329
SGPT (U/L), mean±SD	56±185	74±226	21±13	0.257
Bilirubin (mg/dl), mean±SD	1.2±1.0	1.2±1.0	0.5±0.4	0.008
HS Tnl (pg/mL), mean±SD	4755±1448	5023±1508	1597±265	0.654

* *Independent-Samples Mann-Whitney U Test.* WBC=White blood count, CRP= C- reactive protein, HS Tnl= High-sensitivity troponin I, SGPT= Serum Glutamic Pyruvic Transaminase, SGOT= Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase Test.

4.3 Βιοδείκτες νεκρόπτωσης

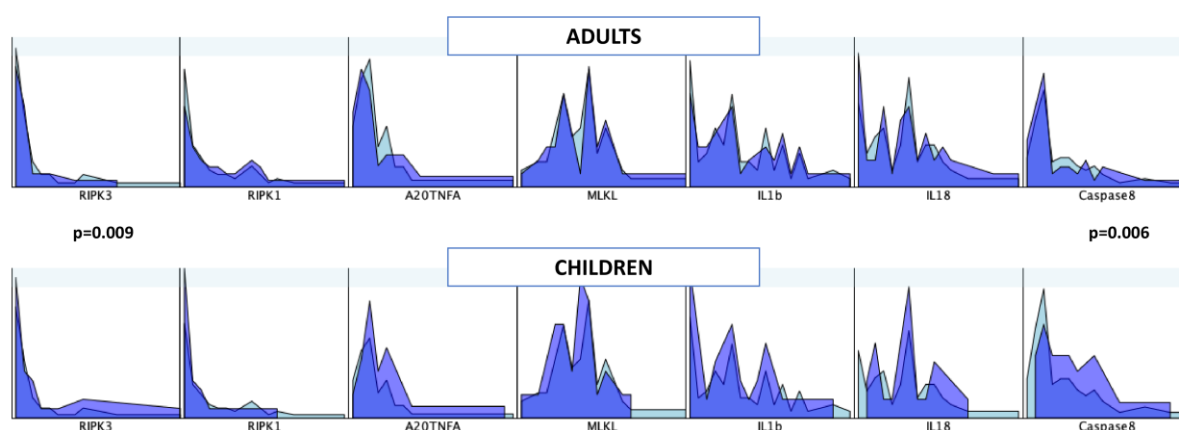
Οι βιοδείκτες νεκρόπτωσης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων με εξαίρεση την RIPK-1 και Caspase-8 όπως παρουσιάζονται στον [Πίνακα 4](#).

Πίνακας 4. Δείκτες διέγερσης των μονοπατιών της νεκρόπτωσης, απόπτωσης, και φλεγμονώδους αντίδρασης, κατανεμημένοι σε ομάδες ενηλίκων και παιδιών.

Biomolecules	Ενήλικες	Παιδιά	p-value *
Συμμετέχοντες, n (%)	56 (63.6)	32 (36.4)	
RIPK-1 (ng/ml), median (IQR)	15.7 (4.97-40.6)	4.6 (2.85-10.8)	0.009
RIPK-3 (ng/ml), median (IQR)	1.96 (0.76-2.94)	1.84 (0.77-4.84)	0.676
MLKL (ng/ml), median (IQR)	6.06 (4.65-6.93)	5.99 (4.72-6.63)	0.647
A20 (ng/ml), median (IQR)	0.51 (0.43-0.74)	0.58 (0.50-0.73)	0.235
IL-1b (pg/ml), median (IQR)	529 (289-1070)	561 (88.9-905)	0.381
IL-18 (pg/ml), median (IQR)	7642 (2873-10922)	8675 (3671-10204)	0.528
Caspase-8 (ng/ml), median (IQR)	14.5 (11.4-24.4)	21.6 (15.4-29.6)	0.006

* Independent-Samples Mann-Whitney U Test.

Παραστατικά οι διαφορές μεταξύ των δύο ηλικιακών ομάδων παρουσιάζονται στο γράφημα συγκριτικής απεικόνισης υποομάδων στην [Εικόνα 8](#).



Εικόνα 8. Συγκριτική κατανομή υποομάδων βιοδεικτών νεκρόπτωσης στις δύο ομάδες μελέτης παιδιών και ενηλίκων.

Μεταξύ των ομάδων μελέτης, σημαντικά υψηλότερες τιμές RIPK-1, IL-1b, και IL-18 και σημαντικά χαμηλότερες τιμές Caspase-8 καταγράφηκαν στην ομάδα της σήψης συγκριτικά με τις άλλες ομάδες ασθενών. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

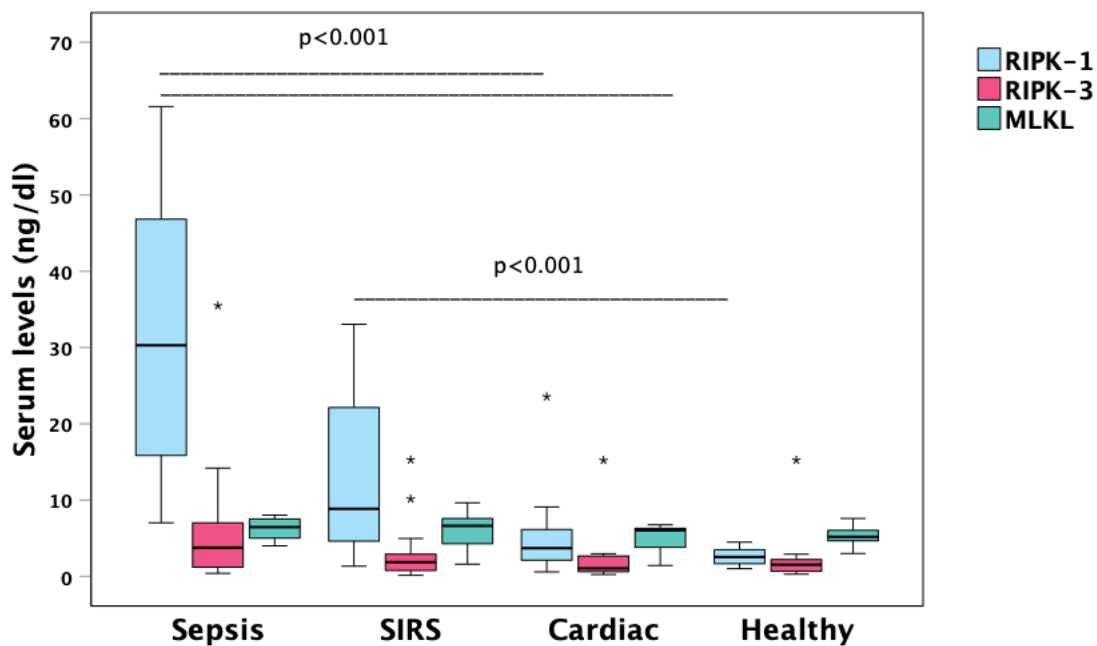
Πίνακας 5. Δείκτες διέγερσης των μονοπατιών της νεκρόπτωσης, απόπτωσης, και φλεγμονώδους αντίδρασης, κατανεμημένοι σε ομάδες ασθενών ΜΕΘ και υγιών ατόμων.

Biomolecules	Sepsis	SIRS	Cardiac	Healthy	p-value**
Συμμετέχοντες, n (%)	23 (100)	29 (63.6)	19 (63.6)	17 (36.4)	
RIPK-1 (ng/ml), median (IQR)	30.3 (16-47)*	8.9 (4.6-22)#	3.7 (2.1-2.5)	2.5 (1.7-1.7)	<0.001
RIPK-3 (ng/ml), median (IQR)	3.8 (1.2-7.0)	1.9 (0.8-2.9)	1.1 (0.6-2.7)	1.5 (0.7-2.2)	0.085
MLKL (ng/ml), median (IQR)	6.5 (5.0-7.0)	6.6 (4.3-7.6)	6.0 (3.8-6.3)	5.2 (4.7-6.0)	0.131
A20 (ng/ml), median (IQR)	0.72 (0.5-0.9)*	80.55 (0.4-0.7)	0.52 (0.5-0.6)	0.37 (0.3-0.5)*	0.065
IL-1b (pg/ml), median (IQR)	561 (387-948)*	723 (406-940)#	933 (658-1027)^	84 (70-99)*, #,^	<0.001
IL-18 (pg/ml), median (IQR)	9815 (7220-13504)*	9033 (3671-12588)#	5417 (3133-6990)^	147 (132-206)*, #,^	<0.001
Caspase-8 (ng/ml), median (IQR)	13.8 (12-15)*	17.4 (15-27)	16.6 (8.9-54)	24.6 (16-34)*	0.015

**Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. Pairwise Comparisons adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests μεταξύ διαγνωστικών ομάδων μελέτης (p<0.05) και σήψης*, SIRS# ή καρδιοπαθών^.

4.4 Εκφραστές διέγερσης νεκρόπτωσης

Οι κύριες πρωτεΐνες εκφραστές της νεκρόπτωσης RIPK-1 και RIPK-3 ήταν αυξημένες σε ασθενείς με σήψη συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, αν και μόνο η RIPK-1 έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα (Εικόνα 9). Η πρωτεΐνη MLKL δεν κατέγραψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς.



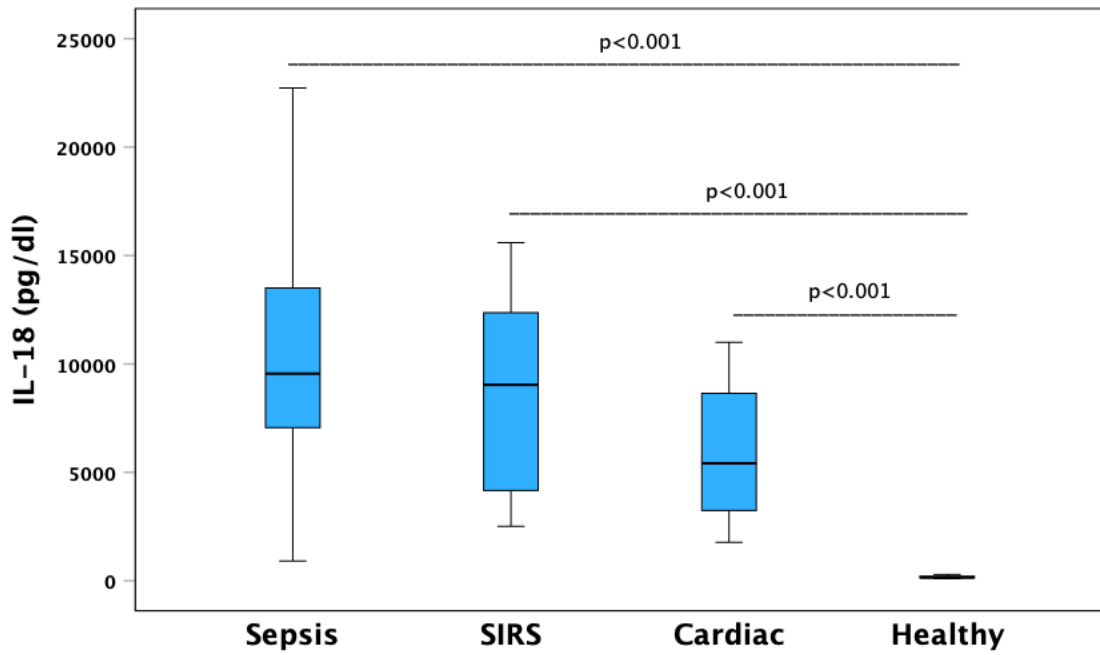
Εικόνα 9. Συγκριτική κατανομή των βασικών πρωτεϊνικών εκφραστών της νεκρόπτωσης μεταξύ των ομάδων μελέτης.

4.5 Φλεγμονώδης διέγερση της νεκρόπτωσης

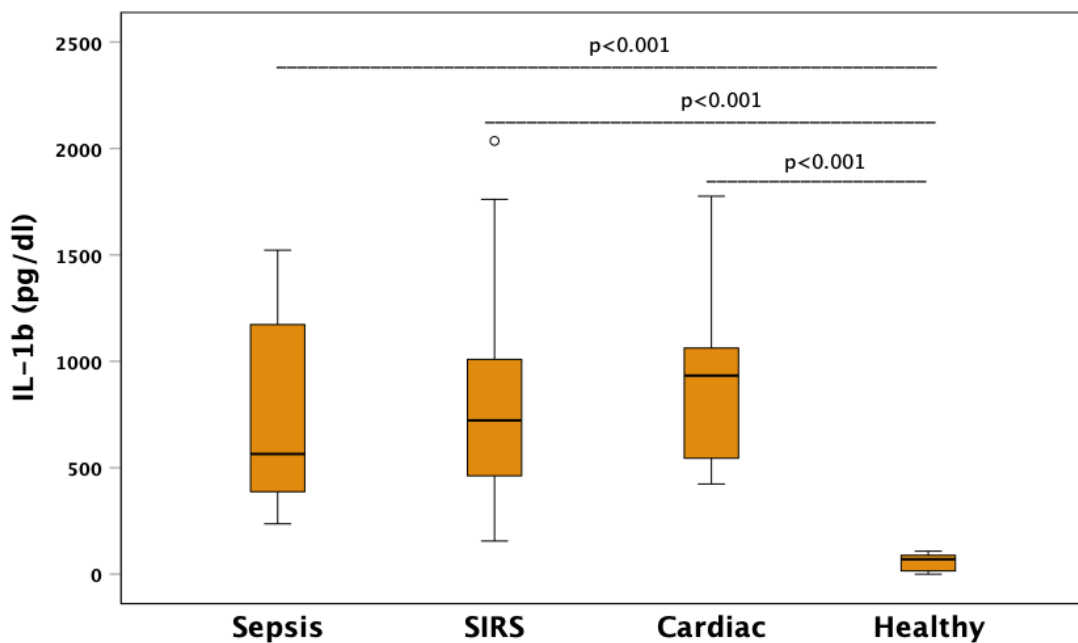
Οι κύριες φλεγμονώδεις ιντελευκίνες που διεγείρονται μέσα από το μονοπάτι της νεκρόπτωσης IL-1b και IL-18 ήταν σημαντικά αυξημένες σε ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς, ιδιαίτερα στην ομάδα της σήψης όσον αφορά την IL-18 (Εικόνα 10).

Η IL-1b παρουσίασε μια ισορροπία μεταξύ των ομάδων ασθενών (Εικόνα 11). Όμως ενώ σε παιδιατρικούς ασθενείς η αύξηση κυρίως εκπροσωπήθηκε από την ομάδα της σήψης, στους ενήλικες μεγαλύτερη σχετική αύξηση παρουσίασαν ασθενείς με έμφραγμα ή μετεγχειρητικά (Εικόνα 12).

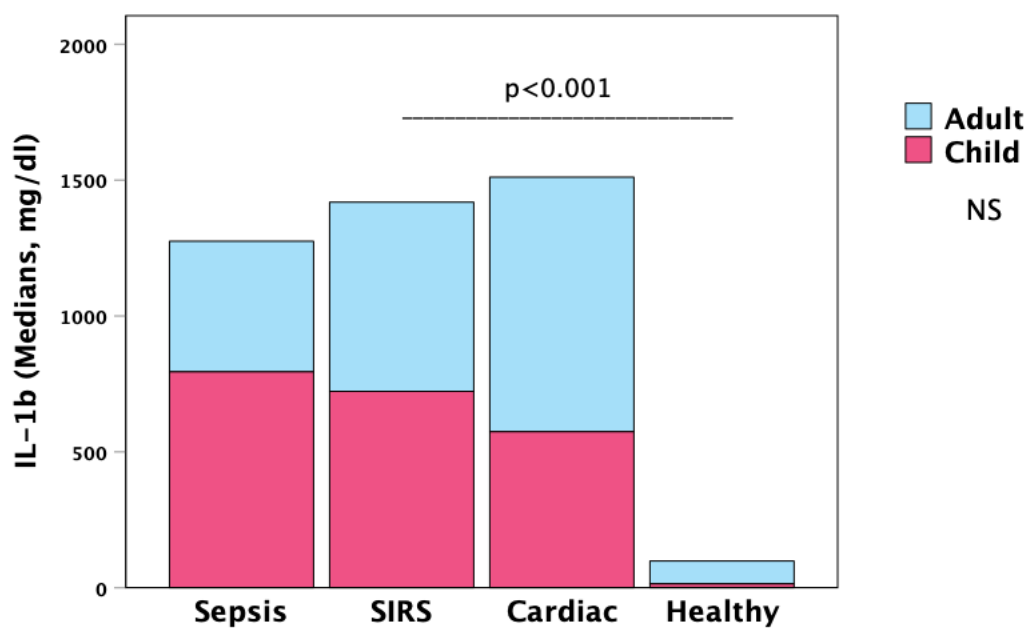
Η πρωτεΐνη MLKL δεν κατέγραψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς.



Εικόνα 10. Συγκριτική κατανομή της IL-18, φλεγμονώδους διεγέρτη της νεκρόπτωσης μεταξύ των ομάδων μελέτης.



Εικόνα 11. Συγκριτική κατανομή της IL-1b, φλεγμονώδους διεγέρτη της νεκρόπτωσης μεταξύ των ομάδων μελέτης.

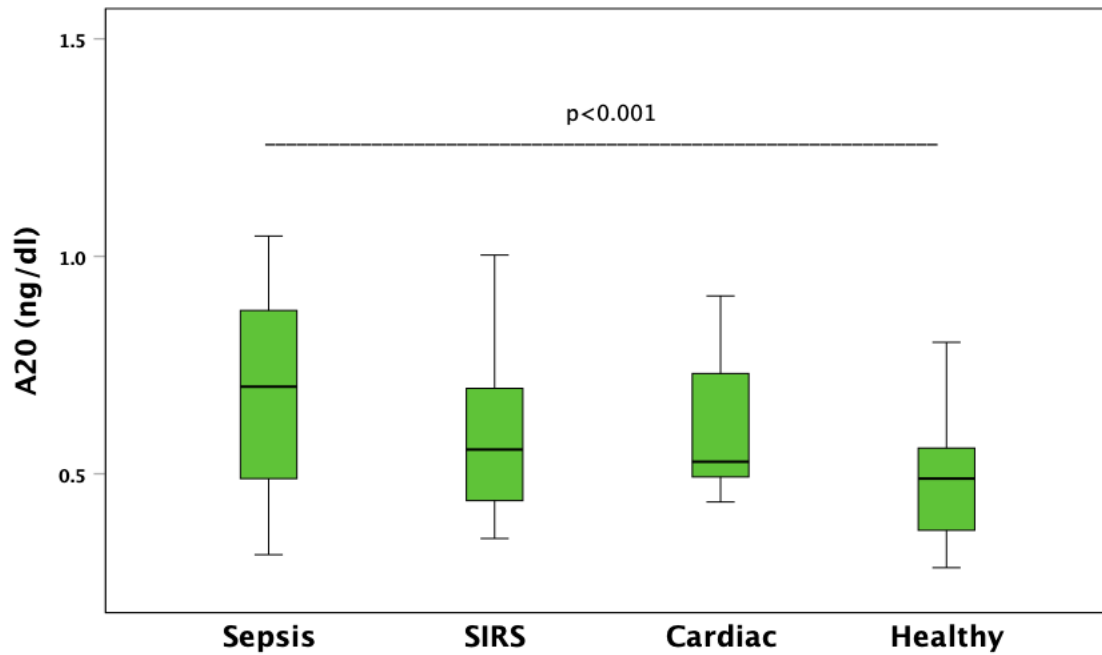


Εικόνα 12. Συγκριτική κατανομή της IL-1β σε παιδιά και ενήλικες μεταξύ των ομάδων μελέτης.

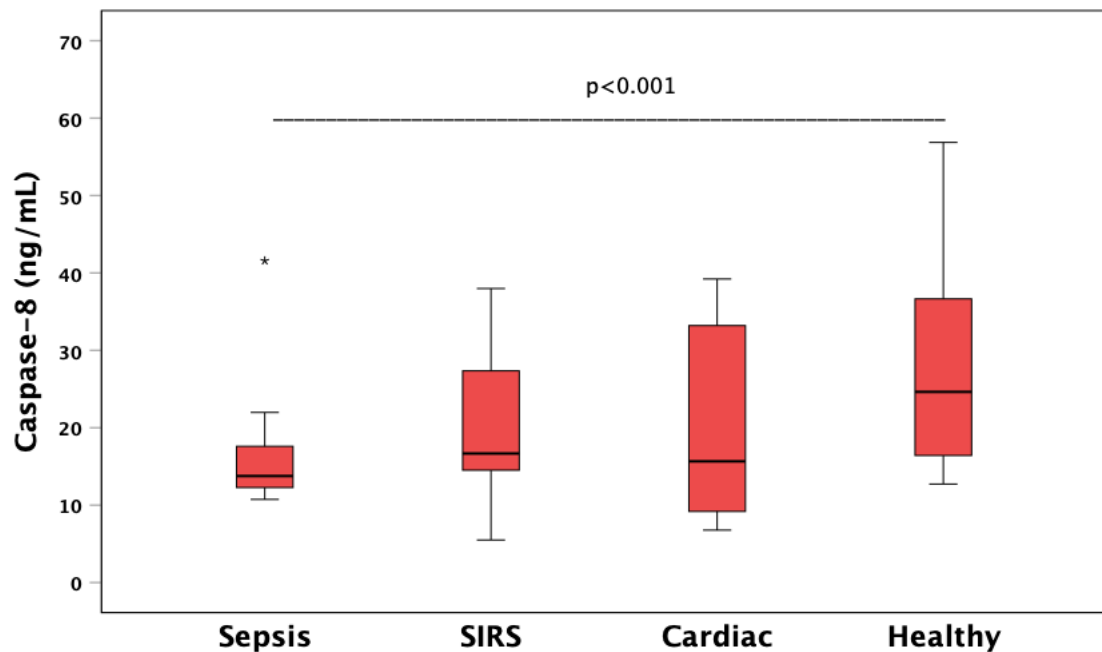
4.6 Επιδραστικές πρωτεΐνες του μονοπατιού της νεκρόπτωσης

Σημαντικά αυξημένη ήταν η έκφραση της πρωτεΐνης A20, ενός ένζυμου επεξεργασίας ουβικουϊτίνης στα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου, στην ομάδα της σήψης συγκριτικά με υγιή άτομα ($p < 0.001$) (Εικόνα 13).

Αντίθετα, σχετικά με την Caspase-8, πρωτεΐνης η οποία διεγείρει την απόπτωση και αναστέλλει τη νεκρόπτωση, σημαντικά μειωμένη ήταν η έκφρασή της στην ομάδα της σήψης συγκριτικά με υγιή άτομα ($p < 0.001$) (Εικόνα 14).



Εικόνα 13. Συγκριτική κατανομή της πρωτεΐνης A20, ένζυμου επεξεργασίας ουβικουΐτινης στα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου, μεταξύ των ομάδων μελέτης.

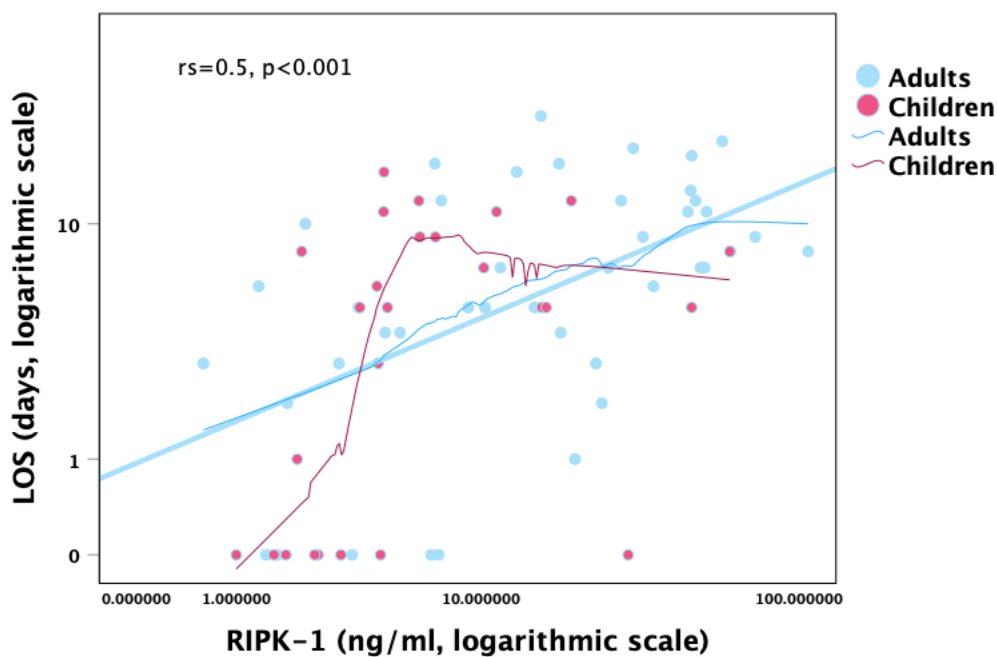


Εικόνα 14. Συγκριτική κατανομή της Caspase-8, πρωτεΐνης η οποία διεγείρει την απόπτωση και αναστέλλει τη νεκρόπτωση, μεταξύ των ομάδων της μελέτης.

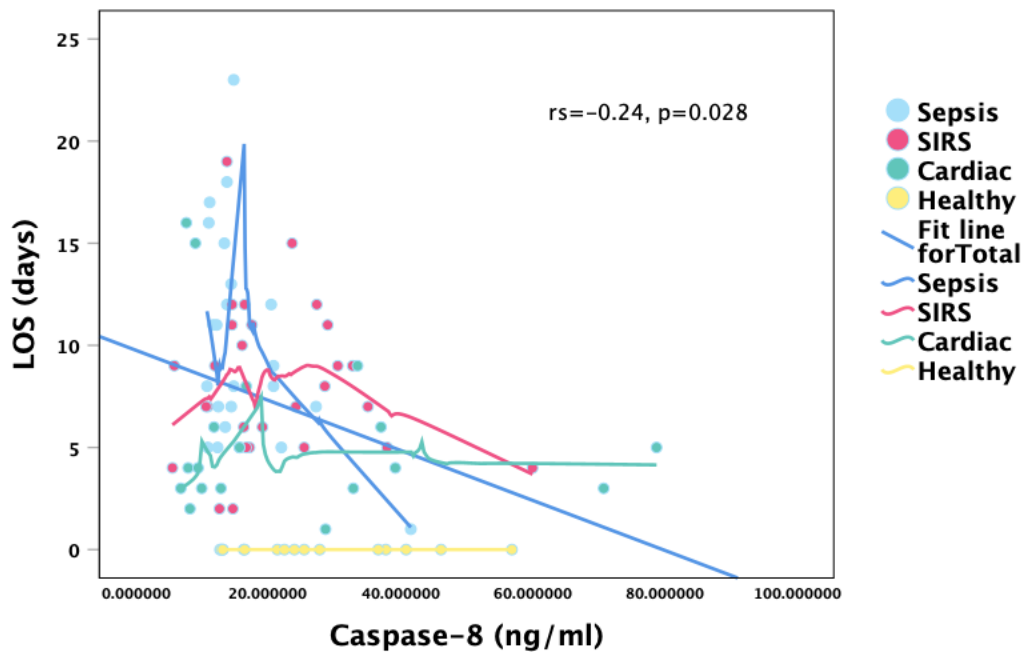
4.7 Συσχετίσεις

Με τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ σχετίζονταν σημαντικά οι ακόλουθοι σχετιζόμενοι με τη νεκρόπτωση βιοδείκτες: RIPK-1 ($r_s=0.5$, $p<0.001$), IL-1b ($r_s=0.43$, $p<0.001$), ($r_s=0.48$, $p<0.001$) και αρνητικά η Caspase-8 ($r_s=-0.24$, $p=0.028$). Η θετική συσχέτιση της RIPK-1 με τη διάρκεια νοσηλείας ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε ενήλικες και παιδιά (Εικόνα 15).

Η αρνητική συσχέτιση της Caspase-8 με τη διάρκεια νοσηλείας αποτυπώθηκε σε διάγραμμα διασποράς μόνο στις ομάδες της σήψης και SIRS, επισημαίνοντας την αναστολή της και ενεργοποίησης της νεκρόπτωσης στις ομάδες αυτές, και όχι σε υγιείς ή καρδιοπαθείς (Εικόνα 16).



Εικόνα 15. Διάγραμμα διασποράς (scatterplot) της συσχέτισης RIPK-1 με τη διάρκειας νοσηλείας στη ΜΕΘ των ομάδων μελέτης παιδιών και ενήλικων ασθενών.



Εικόνα 16. Διάγραμμα διασποράς (scatterplot) της συσχέτισης Caspase-8 με τη διάρκεια νοσηλείας ασθενών ΜΕΘ (σήψη, SIRS) και καρδιοπαθών σε σύγκριση με ομάδα υγιών ατόμων.

4.8 Ανεξάρτητες συσχετίσεις

Προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση των βιοδεικτών νεκρόπτωσης ή απόπτωσης με συνήθεις εργαστηριακούς δείκτες φλεγμονής εξετάστηκε η πιθανότητα ανεξάρτητης συσχέτισής τους με το γαλακτικό στο αίμα των ασθενών, ομαλοποιώντας για τις διαφορές παιδιών και ενήλικων ασθενών.

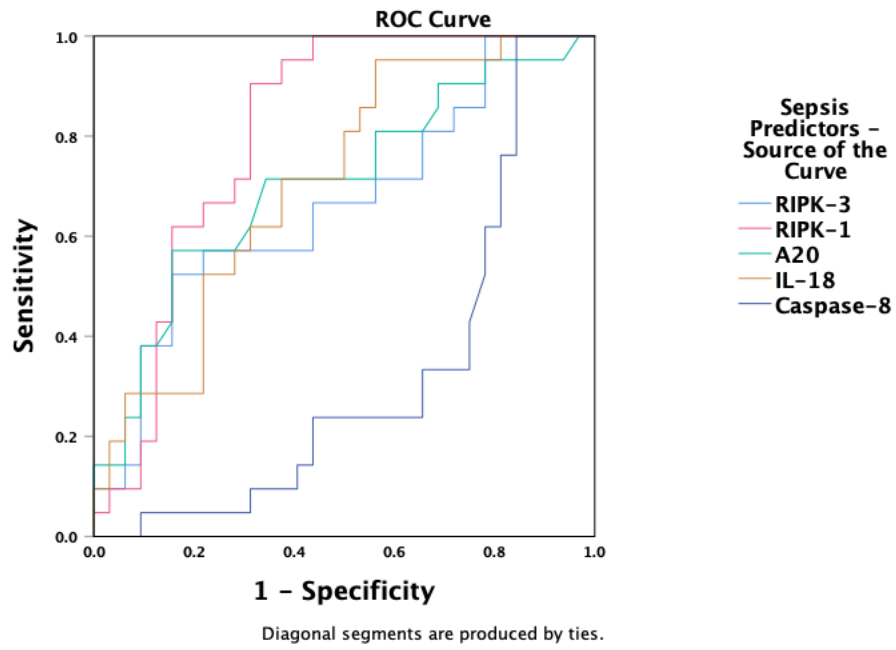
Σε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (backward stepwise method, weighted by age groups), μόνο η πρωτεΐνη A20 συσχετίστηκε ανεξάρτητα με τις τιμές γαλακτικού στο αίμα (Standardized Coefficients Beta 0.55, $p<0.001$).

4.9 Προβλεπτικοί παράγοντες νεκρόπτωσης

Σε ανάλυση ROC πρόβλεψης ενεργοποίησης των βιοδεικτών νεκρόπτωσης πρώτου 24ώρου νοσηλείας στη ΜΕΘ ασθενών με σήψη ή σηπτικό shock, οι βιοδείκτες RIPK-1 (AUC 0.81 (0.69-0.93), $p < 0.001$) IL-18 (AUC 0.71 (0.57-0.85), $p < 0.01$), και A20 (AUC 0.71 (0.56-0.85), $p < 0.012$) (Πίνακας 6) προέβλεπαν καλύτερα την πιθανότητα της διάγνωσης σήψης ή σηπτικού shock στη ΜΕΘ συγκριτικά με την ενεργοποίηση του δείκτη νεκρόπτωσης RIPK-3 (AUC 0.66 (0.51-0.82), $p < 0.044$) και της καταστολής της Caspase-8 (AUC -0.32 (-0.17 — -0.47), $p < 0.029$) (Εικόνα 17).

Πίνακας 6. Ανάλυση ROC πρόβλεψης ενεργοποίησης των βιοδεικτών νεκρόπτωσης πρώτου 24ώρου νοσηλείας στη ΜΕΘ ασθενών με σήψη ή σηπτικό shock.

Area Under the Curve							
Test	Result	Area	Std.	Asymptotic	Asymptotic	95% Confidence	
					Lower Bound	Upper Bound	
RIPK-3		0.66	0.078	0.044	0.513	0.818	
RIPK-1		0.80	0.060	0.000	0.691	0.925	
A20		0.70	0.075	0.012	0.558	0.853	
IL-18		0.71	0.071	0.010	0.571	0.849	
Caspase-8		0.32	0.076	0.029	0.173	0.470	
^a Under the nonparametric assumption							
^b Null hypothesis: true area = 0.5							



Εικόνα 17. Ανάλυση ROC πρόβλεψης ενεργοποίησης των βιοδεικτών νεκρόπτωσης πρώτου 24ώρου νοσηλείας στη ΜΕΘ ασθενών με σήψη ή σηπτικό shock.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο εύρημα της παρούσας έρευνας είναι η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών RIPK1, RIPK3, IL-1b, IL-18 και A20 σε ασθενείς με σήψη. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει την άμεση συσχέτιση των βιοδεικτών της νεκρόπτωσης με την σήψη. Βρέθηκε επίσης ότι η IL-1β είναι αυξημένη στη σήψη στα παιδιά, σε έμφραγμα ή μετεγχειρητικά σε ενήλικες υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι οι φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες, IL-1b και IL-18 διεγείρονται μέσα από το μονοπάτι της νεκρόπτωσης. Πρόσφατες εργαστηριακές έρευνες που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα για σήψη και αναφορές από κλινικά δείγματα προσδιορίζουν το ρόλο για άλλες διεργασίες κυτταρικού θανάτου εκτός από τους κλασικούς μηχανισμούς αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (58). Η νεκρόπτωση είναι μια τέτοια μορφή μη κλασικού προγραμματισμένου νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται μετά από τραυματισμό ή προσβολή ιστού λόγω μικροβιακής πρόκλησης όπως παρατηρείται στη σήψη (58). Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται η έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης σε ασθενείς με σήψη και επισημαίνεται η αναστολή της κασπάσης 8, μιας πρωτεΐνης η οποία διεγείρει την απόπτωση και αναστέλλει την νεκρόπτωση. Τέλος, σημαντική προβλεπτική ικανότητα για τη διάγνωση της σήψης ή του σηπτικού σοκ αποδεικνύεται πως εκφράζουν οι RIPK-1, IL-18 και A20 ενώ με τη διάρκεια νοσηλείας συσχετίζεται θετικά η RIPK-1 και αρνητικά η Caspase-8. Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα μας οδηγούν να συμπεράνουμε τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η νεκρόπτωση ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στην σήψη ενώ η περαιτέρω έρευνα του ενδέχεται να προσθέσει πιθανές θεραπευτικές παρεμβάσεις στην σήψη.

Πιο συγκεκριμένα τα πρωτεϊνικά μόρια RIPK1 και RIPK3 ήταν αυξημένα σε ασθενείς με σήψη, με την RIPK1 να ξεχωρίζει ως ο πιο ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της σήψης έναντι άλλων βιομορίων. Αντιθέτως, σύμφωνα με μελετητές, τα επίπεδα RIPK3 μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρώιμος προγνωστικός βιοδείκτης σε ασθενείς με σήψη, βοηθώντας ενδεχομένως στον εντοπισμό εκείνων που μπορεί να ωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπείες(59). Σύμφωνα με άλλους μελετητές , σε συγκρίσιμες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η σήψη και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας έχει αποδειχθεί ότι σημαντικοί ρυθμιστές του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου, όπως ο RIPK1, ο RIPK3 και η MLKL σχετίζονται με σοβαρή εξέλιξη της νόσου (60).

Στην έρευνα των Wang B, et., al., (2017) τα ευρήματα συμφωνούν με την δική μας μελέτη καθώς τα πρωτεϊνικά μόρια RIPK1 και RIPK3 βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με σήψη (59).

Επιπροσθέτως, σε παρόμοιες μελέτες παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα RIPK3 στα κύτταρα με πυρήνα περιφερικού αίματος σηπτικών ασθενών (58). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες RIPK3 και RIPK1 στην δική μας έρευνα βρέθηκαν επίσης αυξημένες σε ασθενείς με SIRS (τραύμα). Αντιθέτως παρόμοια μελέτη υποστηρίζει ότι η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από το σύμπλεγμα RIPK1-RIPK3 συμβάλλει στη θνησιμότητα κατά τη διάρκεια SIRS (61). Μία ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια απέδειξε την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών της νεκρόπτωσης RIPK1-RIPK3 στον καρδιακό ιστό τρωκτικών μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (62), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της δική μας μελέτης καθώς τα εξωκυττάρια RIPK1 και RIPK3 καταγράφηκαν χωρίς διέγερση σε ασθενείς με έμφραγμα ή καρδιοπάθεια. Φαίνεται πως η διέγερση σε κυτταρικό επίπεδο δεν αντανακλάται άμεσα στην περιφερική έκφραση αυτών των πρωτεϊνών, αλλά σε ένα δεύτερο χρόνο. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν αναδείξει ότι τα υψηλότερα επίπεδα πλάσματος RIPK1 και RIPK3 σε ασθενείς με στεφανιαία αθηροσκληρωτική νόσο μπορεί να προβλέψουν ασταθή στηθάγχη και μπορεί να χρησιμεύσουν ως δείκτης για την έγκαιρη ανίχνευση της στεφανιαίας νόσου (63). Άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη υποστηρίζει ότι η RIPK3 προάγει την οξεία νεφρική βλάβη που προκαλείται από σήψη μέσω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, προσφέροντας μια νέα δυνατότητα θεραπευτικής παρέμβασης (64).

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου, που χαρακτηρίζεται από περιφερειακή ισχαιμία του μυοκαρδίου και υποξία, είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως (65). Προηγούμενα ευρήματα έδειξαν ότι σε σύγκριση με ποντίκια άγριου τύπου, τα επίπεδα RIPK1 και RIPK3 ήταν σημαντικά υψηλότερα στις καρδιές ισχαιμικών ποντικών(66). Στην δική μας μελέτη μόνο η RIPK1 σημείωσε στατιστική σημαντικότητα, ιδιαίτερα όμως σε ασθενείς με σήψη. Επιπλέον, τα επίπεδα RIPK3 σε ασθενείς με σοβαρή σήψη και σηπτικό σοκ κορυφώθηκαν στις 72 ώρες σύμφωνα με έρευνες άλλων μελετητών (59) ενώ στην παρούσα μελέτη η ενεργοποίηση των βιοδεικτών νεκρόπτωσης πρώτου 24ώρου προέβλεπαν την πιθανότητα της σήψης. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν περαιτέρω στοιχεία ότι η νεκρόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σήψης και υποδηλώνει ότι η εξαρτώμενη από το RIPK1/RIPK3 νεκρόπτωση μπορεί να είναι ένας πιθανός νέος στόχος θεραπείας στη σήψη.

Ενώ στην δική μας μελέτη η πρωτεΐνη MLKL δεν κατέγραψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ ενήλικων και παιδιατρικών ασθενών, σε άλλες έρευνες τα ενδοκυττάρια επίπεδα της MLKL ήταν σημαντικά αυξημένα σε σηπτικούς ασθενείς (58). Στην έρευνα αυτή επίσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA και δεν μελετήθηκε η ενδοκυττάρια έκφραση της MLKL με

την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry). Σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα είναι και η έρευνα των Vucur et., al., (2018) στην οποία τα επίπεδα ορού MLKL ασθενών σε κρίσιμη κατάσταση κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ ήταν παρόμοια σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (67). Αντίθετα, έρευνες σε ποντίκια με ανεπάρκεια MLKL στο πλαίσιο δερματικής λοίμωξης ή θετικής κατά Gram σήψης αποκάλυψαν ότι τα ποντίκια είχαν υψηλότερα βακτηριακά φορτία, αδυναμία περιορισμού της παραγωγής ιντερλευκίνης-1β και υπερβολική φλεγμονή (68).

Στην δική μας μελέτη αυξημένα επίπεδα IL-1b παρατηρήθηκαν σε ενήλικες ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε παιδιατρικούς ασθενείς με σήψη. Παρομοίως και σε άλλες μελέτες επισημαίνεται ότι τα παιδιά με σύνδρομο σήψης κατά την παραμονή τους στο νοσοκομείο είχαν υψηλότερα επίπεδα IL-1b (69), ενώ πολλά μέλη της οικογένειας της ιντερλευκίνης IL-1, και ιδιαίτερα η IL-1b, απελευθερώνονται στο έμφραγμα του μυοκαρδίου (70). Επίσης, τα αποτελέσματα μας είναι συνεπή με αυτά μίας προηγούμενης μελέτης στην οποία η έκφραση της ιντερλευκίνης-1β ήταν υψηλότερη σε 11 από τους 13 ενήλικες με σηπτικό σοκ (71). Η IL-18 στην έρευνα μας εντοπίστηκε αυξημένη σε σηπτικούς ασθενείς ενώ σε άλλες μελέτες βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα υποδηλώνοντας ότι κυκλοφορεί σε υγιείς ενήλικες και συμβάλλει στην ανθρώπινη συστηματική φλεγμονώδη απόκριση (72). Τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης-18 σε ασθενείς με σήψη μπορεί να υποδεικνύουν υψηλότερο κίνδυνο θανάτου και σηπτικού σοκ και μπορεί να συσχετίζονται με δυσμενή έκβαση σε σηπτικούς ασθενείς (73).

Οι κασπάσες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη σήψη, συμβάλλοντας στην καταστολή του ανοσοποιητικού και στην δυσλειτουργία των οργάνων έτσι ώστε η κατανόηση του ρόλου τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (25). Στην συγκεκριμένη έρευνα, καταγράφηκε μειωμένη έκφραση της κασπάσης 8, η οποία αναστέλλει την νεκρόπτωση. Αξιοσημείωτο είναι ότι και σε άλλες μελέτες δεν βρέθηκαν δεδομένα σχετικά με τις συγκεντρώσεις κασπάσης-8 στο αίμα κατά την παρακολούθηση της σήψης (74). Αντίθετα στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της κασπάσης-8 στον ορό τη στιγμή της διάγνωσης της σήψης και μετρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις κασπάσης-8 στο αίμα τη στιγμή της διάγνωσης της σήψης σε ασθενείς που δεν επιβίωσαν από ό,τι σε ασθενείς που επιβίωσαν (74). Επιπλέον στην έρευνα μας υπήρξε θετική συσχέτιση της RIPK1 και αρνητική της κασπάσης 8 με την διάρκεια νοσηλείας. Σε αντίθεση με άλλες έρευνες, τα αυξημένα επίπεδα της RIPK3 στο πλάσμα των ασθενών που εισάγονται στη ΜΕΘ σχετίζονται με ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα (75).

Η A20 διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αρνητική ρύθμιση της φλεγμονής και της ανοσίας μειώνοντας τα βασικά προφλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης (43). Πρέπει να αναφερθεί ότι στην παρούσα μελέτη η πρωτεΐνη A20 ήταν αυξημένη σε σηπτικούς ασθενείς. Παρόμοια, σε άλλες έρευνες, σχετίστηκε με σηπτικό σοκ σε ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε σοβαρή καρδιακή ή κοιλιακή χειρουργική επέμβαση (76).

Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες να προσδιοριστεί ο ρόλος της νεκρόπτωσης στην σήψη. Η προσπάθεια αυτή αναμένεται να διευρύνει τους ορίζοντες και να ανοίξει το δρόμο για μεγαλύτερες και στοχευμένες ερευνητικές προσπάθειες στη διερεύνηση και αποκρυπτογράφηση της σηπτικής παθοφυσιολογίας καθώς και των μηχανισμών της νεκρόπτωσης.

6. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην μελέτη μας υπήρξαν κάποιοι περιορισμοί οι οποίοι πρέπει να αναφερθούν.

Αρχικά η παρούσα μελέτη είναι μία προοπτική μονοκεντρική μελέτη και το δείγμα ασθενών και υγιών μαρτύρων της μελέτης τόσο των ενηλίκων αλλά ιδίως των παιδιατρικών ασθενών ήταν μικρό.

Πολλοί ενήλικες ασθενείς της ΜΕΘ λόγω συννοσηροτήτων και ιδίως κακοηθειών, συναντούν τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη και δεν συμπεριλήφθηκαν στο μελετώμενο δείγμα ασθενών. Επιπροσθέτως, μειωμένος ήταν ο αριθμός των ασθενών με σήψη ή σηπτικό σοκ καθώς τις περισσότερες φορές οι ασθενείς αυτοί αποκλείονταν από την μελέτη λόγω κακοηθειών και συννοσηροτήτων .

Ακόμα ένας περιορισμός της μελέτης υπήρξε ο σύντομος χρόνος συλλογής, ανάλυσης και επεξεργασίας των δεδομένων. Αυτό ίσως οφείλεται και στο περιορισμένο χρονικό πλαίσιο πραγματοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Οι παραπάνω περιορισμοί απαιτούν την διεξαγωγή στοχευμένων πειραμάτων σε πρωτεΐνες με μακροχρόνια παρακολούθηση και σε μεγάλο αριθμό ασθενών για τη διεύρυνση των οδών που μεσολαβούν στη σήψη.

7. ΜΕΛΛΟΝ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη δίνει τη δυνατότητα της συνεχούς έρευνας, καθώς εστιάζει στο πεδίο της σήψης το οποίο αποτελεί ένα διαχρονικό πεδίο μελέτης. Οι μηχανισμοί και τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την σήψη είναι ποικίλα και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μοναδικό πεδίο δράσης.

Σε πειραματικό επίπεδο, μπορούμε να μελετήσουμε εις βάθος τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μηχανισμό της νεκρόπτωσης με άλλες τεχνικές, εκτός από την τεχνική της ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), όπως είναι η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) ή η Real Time PCR. Με τις τεχνικές που προαναφέρθηκαν θα μπορέσουμε να καταμετρήσουμε και να αναλύσουμε την ενδοκυττάρια έκφραση των βιοδεικτών της νεκρόπτωσης.

Επιπροσθέτως σε μια εκτεταμένη πολυκεντρική πρόδρομη μελέτη θα μπορούσαν να γίνουν περισσότερες συσχετίσεις με σημαντικές παραμέτρους φλεγμονής και σήψης. Με αυτόν τον τρόπο θα υπήρχε διαφοροποίησή μεταξύ των φαινοτύπων ως προς την έκφραση των βιομορίων και τα αποτελέσματα θα ήταν πιο σαφή για την εκάστοτε υποομάδα.

Τέλος, τα αποτελέσματα από ένα ευρύτερο δείγμα ενήλικων και παιδιατρικών ασθενών, θα οδηγούσε στο να κατανοήσουμε καλύτερα τον μηχανισμό της νεκρόπτωσης σε κύριες ομάδες βαριάς νόσου και τραύματος και να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα για το πεδίο ενεργοποίησης των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη σήψη και τη σηπτική καταπληξία.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι οι μεσολαβητές της νεκρόπτωσης είναι ενεργοποιημένοι σε ασθενείς με σήψη. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές των RIPK1, RIPK3, IL-1b, IL-18 και A20 ήταν υψηλότερες σε ασθενείς με σήψη συγκριτικά με ομάδες ελέγχου. Ιδιαίτερα, ο διεγέρτης της νεκρόπτωσης RIPK1, μεταξύ άλλων βιομορίων νεκρόπτωσης, ξεχώρισε ως ο πιο ισχυρός προγνωστικός παράγοντας σήψης. Επίσης, τα αποτελέσματα κατέγραψαν την αναστολή της λειτουργίας της αποπτωτικής κασπάσης 8, η οποία διεγείρει την απόπτωση και αναστέλλει την νεκρόπτωση. Έτσι επιβεβαιώνεται ο ρόλος της κασπάσης 8 στον μηχανισμό της νεκρόπτωσης.

Με τη διάρκεια νοσηλείας συσχετίζεται θετικά η RIPK1 και αρνητικά η κασπάση 8, επισημαίνοντας για ακόμα μία φορά την αναστολή της και την ενεργοποίηση της νεκρόπτωσης. Όσον αφορά την έκφραση των ιντερλευκινών, η IL-1β ήταν επίσης αυξημένη σε παιδιατρικούς ασθενείς με σήψη, αλλά και σε ενήλικες με έμφραγμα ή μετεγχειρητικούς ασθενείς.

Τα ευρήματα τη μελέτης μας αποκαλύπτουν τους πολύπλοκους μηχανισμούς της νεκρόπτωσης στην παθοφυσιολογία της σήψης. Οι βιοδείκτες της νεκρόπτωσης αποδεικνύεται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην σήψη, η διαγνωστική και προγνωστική αξία των οποίων οφείλει να διερευνηθεί σε μοριακό επίπεδο.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Liu D, Huang SY, Sun JH, Zhang HC, Cai QL, Gao C, κ.ά. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. *Military Medical Research*. 9 Οκτώβριος 2022;9(1):56.
2. Jacobi J. The pathophysiology of sepsis-2021 update: Part 1, immunology and coagulopathy leading to endothelial injury. *Am J Health Syst Pharm*. 18 Φεβρουάριος 2022;79(5):329–37.
3. Giannini HM, Ginestra JC, Chivers C, Draugelis M, Hanish A, Schweickert WD, κ.ά. A Machine Learning Algorithm to Predict Severe Sepsis and Septic Shock: Development, Implementation and Impact on Clinical Practice. *Crit Care Med*. Νοέμβριος 2019;47(11):1485–92.
4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, κ.ά. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 Φεβρουάριος 2016;315(8):801–10.
5. Mathias B, Mira J, Larson SD. Pediatric Sepsis. *Curr Opin Pediatr*. Ιούνιος 2016;28(3):380–7.
6. Chakraborty RK, Burns B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. Στο: StatPearls [Διαδίκτυο]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [παρατίθεται 25 Ιούλιος 2023]. Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>
7. Ko BS, Choi SH, Shin TG, Kim K, Jo YH, Ryoo SM, κ.ά. Impact of 1-Hour Bundle Achievement in Septic Shock. *J Clin Med*. 2 Φεβρουάριος 2021;10(3):527.
8. Vincent JL. The Clinical Challenge of Sepsis Identification and Monitoring. *PLoS Med*. 17 Μάιος 2016;13(5):e1002022.
9. Srzić I, Nesek Adam V, Tunjić Pejak D. SEPSIS DEFINITION: WHAT'S NEW □ IN THE TREATMENT GUIDELINES. *Acta Clin Croat*. Ιούνιος 2022;61(Suppl 1):67–72.
10. Singer AJ, Ng J, Thode HC, Spiegel R, Weingart S. Quick SOFA Scores Predict Mortality in Adult Emergency Department Patients With and Without Suspected Infection. *Annals of Emergency Medicine*. 1 Απρίλιος 2017;69(4):475–9.
11. Chan JYH, Wong VKF, Wong J, Paterson RF, Lange D, Chew BH, κ.ά. Predictors of urosepsis in struvite stone patients after percutaneous nephrolithotomy. *Investig Clin Urol*. Μάρτιος 2021;62(2):201–9.
12. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care*. 27 Νοέμβριος 2019;23(1):374.
13. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, κ.ά. Surviving Sepsis Campaign International Guidelines for the Management of Septic Shock and Sepsis-

Associated Organ Dysfunction in Children. *Pediatric Critical Care Medicine*. Φεβρουάριος 2020;21(2):e52.

14. Matics TJ, Sanchez-Pinto LN. Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. *JAMA Pediatr*. Οκτώβριος 2017;171(10):e172352.
15. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, κ.ά. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. Φεβρουάριος 2013;41(2):580–637.
16. Levy MM, Pronovost PJ, Dellinger RP, Townsend S, Resar RK, Clemmer TP, κ.ά. Sepsis change bundles: converting guidelines into meaningful change in behavior and clinical outcome. *Crit Care Med*. Νοέμβριος 2004;32(11 Suppl):S595-597.
17. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med*. 1 Ιούνιος 2018;44(6):925–8.
18. Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:108.
19. Sun C, Han Y, Zhang R, Liu S, Wang J, Zhang Y, κ.ά. Regulated necrosis in COVID-19: A double-edged sword. *Front Immunol*. 25 Αύγουστος 2022;13:917141.
20. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*. 7 Ιούλιος 2018;392(10141):75–87.
21. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:165974.
22. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 30 Ιούνιος 2016;2:16045.
23. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. Μάιος 2021;18(5):1106–21.
24. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 18 Ιανουάριος 2019;39(1):BSR20180992.
25. Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death Dis*. 20 Νοέμβριος 2014;5(11):e1526.
26. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Μάρτιος 2008;9(3):231–41.
27. Seo J, Nam YW, Kim S, Oh DB, Song J. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Exp Mol Med*. 1 Ιούνιος 2021;53(6):1007–17.
28. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*. 25 Ιούλιος 2003;114(2):181–90.

29. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF- κ B Inducers Upregulate cFLIP, a Cycloheximide-Sensitive Inhibitor of Death Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 1 Ιούνιος 2001;21(12):3964–73.
30. O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A, Ng A, Massoumi R, Xavier R, κ.ά. CASPASE 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol*. 30 Οκτώβριος 2011;13(12):1437–42.
31. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 6 Ιούλιος 2018;15(1):199.
32. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, κ.ά. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*. Σεπτέμβριος 2019;44(3):771–86.
33. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. Φεβρουάριος 2009;7(2):99–109.
34. Murphy JM. The Killer Pseudokinase Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Αύγουστος 2020;12(8):a036376.
35. Moquin D, Chan FKM. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci*. Αύγουστος 2010;35(8):434–41.
36. Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev*. Νοέμβριος 2011;244(1):9–28.
37. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 16 Δεκέμβριος 2008;133(4):693–703.
38. Cho Y, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, κ.ά. Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*. 12 Ιούνιος 2009;137(6):1112–23.
39. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 6 Δεκέμβριος 2002;298(5600):1912–34.
40. Zhan C, Huang M, Yang X, Hou J. MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics*. 2021;11(10):4759–69.
41. Faergeman SL, Evans H, Attfield KE, Desel C, Kuttikkatte SB, Sommerlund M, κ.ά. A novel neurodegenerative spectrum disorder in patients with MLKL deficiency. *Cell Death Dis*. 1 Μάιος 2020;11(5):303.
42. Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*. Ιανουάριος 2014;35(1):22–31.
43. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical Pharmacology*. 15 Δεκέμβριος 2010;80(12):2009–20.
44. Orzalli MH, Kagan JC. Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends Cell Biol*. Νοέμβριος 2017;27(11):800–9.

45. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, κ.ά. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 5 Αύγουστος 2004;430(7000):694–9.
46. Coornaert B, Carpentier I, Beyaert R. A20: Central Gatekeeper in Inflammation and Immunity. *J Biol Chem*. 27 Μάρτιος 2009;284(13):8217–21.
47. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, κ.ά. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*. Οκτώβριος 2004;5(10):1052–60.
48. Martens A, van Loo G. A20 at the Crossroads of Cell Death, Inflammation, and Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Ιανουάριος 2020;12(1):a036418.
49. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. *Cell Mol Life Sci*. Ιούνιος 2019;76(11):2031–42.
50. Hu H, Pan H, Li R, He K, Zhang H, Liu L. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 14 Φεβρουάριος 2022;13:802228.
51. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ*. Ιανουάριος 2019;26(1):99–114.
52. Yang X, Lu H, Xie H, Zhang B, Nie T, Fan C, κ.ά. Potent and Selective RIPK1 Inhibitors Targeting Dual-Pockets for the Treatment of Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 26 Ιανουάριος 2022;61(5):e202114922.
53. Tu LN, Hsieh L, Kajimoto M, Charette K, Kibiryeveva N, Forero A, κ.ά. Shear stress associated with cardiopulmonary bypass induces expression of inflammatory cytokines and necroptosis in monocytes. *JCI Insight [Διαδίκτυο]*. 21 Απρίλιος 2021 [παρατίθεται 10 Αύγουστος 2023];6(1). Διαθέσιμο στο: <https://insight.jci.org/articles/view/141341>
54. Duan YW, Chen SX, Li QY, Zang Y. Neuroimmune Mechanisms Underlying Neuropathic Pain: The Potential Role of TNF- α -Necroptosis Pathway. *Int J Mol Sci*. 28 Ιούνιος 2022;23(13):7191.
55. Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R, Albert MC, Schorn F, Werthenbach JP, κ.ά. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*. Νοέμβριος 2019;575(7784):683–7.
56. Schwarzer R, Jiao H, Wachsmuth L, Tresch A, Pasparakis M. FADD and Caspase-8 Regulate Gut Homeostasis and Inflammation by Controlling MLKL- and GSDMD-Mediated Death of Intestinal Epithelial Cells. *Immunity*. 16 Ιούνιος 2020;52(6):978-993.e6.
57. Zhou L, Huang X, Niesvizky R, Pu Z, Xu G. Caspase-8 Regulates the Antimyeloma Activity of Bortezomib and Lenalidomide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 Δεκέμβριος 2021;379(3):303–9.
58. Mallarpu CS, Ponnana M, Prasad S, Singarapu M, Kim J, Haririparsa N, κ.ά. Distinct cell death markers identified in critical care patient survivors diagnosed with sepsis. *Immunology Letters*. 1 Μάρτιος 2021;231:1–10.

59. Wang B, Li J, Gao HM, Xing YH, Lin Z, Li HJ, κ.ά. Necroptosis regulated proteins expression is an early prognostic biomarker in patient with sepsis: a prospective observational study. *Oncotarget*. 10 Οκτώβριος 2017;8(48):84066.
60. Shashaty MGS, Reilly JP, Faust HE, Forker CM, Ittner CAG, Zhang PX, κ.ά. Plasma receptor interacting protein kinase-3 levels are associated with acute respiratory distress syndrome in sepsis and trauma: a cohort study. *Crit Care*. 28 Ιούνιος 2019;23(1):235.
61. Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T, κ.ά. RIP Kinase-Dependent Necrosis Drives Lethal Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Immunity*. 23 Δεκέμβριος 2011;35(6):908–18.
62. Erdogmus Ozgen Z, Erdinc M, Kelle İ, Erdinc L, Nergiz Y. Protective effects of necrostatin-1 on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat heart. *Hum Exp Toxicol*. 2022;41:9603271211066066.
63. Xiao Z, Zhang Y, Kuang Y, Ma Q. Changes in plasma levels of RIPK1, RIPK3, and MLKL in patients with coronary atherosclerotic heart disease and its clinical predictive value. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*. 2020;45 9:1096–103.
64. Sureshababu A, Patino E, Ma KC, Laursen K, Finkelsztein EJ, Akchurin O, κ.ά. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction. *JCI Insight [Διαδίκτυο]*. 7 Ιούνιος 2018 [παρατίθεται 3 Φεβρουάριος 2024];3(11). Διαθέσιμο στο: <https://insight.jci.org/articles/view/98411>
65. McManus DD, Piacentine SM, Lessard D, Gore JM, Yarzebski J, Spencer FA, κ.ά. Thirty-year (1975 to 2005) trends in the incidence rates, clinical features, treatment practices, and short-term outcomes of patients <55 years of age hospitalized with an initial acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 15 Αύγουστος 2011;108(4):477–82.
66. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M, κ.ά. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 15 Ιούλιος 2014;103(2):206–16.
67. Vucur M, Roderburg C, Kaiser L, Schneider AT, Roy S, Loosen SH, κ.ά. Elevated Serum Levels of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Predict Survival of Patients during Intensive Care Unit Treatment. *Dis Markers*. 11 Φεβρουάριος 2018;2018:1983421.
68. Kitur K, Wachtel S, Brown A, Wickersham M, Paulino F, Peñaloza HF, κ.ά. Necroptosis Promotes Staphylococcus aureus Clearance by Inhibiting Excessive Inflammatory Signaling. *Cell Rep*. 23 Αύγουστος 2016;16(8):2219–30.
69. Samson LM, Allen UD, Creery WD, Diaz-Mitoma F, Singh RN. Elevated interleukin-1 receptor antagonist levels in pediatric sepsis syndrome. *J Pediatr*. Οκτώβριος 1997;131(4):587–91.
70. Frangogiannis NG. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discoveries (Craiova)*. 3(1):e41.
71. Gårdlund B, Sjölin J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis*. Ιούλιος 1995;172(1):296–301.

72. Grobmyer SR, Lin E, Lowry SF, Rivadeneira DE, Potter S, Barie PS, κ.ά. Elevation of IL-18 in Human Sepsis. *J Clin Immunol*. 1 Μάιος 2000;20(3):212–5.
73. Oberholzer A, Steckholzer U, Kurimoto M, Trentz O, Ertel W. INTERLEUKIN-18 PLASMA LEVELS ARE INCREASED IN PATIENTS WITH SEPSIS COMPARED TO SEVERELY INJURED PATIENTS. *Shock*. Δεκέμβριος 2001;16(6):411.
74. Lorente L, Martín MM, Ortiz-López R, González-Rivero AF, Villacampa-Jiménez JJ, Jiménez A, κ.ά. Mortality prediction of septic patients by blood caspase-8 levels. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Απρίλιος 2022;102(4):115639.
75. Ma KC, Schenck EJ, Siempos II, Cloonan SM, Finkelzstein EJ, Pabon MA, κ.ά. Circulating RIPK3 levels are associated with mortality and organ failure during critical illness. *JCI Insight*. 3(13):e99692.
76. Jiménez-Sousa MÁ, Fadrique A, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Lorenzo-López M, Gómez-Sánchez E, κ.ά. TNFAIP3, TNIP1, and MyD88 Polymorphisms Predict Septic-Shock-Related Death in Patients Who Underwent Major Surgery. *Journal of Clinical Medicine*. Μάρτιος 2019;8(3):283.

10.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Α. Έντυπο κωδικοποιημένης καταγραφής

Αύξων Αριθμός μελέτης :

Κωδικός Περιστατικού :

Κωδικός Ομάδας: 1=σήψη, 2=SIRS (τραύμα - χειρουργείο) ,3=Καρδιοπαθής , 4=υγιής

Κατηγορία Ασθενή : Ενήλικας (1) , Παιδί (2)

Κλινική Νοσηλείας : ΜΕΘ (1) , ΜΕΘ Παίδων (2), Μ.Ε.Π.Κ (3)

Φύλο: Άρρεν (1) , Θήλυ (2)

Συννοσηρότητες : ναι (1) ,όχι (2)

Ανοσοκαταστολή : ναι 1 , όχι 2

Χρόνια Φαρμακευτική Αγωγή : λαμβάνει (1), δεν λαμβάνει (2)

Ηλικία (έτη) :

Βάρος (Kg):

Ύψος (cm) :

BMI:

BMI : Υποθρεψία=1, Υγιής=2, Υπέρβαρος=3, Παχυσαρκία=4

Έκβαση: Επιβίωση(1) , Θάνατος (2)

Διάρκεια νοσηλείας (ημέρες) : αυτόματος υπολογισμός excel

Μηχανικός Αερισμός: ναι (1) , όχι (2)

Διάρκεια Μηχανικού Αερισμού (ημέρες) :

Αγγειοδραστικά : Ναι (1) , Όχι: (2)

Διάρκεια χορήγησης αγγειοδραστικών (ημέρες):

SIRS score: ≥ 2 (1), < 2 (2)

qSOFA score: ≥ 2 (1), < 2 (2)

SOFA score: ≥ 2 (1), < 2 (2)

APACHE II score:

PRISM score:

PELOD score:

Διάγνωση εξόδου = γράψε ολογράφως με μια λέξη

Διάγνωση εξόδου κωδικοποιημένη πχ 1= πνευμονία, 2=ΚΕΚ, κλπ. Θα τις ομαδοποιήσουμε με κωδικούς μετά τις πρώτες εγγραφές

Θ (°C):

PaO2:
FiO2:
PaO2/FiO2:
pH:
pCO2:
HCO3:
BE :
WBC:
hs Tnl (0-0,04 ng/mL):
CRP (mg/dL) :
PCT (ng/mL):
GLU (mg/dL):
Urea (mg/dl):
Creatinine (mg/dl):
SGOT (u/L):
SGPT (u/L):
Bilirubin (mg/dl):
Urine culture: positive (1), negative (2)
lactate:
Blood culture: positive (1), negative (2)
RIPK1:
RIPK3:
MLKL:
A20:
IL-1b:
IL-18:
Caspase-8: