ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΕΙΑΣ, ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΣΟΒΑΡΗΣ ΣΗΨΗΣ"

ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΣΠΑΝΑΚΗ ΜΠΑΡΜΠΟΥΝΑΚΗ
Παιδίατρος - Νεογνολόγος - Εντατικολόγος Παίδων
MD, Msc

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Μπριασούλης, Καθηγητής, Εντατικής Θεραπείας Παίδων (επιβλέπων)
Ελένη Δημητρίου, Αν Καθηγήτρια Παιδιατρικής (με έμφαση στην Εργαστηριακή Έρευνα)
Ευμορφία Κονδύλη, Αν. Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Μπριασούλης, Καθηγητής, Εντατικής Θεραπείας Παίδων (επιβλέπων)
Ελένη Δημητρίου, Αν Καθηγήτρια Παιδιατρικής (με έμφαση στην Εργαστηριακή Έρευνα)
Ευμορφία Κονδύλη, Αν. Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας
Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής
Δημήτρης Γεωργόπουλος, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας
Αχιλλέας Γκίκας, Καθηγητής Παθολογίας
Μαρία Βενυχάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

...αφιερώνεται στα παιδιά μου...

και στα παιδιά του κόσμου όλου.....

Mitochondria

"A human being is a whole world to a mitochondrion, just the way our planet is to us. But we're much more dependent on our mitochondria than the earth is on us. The earth could get along perfectly well without people, but if anything happened to our mitochondria, we'd die." —A Wind in the Door by Madeleine L'Engle (1973)

…αντί προλόγου….

…….είναι αλήθεια ότι κάθε φορά, που στη μονάδα - ευτυχώς σπάνια - 'καταλήγει' ένα παιδί από σοβαρή νόσο, από σήψη ή εξαιτίας ενός σοβαρού τραυματισμού - μια συγκλονιστική στιγμή για το ίδιο το παιδί, για την οικογένειά του αλλά και για όλους όσους δουλεύουμε στο χώρο μιας μονάδας - αναρωτιόμαστε τι δεν πήγε καλά, ενώ εφαρμόσαμε τα ίδια, όπως σ' όλα τα παιδιά, πρωτόκολλα ……

Με τούτη δω την εργασία απώτερη επιθυμία όλης της ομάδας είναι να προσθέσουμε ότι δεδομένα προκύψουν, προκειμένου να συμβάλλουν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας, στην πρώιμη ανίχνευση κακής πρόγνωσης περιπτώσεων περιστατικών, την ταχύτερη, καλύτερη ή ίσως διαφοροποιημένη από τους υπόλοιπους ασθενείς αντιμετώπιση, με απώτερο σκοπό να χαθούν όσο το δυνατόν λιγότεροι ασθενείς ….. ενήλικες ή παιδιά.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη-από ότι γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία- που μελετά τις αλλαγές που επιφέρει μια σοβαρή νόσος διαχρονικά κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε ημερών εμφάνισής της , πιθανά και καθοριστικές για την εξέλιξή της, και μάλιστα παράλληλα σε ενήλικες και παιδιά …..

Η ερευνητική αυτή εργασία δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί …

…χωρίς την έμπνευση, την οργάνωση, την επιμονή, την εργατικότητα και την αποτελεσματικότητα του διευθυντή μου, Καθηγητή κ. Γιώργου Μπριασούλη,

…χωρίς τη μεθοδικότητα, τη σχολαστικότητα και την άοκνη υποστήριξη της υπεύθυνης Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ Ελένης Δημητρίου στα Εργαστήρια Υγείας του Παιδιού,

…χωρίς την παράλληλη εργασία της εξαιρετικής φίλης και συναδέλφου παιδιάτρου-εντατικολόγου στη Μονάδα Παίδων Έφης Ταβλαδάκη, που παράλληλα δουλεύαμε τόσο καιρό τις διατριβές μας,

….χωρίς τη βοήθεια και υποστήριξη από την κ Μαρία Βενυχάκη Επίκουρη Καθηγήτρια, υπεύθυνη του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης όπου εκπονήθηκε εργαστηριακό μέρος της διατριβής….

…χωρίς την ξεχωριστή συμπαράσταση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Εντατικής κ Ευμορφίας Κονδύλη,

…..χωρίς τους αξιότιμους καθηγητές κ Ε. Γαλανάκη, Δ. Γεωργόπουλο και Α. Γκίκα, που δέχτηκαν να μου κάνουν την τιμή να συμμετέχουν στην επταμελή μου επιτροπή…….

…. θέλω να ευχαριστήσω όσους από το προσωπικό και των δυο μονάδων παίδων και ενηλίκων, με βοήθησαν μέσα στο φόρτο δουλειάς, στη συλλογή δειγμάτων αίματος της μελέτης και κυρίως το συνάδελφο Παιδοχειρουργό Βαγγέλη Μπλευράκη, που με μεγάλη προθυμία βοήθησε να δημιουργηθεί η ομάδα-control, με τη λήψη αίματος από φυσιολογικά παιδιά που προσέρχονταν στην Παιδοχειρουργική Κλινική για προ-εγχειρητικό έλεγχο, τη Διευθύντρια της Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου μας κ Φουντούλη και όλους όσους έδωσαν αίμα για τη μελέτη μας εθελοντικά…..

…ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Χουλιέτα Πέρεζ- Χαιρέτη, μεξικάνικη - πληθωρική παρουσία στη γραμματεία της μονάδας μας, για την πάντα πρόθυμη βοήθεια και υποστήριξη…

…ευχαριστώ τους γονείς των παιδιών που έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για να χρησιμοποιηθεί δείγμα αίματος από τα δικά τους παιδιά, για το καλό των παιδιών όλων…..

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έχει ανακοινωθεί σε διεθνή συνέδρια ή/και έχει δημοσιευτεί σε διεθνή και ελληνικά περιοδικά.

Μακάρι τούτη η προσπάθεια να προσθέσει έστω κι ένα πολύτιμο κομματάκι στο παζλ της κατανόησης, αλλά κυρίως της αντιμετώπισης της σοβαρής νόσου, για να σωθούν όσοι περισσότερο γίνεται…

Δεν θα μπορούσα τελειώνοντας να μην ευχαριστούσα τα μέλη της οικογένειάς μου που ανέχονται τις τόσες ώρες απουσίας μου…..

Πίνακας περιεχομένων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ **9**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **10**

ABSTRACT **12**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **14**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **14**

ΣΗΨΗ **14**
ΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ 14
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 14
ΟΡΙΣΜΟΙ 17
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ 31
ΤΡΑΥΜΑ **51**
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ SIRS ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΑΥΜΑ 51

ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΝΟΣΟ **59**

ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΣΟΒΑΡΗΣ ΝΟΣΟΥ **63**

ΕΚΒΑΣΗ ΣΟΒΑΡΗΣ ΝΟΣΟΥ **69**

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **74**

ΥΠΟΘΕΣΗ-ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ 74
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 75
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 76
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 88
ΣΥΖΗΤΗΣΗ **112**

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **117**

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ **117**

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ…ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ…. **118**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **120**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ **129**

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Τόπος Γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης
Οικογενειακή Κατάσταση : Έγγαμη με 2 παιδιά
Όνομα συζύγου: Εμμανουήλ Μπαρμπουνάκης
Διεύθυνση Κατοικίας: Κυρά της Ρω 10, 71307, Ηράκλειο Κρήτης
Τηλέφωνο: 6044062133 / 2810392618 /2810322843
Fax: 2810-392652
e-mail: spanakam@yahoo.gr

Σπουδές - Τίτλοι

1984:	3ο Γενικό Λύκειο Ηρακλείου (Απολυτήριο με βαθμό 'Άριστα')
1984:	Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης (2η -Υποτροφία από το ΙΚΥ)
1990:	Πτυχίο Ιατρικής Σχολής (Βαθμός Αποφοίτησης «Λίαν καλώς»)
1990-1992:	Αγροτική Ιατρός- Π.Ι. Αγ. Θωμά, Κ.Υ. Αγ. Βαρβάρας, Ν. Ηρακλείου
1997:	Τίτλος Ειδικότητας Παιδιατρικής
1998:	Ιδιώτης παιδίατρος – Ηράκλειο (~6 μήνες)
1998-2001 :	Εξειδίκευση Νεογνολογίας
2001:	Τίτλος Εξειδίκευσης Νεογνολογίας (Επίδοση εξετάσεων 'Λιαν Καλώς')
2001:	Επιμελήτρια Β, ΜΕΘΠαίδων, ΠαΓΝΗ
2004:	Τίτλος Εξειδίκευσης Εντατικολογίας Ενηλίκων/Παίδων (με εξετάσεις)
2004 :	Επιμελήτρια Α, ΜΕΘΠαίδων, ΠαΓΝΗ
2010	Master of Science, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη 'Δημόσια Υγεία- Διοίκηση Υπηρεσιών Υγείας', Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης (βαθμός 'Λίαν Καλώς (8.2))
2012 – σήμερα	Δ/τρια ΕΣΥ, ΜΕΘΠαίδων, ΠαΓΝΗ

Πεπραγμένα

Ανακοινώσεων σε Ελληνικά και Διεθνή Συνέδρια
Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά και Ξενόγλωσσα περιοδικά
Σεμινάρια (σαν εκπαιδεύτρια/Instructor APLS HELLAS)
Διαλέξεις / Ομιλίες
Μαθήματα φοιτητών Ιατρικής και Ειδικευόμενων Ιατρών
Ερευνητικές εργασίες
Συγγραφικό έργο (συγγραφή κεφαλαίων, μεταφράσεις κτλ)
Συμμετοχή σε Εισηγήσεις/Κρίσεις/Επιτροπές
Κλινικό έργο
Οργάνωση συνεδρίων (πρώην Πρόεδρος της Παγκρήτιας Παιδιατρικής Εταιρείας- για 4 έτη)

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACCP : American College of Chest Physicians
APACHE II : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
DAMP : Danger-associated molecular pattern molecules
eHSP : extracellular heat shock protein
EE: Energy Expenditure
HSP : Heat shock protein
ICU : Intensive Care Unit
IL : Interleukin
IFN : interferon
LOS : Length of stay
LODS : Logistic Organ Dysfunction System score
LPS : Lipopolysaccharide
mHSP : monocyte-HSP
MFI : Mean Fluorescence Intensity
MODS : Multi-Organ Disease Syndrome
nHSP : neutrophil-HSP
NK : Natural killer cell
NK-kB : Nuclear Factor-kB
NO : Nitric Oxide
PAMPs : Pathogen-associated molecular pattern molecules
PAF : Platelet Activating Factor
PRRs : Pattern-recognition receptors
qSOFA : Quick Sequential Organ Failure Assessment
ROS : reactive oxygen species
SAPS : Simplified Acute Physiology Score
SCCM : Society of Critical Care Medicine
SIRS : Systematic Inflammatory Response Syndrome
SOFA : Sequential Organ Failure Assessment
SS : Severe Sepsis
SSC : Surviving Sepsis Campaign
TF : Tissue Factor
TLR : Toll-like receptor
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha
Treg : regulatory- T-cells
WHO : World Health Organization

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το κυτταρικό στρες από σοβαρή σήψη (severe sepsis, SS) ή σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) εκδηλώνεται με οξείες φλεγμονώδεις, ορμονικές, ανοσολογικές και μεταβολικές διαταραχές. Η συσχέτισή τους με πιθανή δυσλειτουργία μιτοχονδρίων δεν έχει επαρκώς μελετηθεί.

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση των διαχρονικών μεταβολών φλεγμονώδους-ορμονικής αντίδρασης, ενδογενούς-ανοσίας, βιοενέργειας και μεταβολισμού σε ασθενείς, ενήλικες και παιδιά, με σοβαρή σήψη (SS) και η σύγκριση με αντίστοιχες ομάδες ασθενών με SIRS και υγιών (H), ενηλίκων και παιδιών.

Υλικά/Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 68 παιδιά (SS/18, SIRS/23, H/27) και 79 ενήλικες (SS/23, SIRS/23, H/33) διαχρονικά, την 1, 3η και 5η ημέρα νοσηλείας. Υπολογίστηκαν ο δείκτης μάζας σώματος (Body mass index (BMI) z-scores) και τα scores βαρύτητας νόσου (PeLOD, APACHE, TISS, SOFA). Μετρήθηκαν η καρδιακή συσταλτικότητα (EF, SF), η τροπονίνη (Tn), το γαλακτικό οξύ, η κατανάλωση ενέργειας (Energy expenditure, EE) με Gas Module E-COVX, το ATP στα λευκά αιμοσφαίρια με δοκιμασία λουσιφεράσης (luciferase luminescent assay), τα επίπεδα γλουταμίνης και NO_2/NO_3 με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), τα προϊόντα υπεροξείδωσης λιπιδίων (TBARS) με χρωματομετρική δοκιμασία, η ρεζιστίνη, η αντιπονεκτίνη ορού και οι εξωκυττάριες Heat Shock Proteins (HSP) με την ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay), και οι ενδοκυττάριες HSP72, HSP90α με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry).

Αποτελέσματα: Διαχρονικά τόσο σε ενήλικες (ICU) όσο και σε παιδιά (PICU) οι τιμές ρεζιστίνης, αντιπονεκτίνης, εξωκυττάριας HPS72 και 90α παρουσιάζαν σταθερό πρότυπο διέγερσης σε όλη την οξεία φάση των 5 ημέρων. Στη χρονική αυτή περίοδο, οι παράμετροι μεταβολισμού VO_2, VCO_2, EE παρουσίασαν σταθερό υπομεταβολικό προφίλ, ίδιο σε ενήλικες και παιδιά. Η αυξημένη έκφραση των NO_3, NO_2, TBARS και αντιπονεκτίνης στη σήψη παρουσίασαν μια πιο ασταθή εικόνα όσον αφορά τη διαχρονική τους έκφραση ανά ηλικιακή ομάδα.

Η βιοενέργεια των μιτοχονδρίων ήταν διαχρονικά μειωμένη σε ενήλικες κα παιδιά που δεν επιβίωσαν σε σχέση με εκείνους που επιβίωσαν, και συνοδεύονταν από σημαντικά μειωμένο μεταβολισμό και υπομεταβολικά πρότυπα την $3^η$ και $5^η$ ημέρα ($p<0.05$).

Οι ασθενείς που επιβίωσαν παρουσίαζαν σημαντική διαφοροποίηση των αρχικών τιμών BVR, γαλακτικού, EE, VO_2, VCO_2 και μεταβολικού προφιλ σε σύγκριση με ασθενείς που πέθαναν, οι οποίοι έδειξαν αδυναμία ανάκαμψης του υπομεταβολισμού ή της αντιοξειδωτικής κατάστασης την $5^η$ ημέρα.

Συμπέρασμα: Η SS χαρακτηρίζεται διαχρονικά, από ισχυρότερη ενδοκυττάρια καταστολή μεταβολισμού, μείωση κατανάλωσης ενέργειας, μείωση των ATP, HPS72, HSP90α, αλβουμίνης, γλουταμίνης και εξωκυττάρια αύξηση φλεγμονωδών ορμονών, ρεζιστίνης και αντιπονεκτίνης και πρωτεϊνών έμφυτης ανοσίας (HSP72). Μια πρώιμη κατάσταση

υπομεταβολισμού, με καταστολή βιοενέργειας και ενδογενούς ανοσίας, η οποία και παραμένει διαχρονικά μαζί με συνεχιζόμενη κατάσταση φλεγμονής, με διαχρονικά αυξημένες μεταβολικές ορμόνες και πρωτείνες eHSP72/HSP90*α*, φαίνεται να ξεχωρίζει τη σήψη από το SIRS, και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου.

Λέξεις κλειδιά: σήψη, SIRS, βιοενέργεια, HSP, μιτοχόνδρια, μεταβολισμός, θερμιδομετρία, αμινοξέα, οξείδιο του αζώτου, ATP, ρεζιστίνη, αντιπονεκτίνη, τραύμα

ABSTRACT

Background: Cell stress induced by severe sepsis (SS) or systemic inflammatory response syndrome (SIRS) presents with acute inflammatory, hormonal, immune and metabolic derangements. Their relation with mitochondrial dysfunction has not been adequately studied.

Objectives: The purpose of the study was to evaluate the longitudinal changes of inflammatory-hormonal response, innate-immunity, bioenergetics and metabolism in critically ill patients, adults and children with severe sepsis and to compare them with patients groups with SIRS and healthy groups (H), adults and children.

Materials / Methods: We studied 68 children (SS / 18, SIRS / 23, H / 27) and 79 adults (SS / 23, SIRS / 23, H / 33) on 1, 3 and 5 day of hospitalization. Body Mass Index (BMI) z-scores and disease severity scores (PeLOD, APACHE, TISS, SOFA) were calculated. Cardiac contractility (EF, SF), troponin (Tn) and lactate were measured, as well as energy consumption (EE) with Gas Module E-COVX, ATP in white blood cells with luciferase luminescent assay, glutamine and NO2 / NO3 levels with high-pressure liquid chromatography (HPLC), lipid peroxidation products (TBARS) by colorimetric assay, resistin, serum antiponectin and extracellular Heat Shock Proteins (HSP) HSP90α, serum HSP72, adiponectin and resistin by ELISA.Intracellular Heat Shock Proteins (HSP72, HSP90α) expressions by flow cytometry.

Results: Longitudinal both in adults (ICU) and children (PICU), resistin, dexponcepin, extracellular HPS72 and 90a values showed a sustained pattern of stimulation throughout the acute 5-day phase. In this period, VO2, VCO2, EE showed a hypometabolic pattern similar in children and adults.The increased expression of NO3, NO2, TBARS and adiponectin in sepsis showed a diffuse pattern relating to their age-related expression per age group. Mitochondrial bioenergy was longitudinal reduced in adults and children who did not survive compared to survivors, and was accompanied by significantly reduced metabolism and hypometabolic patterns on days 3 and 5 ($p < 0.05$). Surviving patients had a significant variation in baseline BVR, lactate, EU, VO2, VCO2 and metabolic profile compared to patients who died, who showed inability to recover hypometabolism or antioxidant status on day 5.

Conclusion: SS is characterized from longitudinally stronger intracellular repression of ATP, HPS72, HSP90α, metabolism (EE, albumin, glutamine) and extracellular induction of inflammatory hormones (resistin) and innate immunity proteins signaling acute stress danger (HSP72) compared to SIRS. A pattern of early longitudinal induction of metabolic-hormones and eHSP72/HSP90*α*, repression of bioenergetics and innate immunity, hypo-metabolism, and amino-acid kinetics changes discriminate sepsis from SIRS; malnutrition,

hypometabolism, and persistently increased resistin and adiponectin are associated with poor outcome.

KEY WORDS: sepsis, SIRS, bioenergy, HSP, resistin, metabolism, calorimetry; amino acids; nitric oxide; heat shock proteins; ATP; resistin; adiponectin; sepsis; trauma

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΗΨΗ

ΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ

Ετυμολογία [ ]

σήψη < *αρχαία ελληνική* σῆψις

1. η οργανική αποσύνθεση
2. (*μεταφορικά*) η διαφθορά ανθρώπων και η κατάρρευση αξιών

πτώση	ενικός	πληθυντικός
ονομαστική	σήψη	Σήψεις
γενική	σήψης & σήψεως	Σήψεων
αιτιατική	σήψη	Σήψεις
κλητική	σήψη	Σήψεις

Η λέξη 'σήψη' προέρχεται από τη λέξη "*σηψις*," η οποία στην Ελληνική γλώσσα σημαίνει 'αποσύνθεση'. Αναφέρεται ήδη από τα έπη του Ομήρου, σχεδόν 2700 χρόνια πριν (1).

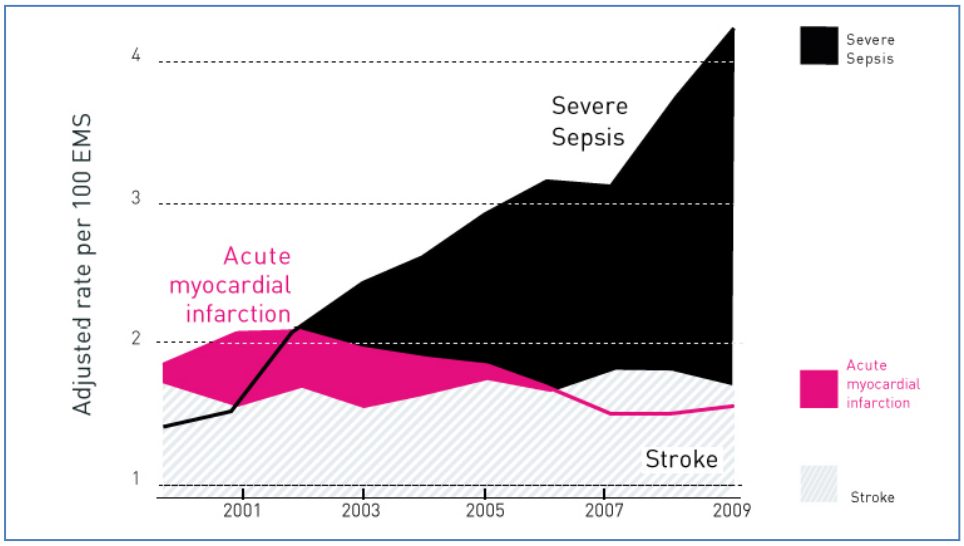
Η Σήψη ή η εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών στον οργανισμό, προκαλεί μια συστηματική φλεγμονώδη απάντηση (2). Ανισορροπία στη φλεγμονώδη αυτή διαδικασία, μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη των ιστών, ανεπάρκεια οργάνων, σήψη (sepsis, S), σηπτική καταπληξία και τελικά θάνατο. Μόνο σχετικά πρόσφατα, μελέτες έχουν οδηγήσει στην ανάλυση των κλινικών ευρημάτων στους σηπτικούς ασθενείς, στην κατανόηση της υποκείμενης παθοφυσιολογίας και στη διαφοροποίηση ορισμών, χωρίς όμως η όλη διαδικασία να έχει πλήρως διευκρινιστεί.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η σήψη αποτελεί παγκοσμίως μείζον ιατρικό πρόβλημα, προσβάλλοντας εκατομμύρια ανθρώπων κάθε χρόνο(3). Παρά την σημαντική εξέλιξη στην εντατική αντιμετώπιση και θεραπεία της τα τελευταία χρόνια, η σηπτική καταπληξία εξακολουθεί να σχετίζεται με υψηλή θνητότητα (4) γι αυτό και παραμένει καυτό θέμα έρευνας, αναζήτησης και κατανόησης των ακριβών μηχανισμών παθοφυσιολογίας της. Κάθε χρόνο, μια μέρα του Σεπτεμβρίου είναι αφιερωμένη σ' αυτό το σύνδρομο.

World Sepsis Day: September 13 2018

Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν περίπου 30-50 θανάτους λόγω σήψης ανά 100.000 άτομα το χρόνο, γεγονός που τοποθετεί τη σήψη στα 10 συχνότερα αίτια θανάτου, ανεξάρτητα από την ηλικία του ασθενούς, το χρόνο νοσηλείας και τις ιατρικές ειδικοτήτες που εμπλέκονται (6). Ο συνολικός αριθμός ασθενών που χάνει τη ζωή του παγκοσμίως από σήψη ξεπερνά κατά πολύ εκείνο από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σύμφωνα με μελέτη, Am J Respir Crit Care Med 2012, που φαινεται παρακατω.



Am J Respir Crit Care Med 2012, 186(12):1264-1271

Η μελέτη ICON (International Intensive Care Over) έδωσε παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα από 10.069 ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ICU) και επιβεβαίωσε ότι 2.973 (29.5%) των ασθενών είχαν σήψη κατά την είσοδο ή κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στη ΜΕΘ. Η θνητότητα από σήψη στη ΜΕΘ ήταν 25,8% και η νοσοκομειακή θνητότητα ήταν 35,3%, ποσοστό σημαντικά υψηλότερα από εκείνη του γενικού πληθυσμού της ΜΕΘ (θνησιμότητα στη ΜΕΘ 16,2%, νοσοκομειακή θνησιμότητα 24,2%) (6).

Η σήψη αποτελεί επίσης την κύρια αιτία παιδικής νοσηρότητας και θνητότητας παγκόσμια σύμφωνα με μεγάλο αριθμό εργασιών, μέρος των οποίων αναγράφεται στον πίνακα που ακολουθεί (7).

Table 1

Epidemiology of pediatric sepsis in multicenter studies in developed countries since 2003

Authors, year	Country	Design Data source	Settings	Age	Incidence/prevalence	Mortality
Watson et al. 2003 [1]	USA 7 states	Retrospective Hospital discharge database	ICD-9[a] coding & modified Angus criteria 1995	≤19 years	Incidence 0.56 per 1000 population (1995)	Hospital 10.3%
Hartman et al. 2013 [14]	USA 7 states	Retrospective Hospital discharge database	ICD-9[a] coding & modified Angus criteria 1995, 2000, 2005	≤19 years	Incidence 0.89 per 1000 population (2005)	Hospital 8.9% (2005)
Ruth et al. 2014 [17]	USA 43 PICUs	Retrospective PHIS[b] database	ICD-9[a] coding & modified Angus criteria 2004–2012	≤18 years	Prevalence 6.2% (2004) to 7.7% (2012)	Hospital 14.4%; 18.9% (2004) to 12.0% (2012)
Wolfler et at. 2008 [23]	Italia 15 PICUs	Prospective	Proulx's criteria[c] 2004–2005	≤16 years	Incidence Severe sepsis 1.6% Septic shock 2.1%	ICU Severe sepsis 17.7% Septic shock[d] 50.8%
Shime et al. 2011 [22]	Japan 9 PICUs	Prospective	Severe sepsis	≤15 years	Prevalence 1.4%	28-day 18.9%
Schlapbach et al. 2015 [18]	Australia/New Zealand 9 PICUs & 22 mixed ICUs	Retrospective [d]ANZPIC registry	Invasive infection, sepsis, septic shock 2002–2013	<16 years	Prevalence Invasive infection 6.9% Sepsis 2.9% Septic shock 2.1%	ICU Invasive infection 3.9% Sepsis 5.6% Septic shock 17.0%
Weiss et al. 2015 (SPROUT) [19]	26 countries worldwide 128 PICUs	Point prevalence	Severe sepsis 5 days, 2013–2014	<18 years	Prevalence 8.2%	[e]ICU 23% [e]Hospital 24%

[a] *ICD-9* International Classification of Diseases, 9th Revision [b] *PHIS* Pediatric Health Information Systems
[c]Proulx's definition of septic shock was different from Goldstein's definition, now common in the world. Briefly, Proulx's septic shock necessitated hypotension despite 20 mls/kg of fluid administration, while Goldstein's septic shock is defined as inadequate perfusion, regardless of blood pressure, after 40 mls/kg of fluid resuscitation
[d] *ANZPIC* Australian and New Zealand Paediatric Intensive Care
[e]These mortality rates were only for the sites in the developed world

J Intensive Care. 2017; 5: 47 (7)

Σύμφωνα με στατιστικά του 2009 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τρεις από τις τέσσερεις κύριες καταστάσεις που σκοτώνουν παιδιά μικρότερα των 5 ετών, είναι λοιμώδεις παράγοντες, πνευμονία, διάρροια και ελονοσία.

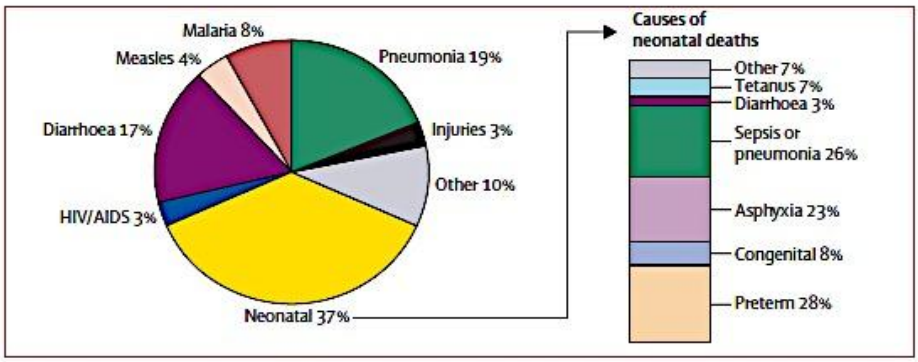


Figure 2: **Major causes of death in children younger than age 5 years and in neonates (yearly average for 2000–03)**

Lancet 2005; 365: 1147–52 (9)

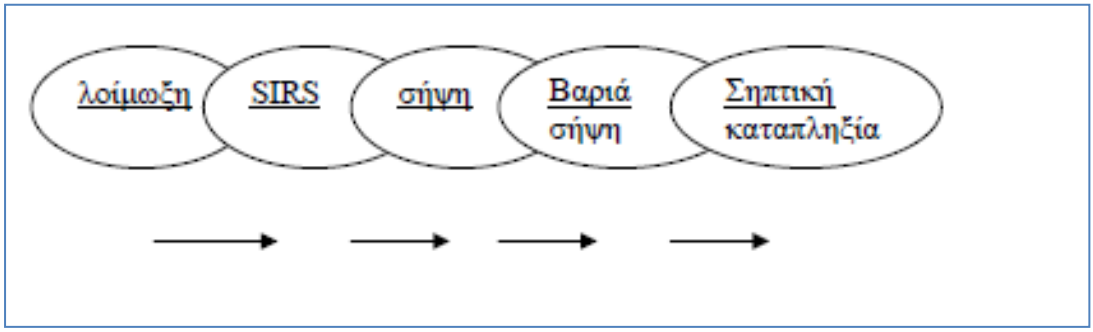
Η ενδονοσοκομειακή θνητότητα σε παιδιά με σήψη υπολογίζεται >10% (3). Μόνο στις ΗΠΑ 72 .000 παιδιά νοσηλεύονται με σήψη ετησίως, με αναφερόμενη θνητότητα 25% και οικονομικό κόστος που υπολογίζεται στο $4.8 Δις (8).

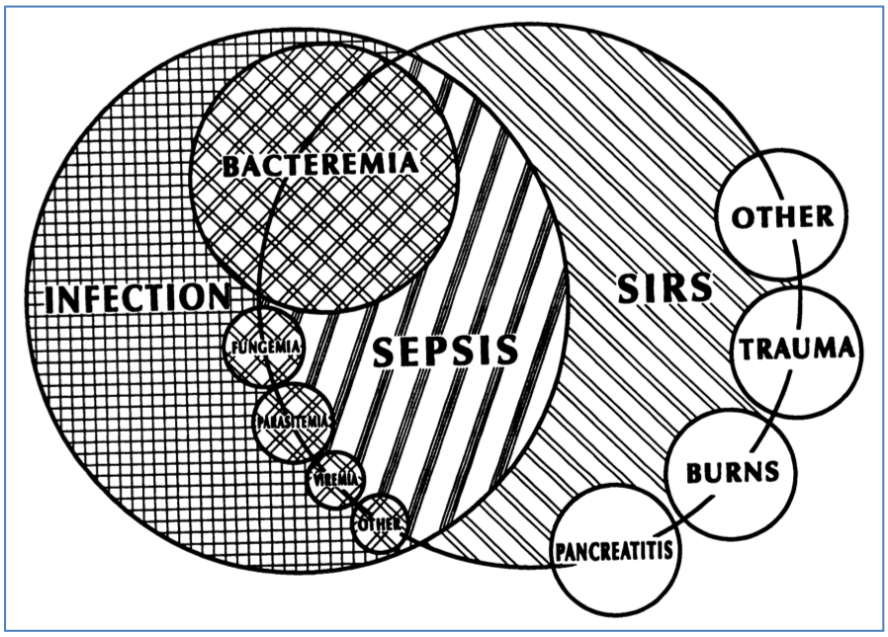
Έγκαιρη αναγνώριση και διάγνωση της σήψης και πρώιμη evidence-based θεραπεία απαιτείται, προκειμένου να αποφευχθεί η σηπτική καταπληξία, η οποία συνδέεται με ποσοστό θνητότητας 40% ή και περισσότερο, στο γενικό πληθυσμό. Αυτός είναι και ο στόχος της Surviving Sepsis Campaign (SSC) την τελευταία δεκαετία, μέσα από την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

ΟΡΙΣΜΟΙ

Παλιοί ορισμοί

Παλαιότερα επικρατούσαν οι παρακάτω ορισμοί, που συνδέονταν μεταξύ τους με βάση το παρακάτω σχήμα που ακολουθεί:





Λοίμωξη είναι η παθολογική διαδικασία που προκαλείται από την εισβολή παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών σε φυσιολογικά στείρους ιστούς, υγρά ή κοιλότητες του σώματος.

Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome) είναι το σύνολο των αμυντικών διεργασιών του οργανισμού έναντι βλαπτικών παραγόντων λοιμωδών και μη (τραύμα, έγκαυμα, παγκρεατίτιδα κ.ά.), που σημαίνει κλινικά :

για τους ενήλικες παρουσία δυο ή περισσότερων από τα παρακάτω κριτήρια (5):

Box 1. SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)

Two or more of:

Temperature >38°C or <36°C

Heart rate >90/min

Respiratory rate >20/min or $PaCO_2$ <32 mm Hg (4.3 kPa) White blood cell count >12 000/mm^3 or <4000/mm^3 or >10% immature bands

From Bone et al.[9]

Critical Care Medicine 2003

ενώ για τα παιδιά, παρουσία τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα κριτήρια:

- κεντρική θερμοκρασία >38,5^o C ή <36° C
- ταχυκαρδία (καρδιακό ρυθμό >2SD από τα φυσιολογικά όρια για την ηλικία, απουσία εξωτερικού αιτίου: χρόνια φαρμακευτική αγωγή ή επώδυνο ερέθισμα, ή ανεξήγητη αύξησή του για >30 λεπτά έως 4 ώρες ή για τα παιδιά <1έτους – βραδυκαρδία : καρδιακός ρυθμός<10^η ΕΘ για την ηλικία, απουσία εξωτερικών παραγόντων: β-αποκλειστές ή συγγενής καρδιακή νόσος ή ανεξήγητη εμμένουσα μείωση καρδιακού ρυθμού για πάνω από μισή ώρα
- ταχύπνοια ή μηχανικός αερισμός για οξύ πρόβλημα που δεν συνδέεται με νευρομυική παθολογία ή χορήγηση γενικής νάρκωσης
- αυξημένος ή μειωμένος αριθμός λευκοκυττάρων για την ηλικία (όχι μετά την χημειοθεραπεία) ή >10% βλάστες

ένα από τα οποία πρέπει να είναι η παθολογική θερμοκρασία ή ο αριθμός λευκοκυττάρων.

Σήψη είναι το κλινικό σύνδρομο που χαρακτηριζεται από την παρουσία λοίμωξης και συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) (6)

Για τα παιδιά, διαγνωστικά κριτήρια σήψης είναι παρουσία λοίμωξης μαζί με σημεία και συμπτώματα φλεγμονής :

- υπερ ή υποθερμία (θερμοκρασία ορθού > 38.5 or <35 _C)
- ταχυκαρδία (μπορεί να απουσιάζει σε υποθερμικούς ασθενείς) και τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες
- ενδείξεις επηρεασμένης λειτουργίας οργάνων: επηρεασμένο επίπεδο συνείδησης, υποξαιμία, αυξημένο γαλακτικό ορού ή αυξημένος καρδιακός ρυθμός (7) (12)

Σοβαρή σήψη: αποδεδειγμένη ή ύποπτη λοίμωξη που προκαλεί συστηματική φλεγμονώδη απάντηση (SIRS) μαζί με δυσλειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος ή σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή ≥2 άλλες οργανικές δυσλειτουργίες με βάση συγκεκριμένα κριτήρια ανεπάρκειας οργάνων:

Για τους ενήλικες (6) (12):

Dellinger et al

TABLE 2. Severe Sepsis

Severe sepsis definition = sepsis-induced tissue hypoperfusion or organ dysfunction (any of the following thought to be due to the infection)
Sepsis-induced hypotension
Lactate above upper limits laboratory normal
Urine output < 0.5 mL/kg/hr for more than 2 hrs despite adequate fluid resuscitation
Acute lung injury with Pao_2/Fio_2 < 250 in the absence of pneumonia as infection source
Acute lung injury with Pao_2/Fio_2 < 200 in the presence of pneumonia as infection source
Creatinine > 2.0 mg/dL (176.8 μmol/L)
Bilirubin > 2 mg/dL (34.2 μmol/L)
Platelet count < 100,000 μL
Coagulopathy (international normalized ratio > 1.5)

Adapted from Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250–1256.

Για τα παιδιά:

Καρδιο-αγγειακή δυσλειτουργία

- ανεξάρτητα από χορήγηση υγρών >40ml/kg σε 1h
- μείωση της αρτηριακής πίεσης < 5η Ε.Θ. για την ηλικία ή συστολική <2SD για την ηλικία ή
- ανάγκη για ινότροπα για να διατηρηθεί η ΑΠ σε φυσιολογικές τιμές ή
- δυο από τα ακόλουθα:

ανεξήγητη μεταβολική οξέωση
αύξηση του αρτηριακού γαλακτικού οξέος

ολιγουρία
παρατεταμένος χρόνος τριχοειδικής επαναπλήρωσης
διαφορά κεντρικής-περιφερικής θερμοκρασία >3° C
Αναπνευστική δυσλειτουργία:
- PaO2/FiO2<300 απουσία κυανωτικής καρδιακής ή προϋπάρχουσας πνευμονικής νόσου
- PaCO2>65 mmHg
- αποδεδειγμένη ανάγκη FiO2 >50% για διατήρηση SAT≥92%
- ανάγκη για μηχανικό αερισμό

Νευρολογική δυσλειτουργία:
- Glasgow Coma Scale ≤ 11
- οξείες αλλαγές με μείωση της GCS

Νεφρολογική δυσλειτουργία:
- κρεατινίνη ορού τουλάχιστον 2 φορές μεγαλύτερη από τη φυσιολογική για την ηλικία τιμή

Ηπατική δυσλειτουργία :
- ολική χολερυθρίνη ≥ 4mg/dl (όχι στα νεογέννητα)
- διπλάσια τιμή αμινοτρασφεράσης

Αιματολογική δυσλειτουργία :
- PLT<100.000/mm3 ή μείωση 50% των PLT από μέγιστη τιμή τριών τελευταίων ημερών
- INP (international normalized ratio) >2

Σηπτική καταπληξία : η παρουσία εμμένουσας υπότασης σε σηπτικό ασθενή, παρά την επαρκή χορήγηση υγρών και απουσία άλλων αιτίων υπότασης.

Εξέλιξη ορισμών-Νέοι ορισμοί

Η Surviving Sepsis Campaign (SSC) Guidelines Committee, στοχεύοντας σε μια ορθολογικότερη προσέγγιση, προσπαθεί συνεχώς να βελτιώνει τους ορισμούς, να τους συσχετίζει με την παθοφυσιολογία και κυρίως με την εφαρμογή κατευθυντήριων οδηγιών - guidelines (The Surviving Sepsis Campaign Guidelines) και συστάσεων (evidence-based recommendations), και να κατευθύνει την πρακτική αναζωογόνησης και επείγουσας αντιμετώπισής της, με απώτερο στόχο τη μείωση της θνητότητας (8).

Το 1991, στο συμπόσιο συμφωνιών (consensus conference) που πραγματοποιήθηκε από το Αμερικάνικο Κολλέγιο Πνευμονολόγων American College of Chest Physicians (ACCP) και της Εταιρείας Εντατικής θεραπείας Society of Critical Care Medicine (SCCM), για να καθοριστούν παγκόσμιοι ορισμοί για τη σήψη (5), χρησιμοποιήθηκε ο όρος σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης “systemic inflammatory response syndrome” (SIRS), που ορίσθηκε σαν συνδυασμός κλινικών σημείων, χωρίς όμως την παρουσία υποκείμενης λοίμωξης (2)(7). Θεωρώντας ότι SIRS μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία μη λοιμωδών παραγόντων, όπως το

τραύμα, το έγκαυμα, η αιμορραγία και η υποογκαιμική καταπληξία, η παγκρεατίτιδα και άλλες νόσοι.

Το 2001 πραγματοποιήθηκε διεθνές συμπόσιο (International Sepsis Definition Conference) για τη σήψη, για να αξιολογήσει τους προηγούμενους ορισμούς για το SIRS, τη σήψη, τη σοβαρή σήψη και τη σηπτική καταπληξία (7), μετά από το οποίο δημιουργήθηκε μια μεγάλη λίστα με κλινικά και βιοχημικά διαγνωστικά κριτήρια για τη σήψη, που θεωρούνταν ότι αντανακλούσαν καλύτερα αυτήν την πολύπλοκη νόσο.

Το 2002 μια διεθνής ομάδα ειδικών (experts) στο χώρο ειδικά της σήψης στα παιδιά, συναντήθηκαν για να δώσουν concensus ορισμούς και κατευθυντήριες οδηγίες και για τα παιδιά, ώστε να βοηθηθούν η κλινική και εργαστηριακή έρευνα.

Η ομάδα όρισε τη σήψη στα παιδιά σαν μια συστηματική αντιφλεγμονώδου απάντηση στη λοίμωξη, που εν δυνάμει εξελίσσεται σε σοβαρή σήψη ή ακόμη και σε σηπτική καταπληξία, με βάση ειδικά ανά ηλικία ζωτικά σημεία και εργαστηριακά δεδομένα (15).

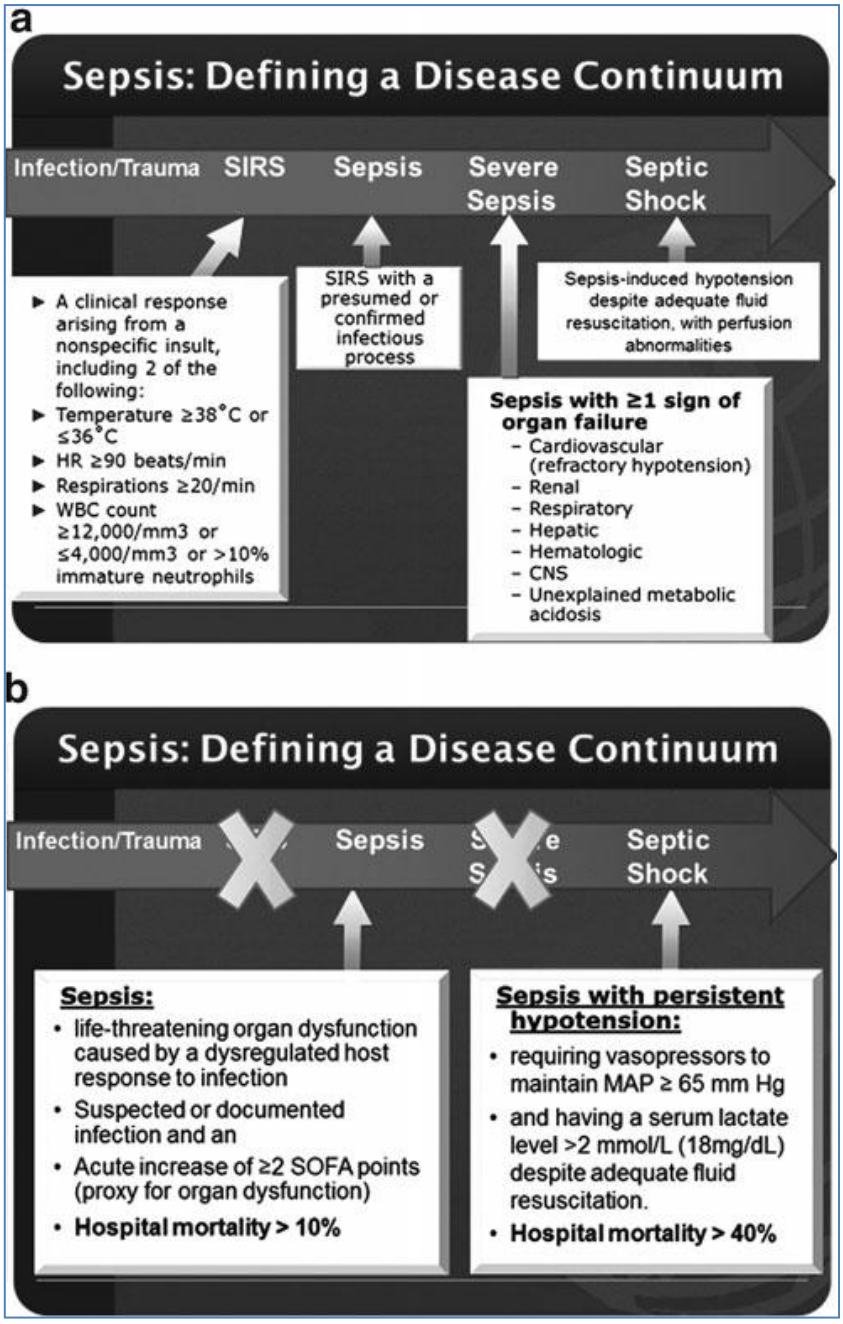
Το 2004 η διεθνής ομάδα των ειδικών για τη σήψη δημοσίευσε πρακτικές κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση της σοβαρής σήψης και της σηπτικής καταπληξίας (16). Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες διαδόθηκαν σαν μέρος της “Surviving Sepsis Campaign”, ανανεώθηκαν με την τελευταία έκδοση το 2013 (6) και επικρατούν για τα παιδιά μέχρι σήμερα.

Για τους ενήλικες, νέοι ορισμοί επικρατούν πλέον σήμερα για τη σήψη και τη σηπτική καταπληξία, στους οποίους κατέληξε το Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock γνωστό σαν [Sepsis-3] (13), οι οποίοι χρησιμοποιούνται με κύριο σκοπό την πρωιμότερη αναγνώριση, την ταχύτερη αντιμετώπιση και καλύτερη έκβαση της νόσου. Ένα νέο εργαλείο, το quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA) έχει προταθεί, για την πρόβλεψη της πιθανότητας κακής έκβασης σε ασθενείς με κλινική υποψία σήψης, για τον πρώιμο εντοπισμό τους, κυρίως έξω από τη μονάδα εντατικής θεραπείας (ICU).

Σήμερα σήψη θεωρείται το σύνδρομο που προκαλείται από την απάντηση του ξενιστή εναντίον εισβολέων παθογόνων, τοξινών τους ή άλλων στοιχείων (particles) τους και είναι μια κατάσταση με πολλαπλά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα(6). Έχει συχνή κατάληξη το θάνατο μέσω ανεπάρκειας πολλών οργάνων (Σύνδρομο Πολυοργανικής Ανεπάρκειας) και μη αναστρέψιμης πτώσης της αρτηριακής πίεσης (Σηπτική Καταπληξία).

SEPSIS-3

Στο σχήμα 1a, φαίνεται ο αρχικός ορισμός της σήψης, που ήταν συστηματική φλεγμονώδη απάντηση (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) και υποψία λοίμωξης, της σοβαρής σήψης, σήψη και οργανική δυσλειτουργία και της σηπτικής καταπληξίας, σήψη και καταπληξία, που επιμένει παρά τη χορήγηση υγρών. Μετά τους ορισμούς της Sepsis-3 από τη Society of Critical Care Medicine (SCCM) και την European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)(17), ο ορισμός του συνδρόμου SIRS απομακρύνθηκε από τη συσχέτιση λοίμωξης και φλεγμονής και εγκαταλήφθηκαν τα κριτήριά του (8) (17) (9).



Surg Infect (Larchmt) 2018 Feb/Mar;19(2):117-125

Σχήμα 1 *Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. Napolitano LM*

Οι όροι SIRS και σοβαρή σήψη δεν χρησιμοποιούνται σήμερα για να ορίσουν οποιοδήποτε στάδιο της σήψης σε ενήλικες. Πλέον μια σοβαρή εξέλιξη της λοίμωξης χαρακτηρίζεται ως σήψη με βάση κριτήρια (SOFA) που περιγραφονται αμέσως παρακάτω, και σηπτική καταπληξία, η κατάσταση στην οποία ανεπαρκούν ο κυτταρικός μεταβολισμός και το κυκλοφορικό σύστημα, και στην οποία, εκτός της χορήγησης υγρών χρειάζονται αγγειοδραστικά φάρμακα προκειμένου να διατηρείται η μέση αρτηριακή πίεση ≥ 65 mmHg και το γαλακτικό > 2 mmol / L (18 mg / dL) (8) (Σχήμα 1b). Το ποσοστό θνητότητας 10% της σήψης ανέρχεται στο 40% στη σηπτική καταπληξία.

SOFA και qSOFA έναντι SIRS στη σήψη

Μια αναδρομική ανάλυση (10) στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, από την Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) database (2000–2013), που περιλάμβανε 109.663 ασθενείς με λοίμωξη και ανεπάρκεια οργάνων, έδειξε ότι η έως τότε χρήση δύο ή περισσότερων κριτηρίων SIRS δεν είχε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση σοβαρής σήψης σε ασθενείς ΜΕΘ. Συγκρίθηκαν τα κλινικά κριτήρια SIRS, το Logistic Organ Dysfunction System (LODS) score, με δυο νέα κριτήρια το SOFA score (baseline Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (SOFA) score και το quick SOFA (qSOFA) score, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στους νέους ορισμούς Sepsis-3. Βρέθηκε ότι το qSOFA μπορούσε καλύτερα από τα κριτήρια SIRS να προβλέψει την ενδονοσοκομειακή θνητότητα (11).

Με σκοπό επομένως τη μείωση των υψηλών ποσοστών θνητότητας προτάθηκε, αρχικά στους ενήλικες, ο υπολογισμός των SOFA (σχήμα 2) και qSOFA (σχήμα 3) ως πολύ ευαίσθητων δεικτών εντόπισης ασθενών με αυξημένη πιθανότητα κακής έκβασης, κυρίως ενδονοσοκομειακά στη ΜΕΘ αλλά και εκτός ΜΕΘ (17).

Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score[a]

	Score				
System	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO_2/FIO_2, mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, $\times 10^3/\mu L$	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2–1.9 (20–32)	2.0–5.9 (33–101)	6.0–11.9 (102–204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose)[b]	Dopamine 5.1–15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1[b]	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1[b]
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score[c]	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2–1.9 (110–170)	2.0–3.4 (171–299)	3.5–4.9 (300–440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: FIO_2, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO_2, partial pressure of oxygen.

[a]Adapted from Vincent et al. [27]

[b]Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

[c]Glasgow Coma Scale scores range from 3–15; higher score indicates better neurological function.

The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score[15]

A clinical evaluation of the patient that includes laboratory values (bilirubin, creatinine, coagulation studies, and arterial blood gases) is needed to calculate a SOFA score. The SOFA score is most commonly used in the ICU practice setting.

The following are the abnormal physiologic SOFA parameters, each of which receives a score of 2 or higher:

- PaO_2:FiO_2, < 300 mmHg
- platelets, < $100 \times 10^3/mm^3$
- bilirubin, ≥ 2 mg/dL
- hypotension requiring vasopressor support
- Glasgow Coma Scale score, ≤ 12
- creatinine, ≥ 2 mg/dL, or urine output < 500 mL/day

Physiologic parameters are scored from 0 (normal function) to 4 (organ failure). Each parameter is scored individually, after which a total score is derived to suggest severity of illness. The higher the cumulative score, the greater the patient's risk. A score of 2 or higher in any system indicates an elevated risk of organ dysfunction, poor outcome, or death.

An online SOFA calculator can be found at www.mdcalc.com/sequential-organ-failure-assessment-sofa-score.

FiO_2 = fractional inspired oxygen; PaO_2 = partial pressure of arterial oxygen.

The SOFA score

The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)

Σχήμα 2 : SOFA score (8)

The Quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA) Score[1]

The following are the abnormal physiologic qSOFA parameters:

- systolic blood pressure, ≤ 100 mmHg
- respiratory rate, ≥ 22 breaths per minute
- any change in mental status

Patients are assigned one point for each abnormal parameter. Non-ICU patients with a total score of 2 or 3 are considered at elevated risk for an extended ICU stay or death and should be assessed for evidence of organ dysfunction using the SOFA. An online qSOFA calculator can be found at www.mdcalc.com/qsofa-quick-sofa-score-sepsis.

The Quick Sequential Organ Failure Assesment (qSOFA) Score

Box 4. qSOFA (Quick SOFA) Criteria

Respiratory rate ≥22/min

Altered mentation

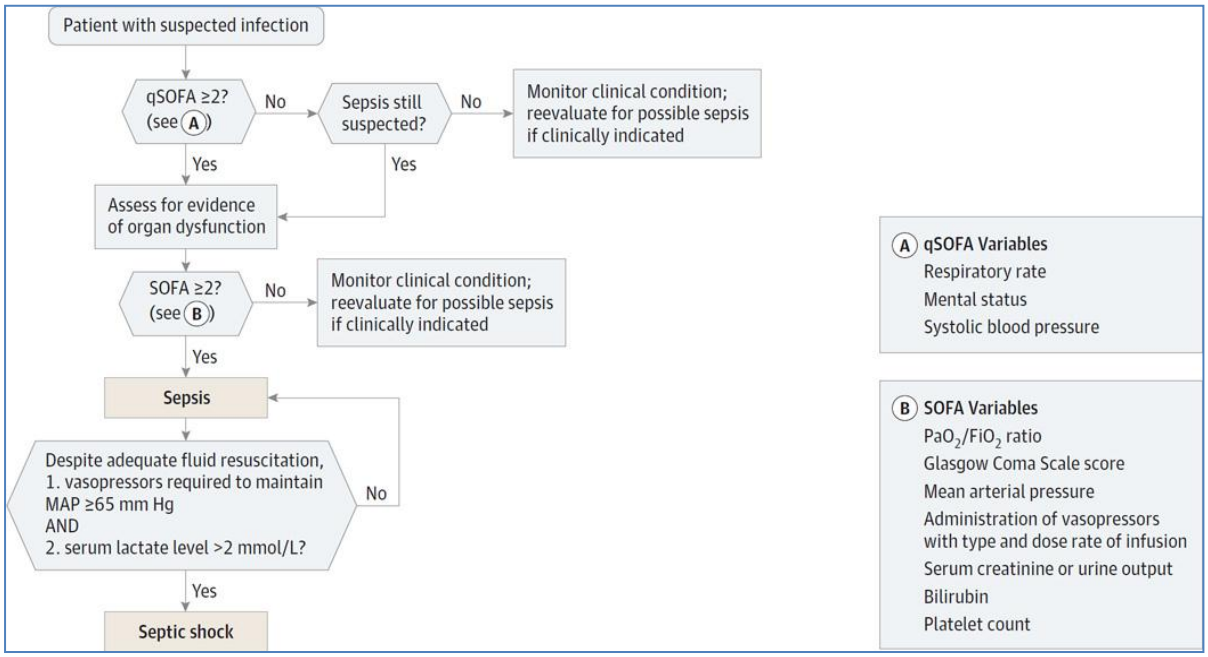
Systolic blood pressure ≥100 mm Hg

Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)
JAMA. 2016 February 23; 315(17)

Σχήμα 3 : quick SOFA (qSOFA) score (8)

Στη συνέχεια περιγράφεται ο αλγόριθμος αξιολόγησης ασθενών-ενηλίκων με υποψία λοίμωξης με σκοπό την ανίχνευση ασθενών με σήψη ή σηπτική καταπληξία (σχήμα 4).

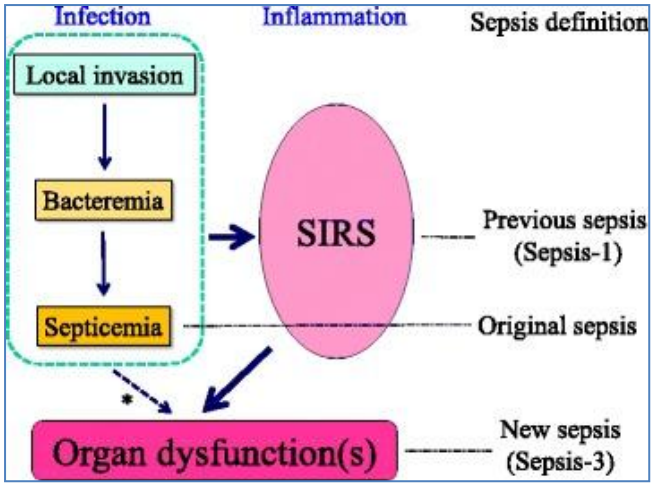
Η βασική τιμή στην εκτίμηση κατά SOFA (baseline Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (SOFA) score) (8) θεωρείται μηδέν, εκτός αν είναι από πριν γνωστό ότι ο ασθενής είχε κάποια οξεία ή χρόνια οργανική δυσλειτουργία (8) (17).



qSOFA indicates quick SOFA; MAP, mean arterial pressure ***JAMA. 2016 Feb 23; 315(8): 801–810***

Σχήμα 4: Αλγόριθμος ανεύρεσης ασθενών με σήψη και σηπτική καταπληξία με βάση κλινικά κριτήρια (Operationalization of Clinical Criteria Identifying Patients With Sepsis and Septic Shock)

Σήψη ορίζεται πλέον μια απειλητική για τη ζωή δυσλειτουργία οργάνων, αποτέλεσμα μιας μη καλά ρυθμισμένης απόκρισης του ξενιστή σε λοίμωξη. Μια λοίμωξη επομένως, όταν προκαλεί δυσλειτουργία ενός ή περισσοτέρων οργάνων, η οποία εκτιμάται με αύξηση του Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score κατά 2 ή περισσοτέρους βαθμούς, ορίζεται - με βάση τα νέα κριτήρια γνωστά σαν “Sepsis-3”- σαν σήψη(17)(12)(21). Στο σχήμα 5, σχηματοποιείται η διαφοροποίηση του ορισμού της σήψης από τη θεωρία του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης SIRS (Sepsis-1) σε εκείνη που περιγράφει τη δυσλειτουργία οργάνων (Sepsis-3) (13). Είναι φανερό (αστερίσκος), ότι κάποιοι ασθενείς με λοίμωξη αναπτύσσουν δυσλειτουργία οργάνων χωρίς να πληρούν τα κριτήρια SIRS-ανεπάρκεια προηγούμενου ορισμού.



Ο αστερίσκος δηλώνει *ότι ένα μικρό ποσοστό των ασθενών ασθενών με λοίμωξη, αναπτύσσουν δυσλειτουργία οργάνων χωρίς να πληρούν τα κριτήρια SIRS* : systemic inflammatory response syndrome

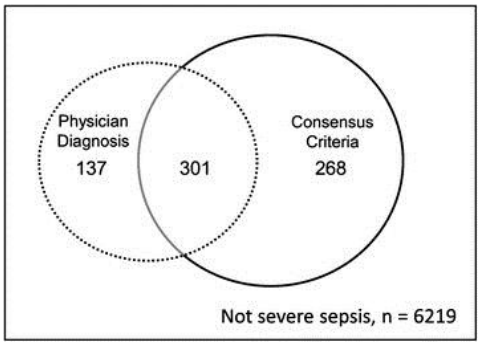
Inflamm Regen. 2016 Nov 15;36:24

Σχήμα 5. Η δυσλειτουργία οργάνων νέο κριτήριο ορισμού στη σήψη

Σοβαρές αντιρρήσεις παραμένουν για τη χρήση των ορισμών της Sepsis-3 definitions. Διεθνείς οργανισμοί όπως η American College of Chest Physicians (8), η Infectious Disease Society of America, η Latin American Sepsis Institute και η American College of Emergency Physicians αμφισβητούν στοιχεία τους και συστήνουν την αναζήτηση βελτιωμένου συστήματος βαθμονόμησης (scoring system), με μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση αυξημένου κινδύνου ασθενών με σήψη (14)(15). Πιθανά επομένως να χρειαστεί περαιτέρω αξιολόγηση των νέων ορισμών (8) (11).

SOFA SCORE για παιδιά

Τα κριτήρια δυσλειτουργίας οργάνων δεν είχαν συνδεθεί με την κλινική έκβαση στα παιδιά (16)(27). Μελέτες έδειξαν μικρή μόνο συμφωνία μεταξύ κλινικών κριτηρίων και εκείνων από το αντίστοιχο consensus, στη διάγνωση της σοβαρής σήψης (27). Το διάγραμμα Venn (σχήμα 6) δείχνει την αλληλεπικάλυψη των ασθενών με διάγνωση σήψης με βάση την κλινική ιατρική εκτίμηση και εκείνων με βάση τα διεθνή κριτήρια συναίνεσης (“consensus criteria” 2005). Από τα 6.925 παιδιά-ασθενείς που εξετάστηκαν σε μονάδα εντατικής, τα 706 εντοπίστηκαν με σοβαρή σήψη, από τα οποία μόνο 301 (43%) ταυτοποιήθηκαν ταυτόχρονα με διάγνωση γιατρού και με τα συναινετικά κριτήρια consensus criteria (28). Τα κριτήρια επομένως σήψης βασιζόμενα στη θεωρία του SIRS (consensus criteria) και στα παιδιά δεν μπορούν να αναγνωρίσουν τα πιο σοβαρά πάσχοντα.



Σχήμα 6. ***Crit Care. 2015; 19(1): 325 (28)***

Ακολούθησαν προσπάθειες προσαρμογής της βαθμολογίας του SOFA SCORE (17) στα παιδιά με αντίστοιχο consensus definition για παιδιά (27) και με προσαρμογή των κριτηρίων δυσλειτουργίας οργάνων στα παιδιά (pediatric SIRS and organ dysfunction criteria), αντίστοιχα με των ενηλίκων (16) (17) (7).

Το SOFA SCORE προσαρμόστηκε, αξιολογήθηκε και επικυρώθηκε σε σοβαρά άρρωστα παιδιά με μεταβλητές προσαρμοσμένες στην ηλικία τους (25) και προέκυψε το pediatric SOFA score (pSOFA)(σχήμα 7). Το pSOFA χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν οι ορισμοί της Sepsis-3 σε παιδιά με επιβεβαιωμένη ή ύποπτη λοίμωξη με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, με μεγάλη ευαισθησία εντοπισμού υψηλής ενδονοσοκομειακής θνητότητας σε ΜΕΘ παίδων.

Pediatric SOFA Score Validation and Sepsis-3 Assessment in Critically Ill Children — Original Investigation Research

Table 1. Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score

Variables	Score[a] 0	1	2	3	4
Respiratory					
Pao_2:Fio_2[b] or Spo_2:Fio_2[c]	≥400	300-399	200-299	100-199 With respiratory support	<100 With respiratory support
	≥292	264-291	221-264	148-220 With respiratory support	<148 With respiratory support
Coagulation					
Platelet count, $\times 10^3/\mu L$	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Hepatic					
Bilirubin, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular					
MAP by age group or vasoactive infusion, mm Hg or μg/kg/min[d]					
<1 mo	≥46	<46	Dopamine hydrochloride ≤5 or dobutamine hydrochloride (any)	Dopamine hydrochloride >5 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine bitartrate ≤0.1	Dopamine hydrochloride >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine bitartrate >0.1
1-11 mo	≥55	<55			
12-23 mo	≥60	<60			
24-59 mo	≥62	<62			
60-143 mo	≥65	<65			
144-216 mo	≥67	<67			
>216 mo[e]	≥70	<70			
Neurologic					
Glasgow Coma Score[f]	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine by age group, mg/dL					
<1 mo	<0.8	0.8-0.9	1.0-1.1	1.2-1.5	≥1.6
1-11 mo	<0.3	0.3-0.4	0.5-0.7	0.8-1.1	≥1.2
12-23 mo	<0.4	0.4-0.5	0.6-1.0	1.1-1.4	≥1.5
24-59 mo	<0.6	0.6-0.8	0.9-1.5	1.6-2.2	≥2.3
60-143 mo	<0.7	0.7-1.0	1.1-1.7	1.8-2.5	≥2.6
144-216 mo	<1.0	1.0-1.6	1.7-2.8	2.9-4.1	≥4.2
>216 mo[e]	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	≥5

Abbreviations: Fio_2, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; pSOFA, pediatric Sequential Organ Failure Assessment; Spo_2, peripheral oxygen saturation.

SI conversion factors: To convert bilirubin to micromoles per liter, multiply by 17.104; creatinine to micromoles per liter, multiply by 88.4; and platelet count to $\times 10^9$/L, multiply by 1.

[a] The pSOFA score was calculated for every 24-hour period. The worst value for every variable in each 24-hour period was used to calculate the subscore for each of the 6 organ systems. If a variable was not recorded in a given 24-hour period, it was assumed to be normal and a score of 0 was used. Daily pSOFA score was the sum of the 6 subscores (range, 0-24 points; higher scores indicate a worse outcome).

[b] Pao_2 was measured in millimeters of mercury.

[c] Only Spo_2 measurements of 97% or lower were used in the calculation.

[d] MAP (measured in millimeters of mercury) was used for scores 0 and 1; vasoactive infusion (measured in micrograms per kilogram per minute), for scores 2 to 4. Maximum continuous vasoactive infusion was administered for at least 1 hour.

[e] Cutoffs for patients older than 18 years (216 months) were identical to the original SOFA score.

[f] Glasgow Coma Scale was calculated using the pediatric scale.

JAMA Pediatr 2017;171 (16)

TABLE 1. Proposed Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score

Organ	Variable	0	1	2	3	4
Respiratory	Pao_2/Fio_2	> 400	≤ 400 O_2 therapy	≤ 300 Noninvasive ventilatory support	≤ 200 Ventilatory support	≤ 100 Ventilatory support
Hematologic	Platelet count (× 10^3/ mm^3)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Liver	Bilirubin (mg/dL)	< 1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	> 12.0
Cardiovascular	Cardiovascular support		Systolic arterial blood pressure < age-based cutoff, mm Hg	Dopamine ≤ 5 μg/kg/min or dobutamine at any dose	Dopamine > 5 μg/kg/min or adrenaline/ noradrenaline ≤ 0.1 μg/kg/min	Dopamine > 15 μg/kg/min or adrenaline/ noradrenaline > 0.1 μg/kg/min
CNS	Glasgow Coma Scale	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Renal	Creatinine (mg/dL)	< 1 × age-based cutoff	1–1.6 × age-based cutoff	1.7–2.8 × age-based cutoff	2.9–4.1 × age-based cutoff	≥ 4.2 × age-based cutoff

Pediatric Critical Care Medicine, Jan 2017 (30)

Σχήμα 7. Παιδιατρικό SOFA score (pSOFA)

Αναγκαία είναι πλέον η δοκιμαστική εφαρμογή σε ερευνητικά πρωτόκολλα και περαιτέρω αξιολόγηση του Sepsis-3 στα παιδιά (30)(31).

Αίτια Σήψης

Λοίμωξη

Λοίμωξη με Gram-αρνητικά ή Gram-θετικά βακτήρια, μύκητες (ιδίως Candida) ή και ιούς μπορεί να οδηγήσει σε σήψη. Μικροβιακές τοξίνες - κυρίως η Gram-αρνητική βακτηριακή ενδοτοξίνη (λιποσακχαριδάση, LPS) - αλλά και ενδογενείς κυτοκίνες έχουν ενοχοποιηθεί σαν επαγωγείς της (18).

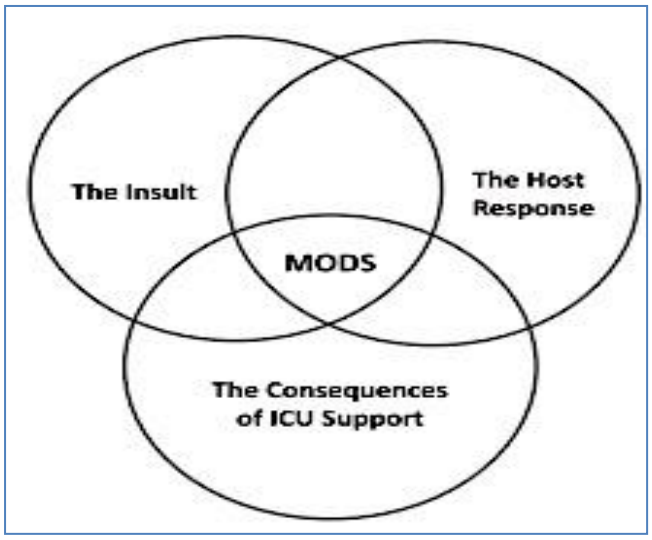
Τραύμα

Η βλάβη από τραυματισμό προκαλεί μια σύνθετη αντίδραση από τον ξενιστή, που διαταράσσει την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, προδιαθέτει τους ασθενείς σε ευκαιριακές λοιμώξεις και προκαλεί φλεγμονώδεις επιπλοκές.

Καθοριστές απάντησης οργανισμού σε λοίμωξη ή τραύμα

Η φυσιολογική αντίδραση στη λοίμωξη περιλαμβάνει ανοσολογικές αντιδράσεις που απαντούν άμεσα και δυναμικά στη μικροβιακή εισβολή. Η απάντηση αυτή του οργανισμού ποικίλλει

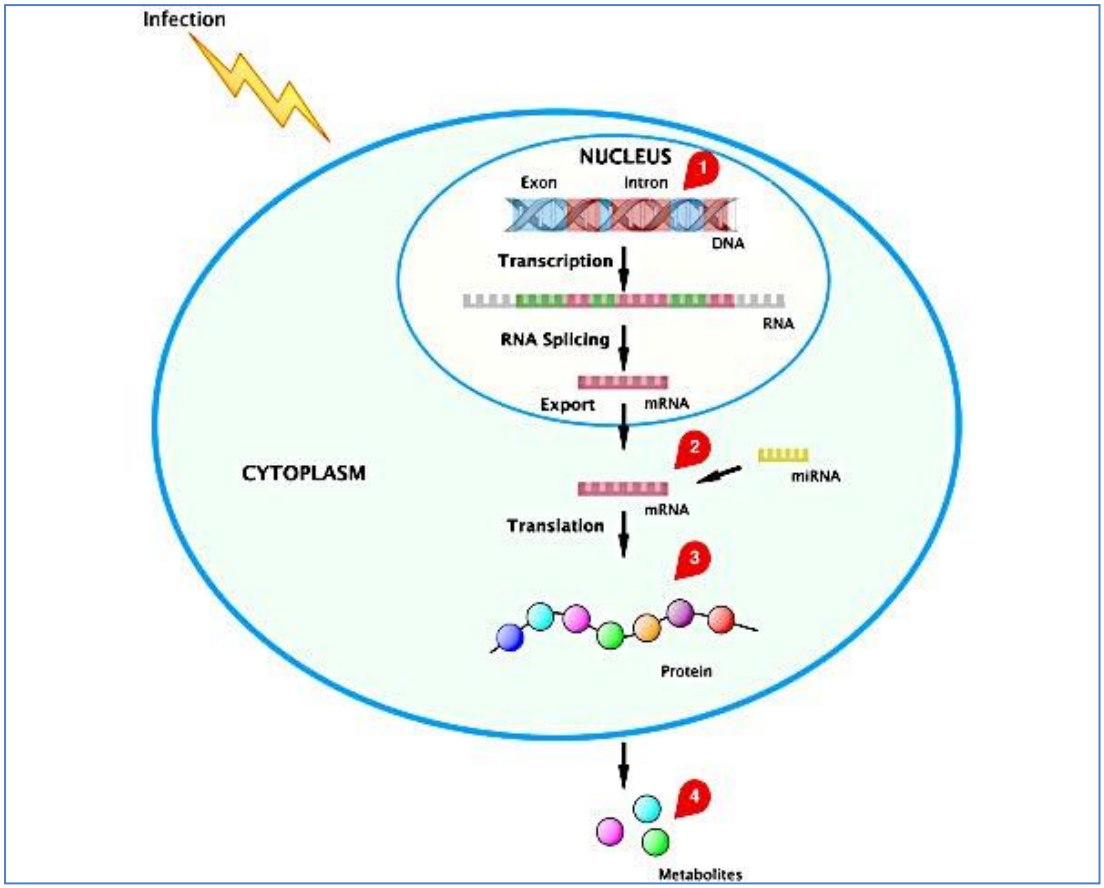
σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του παθογόνου, το φορτίο του στον οργανισμό, το σημείο προσβολής, τη χρονική καθυστέρηση πιθανά της αναγνώρισής της. Αντίστοιχα στην περίπτωση κάποιου τραύματος, η απάντηση εξαρτάται από τον τύπο και τη σοβαρότητά του. Και στις δυο όμως περιπτώσεις η απάντηση έχει να κάνει με την ετερογένεια του ασθενή, την ηλικία, το φύλο το γενετικό προφίλ, τις συννοσηρότητες και την συνχορηγούμενη θεραπεία και άλλα. Η συνολική έκβαση της νόσου και η ανταπόκριση του ασθενούς ασφαλώς επηρεάζονται και από τη διαφορετικότητα των πρωτοκόλλων της χορηγούμενης θεραπείας, τα διαφορετικά συστήματα υγείας (1) και τους προϋπολογισμούς που εκείνα διαθέτουν (σχήμα 8) (33). Η απάντηση του ξενιστή εξαρτάται επιπλέον από την πρόσθετη ιατρογενή βλάβη από την υποστήριξη σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), η οποία μπορεί να διατηρεί τον ασθενή στη ζωή, τροποποιεί όμως την απόκριση του ξενιστή, προκαλεί πιθανά επιπλέον βλάβη και οδηγεί σε άλλο κλινικό σύνδρομο.



Σχήμα 8 : Η απάντηση ενός οργανισμού στη σήψη αντανακλά τη δυναμική αλληλεπίδραση τριών μεταβλητών παραγόντων: το αίτιο, τη λοίμωξη, ή το τραύμα, την απάντηση από τον οργανισμό και τις ιατρογενείς βλαβες.

Γενετική προδιάθεση στη σήψη και τη σηπτική καταπληξία

Γενετικοί παράγοντες έχουν μείζονα ρόλο στην εξέλιξη μιας φλεγμονής (σχήμα 9). Πολυμορφισμός έχει παρατηρηθεί τόσο στα γονίδια που ελέγχουν την αντίδραση στη φλεγμονή, όσο και στα γονίδια που επάγουν την παραγωγή και την απελευθέρωση των κυτοκίνων, τα οποία καθορίζουν και την παραγωγή φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών και αν θα συμβεί υπερβολική ή μειωμένη γενικευμένη αντίδραση.



Bench-to-bedside review: future novel diagnostics for sepsis - a systems biology approach
Skibsted S. Crit Care. 2013 Oct 4; 17 (5):231

Σχήμα 9. Ενεργοποίηση γονιδίου και παραγωγή πρωτεϊνών-μεταβολίτες, σαν απάντηση σε μια λοίμωξη

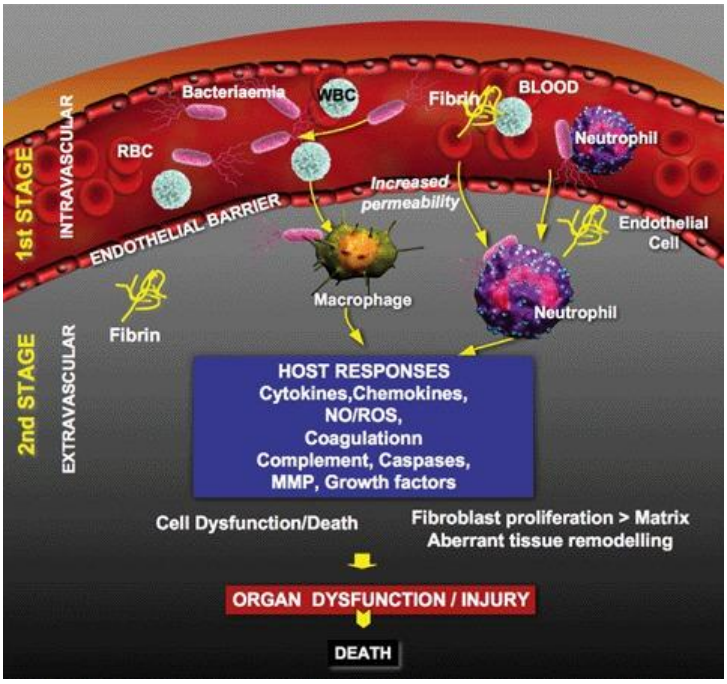
Σύμφωνα με τη μοριακή βιολογία, μετά τη γονιδιακή ενεργοποίηση, το DNA μεταγράφεται και μεταφράζεται σε πρωτεΐνες οι οποίες απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, σύμφωνα με τις γενετικές οδηγίες που είναι αποθηκευμένες στο DNA του ατόμου (19)(20)(1). Η απάντηση συνεπώς εξατομικεύεται. Τα σημεία που υπάρχουν οι αριθμοί στο παραπάνω σχήμα υποδηλώνουν και διαφορετικούς στόχους μελλοντικών ή πιθανά διαγνωστικών προσεγγίσεων: 1: επιγενετική epigenomics (μεταβλητές θέσεις μεθυλίωσης) και γονιδιωματική genomics (SNPs) 2 : μεταγραφική transcriptomics (mRNA και miRNA). 3, πρωτεϊνωμα proteomics και 4 : metabolomics μεταβολική.

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Θεωρία του 2015 (A 2015 concept of sepsis pathophysiology)

Ήδη από δεκαετίας, από το Merinoff συμπόσιο (21), η σήψη έχει οριστεί σαν 'μια απειλητική για τη ζωή κατάσταση, που προκύπτει όταν η απάντηση του οργανισμού σε μια λοίμωξη-ή άλλο αίτιο- στρέφεται εναντίον των δικών του ιστών και οργάνων'.

Στην περίπτωση της λοίμωξης, η διαδικασία της σήψης ξεκινά από τη στιγμή που ο οργανισμός αναγνωρίζει μόρια που σχετίζονται με το παθογόνο (pathogen- associated molecular patterns, PAMPs) ή προϊόντων αποδόμησης παθογόνου (damage-associated molecular patterns, DAMPs), alarmins, αυτοαντιγόνα και κυτοκίνες (38), οπότε και ξεκινά άμεσα η ενεργοποίηση του καταρράκτη της φλεγμονής. Η απάντηση από τον οργανισμό μπορεί να είναι από μια απλή μη επιπλεγμένη λοίμωξη μέχρι μια κατάσταση σοβαρής ανεπάρκειας και έκπτωσης οργάνων ή θάνατο (21) (σχήμα 10).



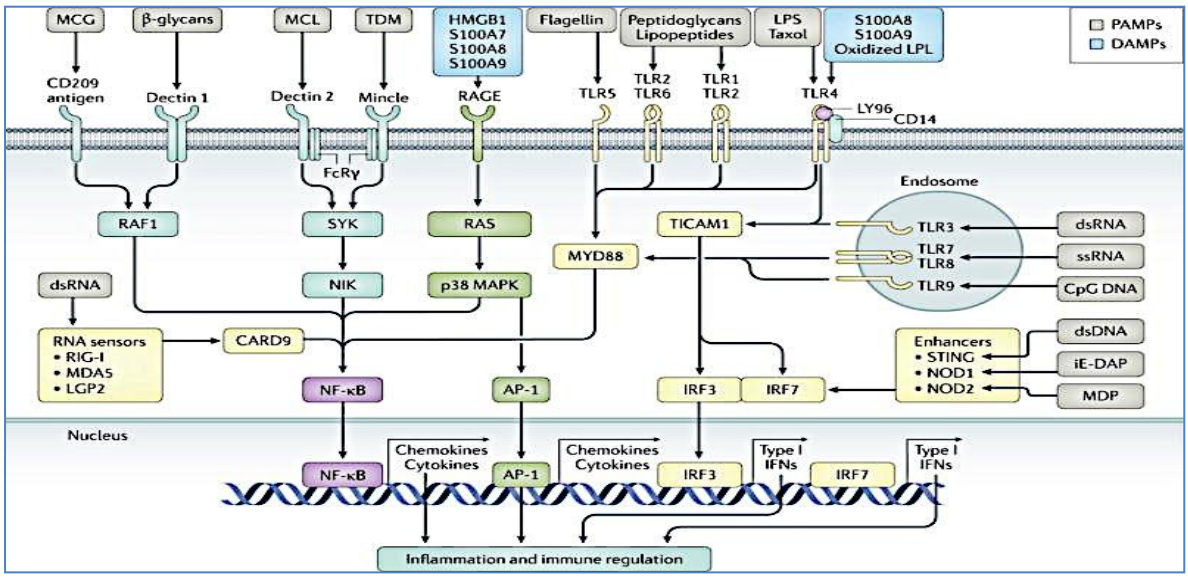
J Cell Mol Med. 2008 Aug; 12(4): 1072–1073

Σχήμα 10. Διάγραμμα των σταδίων και γεγονότων που καθορίζουν την εξέλιξη της σήψης

Η σήψη άρα είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης ενεργοποίησης αμυντικών μηχανισμών του σώματος προς τους εισβολείς μικροοργανισμούς, gram-θετικούς, μύκητες και gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς ή τις ενδοτοξίνες τους. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί

περιλαμβάνουν την απελευθέρωση κυτοκινών, την ενεργοποίηση ουδετερόφιλων, μονοκύτταρων και ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ένας μεγάλος αριθμός υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας και ενδοκυττάριων φαίνεται να αναγνωρίζουν τα μόρια αυτά, PAMPs και DAMPs (τμήματα μικροβίου, γλυκοπρωτεϊνες, λιποπρωτεϊνες, νουκλεϊκά οξέα κτλ). Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 10 διαφορετικοί υποδοχείς Tol l-like receptors (TLRs), -C-type lectin domain family 7 member A (dectin 1), C-type lectin domain family 6 member A (dectin 2) οι οποίοι ενεργοποιούν, μέσω του παράγοντα interferon regulatory factor (IRF) μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή ιντερφερόνης (IFN) ή nuclear factor-κB (NF-κB) και activator protein 1 (AP-1), παράγοντες οι οποίοι ευθύνονται για την πρώιμη ενεργοποίηση γονιδίων φλεγμονής, όπως εκείνα των TNF, IL1, καθώς και άλλων, που κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής επιφάνειας ενδοθηλίου (endothelial cell-surface molecules) (22) (20) (1) (23) (σχήμα 11).

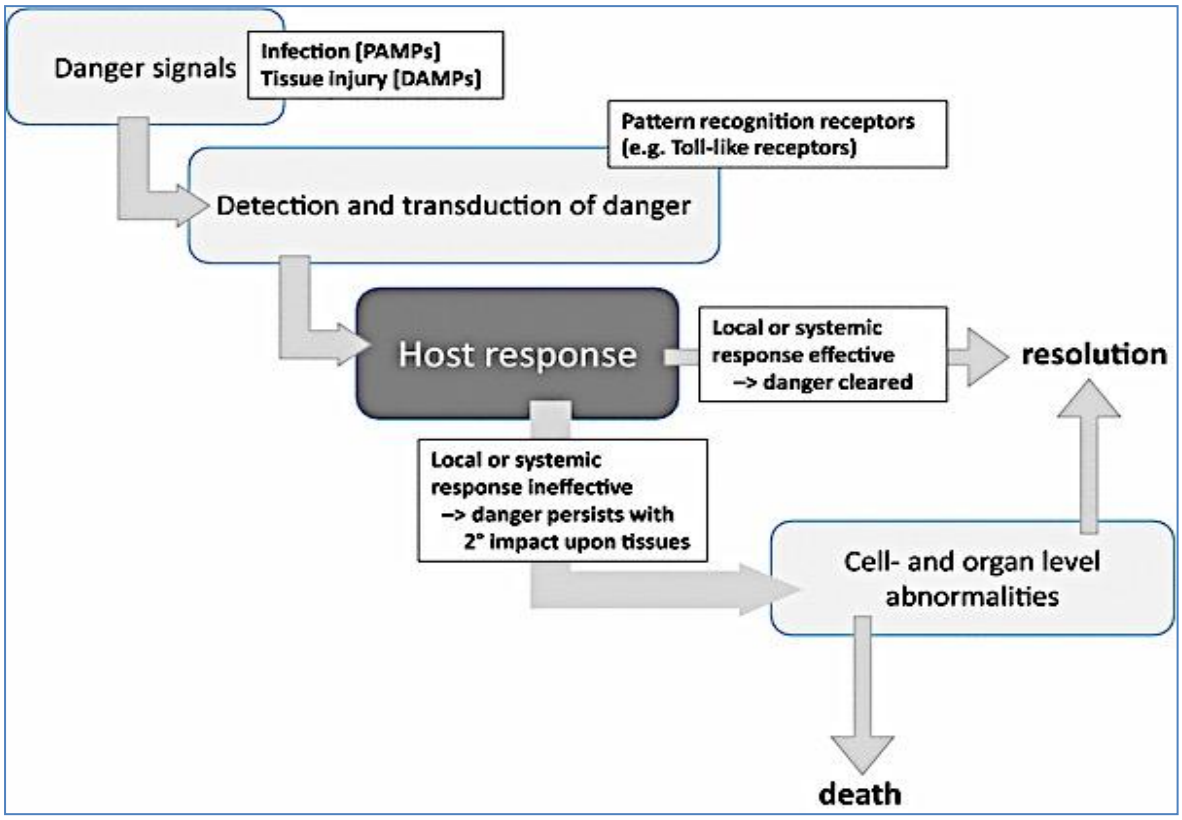


CARD9, caspase recruitment domain-containing protein 9; dsDNA, double-stranded DNA; dsRNA, double-stranded RNA; FcRγ, Fcγ receptor; HMGB1, high-mobility group protein B1; iE-DAP, d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid; LGP2, laboratory of genetics and physiology 2 (also known as DHX58); LPL, lipoprotein lipase; LPS, lipopolysaccharide; LY96, lymphocyte antigen 96; MAPK, mitogen- activated protein kinase; MCG, mannose-containing glycoprotein; MDA5, melanoma differentiation-associated protein 5 (also known as IFIH1); MDP, muramyl dipeptide; MCL, mannose-cappedipoarabinomannan; Mincle, also known as CLEC4E; MYD88, myeloid differentiation primary response protein 88; NIK, NF-κB-inducing kinase (also known as MAP3K14); NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; RAF1, RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RAGE, advanced glycosylation end product-specific receptor; RIG-I, retinoic acid-inducible gene 1 protein (also known as DDX58); ssRNA, single-stranded RNA; STING, stimulator of interferon genes protein; SYK, spleen tyrosine kinase; TDM, trehalose-6,6′-dimycolate; TICAM1, TIR domain-containing adaptor molecule 1.

Nat Rev Dis Primers. 2016 Jun 30; 2: 16045.

Σχήμα 11. Υποδοχείς στην επιφάνεια και στο εσωτερικό των κυττάρων αναγνωρίζουν τα προϊόντα των μικροβίων και τα ενδογενή σήματα κινδύνου danger signals (alarmins)

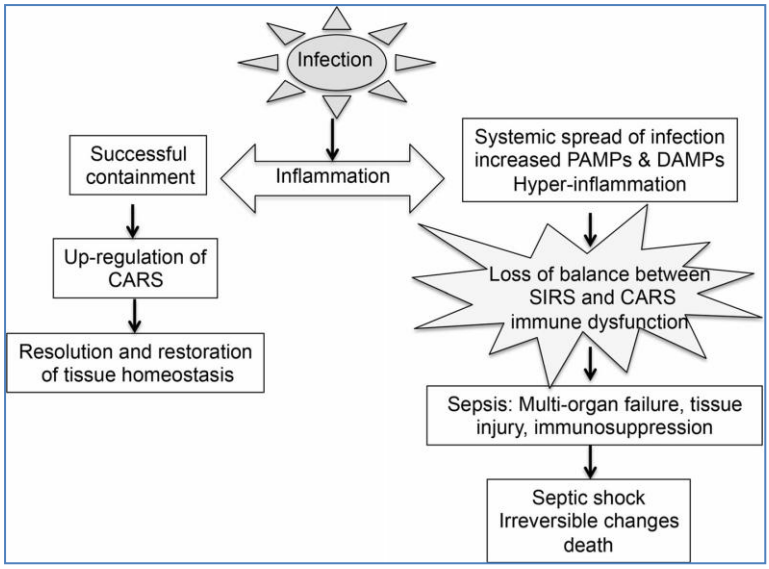
Η αλληλεπίδραση αυτή του παθογόνου με διάφορους υποδοχείς των ανοσοκυττάρων ενεργοποιούν μια σειρά κλινικών φλεγμονωδών συμβάντων, που στοχεύουν στην απομάκρυνση του παθογόνου και στην αποκατάσταση της κανονικότητας, της ομοιόστασης (Σχήμα 12).



Intensive Care Med (2015) 41:909–911 (38)

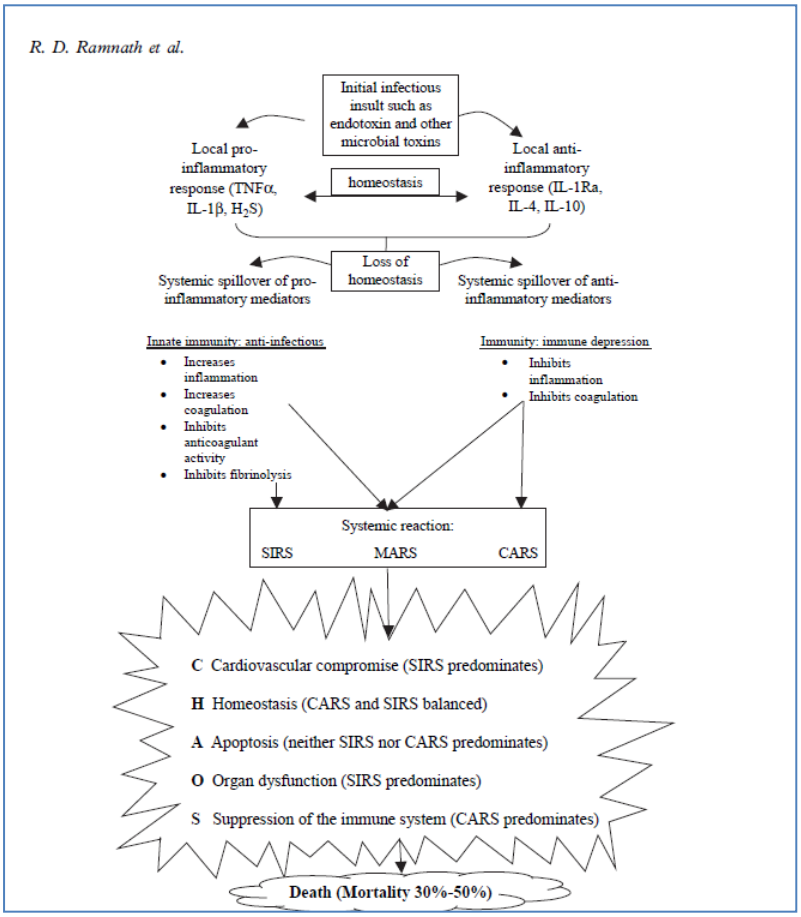
Σχήμα 12. Παθοφυσιολογία της σοβαρής νόσου

Εάν η απάντηση του ξενιστή αποτύχει να περιορίσει τη λοίμωξη, οι φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις κορυφώνονται, επικρατεί ανισορροπία του συστήματος αντιφλεγμονώδους απάντησης SIRS, με το σύνδρομο αντιστάθμισης της κατάστασης, το «σύνδρομο αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απόκρισης /compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS)», με συνέπεια ανεπανόρθωτες βλάβες ιστών, πολυοργανική ανεπάρκεια, χάος CHAOS (ΧΑΟΣ) και θάνατο (23)(35) (σχήμα 13,14).



Inflamm. Res. (2016) 65:853–868

Σχήμα 13. Ο ρόλος των κυτταρικών γεγονότων στην παθοφυσιολογία της σήψης



Crit Care Med 2007 Vol 35, No.10

Σχήμα 14. Ο καταρράκτης με την τοπική φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη απάντηση μέσω μεσολαβητών στη σήψη, που οδηγούν στο CHAOS (ΧΑΟΣ)

Αυτό μπορεί να προκληθεί από μια λοίμωξη ή από σοβαρή τραυματική βλάβη (σχήμα 15), όταν αυτή προκαλέσει τροποποίηση στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς, βλάβη στη μικροκυκλοφορία, άμεση ιστική βλάβη, ή λόγω πιθανά αιμορραγικής καταπληξίας, δευτεροπαθή βλάβη λόγω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (Multiple Organ Dysfunction Syndrome/ Multiple Organ Failure–MODS/MOF)(24), εισόδου πιθανά μικροοργανισμών από το έντερο και νοσοκομειακή λοίμωξη.

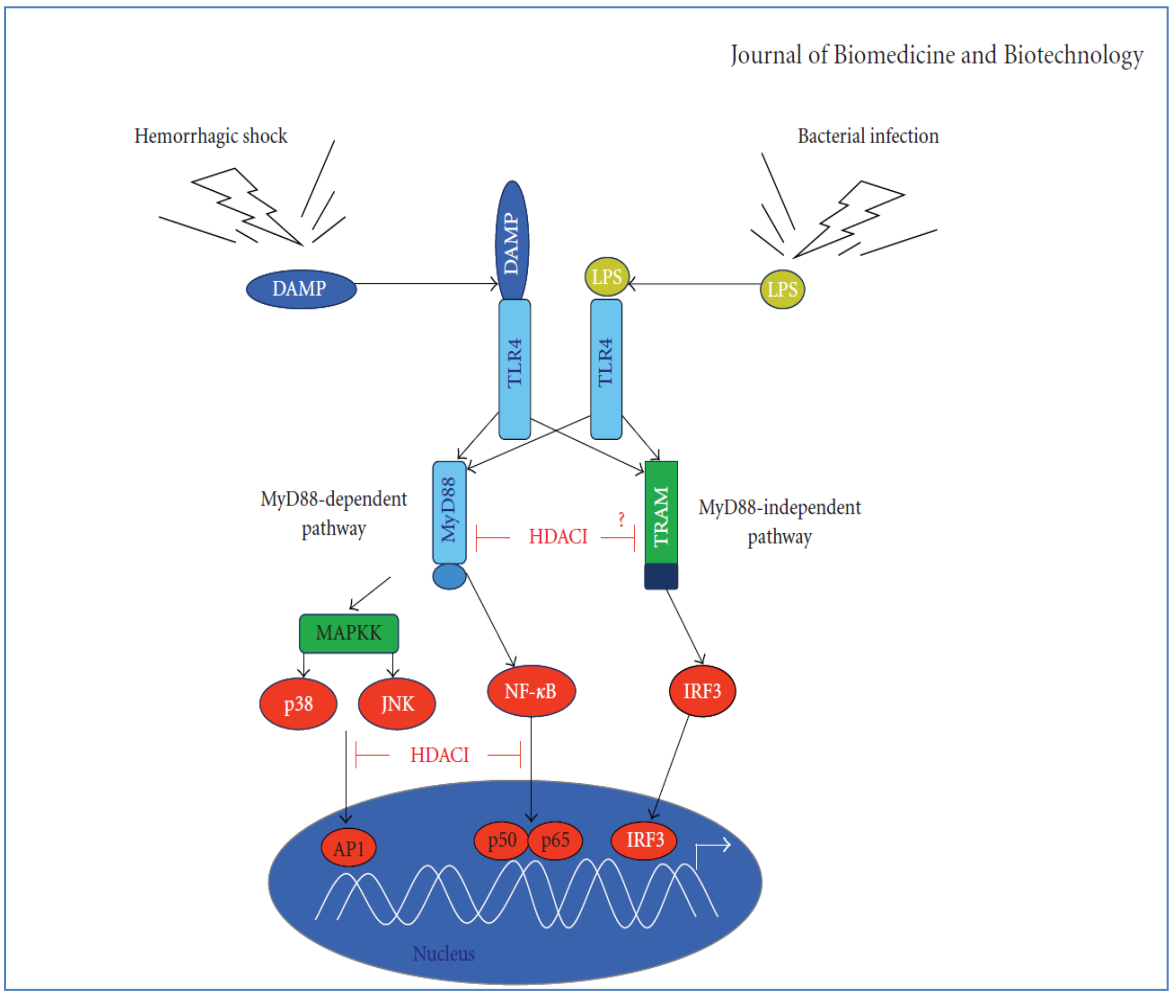


FIGURE 3: TLR4 signaling – a converged immune response pathway for hemorrhagic shock and septic shock. TLR4 not only serves as a key sensor of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) but also is proposed recently to act as a receptor for some endogenous molecules called "alarmins". HDACIs block TLR4 signaling at multiple steps; therefore, they can inhibit immune response for both hemorrhagic shock and septic shock.

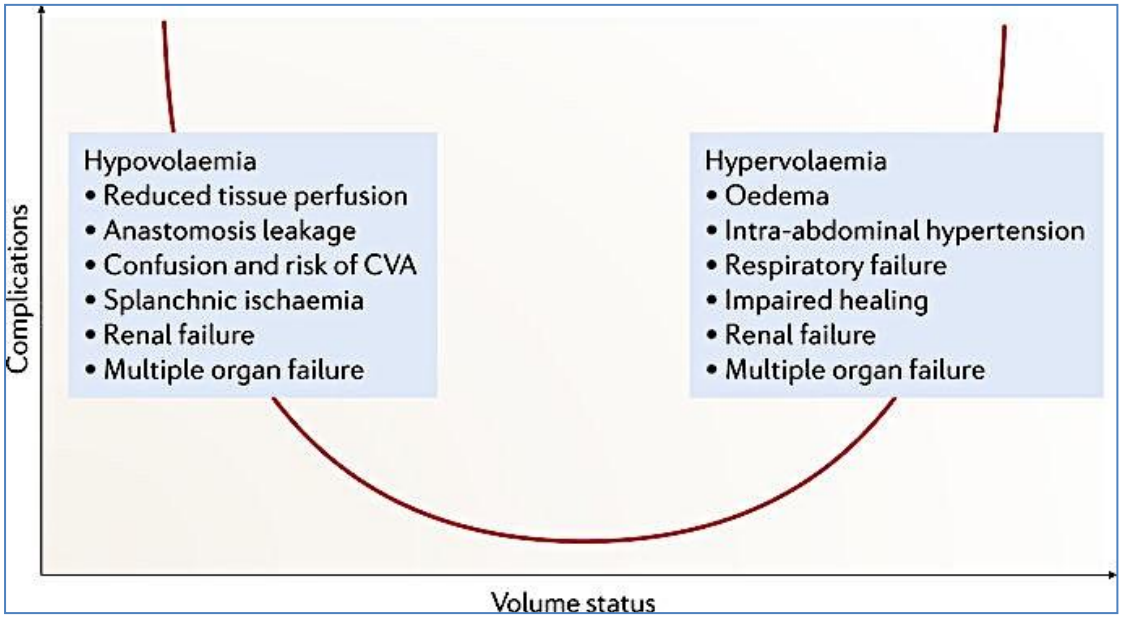
Crit Care Med 2007 Vol 35, No 10

Σχήμα 15. Ανοσοαπάντηση στη σήψη και στο SIRS

Κύριοι μηχανισμοί βλάβης οργάνων στη σήψη

Υποογκαιμία ή υπερογκαιμία στη σήψη

Η ανεπαρκής χορήγηση υγρών στη σήψη μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, κυρίως εξαιτίας μειωμένης αιμάτωσης ιστών, ενώ η υπερβολική χορήγηση υγρών μπορεί επίσης να προκαλέσει ιστική βλάβη, κυρίως εξαιτίας οιδήματος ιστών (σχήμα 16)(25).



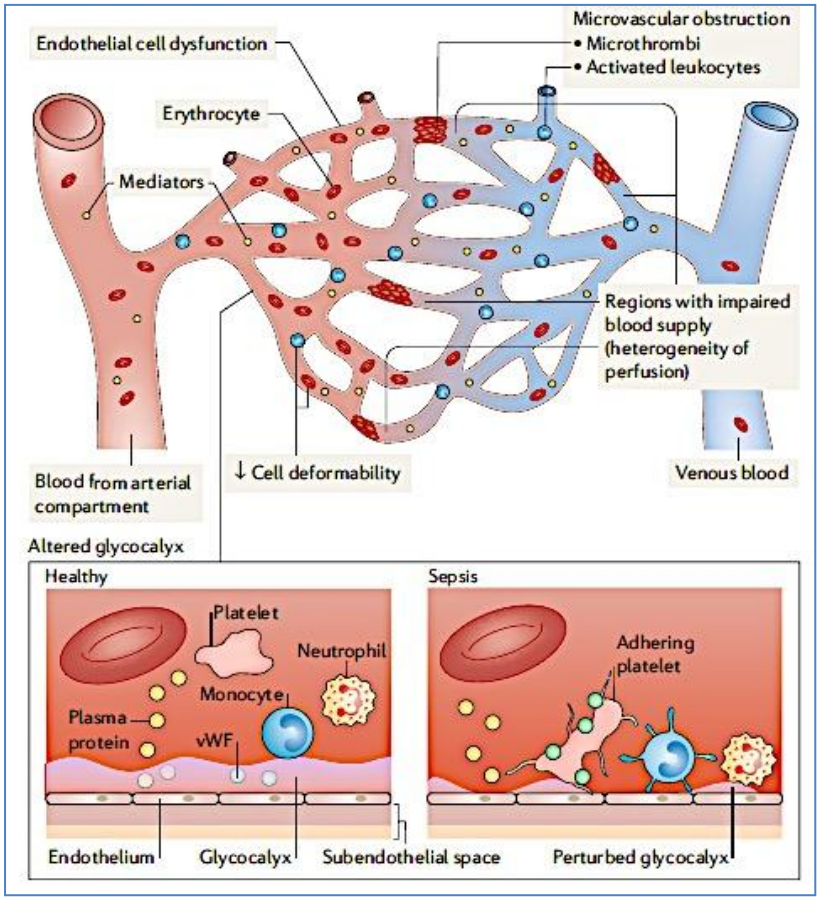
Nat Rev Nephrol. 2018 Apr 24

Σχήμα 16. Επιπλοκές λόγω υπο- ή υπερ-ογκαιμίας στη σήψη. Μηχανισμοί και θεραπεία ανεπάρκειας οργάνων στη σήψη

Μικροαγγειακές και κυτταρικές αλλοιώσεις - Τροποποιημένος γλυκοκάλυκας- Ο ρόλος των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών

Η βλάβη του ενδοθηλίου στη σήψη είναι αποτέλεσμα παραγωγής βλαπτικών παραγόντων προερχόμενων από τον ξενιστή ή/και τα παθογόνα αίτια, ελεύθερων ριζών οξυγόνου, (reactive oxygen species, ROS), μεταβολιτών αραχιδονικού οξέος, προϊόντων αναερόβιου μεταβολισμού, ενεργοποίησης του συμπληρώματος, συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, ενεργοποίησης ουδετερόφιλων και παραγωγής κυτοκινών. Τα ίδια τα ενδοθηλικά κύτταρα παράγουν μεσολαβητές φλεγμονής. Οι αλλαγές αυτές, γνωστές ως «ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων», περιλαμβάνουν τη μετατροπή του ενδοθηλίου από μια αντιπηκτική επιφάνεια σε επιφάνεια που προάγει τον πηκτικό μηχανισμό, την παραγωγή αγγειοδραστικών ουσιών, μορίων προσκόλλησης και μεσολαβητών φλεγμονής, που προκαλεί αύξηση διαπερατότητας των αγγείων, τοπικό οίδημα αλλά και υπόταση εξαιτίας της μαζικής απώλειας υγρών στον μεσοκυττάριο χώρο.

Η μικροαγγειακή δυσλειτουργία στη σήψη προκαλείται από τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου την οποία προκαλούν οι κυκλοφορούντες μεσολαβητές και ο τροποποιημένος γλυκοκάλυκας(25). Ο γλυκοκάλυκας (glycocalyx) είναι ένα λεπτό στρώμα γλυκοζαμινογλυκανών που καλύπτει την επιφάνεια του ενδοθηλίου, διευκολύνει τη ροή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και περιορίζει την πρόσφυση λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων σε αυτό. Στη σήψη ο γλυκοκάλυκας αυτός μεταβάλλεται, όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αγγειακού ενδοθηλίου και των κυκλοφορούντων κυττάρων, λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων. Τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, ενεργοποιώντας τη πήξη και τη δημιουργία μικροθρόμβων, με συνέπεια αλλαγές στη μικροκυκλοφορία, στο σχήμα των ερυθροκυττάρων και στην προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο (σχήμα 17). Όλες αυτές οι αλλαγές προκαλούν ετερογένεια στη ροή αίματος στη μικροκυκλοφορία, μείωση βατότητας αγγείων και μη αιματούμενα τριχοειδή, και διαταραχή της χρήσης οξυγόνου και του παράγοντα von Willebrand (25).



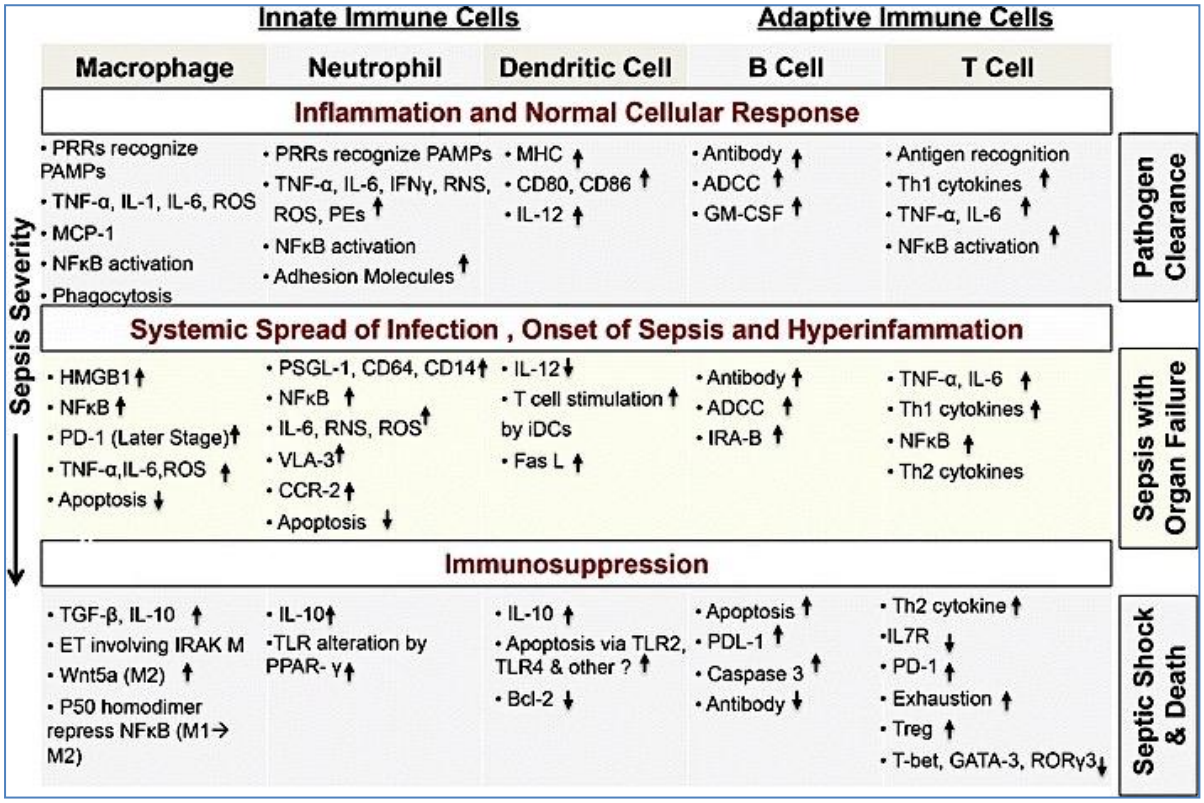
Nat Rev Nephrol. 2018 Apr 24

Σχήμα 17. Μικροαγγειακές και κυτταρικές αλλαγές στη σήψη. Μηχανισμοί και θεραπεία βλάβης οργάνων στη σήψη.

Ρόλοι κυττάρων

Κυτταρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της σήψης:

Η είσοδος και η αναγνώριση των PAMPs από τα κύτταρα του ανοποιητικού συστήματος προκαλούν έναν καταρράκτη φλεγμονωδών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ρύθμισης των μορίων προσκόλλησης, των κυτοκινών και της παραγωγής ROS. Αυτή η απάντηση, στην περίπτωση που επιτυγχάνει την εκκαθάριση των παθογόνων, εμφανίζει μια αυξημένη αντιφλεγμονώδη απάντηση και τελικά αποκατάσταση της ομοιοστασίας ιστού (σχήμα 18-άνω μέρος). Αν όμως οι ενδογενείς και προσαρμοστικές αποκρίσεις δεν καταφέρουν να περιορίσουν την συνεχιζόμενη λοίμωξη τοπικά, η λοίμωξη εξαπλώνεται συστηματικά προκαλώντας μια υπερ-φλεγμονή. Συνέχιση της λοίμωξης και της δυσλειτουργικής και τροποποιημένης κυτταρικής απάντησης, συμπεριλαμβανομένων της αλλαγής έκφρασης επιφανειακών υποδοχέων, ακατάλληλης έκκρισης φλεγμονωδών μεσολαβητών και πρόωρης απόπτωσης ορισμένων ανοσοκυττάρων, οδηγεί στην ανάπτυξη σηψαιμίας (σχήμα 18-μεσαίο μέρος) μεσαία ομάδα).



Overview of cellular changes occurring during sepsis:

PE proteolytic enzymes, *ADCC* antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, *iDCs* immature dendritic cells

Inflamm Res. 2016 Nov;65(11):853-868

Σχήμα 18. Κυτταρικές μεταβολές στη σήψη

Για να ρυθμιστεί η υπερφλεγμονή από τα ανοσοκύτταρα, ενεργοποιείται σε μεγαλύτερο ποσοστό η ανοσορυθμιστική απάντηση του σώματος οδηγώντας τελικά σε απώλεια ισορροπίας φλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους απάντησης και ανοσοκαταστολή. Διάφορες μεταβολές συμβαίνουν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς προχωρά η σήψη, από την υπερ-φλεγμονή στην ανοσοκαταστολή.

Ο ξενιστής δηλαδή έχει σχεδιαστεί να προστατεύεται από το παθογόνο, προκαλώντας ζημιά στους ιστούς και οδηγώντας σε πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο (σχήμα 18-κάτω μέρος) (23).

Τα μακροφάγα είναι τα πρώτα φαγοκύτταρα που έρχονται σε επαφή με τα παθογόνα μικρόβια και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης που ακολουθεί (27). Διεγείρονται κι απελευθερώνουν κυτοκίνες και σε συνδυασμό με άλλα κύτταρα όπως εκείνα του ενδοθηλίου των τριχοειδών και τα λευκοκύτταρα, οδηγούν σε έναν καταρράχτη απελευθέρωσης μεσολαβητών φλεγμονής (TNF-a, IL-1 και IL-6) (26).

Ουδετερόφιλα

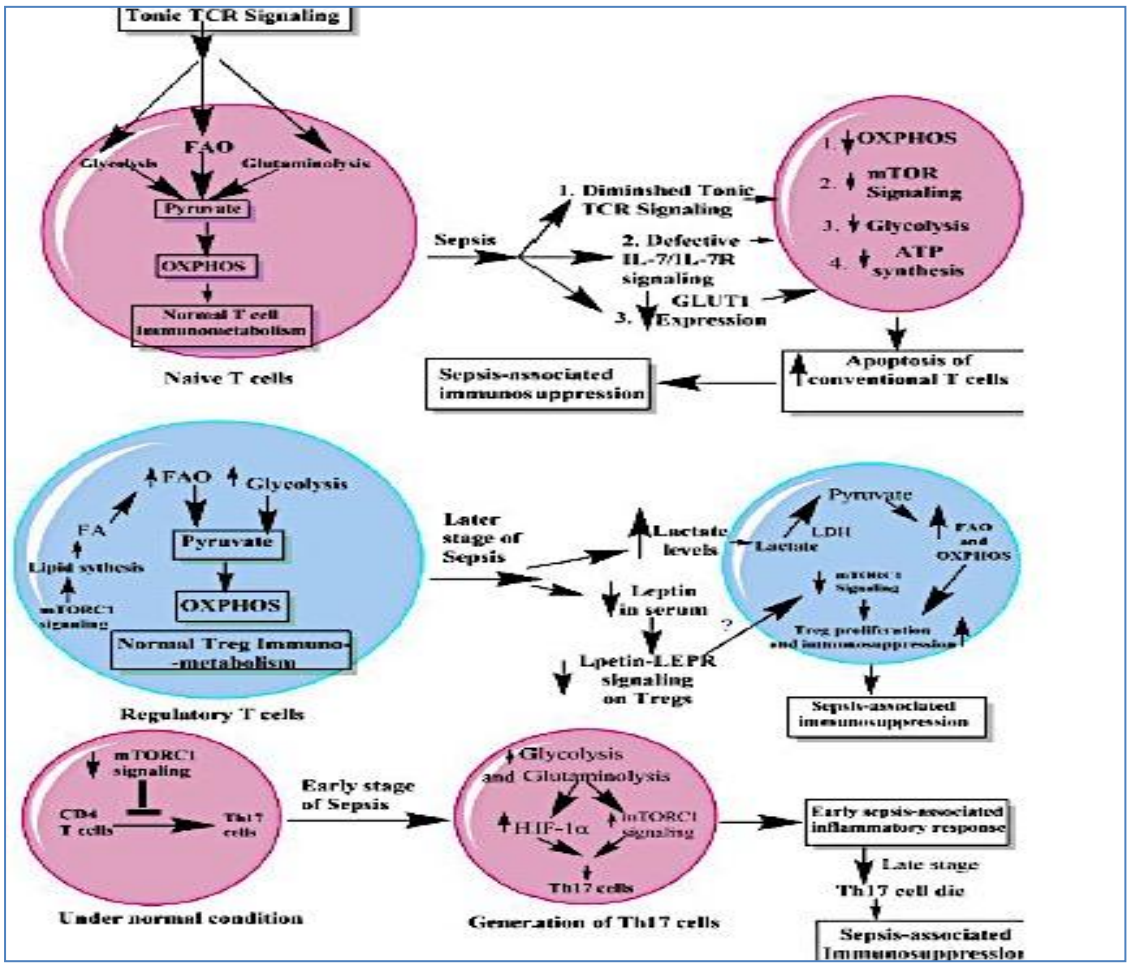
Στη σήψη, η φλεγμονώδης απάντηση του οργανισμού οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων τα οποία συγκεντρώνονται στον αυλό των τριχοειδών, τον αποφράσσουν και προκαλούν ισχαιμία. Είναι μεν αναποτελεσματικά στην άμυνα εναντίον των μικροοργανισμών, παράλληλα όμως, προκαλούν μη ελεγχόμενη συστηματική φλεγμονή εκκρίνοντας φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λυτικούς παράγοντες, βλάπτοντας παρακείμενους ιστούς, προκαλώντας έτσι δυσλειτουργία οργάνων.

Η παρουσία των ουδετεροφίλων στο σημείο της φλεγμονής, είναι απαραίτητη στην αντιμετώπιση παθογόνων και την αποφυγή συστηματικής διασποράς της φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα παράγουν μεγάλο αριθμό παραγόντων (πρωτεάσες, κυτοκίνες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) απαραίτητων για την καταστροφή των βακτηριδίων, που ωστόσο προκαλούν βλάβες και σε κύτταρα του οργανισμού. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, αφού προσκολληθούν στο ενδοθήλιο, σχηματίζουν συσσωματώματα, αποφράσουν τα μετατριχοειδικά φλεβίδια και μπορούν να προκαλέσουν ιστική ισχαιμία. Πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου από τα κύτταρα αυτά, βλάπτουν το ενδοθήλιο, προκαλούν τη δημιουργία κενών, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα του αγγείου (45)

Τ-κύτταρα

Τα Τ-λεμφοκύτταρα (σχήμα 19) είναι δυναμικά κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος (adaptive immune system), τα οποία απέκτησαν σημασία στη σήψη, εξαιτίας της απόπτωσής τους κατά τα πρώιμα στάδια της και της πρόκλησης ανοσοπαράλυσης/ανοσοκαταστολής σε μετέπειτα στάδια. Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει μια αξιοσημείωτη αλλαγή στην ανοσο-μεταβολική τους

κατάσταση και τη λειτουργία τους κατά τη διάρκεια της σήψης. Τα αυξημένα επίπεδα ROS που υπάρχουν στο περιερικό αίμα πρώιμα στη σήψη (Oliveira et al., 2017) επιδρούν στα CD4+ , CD8+ , and CD4+CD8+ T κύτταρα.



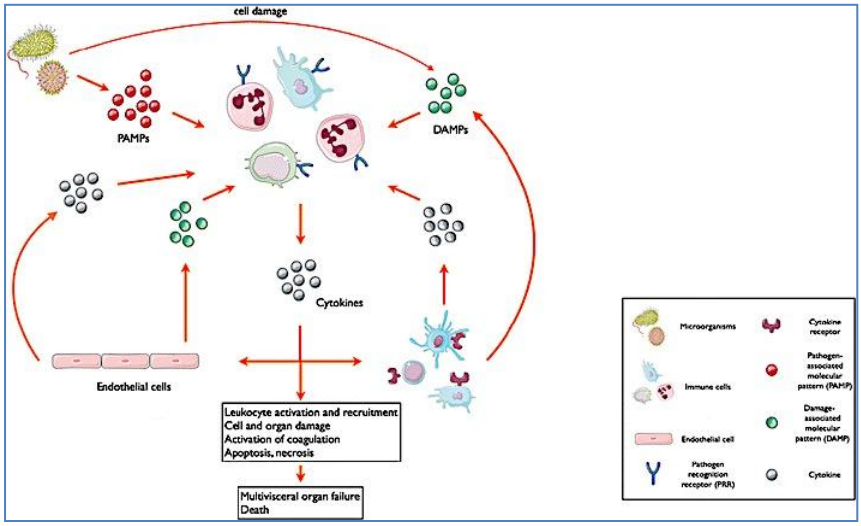
Eur J Cell Biol. 2018 May 5

Σχήμα 19. Μεταβολισμός ρυθμιστικών Τ-κυττάτων, Regulatory T-cell (Tregs) σε φυσιολογικές και συνθήκες φλεγμονής

Τα Τ-λεμφοκύτταρα έχουν μεγάλη σημασία για την προσαρμοστική ανοσία του ασθενή και επηρεάζονται μέσα στις τρεις πρώτες ώρες στη σήψη. Τα Tregs είναι εκείνα που ευθύνονται για την ανοσοκαταστολή στα όψιμα στάδια της σήψης. Επεμβαίνοντας πάνω στο μεταβολισμό των Τ-λεμφοκυττάρων είναι πιθανό να τροποποιήσουμε την πορεία της σήψης (28). Ιδιαίτερα, τα Tregs επιβιώνουν περισσότερο και προκαλούν μια μεγαλύτερης διάρκειας ανοσοκαταστολή, όπως στα όψιμα στάδια της σήψης. Έχουν άλλωστε περισσότερα μιτοχόνδρια σε σχέση με άλλα Τ-κύτταρα.

Πρόσφατα μόρια που συνδέονται με μόρια ROS– έχουν χρησιμοποιηθεί σαν βιομόρια καθορισμού θνητότητας ή πρόγνωσης σηπτικών ασθενών (Bime et al., 2016). Η

μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες έχουν επαρκώς συσχετιστεί με την πολυοργανική ανεπάρκεια στη σήψη (Galley, 2011; Rocha et al., 2012). Αντιοξειδωτικές θεραπείες έτσι που έχουν για στόχο τα μιτοχόνδρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοχεύοντας σε συγκεκριμμένες υποομάδες Τ κυττάρων σε διαφορετικά στάδια της σήψης σε μια πιο στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση σε επίπεδο κυττάρου. Στοχευμένη τροποποίηση του ανοσομεταβολισμού των Τ κυττάρων στην πρώιμη ή στην όψιμη φάση της σήψης ίσως επιφέρει μεγάλο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Πρόσφατη μελέτη πρότεινε τον επαναπρογραμματισμό των Β σε Τ κύτταρα μέσω ενός παράγοντα transcription factor called Hoxb5 (Zhang et al., 2018). Η έρευνα η στοχευμένη στον ανοσομεταβολισμό των Τ κυττάρων και στην ανοσοκαταστολή που σχετίζεται με τη σήψη φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενο πεδίο και σε άλλες σχετιζόμενες με σήψη καταστάσεις, όπως ο καρκίνος.



Semin Immunopathol. 2017;39(5):517–28

Σχήμα 20. Οι κυτταροκίνες στη σήψη

Η θύελλα των κυτοκινών που προκαλείται σε μια λοίμωξη (σχήμα 20) είναι το αποτέλεσμα ενός φαινομένου που σκοπό έχει την καταστροφή του εισβολέα και την αποκατάσταση της ομοιόστασης. Η κατανόηση της κυτταρικής αυτής απόκρισης με τις κυτοκίνες στη σήψη βρίσκεται σε συνεχιζόμενη έρευνα χωρίς να έχει γίνει ακόμη πλήρως κατανοητή. Έχουν αναγνωριστεί κάποια μόρια-κλειδιά, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, όμως κάθε προσπάθεια μείωσης του ίδιου ή άλλης κυτοκίνης δεν πέτυχε κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα σε κλινικές δοκιμές. Σε επόμενες μελέτες αναμένεται να εντοπιστούν οι ακριβείς ενεργοποιητές - το ενδοθήλιο φαίνεται να είναι ένας έγκυρος και πολλά υποσχόμενος στόχος – να υπάρξει πιθανά μια ακριβέστερη εικόνας εντός των κυττάρων και εντός των οργάνων στη λοίμωξη, ώστε να διευρυνθούν οι γνώσεις μας, και να επανεξετάσουμε τους θεραπευτικούς μας στόχους, ώστε να γίνουν πιο αποτελεσματικοί (29).

Οι κυτταροκίνες αποτελούν στοιχεία-κλειδιά στη φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζει τη σήψη. Είναι ανοσορυθμιστικά πεπτίδια με δυνατότητα φλεγμονώδους δράσης, που μεσολαβούν στην ανοσο-μεταβολική απάντηση στο ερέθισμα και συντελούν στο να οδηγήσει αυτή στην ανεπάρκεια πολλών οργάνων. Οι κυτταροκίνες διαιρούνται σε εκείνες που προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση (όπως οι TNF, IL-1και IL-8) και σε εκείνες με αντιφλεγμονώδη δράση (όπως οι IL- 3, IL-4 και IL-10). Οι κυτταροκίνες που προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, με τη μεσολάβηση των ουδετερόφιλων ή και απευθείας, προκαλούν ιστική βλάβη με τη σύνθεση ενζύμων, διεγείρουν την φλεγμονή με την παραγωγή ουσιών, όπως οι προσταγλανδίνες και οι λευκοτριένες, και δρουν χημειοτακτικά προς τα ουδετερόφιλα. Οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δρουν κυρίως αναστέλλοντας από τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα την απελευθέρωση των κυτταροκινών που προάγουν την φλεγμονή.

Heat Shock Proteins, HSPs

Μεταξύ των πρωτεϊνών του στρες (Heat Shock Proteins, HSPs), η τσαπερόνη HSP72 έχει δειχθεί να ασκεί προστατευτική αντιφλεγμονώδη δράση μετά από έκθεση σε ενδοτοξίνη, υπερπυρεξία και σήψη σε κυτταρικούς πληθυσμούς και ζωικά μοντέλα σήψης (30). Η ενδογενής HSP72 τροποποιεί την έκφραση των ελεγχόμενων γονιδίων του NF-κB κατά τη διάρκεια της σήψης, ενώ η εξωγενής HSP70 μπορεί να ενισχύσει την φλεγμονώδη ανταπόκριση.

Η HSP90α, η αφθονότερη ενδοκυττάριος πρωτεΐνη, ασκεί μια παρόμοια δράση τσαπερόνης εξασφαλίζοντας τη σωστή δομή των πρωτεϊνών και τη μεταφορά ενδοκυττάριων σημάτων (31). Η HSP90 σχετίζεται με την κινάση IκB (IKK). Αναστολείς της HSP90 προκαλούν τη διάσπαση των παραπάνω συμπλόκων, εμποδίζοντας την NF-kB και τη φλεγμονώδη διαδικασία κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων.

Οι HSP72, HSP90α εξέρχονται από τα κύτταρα σε καταστάσεις στρες στον εξωκυττάριο χώρο διεγείρουν την προ και αντι-φλεγμονώδη διαδικασία (32) και σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου, την οργανική ανεπάρκεια και θνητότητα (33).

Αντιποκίνες

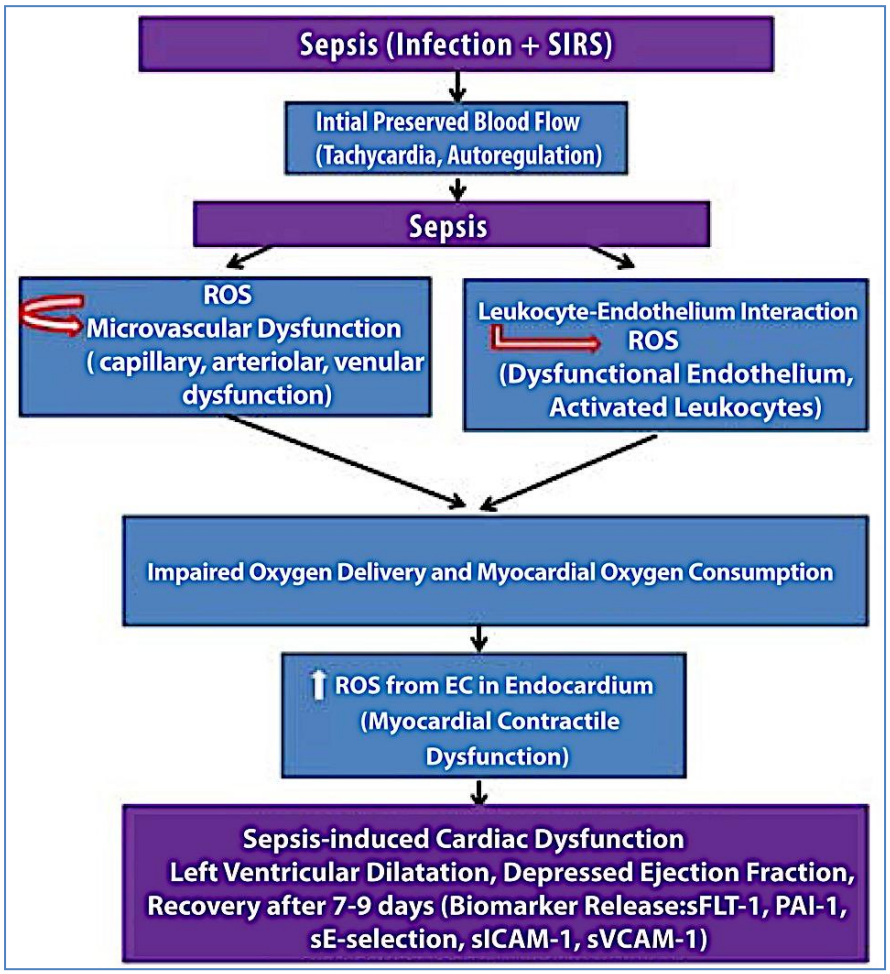
Παράλληλα με την ενδογενή ανοσία που χαρακτηριστικά εκφράζεται με τις HSPs, το ενδοκρινικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απάντηση στο στρες. Εντούτοις, οι ορμόνες που προέρχονται από το λιπώδη ιστό, οι αντιποκίνες, με εξαίρεση τη λεπτίνη (34) δεν έχουν μελετηθεί στη σήψη. Οι αντιποκίνες ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κι έχουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό σύστημα (72). Συγκεκριμένες αντιποκίνες μάλιστα όπως η ρεζιστίνη (resistin) προέρχονται από ανοσοκύτταρα και μεταβολές των επιπέδων του πιθανώς σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απάντηση (35). Έχει επίσης περιγραφεί ότι η αντιπονεκτίνη (adiponectin) σχετίζεται με τη

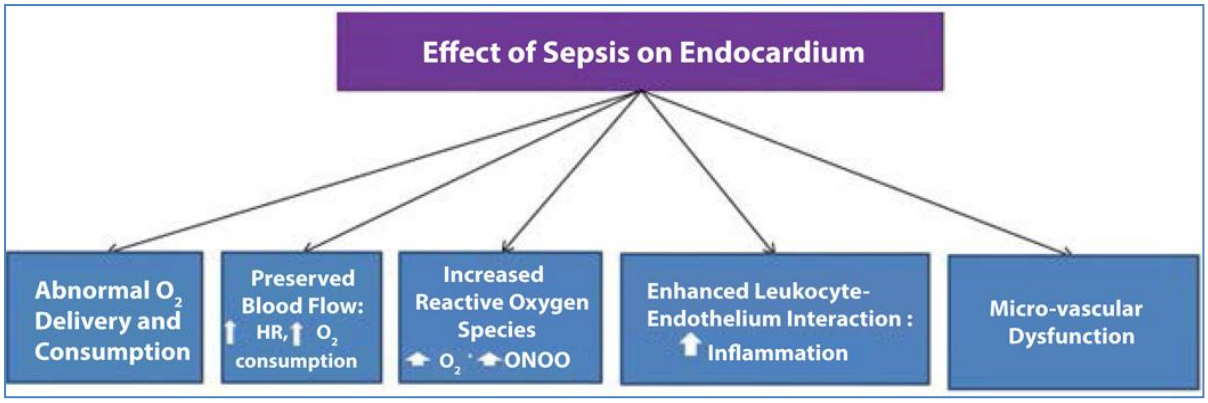
σοβαρότητα της νόσου και το βαθμό φλεγμονώδους απάντησης, όμως για καμία από αυτές δεν υπάρχουν μελέτες με διαχρονικές μετρήσεις στη σοβαρή νόσο (74).

Μεσολαβητές φλεγμονής

Δραστικές ενώσεις οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS)

Η ομάδα αυτή παράγωγων ουσιών του οξυγόνου περιλαμβάνει την ανιονική ρίζα του υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τη ρίζα του υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του αζώτου. Οι ενώσεις αυτές στα θηλαστικά παράγονται από τα λευκοκύτταρα σαν αμυντικός μηχανισμός ενάντια σε λοιμογόνους μικροοργανισμούς και προκαλούν νέκρωση βλάπτοντας την κυτταρική τους μεμβράνη(48). Η δράση των ενώσεων αυτών συσχετίζεται με τη σήψη, το σύνδρομο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης και το σύνδρομο πολυοργανικής ανεπάρκειας. Στην επίμονη φλεγμονώδη σηπτική διαδικασία, η αύξηση παραγωγής ROS από το ενδοθήλιο οδηγεί σε μικροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η διαταραχή της αλληλεπίδρασης ενδοθηλίου-λευκοκυττάρου επιτείνει τη μικροαγγειακή δυσλειτουργία και την παραγωγή ROS, επιδεινώνει τη σήψη και οδηγεί σε άνιση για τις ανάγκες του κατανομή οξυγόνου στο σηπτικό μυοκάρδιο, επιδείνωση της συσταλτικότητας του και καρδιακή δυσλειτουργία (σχήμα 21)(36).





J Intensive Crit Care. 2016;2(1)

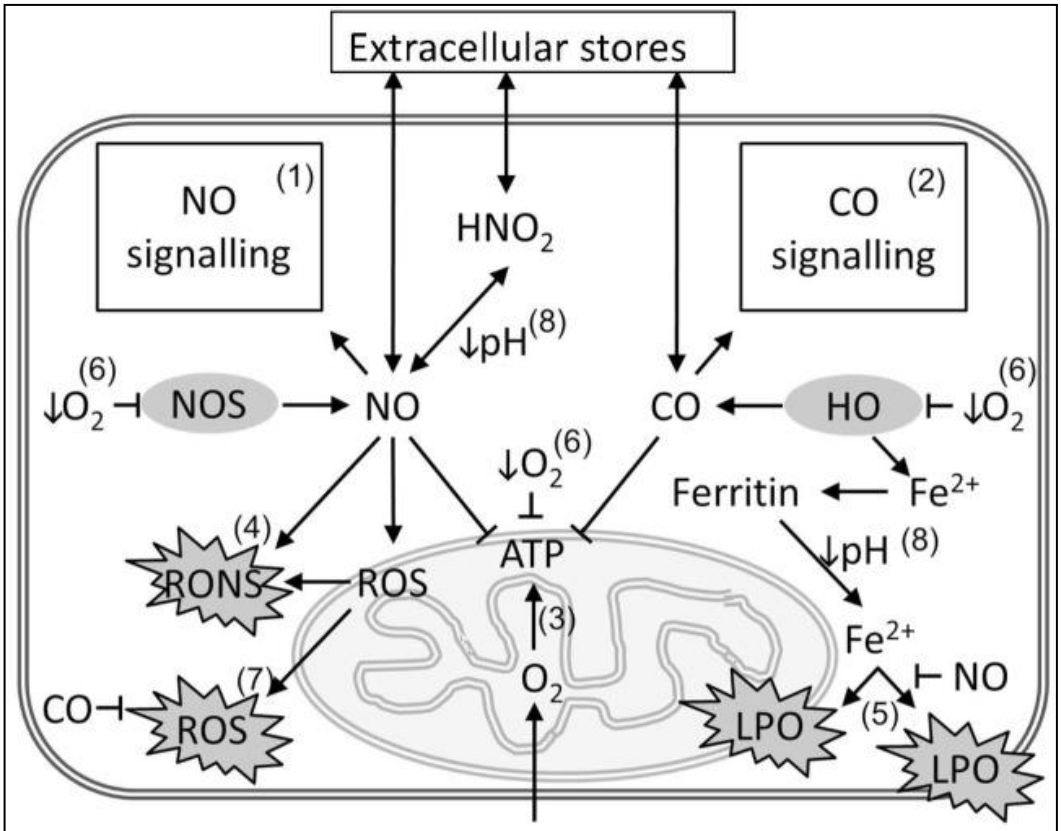
Σχήμα 21. Καρδιακή δυσλειτουργία στη σήψη σαν αποτέλεσμα δυσλειτουργίας ενδοθηλίου

Η διαλυτή κινάση τυροσίνης soluble fms-like tyrosine kinase/sVEGFR1 (sFlt-1), αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), sE- σελεκτίνη, διαλυτό μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης (sICAM-1) (sVCAM-1) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν υποψήφιοι βιοδείκτες καρδιακής δυσλειτουργίας (36).

Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και Μιτοχόνδρια

Αυξημένη παραγωγή NO εμπλέκεται στην παθογένεια της σήψης. Το NO αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μόρια που προκαλεί καταστολή του μυοκαρδίου και αγγειοδιαστολή ανθεκτική στα αγγειοσυσπαστικά (37). Η έκβαση στη σοβαρή νόσο όπως στη σήψη, στο αιμορραγικό σοκ ή στο τραύμα συνδέεται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προκαλείται από τη δραση του νιτρικού οξειδίου (NO) (σχήμα 22) και μονοξειδίου του άνθρακα (CO), που σχηματίζονται στα κύτταρα μέσω της NO συνθάσης (NOS) και της οξυμεράσης της αίμης (HO), αντίστοιχα. Μεγάλος αριθμός παραγόντων σχετίζονται με την παθολογία στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τέσσερις σημαντικοί παράγοντες επηρεάζουν άμεσα τις επιδράσεις των NO και CO στα μιτοχόνδρια: (i) η τοπική συγκέντρωση NO και/ή CO, (ii) η οξυγόνωση του ιστού, (iii) η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων όσον αφορά τη διευκόλυνση ή την αναστολή σχηματισμού αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και (iv) ο βαθμός οξέωσης του ιστού. Ο συνδυασμός αυτών των τεσσάρων παραγόντων καθορίζει εάν οι επιδράσεις του NO και του CO, σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, είναι ευεργετικές ή επιβλαβείς (38).
Το σχήμα απεικονίζει τις πιθανές αλληλεπιδράσεις NO και CO με τα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με παράγοντες που σχετίζονται με τη σοβαρή νόσο. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση NO και CO καθορίζεται από τη δραστικότητα αντίστοιχων ενζύμων NOS και HO και από τη διάχυση τους από ή προς εξωκυττάριες αποθήκες. Τα NO και CO εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια (1 και 2) όπως η ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης, οι δίαυλοι ιόντων και η ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων κλπ. Και τα δυο

αυτά μόρια μπορούν να αναστείλλουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή (3), ανταγωνιζόμενα τη σύνδεση του O στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX).



Condition		Intracellular signalling via		Mitochondrial respiration (3)	Oxidative Stressor/ oxidative damage	
		NO (1)	CO (2)		ONOO(4)	Fenton reaction(5)
Basic NOS/HO activity		↑	↑	(↓)	+/-	+/-
in combination with	↓ O_2(6)	(↑)	(↑)	↓↓	+/-	+/-
	↑ROS(7)	(↓)	↑	(↓)?	↑	↑
	↓pH(8)	↑(↑)	↑(↑)	↓	+/-	↑↑
High NOS/HO activity		↑↑	↑↑	↓↓	+/-	+/-
in combination with	↓ O_2(6)	↑↑(↑)	↑↑	↓↓↓	+/-	+/-
	↑ROS(7)	↑	↑↑	+/-	+/-	↑
	↓pH(8)	↑↑↑	↑↑(↑)	↓↓↓	↑	↑

Front Med (Lausanne). 2017; 4: 223

Σχήμα 22. Παθολογική επίδραση NO και CO στα μιτοχόνδρια σε ασθένειες με σοβαρή νόσο. Ενδοκυττάρια δράση NO και CO στην αναπνοή των μιτοχονδρίων. Δημιουργία οξειδωτικού στρες και τις επιδράσεις οξειδωτικών παραγόντων στρες. Δυσλειτουργία οργάνων που σχετίζεται με δυσλειτουργία μιτοχονδρίων σε φλεγμονή ή τραύμα

Το NO σε συνδυασμό με τα αντιδραστικά μόρια οξυγόνου (ROS) μέσω δημιουργίας υπεροξυνιτρίτη, καταστρέφει διάφορα βιομόρια (4). Το ελεύθερο ιόν σιδήρου επάγει την υπεροξείδωση λιπιδίων (LPO) μέσω της αντίδρασης Fenton (5) παρουσία ROS. Με τον

σχηματισμό νιτροζυλικών ειδών, το NO μπορεί να αποτρέψει οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τον σίδηρο. Η έλλειψη O_2 που προκύπτει από την υποξία των ιστών (↓ 0_2) επιβραδύνει όλες τις εξαρτώμενες από οξυγόνο αντιδράσεις (6) και οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό ATP. Στην υποξία επίσης μειώνεται η ενδοκυτταρική παραγωγή NO και CO και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα NO και CO μειώνονται επίσης, η υψηλή κατανάλωση οξυγόνου μετατοπίζει την ισορροπία προς την αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής μέσω NO και CO. Ενδοκυττάρια παραγωγή ROS μπορεί να προέρχεται από μιτοχόνδρια που δυσλειτουργούν, ειδικά παρουσία αυξημένων επιπέδων NO ή από μη μιτοχονδριακές πηγές, με προ-οξειδωτικές βλαπτικές επιδράσεις (7). Αυτές μπορεί να περιορίζονται από τα προϊόντα HO αντίδρασης CO και biliverdin / χολερυθρίνης. Η οξέωση (↓ pH) (8), δευτεροπαθώς της υποξίας των ιστών, ευνοεί τον σχηματισμό νιτρικού οξέος από προϊόντα οξείδωσης NO, όπως νιτρώδη ή νιτρικά άλατα, επιτρέποντας τη διάχυση σε μεμβράνες. Το χαμηλό pH επηρεάζει τον βαθμό συγγένειας CO στο μόριο της αίμης. Μειωμένη συγγένεια με την αιμοσφαιρίνη (αποθήκη του CO) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου CO και αυξημένη πιθανότητα αναστολής της αναπνοής των μιτοχονδρίων. Στον πίνακα γίνεται προσπάθεια να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα των παραγόντων που σχετίζονται με τη σοβαρή νόσο, όπως η υποξία και η οξέωση των ιστών, η αυξημένη παραγωγή ROS (↑ ROS) και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αερίων NO και CO με τα μιτοχόνδρια (37).

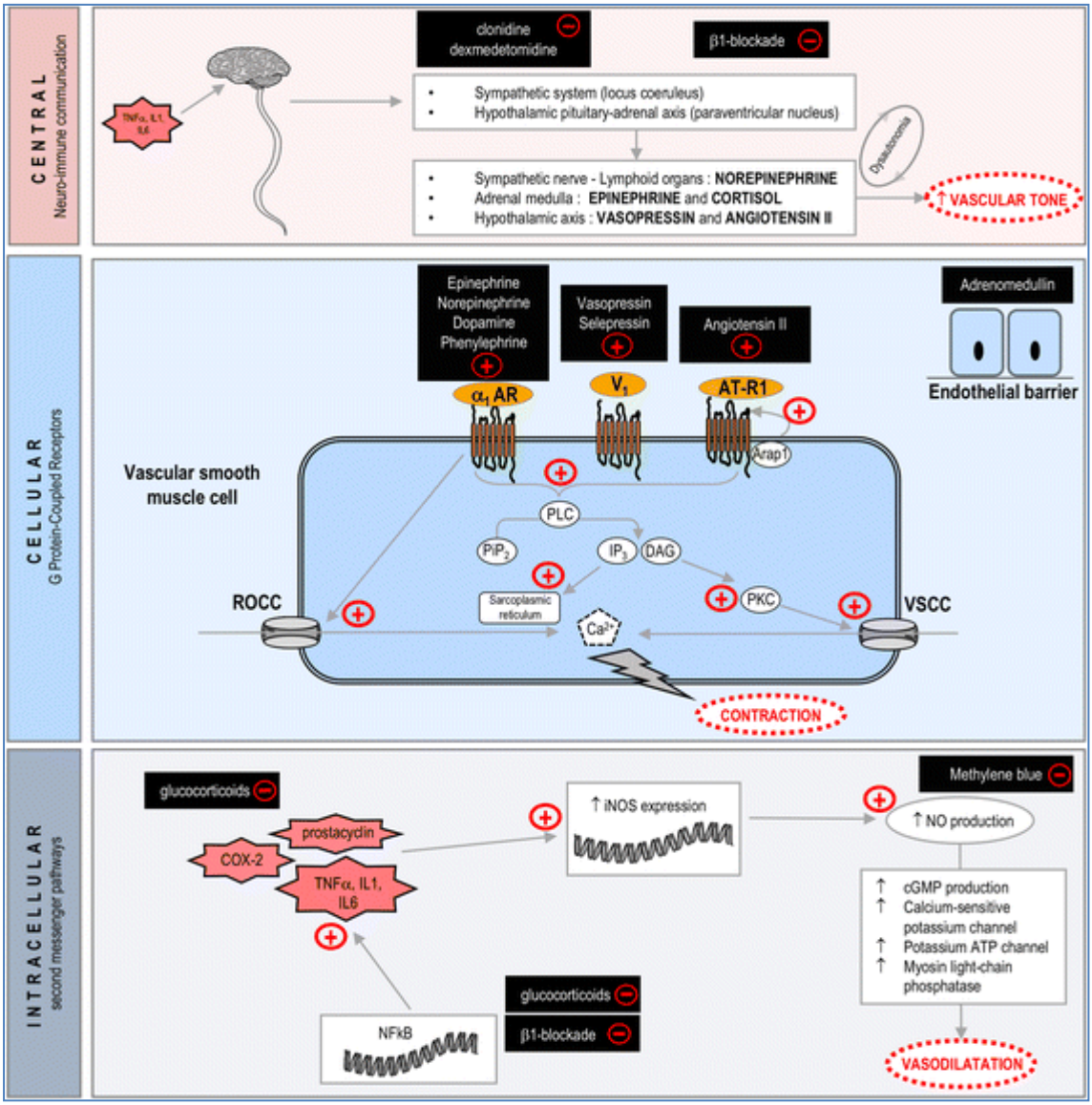
NO και αγγειοπαράλυση

Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση του τόνου των αγγείων κατά τη διάρκεια της αγγειοπαράλυσης και θεραπευτικές επιλογές σε κεντρικό, κυτταρικό και ενδοκυτταρικό επίπεδο φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 23.

Κεντρικό επίπεδο. Φλεγμονώδεις διεγέρτες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF), ιντερλευκίνη (IL)-1 και IL-6 ενεργοποιούν το νευρο-ανοσοποιητικό σύστημα. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην παραγωγή νορεπινεφρίνης, επινεφρίνης, κορτιζόλης, βαζοπρεσσίνης και έμμεσα αγγειοτενσίνης που αλληλεπιδρούν για τη αγγειοπαράλυση. Υπερενεργοποίηση αυτού του συστήματος μπορεί να αντιμετωπιστεί με α2 αγωνιστές και επιλεκτικούς β1 αναστολείς.

Κυτταρικό επίπεδο. Οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς G εμπλέκονται κυρίως στη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων: των αγγείων: α_1 αδρενοϋποδοχείς ($\alpha_1 AR$), υποδοχείς αγγειοπιεστίνης 1 (V1R) και υποδοχείς αγγειοτενσίνης τύπου 1 (AT-R1). Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC) με δημιουργία ινοσιτόλης 1,4,5 τριφωσφορικής (IP3) και διακυλογλυκερόλης (DAG) από διφωσφορικό φωσφατιδυλο ινοσιτόλη 4,5 Η DAG διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί διαύλους ασβεστίου, ενώ το IP3 ενεργοποιεί τα κανάλια ασβεστίου του σαρκοπλασμικού δικτύου. Το α1ARs αυξάνει το ενδοκυτταρικό ασβέστιο μέσω υποδοχέων- (ROCC). Οι διαθέσιμες θεραπείες σε αυτό το επίπεδο είναι η επινεφρίνη, η νορεπινεφρίνη, η ντοπαμίνη, η

φαινυλεφρίνη, η σελεκτρίνη, η αγγειοπιεστίνη (V1) και η αγγειοτενσίνη ΙΙ. Η αδρενομεδουλίνη δρα κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



Crit Care Lond Engl. 2018 Feb 27;22(1):52

Σχήμα 23. ΝΟ και αγγειοπαράλυση

<u>Ενδοκυττάριο επίπεδο</u>. Η μετατόπιση του παράγοντα-κΒ (NF-κB) στον πυρήνα επάγει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτές οι κυτοκίνες ενισχύουν την έκφραση συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) και την υπερπαραγωγή ΝΟ. Αυτό το μόριο ενεργοποιεί την παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης ως μεσολαβητή αγγειοδιαστολής. Διαθέσιμη θεραπεία εδώ είναι τα γλυκοκορτικοειδή, β_1 blockade, and methylene blue. Vascular sensitive calcium channel (*VSCC*) (39)

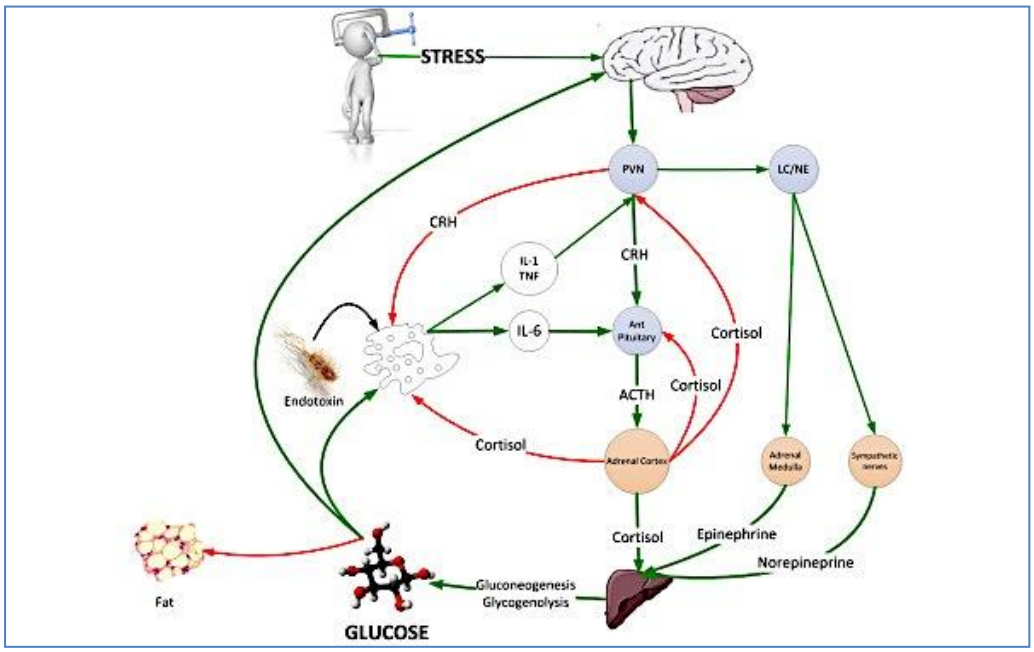
Λιπιδικοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές)

Στη σοβαρή νόσο έχουμε μειωμένη απορρόφηση λίπους και η λιπόλυση λιπώδους ιστού οδηγεί σε αύξηση επιπέδων τριγλυκεριδίων. Στη σήψη η λιποπρωτεϊνη υψηλής πυκνότητας (High-density lipoprotein) και η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας low-density lipoprotein μειώνονται λόγω της εξασθένισης της ακυλοτρανσφεράσης της λεκιθίνης-χοληστερόλης. Το λιπιδαιμικό προφίλ στους σηπτικούς ασθενείς, μπορεί να προβλέψει την επιβίωση. Μη επιβιώσαντες είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL και LDL. Οι μη επιβλαβείς ουσίες έχουν χαμηλότερα επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας και λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας. Σε μελέτες μεταβολισμού, οι περισσότερες από τις αλλαγές από την έναρξη σε σηπτικούς ασθενείς σχετίζονταν με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Το λιπιδαιμικό προφίλ παραμελείται πάρα πολύ συχνά στην κλινική πράξη, παρά την αυξανόμενη γνώση πάνω στις τροποποιήσεις που σχετίζονται με την σηπτική κατάσταση και τη σημασία αυτών στην πρόγνωση των ασθενών. Η χορήγηση λίπους (εντερικά ή παρεντερικά) θα πρέπει να καθοδηγείται από καλύτερη γνώση του μεταβολισμού των λιπιδίων από τον ασθενή (40).
Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το προφίλ των λιπιδίων σε σοβαρά άρρωστα παιδιά με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονής. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στα παιδιά υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της φλεγμονής και της συνολικής χοληστερόλης, της high-density lipoprotein, και της apolipoprotein A-1 Έτσι αυτές οι λιποπρωτείνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά σαν βιοδείκτες για τη σήψη (41). Σε παιδιά που εισάγονται σε μονάδα εντατικής θεραπείας με σοβαρή σήψη ή σηπτική καταπληξία, οι συγκεντρώσεις TC, HDL-C και LDL-C ήταν χαμηλότερες σε σχέση με ομάδα ελέγχου (control). Αυτές οι μειώσεις των λιποπρωτεϊνών συνοδεύονταν από μειώσεις και των επιπέδων απολιποπρωτεϊνης. Οι αλλαγές αυτές υποχωρούσαν καθώς μειωνόταν η αντιφλεγμονώδης απάντηση στους ασθενείς. Συνεπώς αυτές οι λιποπρωτεϊνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά σαν βιοδείκτες στη σήψη (41).

Ορμονικές και μεταβολικές αλλαγές σαν απάντηση στο στρες

Στο στρες συμβαίνει μια ενεργοποίηση ορμονών από τον οργανισμό, με σκοπό μια απάντηση “flight or fight”, να ‘φύγει’ δηλαδή ο οργανισμός ή να παλέψει, μαζί με όλες τις καταβολικές ορμόνες τη γλυκαγόνη, τη κορτιζόλη και τις κατεχολαμίνες, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη. Η ενεργοποίησή τους επιτρέπει στον οργανισμό να χρησιμοποιήσει αποθηκευμένα συστατικά προκειμένου να καλύψει τις υψηλές ενεργειακές του ανάγκες. Η γλυκαγόνη αυξάνει την παραγωγή γλυκόζης, διεγείροντας την ηπατική γλυκογονόλυση. Η κορτιζόλη αυξάνει τη γλυκονεογένεση και την κινητοποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση λόγω αυξημένου καταβολισμού των σκελετικών μυών. Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν το μεταβολικό ρυθμό, διεγείρουν τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ και στους μύες, καθώς και τη γλυκονεογένεση, και απελευθερώνουν λιπαρά οξέα από τον λιπώδη ιστό. Διεγείρουν δε την έκκριση της γλυκαγόνης από το πάγκρεας.

Η νευροενδοκρινική απάντηση στο στρες χαρακτηρίζεται από γλυκονεογέννεση και γλυκογονόλυση, οδηγώντας σε υπεργλυκαιμία παρέχοντας έτσι ενέργεια στο ανοσοποιητικό σύστημα και στον εγκέφαλο (σχήμα 24).



ACTH, adrenocorticotrophic hormone; CRH, corticotrophin releasing hormone; LC/NE, locus ceruleus norepinephrine system; PVN, paraventricular nucleus

Crit Care. 2013; 17(2): 305

Σχήμα 24. Ορμονικές αλλαγές στο στρες

Υπεργλυκαιμία του στρες εμφανίζεται συχνά στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς, σαν συνδυαστικό αποτέλεσμα των παραπάνω ορμονών, που αυξάνουν την ηπατική παραγωγή γλυκόζης μέσω γλυκογονόλυσης και γλυκονεογένεσης. Παράγοντας που επίσης συμβάλλει στην εκδήλωση της υπεργλυκαιμίας είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με σοβαρή νόσο. Η υπεργλυκαιμία από στρες οφείλεται κυρίως σε αύξηση της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης και όχι σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς. Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, ήπια έως μέτρια υπεργλυκαιμία του στρες και αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να παίζουν προστατευτικό ρόλο στην εξασφάλιση της επιβίωσης (42) (43).

Μεταβολικές διαταραχές στη σοβαρή νόσο

Σύμφωνα με τη φυσιολογία και τη νευροενδοκρινολογία, το στρες διαταράσσει την ισορροπία σε έναν οργανισμό, απειλώντας την ομοιόστασή του. Σε καταστάσεις στρες (λοίμωξη, τραύμα, χειρουργείο, έγκαυμα) δίνεται προτεραιότητα σε εκείνες τις μεταβολικές διεργασίες που έχουν άμεση σημασία για τη διατήρηση της ζωής του ασθενούς, καθυστερώντας άλλες όπως η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή και η μακροχρόνια ανοσία (35). Το μεταβολικό προφίλ επηρεάζεται σημαντικά στη σοβαρή λοίμωξη. Η

γρήγορη διάσπαση των ενεργειακών αποθεμάτων του σώματος (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπος), η υπεργλυκαιμία με τη συνοδό αντίσταση στην ινσουλίνη, το αρνητικό ισοζύγιο αζώτου και η στροφή στην παραγωγή δομικών πρωτεϊνών, αποτελούν τα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού στη σήψη. Οι μεταβολικές αυτές αλλαγές που παρατηρούνται στους σηπτικούς ασθενείς επικρατούν με τον όρο «σηπτικός αυτοκαννιβαλισμός». Μεσολαβητές στις διαταραχές αυτές είναι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNFa, IL-1, IL-6), ενώ η επαγωγή κατεχολαμινών, κορτιζόλης και γλυκαγόνου από τις κυταροκίνες αποτελεί εξίσου σημαντικό μηχανισμό. Το αποτέλεσμα αυτών των μεταβολικών διαταραχών είναι η εμφάνιση σοβαρής διαταραχής της θρέψης που μπορεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα θνητότητας. Η υποθρεψία επηρεάζει την ανοσολογική κατάσταση του ασθενή και την ικανότητά του να αναπτύσσει επαρκή φλεγμονώδη αντίδραση έναντι των μικροοργανισμών. Τροποποιήσεις του μεταβολισμού στους σηπτικούς ασθενείς εμποδίζουν την αποτελεσματική χρήση της εξωγενώς χορηγούμενης γλυκόζης και των πρωτεϊνών επιτρέποντας έτσι τον καταβολισμό. Η σοβαρή νόσος μετά από μια αρχική περίοδο υπομεταβολισμού στη οξεία φάση του στρες (44) , ακολουθείται στη φάση ανάρρωσης από μια υπερμεταβολική κατάσταση που σχετίζεται με την ενεργοποίηση διαφόρων καταβολικών ορμονών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας (energy expenditure, EE) με κίνδυνο υποθρεψίας (25). Η υποθρεψία έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με αυξημένη παραμονή στο νοσοκομείο, αυξημένη συχνότητα επιπλοκών όπως λοιμώξεις και ανεπάρκεια οργάνων και αυξημένη θνητότητα (45) (46). Η υπερβολική χορήγηση έχει επίσης σχετιστεί με διάφορες επιπλοκές, όπως η υπεργλυκαιμία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η ηπατική στεάτωση, η αζωθεμία, η υπερκαπνία και ο αυξημένη θνητότητα (47) (48).

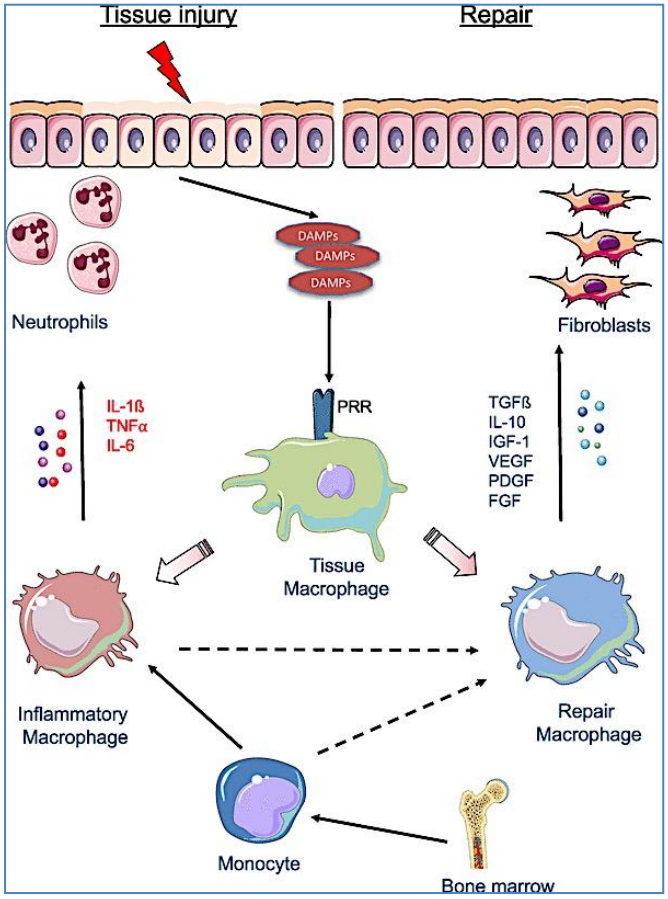
Αμινοξέα

Ο μεταβολισμός των αμινοξέων σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς αποτελεί θέμα εκτεταμένης έρευνας στους ενήλικες την τελευταία δεκαετία (49) (50), ενώ δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι ακριβείς απαιτήσεις αμινοξέων στις διάφορες φάσεις του στρες στη σήψη στα παιδιά (79). Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η γλουταμίνη σε καταστάσεις στρες απελευθερώνεται από τους μυς σε μεγάλες ποσότητες ώστε να παράσχει ζωτική ενεργειακή πηγή σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα ανοσοκύτταρα και κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και να αποτελέσει την κύρια πηγή σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος, νιτρικού οξέος (nitric oxide, NO), και του αντιοξειδωτικού γλουταθειόνη (51). Οι ευεργετικές ανοσο-ενισχυτικές επιδράσεις της γλουταμίνης που έχουν δειχθεί και σε ζωικά μοντέλα σήψης, ασκούνται μέσω της διέγερσης των HSPs (52), δεν έχουν όμως μέχρι σήμερα επιβεβαιωθεί σε κλινικές μελέτες σε παιδιά και βρέφη με σήψη (53). Πρόσφατη παιδιατρική μελέτη της επίδρασης της γλουταμίνης στο οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονώδη απάντηση σε σοβαρά άρρωστα παιδιά, έδειξε ότι η προσθήκη της διεγείρει τα επίπεδα HSP72, χωρίς να επηρεάζει τις ιντερλευκίνες 6 και 10 (54) (10).

ΤΡΑΥΜΑ

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ SIRS ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΑΥΜΑ

Το σοβαρό τραύμα συνοδεύεται από εκσεσημασμένη ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Οι πολυτραυματίες αναπτύσσουν σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Σε κυτταρικό επίπεδο η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και η νέκρωση των κυττάρων οδηγεί στην απελευθέρωση ενδογενών "damage-associated molecular patterns" (DAMPs), μόρια κινδύνου που σχετίζονται με τη βλάβη, τα οποία και διεγείρουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η φλεγμονή που συμβαίνει στο τραύμα ονομάζεται άσηπτη φλεγμονή, μια και συμβαίνει απουσία διεισδυτικών παθογόνων (σχήμα 25) (59).



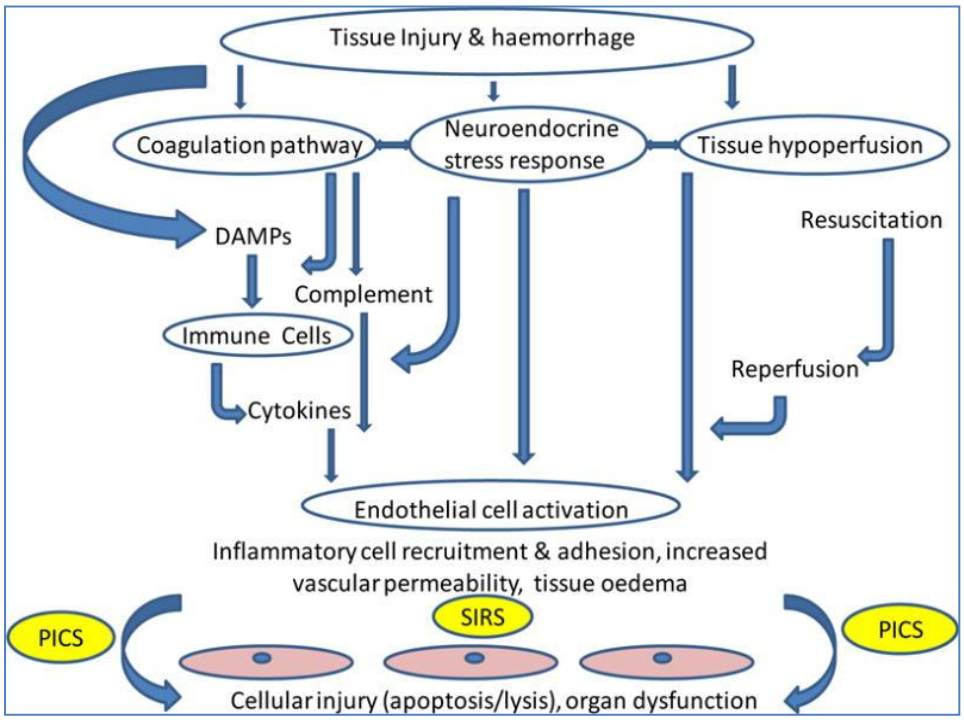
DAMP damage-associated molecular pattern, *IL-1ß* interleukin 1ß, *TNF-α* tumor necrosis factor α, *IL-6*interleukin 6, *PRR* pattern recognition receptor, *TGF-ß* transforming growth factor ß, *IL-10* interleukin 10, *IGF-1* insulin-like growth factor 1, *VEGF* vascular endothelial growth factor, *PDGF* platelet-derived growth factor, *FGF* fibroblast growth factor

Eur J Trauma Emerg Surg. 2018 Apr 17

Σχήμα 25 . Παθοφυσιολογία στο τραύμα

Μονοπάτια που οδηγούν σε καταστροφή ιστών και οργάνων μετά από τραύμα

Η βλάβη των ιστών και η αιμορραγία στο τραύμα, η μειωμένη αιμάτωση ιστών, η ενεργοποίηση της πήξης και διαφόρων νευροενδοκρινικών οδών οδηγούν σε απώλεια της ακεραιότητας και ενεργοποίηση των κυττάρων του ενδοθηλίου, επιτρέποντας σε κυτταρικούς και άλλους παράγοντες να καταστρέψουν ιστούς ακόμα και μακριά από το σημείο του αρχικού τραυματισμού, οδηγώντας σε σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) και σε πολυοργανική ανεπάρκεια μέσω διαφόρων οδών (55)(56) (σχήμα 26).

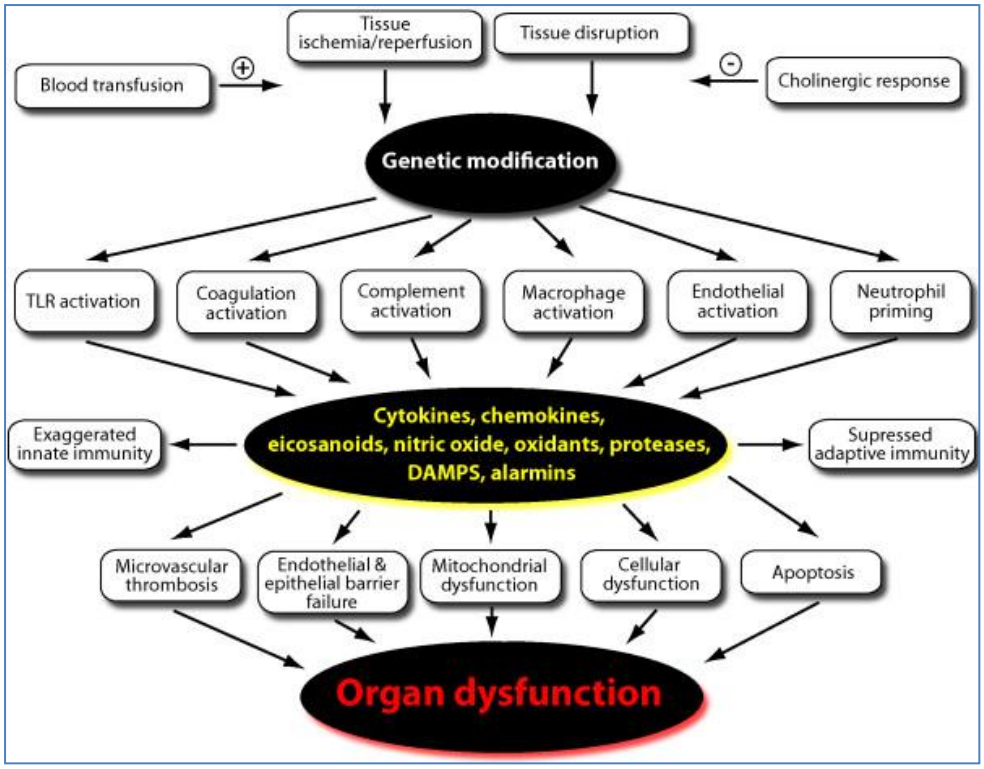


DAMPs: damage-associated molecular patterns; PICS: Persistent Inflammation/Immunosuppression and Catabolism Syndrome

Lancet. 2014 Oct 18;384(9952):1455-65

Σχήμα 26. Οδοί που οδηγούν σε καταστροφή ιστών και οργάνων μετά από τραύμα (56)

Λόγω της διαφορετικότητας του μικροπεριβάλλοντος των οργάνων και της παρουσίας διαφορετικών μακροφάγων σε διαφορετικούς ιστούς, η αντιφλεγμονώδης απάντηση και η διαδικασία ίασης και αποκατάστασης στο τραύμα διαφέρει ανάλογα με την ανατομική θέση του τραυματισμού (55).

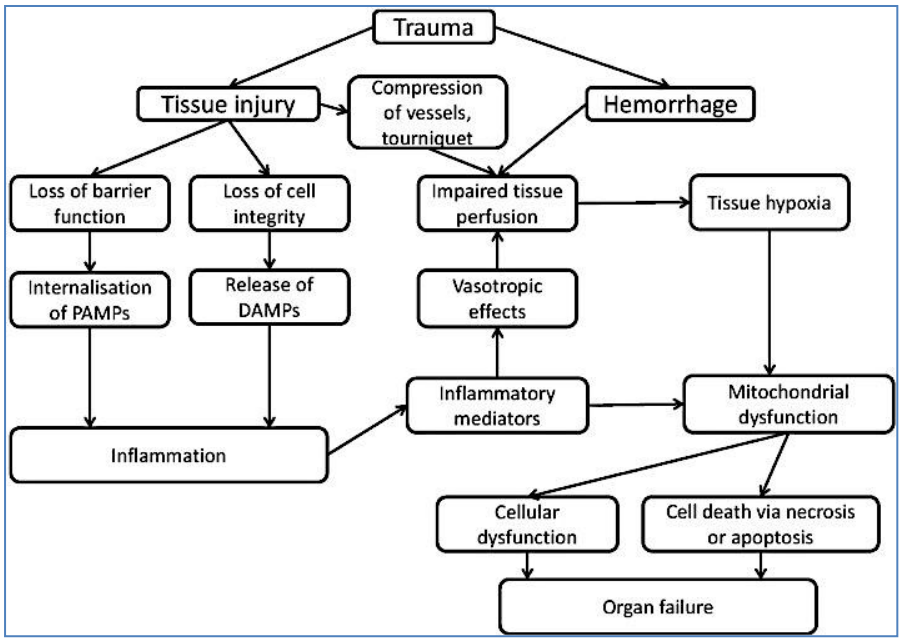


Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2010; 18: 34

Σχήμα 27. Παθοφυσιολογία στο τραύμα

Τα (Danger-associated molecular patterns, DAMPs) (σχήμα 26,27,28,29) όπως στη λοίμωξη τα (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), διεγείρουν τα κύτταρα του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος και το συμπλήρωμα, και οδηγούν δυνητικά σε ενδοθηλιακή βλάβη, βλάβη οργάνων και ανοσοπαράλυση. Αναγνωρίζονται τα μόρια αυτά μέσω υποδοχέων από τα μακροφάγα των ιστών, τα οποία απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως TNF-α, IL-1β and INFγ, με συνέπεια να προκαλείται φλεγμονώδης απάντηση απουσία λοίμωξης, η ονομαζόμενη άσηπτη φλεγμονή (55)(57). Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που μεταναστεύουν στη θέση του τραύματος. Προφλεγμονώδη μονοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών και γίνονται μακροφάγα τα οποία υπόκεινται σε φαινοτυπικές και λειτουργικές αλλάγες και ξεκινούν την επανόρθωση του ιστού εκκρίνοντας growth factors και αντιφλεγμονώδεις κυτοκινες όπως η IL-10, TGF-β και ο IGF-1. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα και προγονικά κύτταρα για να βοηθήσουν στην αναδιαμόρφωση του ιστού. Τα διηθητικά μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα εμφανίζουν ιδιότητες μακροφάγων ιστών. Τα μακροφάγα είναι μια ετερογενής ομάδα φαγοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, κι είναι εκείνα που ανιχνεύουν την απώλεια της ακεραιότητας του ιστού, και με μια αξιοσημείωτη πλαστικότητα και υπόκεινται σε φαινοτυπικές αλλαγές προκειμένου να απαντήσουν και να αποκαταστήσουν τη βλάβη. Μακροφάγα των ιστων βρίσκονται σε διάφορα όργανα με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη

των ιστών και στη διατήρηση της ομοιόστασης. Φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως το σοβαρό τραύμα, οδηγούν σε επιπλέον απελευθέρωση μονοκυττάρων από το αίμα στους ιστούς, τα οποία ωριμάζουν σε μακροφάγα καθώς και από τις κοιλότητες γύρω από το προσβεβλημένο όργανο, με αποτέλεσμα την αύξηση των μακροφάγων των ιστών. Η βλάβη των οργάνων οδηγεί σε περαιτέρω απελευθέρωση μορίων DAMPs με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου, με συνεχιζόμενη φλεγμονή και ανοσολογική διέγερση.

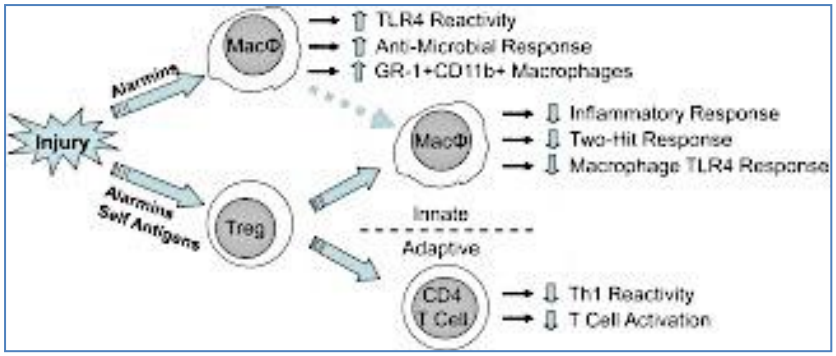


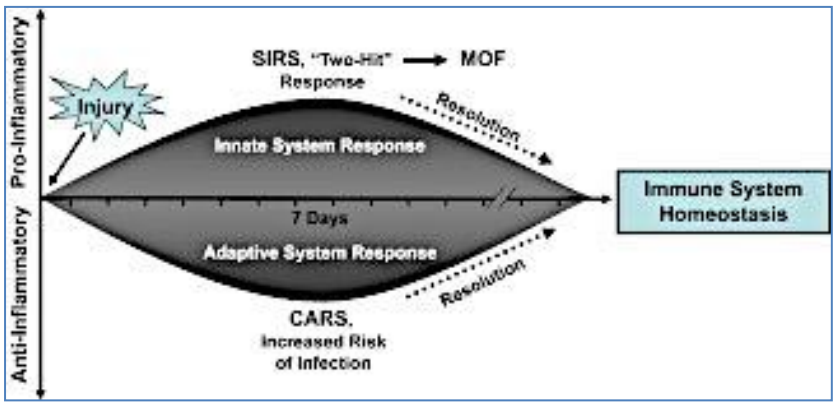
Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2010 Jun 17;18:34

Σχήμα 28. Ανεπάρκεια οργάνων στο τραύμα

Ομάδες ανοσοκυττάρων που απαντούν στο τραύμα και ελέγχουν την απάντηση στο τραύμα.

Τα 'μόρια κινδύνου' alarmins και τα αυτοαντιγόνα από τη βλάβη των ιστών στο τραύμα συνδέονται και ενεργοποιούν τα μακροφάγα (Macφ) και τα Τ λεμφοκύτταρα Tregs. Τα μακροφάγα υπόκεινται σε αλλαγές φαινοτυπικές και λειτουργικές και αύξηση της παρουσίας μακροφάγων GR-1^{+}/CD11b^{+}. Τα Tregs στη συνέχεια ενεργοποιούνται και θεωρουνται οι ρυθμιστές "master regulators" της απάντησης στο τραύμα, καταστέλλοντας την (58).



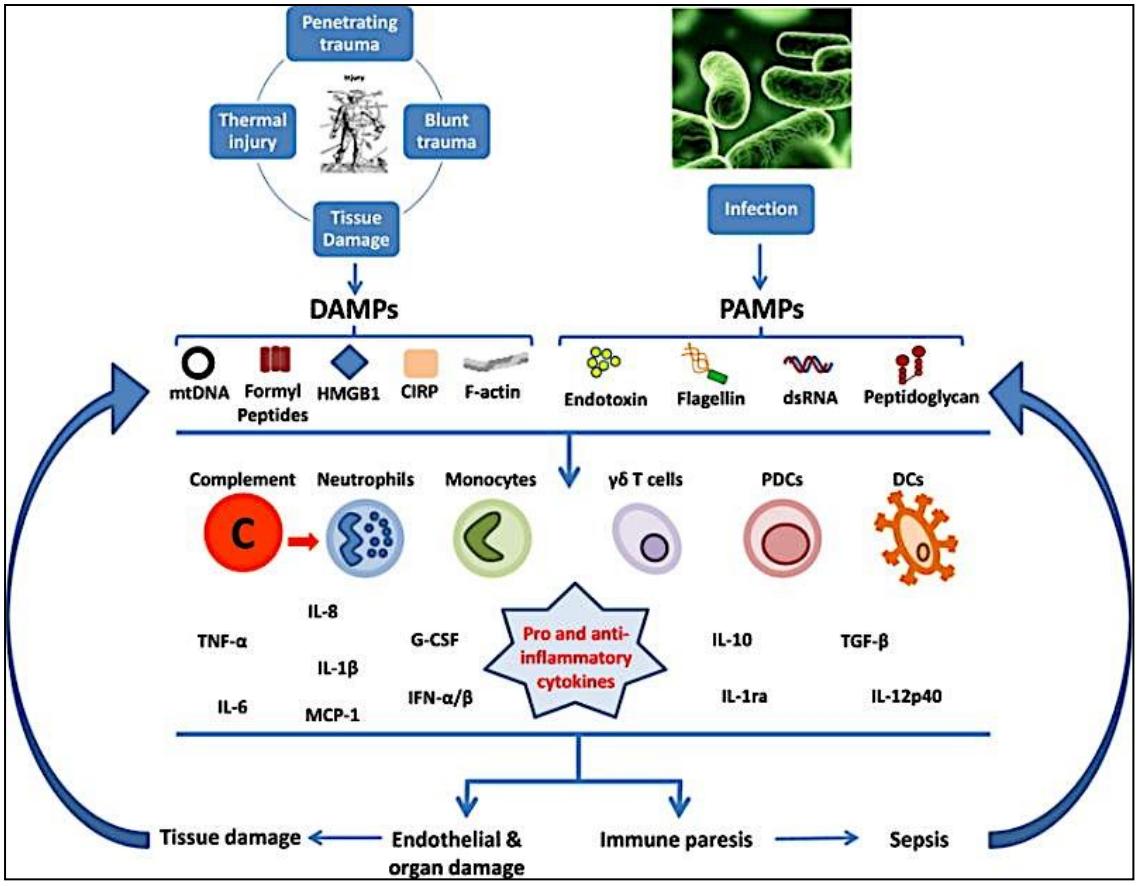


J Leukoc Biol. 2012 Sep; 92(3): 539–551

Σχήμα 29

Οι τραυματικές βλάβες διαταράσσουν την ισορροπία της ομοιόστασης του ανοσολογικού συστήματος. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα το τραύμα προκαλεί μια προοδευτικά αυξανόμενη φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη απάντηση. Η φλεγμονώδης απάντηση ρυθμίζεται από κύτταρα και μεσολαβητές του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος ενώ η αντιφλεγμονώδης από το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Οι αντίθετες αυτές απαντήσεις διαταράσσουν την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος και οδηγούν στην ανάπτυξη SIRS και CARS σε ασθενείς με τραύμα, όπως στη λοίμωξη (σχήμα 30) (22).

Εάν προκύψουν ευκαιριακές λοιμώξεις σε χρονικές στιγμές που υπάρχει μεγάλη έλλειψη ισορροπίας στην ομοιόσταση του ανοσοποιητικού, ο τραυματισμένος ασθενής θα εμφανίσει επιπλοκές που σχετίζονται με τραύμα όπως νοσοκομειακή λοίμωξη, σηπτικό σοκ ή πολυοργανική ανεπάρκεια (Multiple Organ Failure, MOF) (22)(38)(58). Θα επιβιώσουν οι ασθενείς εκείνοι που θα καταφέρουν να ελέγξουν την απάντηση στο τραύμα και να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος.



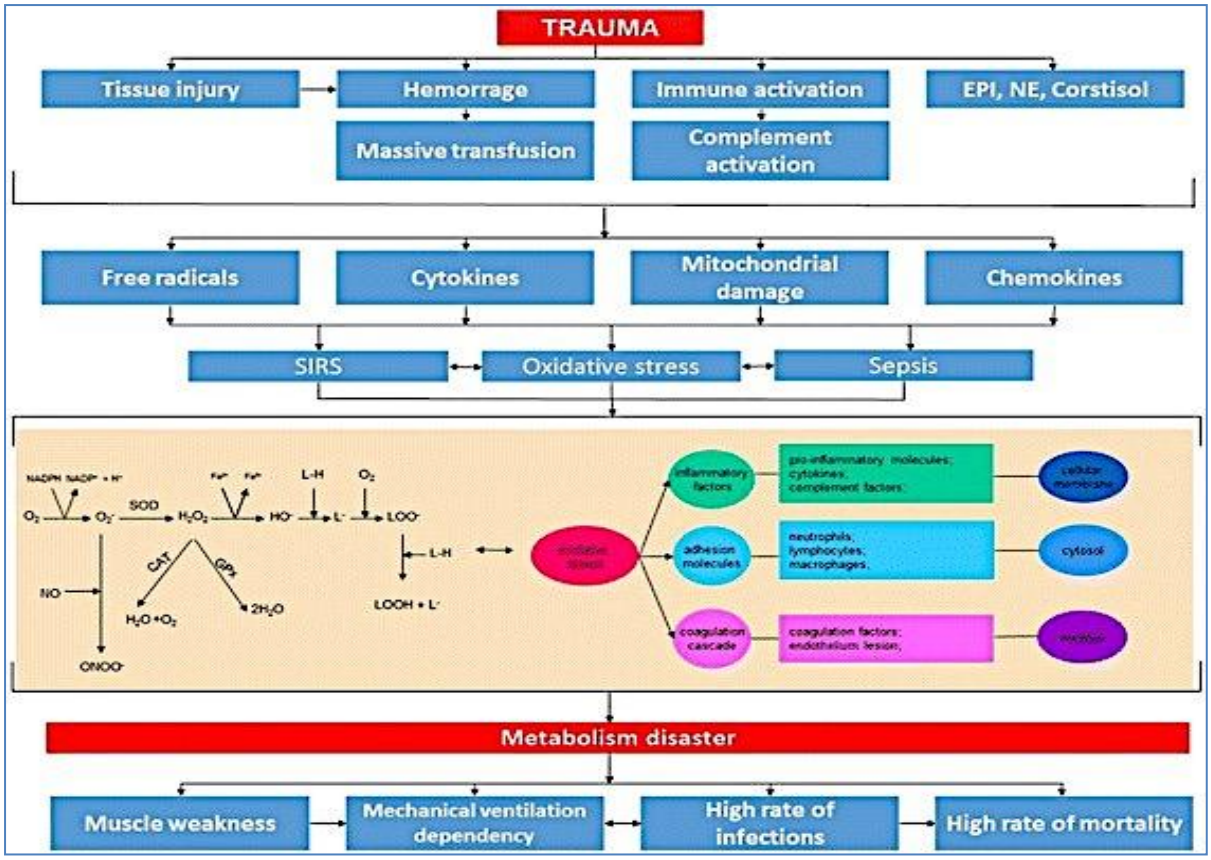
mtDNA, Mitochondrial DNA; HMGB1, High mobility group box 1 protein; CIRP, Cold-inducible RNA-binding protein; dsRNA, double-stranded RNA; PDCs, Plasmacytoid dendritic cells; DCs, Dendritic cells, TNF-α, Tumour necrosis factor-alpha; G-CSF, Granulocyte-colony stimulating factor; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein 1; TGF-β, Transforming growth factor-beta; IFN, interferon; IL, interleukin.

Inflamm Res. 2016 Nov 1;65(11):853–68

Σχήμα 30. Τραύμα, κυτοκίνες και ανεπάρκεια οργάνων

Διάφοροι παράγοντες καθορίζουν την αλληλεπίδραση τραύματος και ανοσολογικού συστήματος και τη λειτουργία ανοσοκυττάρων και οδών, ώστε να ρυθμιστεί η απάντηση από τον οργανισμό και να αποκατασταθεί η ομοιόστασή του (σχήμα 31) (60).

Μη ρυθμιζόμενη άσηπτη φλεγμονή και μη καλή αποκατάσταση θα οδηγήσουν σε χρόνια νόσο. Οι σοβαρά τραυματισμένοι ασθενείς μπορεί να επιπλακούν με ποικίλες διαταραχές οι οποίες μπορεί να μειώσουν σημαντικά την επιβίωση (59) (59).



EPI epinephrine, *NE* norepinephrine, *SIRS* systemic inflammatory response syndrome

Burns Trauma. 2017; 5: 8

Σχήμα 31. Παθοφυσιολογική συσχέτιση μεταξύ τραύματος και κλινικής έκβασης (59)

Μεταβολισμός στο τραύμα

Ο David Cuthbertson περιέγραψε για πρώτη φορά τις μεταβολές στο μεταβολισμό, που εμφανίζονται σε ασθενείς μετά από σοβαρό τραυματισμό (60). Παρατήρησε μια δραματική μείωση ενδοκυττάριων συστατικών, όπως του αζώτου (ως ουρία), του καλίου, του φωσφόρου, του θείου και της κρεατίνης λόγω του τραυματικό στρες. Συνέδεσε αυτή την απώλεια με τη καταστροφή των ιστών, η οποία επιβεβαιώθηκε και σε μετέπειτα μελέτες, οι οποίες έδειξαν ταυτόχρονη αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου με το μέγιστο-peak της καταστροφής των ιστών (61). Σύμφωνα με με τις παρατηρήσεις του Cuthbertson υπάρχουν δυο φάσεις μεταβολικών αλλαγών, μια αμέσως μετά τον τραυματισμό που χαρακτηρίζεται από μείωση του μεταβολικού ρυθμού, μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου και της θερμοκρασίας του σώματος, μαζί με μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα. Η επόμενη φάση χαρακτηρίζεται από αυξημένο καταβολισμό, υψηλή κατανάλωση οξυγόνου και αυξημένη ενεργειακή κατανάλωση, υψηλό ρυθμό καταβολισμού που οδηγεί σε αρνητικό ισοζύγιο αζώτου, αύξηση πρωτεόλυσης, οξείδωσης αμινοξέων και γλυκονεογένεσης. Η φάση αυτή διαρκεί περισσότερο (52) και έχει σαν επιπλοκές υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη (62) (74) (55).

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΝΟΣΟ (ENERGY EXPENDITURE, EE)

Οι μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν στην απάντηση στο στρες αλλάζουν και τις ανάγκες των σοβαρά πασχόντων εξαιτίας της απρόβλεπτα μεταβαλλόμενης REE σε σχέση με τα υγιή άτομα (35). Ο ακριβής προσδιορισμός των ενεργειακών απαιτήσεων των ασθενών είναι ζωτικής σημασίας, και η υποστήριξη της θρέψης με την ιδανική ενεργειακή κάλυψη είναι το κλειδί για την καλή κλινική έκβαση (35). Με τη βοήθεια της θερμιδομετρίας (indirect calorimetry, IC) είναι δυνατή σήμερα η βελτιστοποίηση της θερμιδικής κάλυψης των σοβαρά πασχόντων ασθενών (48).

Εκτίμηση ενεργειακών αναγκών στη σοβαρή νόσο- Εξισώσεις πρόβλεψης REE σε σοβαρά πάσχοντες ασθενείς

Διάφορες εξισώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη REE σε ασθενείς με σοβαρή νόσο, ειδικά εξαιτίας του ότι η μέτρηση με IC δεν είναι πάντα πρακτικά εφικτή. Μερικές από τις εξισώσεις REE που χρησιμοποιούνται συνήθως σε σοβαρά πάσχοντες ασθενείς παρουσιάζονται στο σχήμα 32 και έχουν επικυρωθεί για χρήση σε σοβαρά άρρωστους ασθενείς . Η έμμεση θερμιδομετρία είναι και παραμένει το gold standard για τη μέτρηση της κατανάλωσης ενέργειας στους σοβαρά πάσχοντες ασθενείς (63) (64). Λόγω δυσκολίας εφαρμογής της μεθόδου, πιθανά εξαιτίας συνθηκών ασθενούς, υψηλού κόστους ή έλλειψης εμπειρίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξισώσεις για την εκτίμηση της βασικής κατανάλωσης ενέργειας (REE). Οι τύποι αυτοί έχουν προκύψει από δεδομένα σε υγιή άτομα και σε σοβαρή νόσο. Μερικές από τις εξισώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως σε ασθενείς με σοβαρή νόσο είναι εξισώσεις Schofield, Harris-Benedict (HB), Mifflin, Swinamer, Ireton-Jones και Penn State, καθώς και εκείνες από τις συστάσεις του American College of Chest Physicians (ACCP).

Table 1. Equations for predicting REE (kcal/day)

Reference	Calculation of REE
Harris-Benedict (1919) [46]	Male: 66.4730 + (13.7516 × W) + (5.0033 × H) − (6.7550 × A) Female: 655.0955 + (9.5634 × W) + (1.8496 × H) − (4.6756 × A)
ACCP recommendation [47]	25 × weight - If BMI 16–25 kg/m² use usual body W - If BMI > 25 kg/m² use ideal body W - If BMI < 16 kg/m² use existing body weight for the first 7–10 days, then use IBW
Mifflin [38]	Male: (9.99 × W) + (6.25 × H) − (4.92 × A) + 5 Female: (9.99 × W) + (6.25 × H) − (4.92 × A) − 161
Swinamer [39]	(945 × BSA) − (6.4 × A) + (108 × T) + (24.2 × RR) + (817 × V_T) − 4,349
Ireton-Jones (1992) [48]	1,925 − (10 × A) + (5 × W) + (281 if male) + (292 if trauma present) + (851 if burns present)
Ireton-Jones (1997) [49]	(5 × W) − (11 × A) + (244 if male) + (239 if trauma present) + (840 if burns present) + 1,784
Penn State (1998) [49]	(1.1 × value of HBE) + (140 × T_{max}) + (32 × V_E) − 5,340
Penn State (2003) [50]	(0.85 × value of HBE) + (175 × T_{max}) + (33 × V_E) − 6,433

REE, resting energy expenditure; W, weight (kg); H, height (cm); A, age (years); ACCP, American College of Chest Physicians; BMI, body mass index (kg/m²); IBW, ideal body weight (kg); BSA, body surface area (m²); T, body temperature (°C); RR, respiratory rate (breaths/min); V_T, tidal volume (L); HBE, Harris-Benedict equation; T_{max}, Maximum body temperature in the past 24 hour (°C); V_E, minute volume (L/min).

Clin Nutr Res. 2018 Apr;7 (2):81-90.

Σχήμα 32. Εξισώσεις υπολογισμού REE

Έμμεση Θερμιδομετρία (indirect calorimetry, IC)

Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για την ανάπτυξη διαφόρων εξισώσεων που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της REE σε ασθενείς με σοβαρή νόσο (65) (66) όσο και για την επικύρωση εξισώσεων (67). Η αρχή της IC βασίζεται στη μέτρηση του όγκου του εισπνεόμενου οξυγόνου (VO_2) και του όγκου του εκπνεόμενου διοξειδίου του άνθρακα (VCO_2). Οι τιμές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της REE με βάση την εξίσωση Weir (68). Η σύντομη εκδοχή της εξίσωσης που χρησιμοποιείται συνήθως έχει ως εξής (69):

REE (kcal/day) = (3.941 × VO_2 [L/min] + 1.106 × VCO_2 [L/min]) × 1,440

Σε πολλές περιπτώσεις, η χρήση της έμμεσης θερμιδομετρίας μπορεί να περιορίζεται από το υψηλό κόστος των μηχανημάτων, ή την έλλειψη ειδικευμένου προσωπικού. Σε ασθενείς με σοβαρή νόσο, άλλοι παράγοντες που μπορούν να περιορίσουν τη χρήση της, περιλαμβάνουν την παρουσία διαρροής αέρα ή την παρουσία θωρακοσωλήνων ή συσκευών χορήγησης συμπληρωματικού οξυγόνου (π.χ. ρινική κάνουλα, εφαγρμογή θετικής πίεσης αεραγωγών), ρυθμίσεων αναπνευστήρα (οξυγόνο, θετική τελοεκπνευστική πίεση), συνεχής θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης (continuous renal replacement therapy (CRRT)), αναισθησία, φυσιοθεραπεία ή υπερβολική κινητική θεραπεία και υπερβολική κίνηση. Από την American Society for Parenteral and Enteral Nutrition προτείνεται η ακριβής μέτρηση κατανάλωσης ενέργειας (Energy Expenditure, EE) με έμμεση θερμιδομετρία σε κάθε διασωληνωμένο σοβαρά πάσχοντα ασθενή για εκτίμηση ενδεχόμενης διαταραχής μεταβολισμού, υπερθρεψία ή υποθρεψία (70).

ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΝΟΣΟ

Κυρίως έξι οργανικά συστήματα δυσλειτουργούν στη σήψη και εκείνα έχουν περισσότερο μελετηθεί, το καρδιαγγειακό, αναπνευστικό, ουροποιητικό, νευρολογικό, αιματολογικό και το ήπαρ (Σχήμα 33,34) (71). Οι μεταβολές σε κάθε σύστημα οργάνων κυμαίνονται από ήπια δυσλειτουργία μέχρι την πλήρη ανεπάρκεια οργάνων, χωρίς να σημαίνει ότι η ανεπάρκεια αυτή είναι μη αναστρέψιμη. Η δυσλειτουργία ενός μόνο οργάνου είναι σπάνια, εξαιτίας της ύπαρξης "διασταυρούμενης δυσλειτουργίας οργάνων" κι έτσι η δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια ενός οργάνου, οδηγεί σε δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια άλλου οργάνου. Για τον ίδιο λόγο η λειτουργία πολλών οργανικών συστημάτων διακόπτεται συνήθως ταυτόχρονα (72).

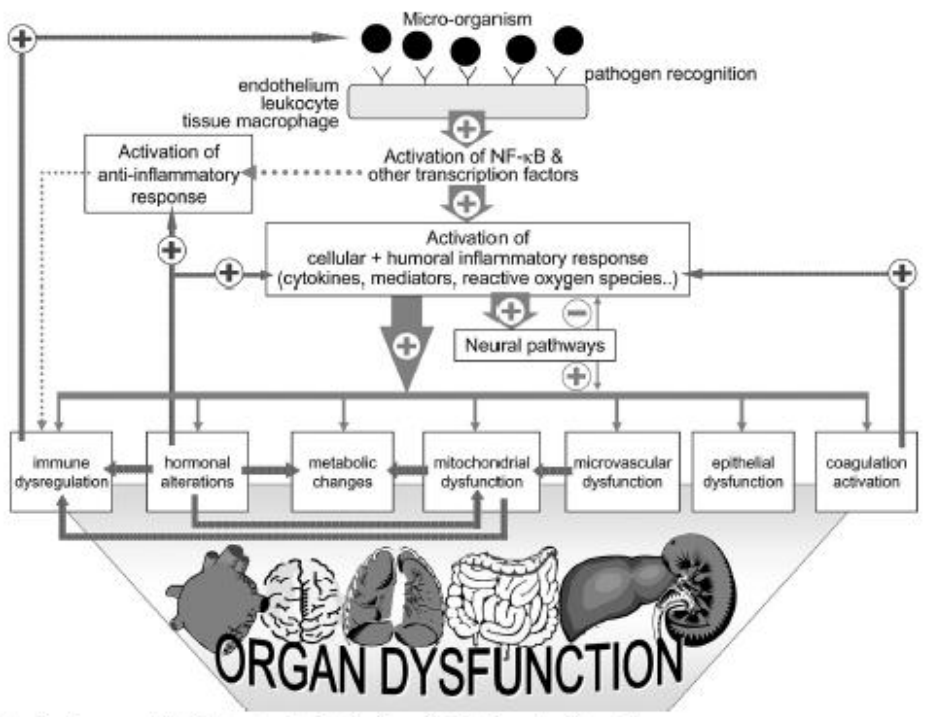


Figure 1. Systemic pathways contributing to organ dysfunction in sepsis. *NF-κB*, nuclear factor-κB.

Critical Care Medicine.35(10):2408-2416, OCT 2007

Σχήμα 33. Οδοί που συμβάλλουν στην ανεπάρκεια οργάνων στη σήψη (71)

Table 1

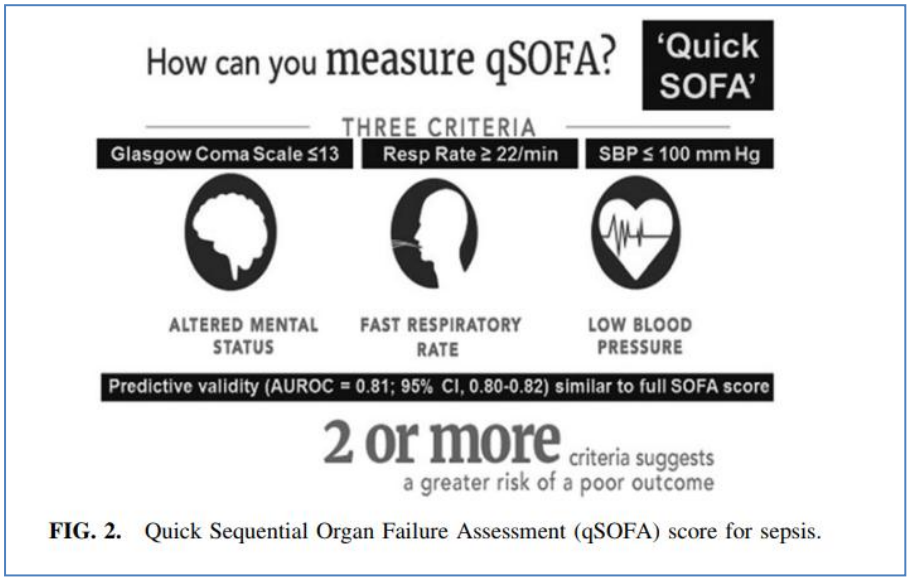
Organ dysfunction in sepsis

Target organ	Pathophysiology	Clinical features	SOFA score indices (other beneficial indices)	Available treatments
Lung (ARDS)	Vascular hyper-permeability, neutrophil accumulation	Impaired oxygenation	PaO_2/FIO_2 <400 (bilateral infiltration on CXR)	Mechanical ventilation with low tidal volume and PEEP
Liver	Disturbed intracellular and extracellular bile salt transport	Jaundice, cholestasis	Serum bilirubin ≥1.2 mg/dl	Not established
Kidney (AKI)	Tubular epithelial cell injury, dysfunction or adaptive response of tubular epithelial cells	Reduced GFR, reduced urine volume	Serum creatinine ≥1.2 Urine output <500 ml/day	Hemodialysis
Cardiovascular system	Myocardial depression, impaired intracellular calcium homeostasis, disrupted high energy phosphate production.	Ventricular dilatation, reduced ejection fraction, reduced contractility	Mean arterial pressure <70 mmHg	Inotropic agents, beta-blocker
Gastrointestinal tract	Epithelial hyper-permeability, altered microbiome	Mucosal bleeding, paralytic ileus	Not included	Proton pump inhibitor, early enteral nutrition, probiotics, SDD
Central nervous system (SAE)	Direct cellular damage, mitochondrial and endothelial dysfunction, neurotransmission disturbances, calcium dyshomeostasis	Altered mental status	GCS <15	Light sedation, early rehabilitation
Blood coagulation system (DIC)	Intravascular coagulation, microvascular damage, systemic thrombin generation, endothelial injury	Bleeding diathesis, microthrombi and tissue ischemia	Platelets $<150 \times 10^3/\mu l$ (prolonged prothrombin time, increased FDP)	Antithrombin, recombinant thrombomodulin, concentrated platelet preparation

SOFA sequential organ failure assessment, *ARDS* acute respiratory distress syndrome, *CXR* chest X-ray, *PEEP* positive end-expiratory pressure, *AKI* acute kidney injury, *GFR* glomerular filtration ratio, *SDD* selective digestive decontamination, *SAE* sepsis-associated encephalopathy, *GCS* Glasgow coma scale, *DIC* disseminated intravascular coagulation, *FDP* fibrin degradation product

Σχήμα 34. Οργανική δυσλειτουργία στη σήψη- εκτίμηση με SOFA

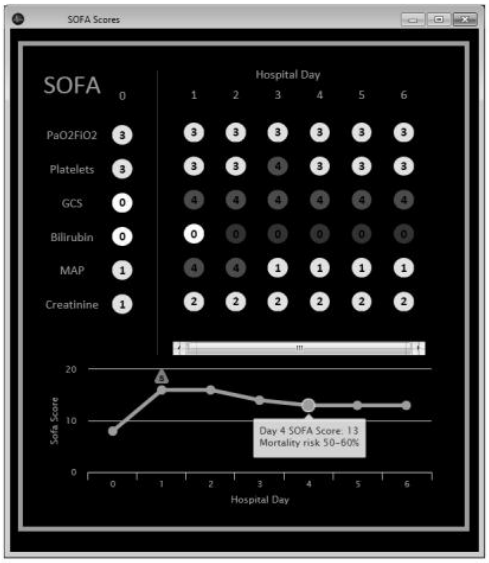
Για την ποσοτική καταγραφή δυσλειτουργίας των οργάνων και για βαθμονόμηση της βαρύτητάς της, αλλά και για ερευνητικούς σκοπούς, χρησιμοποιείται όπως έχει ήδη ειπωθεί το Sequential Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score (σχήμα 34) (73) και με το quick Sequential Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA) για πιο γρήγορη αναγνώριση (σχήμα 35).



Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. Napolitano LM

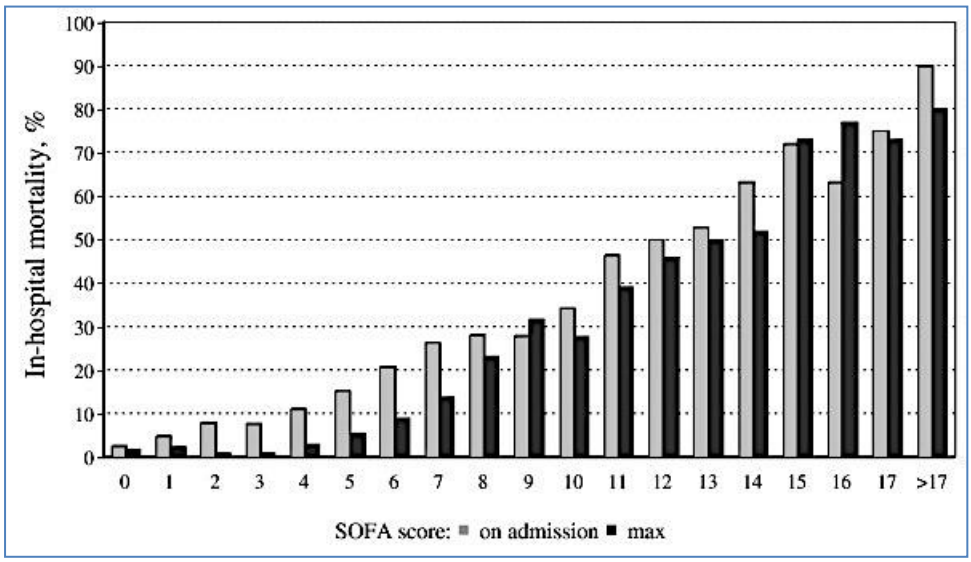
Σχήμα 35. quick SOFA (qSOFA)

Οι εργαστηριακές τιμές που απαιτούνται για τον υπολογισμό του SOFA μπορούν εύκολα να ληφθούν αυτόματα από φορητές συσκευές (σχήμα 36) (22). Είναι σημαντικό, ότι για τον υπολογισμό του SOFA δεν είναι απαραίτητη η κλινική εκτίμηση των ασθενών (73).



Σχήμα 36. Παράδειγμα αυτόματου υπολογισμού SOFA score

Η σχέση των οργάνων που ανεπαρκούν μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα, ενώ όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των οργάνων που επηρεάζονται, τόσο υψηλότερη είναι η θνητότητα (σχήμα 37)(73).



Crit Care. 2012; 16(6): R222

Σχήμα 37. Νοσοκομειακή θνητότητα σε σχέση με το SOFA score στην εισαγωγή (γκρι στήλες) και με το μέγιστο SOFA score (μαύρες στήλες)

Η δυσλειτουργία του μυοκαρδίου κατά την σηπτική καταπληξία

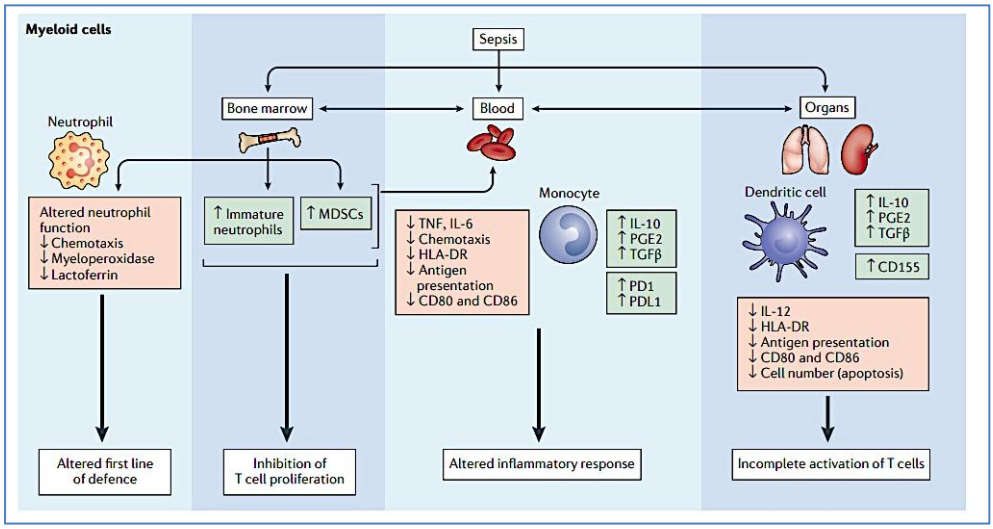
Στη σήψη και τη σηπτική καταπληξία παρατηρείται συχνά δυσλειτουργία του μυοκαρδίου. Στον άνθρωπο η σηπτική καταστολή του μυοκαρδίου χαρακτηρίζεται από αναστρέψιμη διάταση των κοιλιών, αυξημένο τελοδιαστολικό όγκο, ελαττωμένο κλάσμα εξώθησης και ελαττωμένη ανταπόκριση στη χορήγηση υγρών και τη διέγερση με κατεχολαμίνες. Για την καταστολή αυτή της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου είναι υπεύθυνοι παράγοντες της κυκλοφορίας και όχι η υποάρδευση του μυοκαρδίου. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται οι κυτοκίνες TNFa και IL-1.

Νευρο-ενδοκρινικά αντανακλαστικά

Η νευρο-ενδοκρινική και μεταβολική απάντηση στη λιποπολυσακχαρίδη (LPS) επάγεται από κυτοκίνες όπως η IL-1 και ο TNFa. Η αντίδραση οξείας φάσης που προκύπτει χαρακτηρίζεται από πυρετό, ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης - επινεφριδίων, διέγερση του μυελού των οστών και των λευκοκυττάρων, αύξηση της παραγωγής πρωτεϊνών οξείας φάσης στο ήπαρ, καταβολισμό και διάσπαση μυϊκών πρωτεϊνών. Οι ορμόνες που διεγείρουν την ειδική ανοσία, όπως η προλακτίνη και η αυξητική ορμόνη, είναι κατασταλμένες ή σε χαμηλά επίπεδα, ενώ η ινσουλίνη που σε αυτή την φάση ενισχύει την διέγερση των λευκοκυττάρων είναι αυξημένη.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΣΟΒΑΡΗΣ ΝΟΣΟΥ

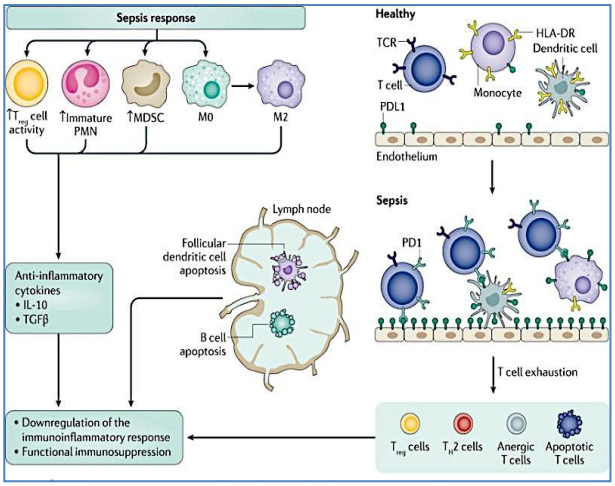
Αυτό που επικρατεί σήμερα στην παθοφυσιολογία της σήψης (74), είναι ο ρόλος που διαδραματίζει η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στον εισβολέα και στις συνέπειες που εκείνη με τη σειρά της προκαλεί στον οργανισμό. Σήψη εμφανίζεται όταν η απόκριση του ξενιστή σε μια λοίμωξη έχει σαν αποτέλεσμα απειλητικές για τη ζωή βλάβες ιστών και δυσλειτουργία οργάνων, όπου βασίζεται και ο πρόσφατα ορισμός της σήψης (Sepsis-3) (16). Παρουσία επομένως ανεξήγητης δυσλειτουργίας οργάνων σε ασθενή με οξεία νόσο, πρέπει να εγείρει υποψίες για πιθανή σήψη, μιας κατάστασης με θνητότητα 15-20% και σημαντική βραχυπρόθεσμη και μακροχρόνια νοσηρότητα. Στην αρχή στη σήψη επικρατεί μια παροδική οξεία φλεγμονώδης απάντηση. Ανοσοκατασταλτικά ανώριμα πολυμορφοπύρηνα (PMNs) και κατασταλτικά μυελοκύτταρα (MDSCs) κινητοποιούνται από τον μυελό των οστών και μονοκυττάρα διαφοροποιούνται προς μακροφάγα M2, που έχουν σκοπό να ελέγξουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στην αποκατάσταση των ιστών (35) (σχήμα 38). Η απάντηση αυτή είναι φυσιολογική. Αν όμως η πηγή της λοίμωξης δεν ελεγχθεί, η συνεχιζόμενη απάντηση γίνεται γρήγορα παθολογική και οδηγεί σε μια κατάσταση ανοσοκαταστολής.



Nat Rev Nephrol. 2018 Feb;14(2):121-137

Σχήμα 38. Ανοσοπάντηση στη σήψη

Τα ανώριμα PMN, τα MDSCs και τα M2 μακροφάγα παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως IL-10 και τον αυξητικό παράγοντα-β (growth factor-β,TGFβ). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα δενδριτικά και τα μακροφάγα, μειώνουν την έκφραση των μορίων ιστοσυμβατότητας (MHC), που σχετίζονται με το αντιγόνο D (HLA-DR) του ανθρώπινου λευκοκυττάρου. Τα Τ-κύτταρα και τα δενδριτικά εκφράζουν μόρια προγραμματισμένου θανάτου (PD1) και (PDL1) αποπίπτουν και η ανοσοαπάντηση καταργείται (σχήμα 39) (8).



T cells and stromal cells: εκφράζουν πρωτεϊνες-μόρια προγραμματισμένου θανάτου (PD1) και ligand 1 (PDL1), αντίστοιχα, ελέγχεται η αύξηση των ρυθμιστικών T (T_{reg}) κυττάτων σε ανενεργά (unresponsive) T κύτταρα. Δενδριτικά, B και T κύτταρα αποπίπτουν κι η ανασοσαπάντηση καταργείται
TCR, T cell receptor; T_H2, T helper 2.

Surg Infect (Larchmt) 2018 Feb/Mar;19 (2):117-125

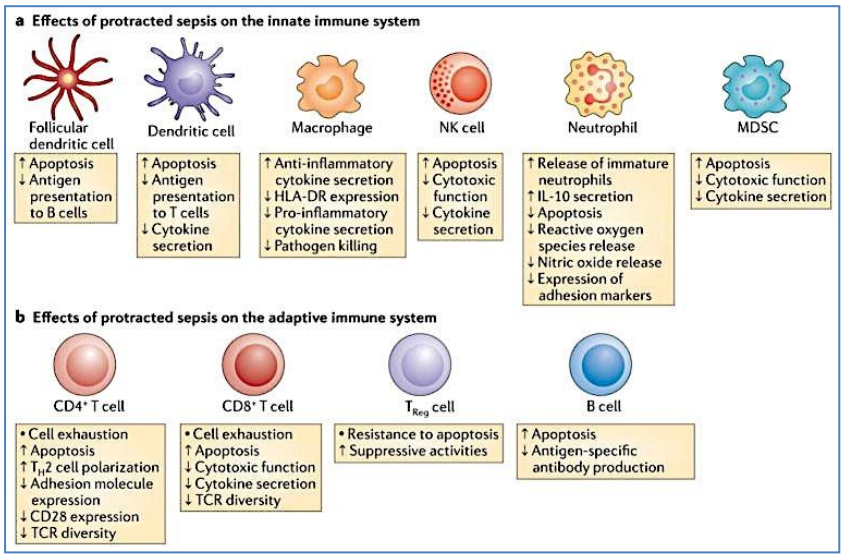
Σχήμα 39. Ανοσοαπάντηση στη σήψη

Η σήψη μετά από μια προσωρινή οξεία φλεγμονώδη απάντηση, οδηγεί σε μια κατάσταση ανοσοκαταστολής. Η σύνθετη ανοσοαπόκριση που πυροδοτείται αρχικά, διαφοροποιείται στην πάροδο του χρόνου, με την ταυτόχρονη εξέλιξη προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού κατά τη διάρκεια της σήψης, είναι η ρύθμιση από το κεντρικό νευρικό σύστημα, αποπτωτική, επιγενετική και / ή μεταγραφική ρύθμιση μαζί με την τροποποίηση μεταβολισμού και ανοσίας και την προσπάθεια ανοχής της ενδοτοξίνης. Παράλληλα άλλοι παράμετροι ειδικοί για κάθε περίπτωση σήψης, που σχετίζονται με τον ασθενή και τα συγκεκριμένα παθογόνα, την έκταση της κυτταρικής βλάβης και το είδος θεραπείας που χορηγείται, επηρεάζει τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού στη σήψη. Διαφορετική ρύθμιση ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με σήψη μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική προ-φλεγμονώδη απόκριση, σε ανοσοκαταστολή ή/και μακροχρόνιες ανοσολογικές διαταραχές. Μια μη καλά ρυθμισμένη ομοιόσταση ανοοσποιητικού έχει επιβλαβείς κλινικές συνέπειες, όπως ανεπάρκεια οργάνων, αυξημένη ευαισθησία σε νοσοκομειακές και/ή δευτεροπαθείς λοιμώξεις, αναζωπύρωση ιών και/ή αυξημένη θνητότητα. Μια υπερβολική ή κακώς ρυθμιζόμενη απάντηση μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον ξενιστή λόγω ανεξέλεγκτης απελευθέρωσης ενδογενών φλεγμονωδών ουσιών.

Η σηψαιμία έχει ποικίλες επιδράσεις σε όλα τα κυτταρικά στοιχεία καταστέλλοντας το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα. Η σήψη οδηγεί γρήγορα σε εκτεταμένη απόπτωση τα δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και ανώριμα μακροφάγα, κύτταρα φυσικού φονέα (NK) και κύτταρα καταστολής που προέρχονται από μυελοειδή (σχήμα 40) (MDSCs). Αντίθετα καθυστερεί την απόπτωση ουδετερόφιλων, εξαιτίας πιθανά της ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων. Μετά την αρχική κινητοποίηση και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, επιπλέον ουδετερόφιλα απελευθερώνονται από τον μυελό των οστών αλλά με μικρότερη βακτηριοκτόνο ικανότητα και μειωμένη παραγωγή κυτοκίνης. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι μια ομάδα ουδετεροφίλων απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες της ανοσοκατασταλτικής κυτοκίνης της ιντερλευκίνης-10 (IL-10). Χαρακτηριστικό γνώρισμα της

σήψης είναι η μειωμένη έκφραση HLA-DR σε αντιγονοπαρουσιαστκά κύτταρα, μονοκυττάρα/ μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, μείωση η οποία φαίνεται να επηρεάζει την παρουσίαση των μικροβιακών αντιγόνων στα Τ κύτταρα.

Οι μηχανισμοί ανοσοπαράλυσης στη σήψη (35) φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D Nat Rev Immunol 13:862–874 (2013)

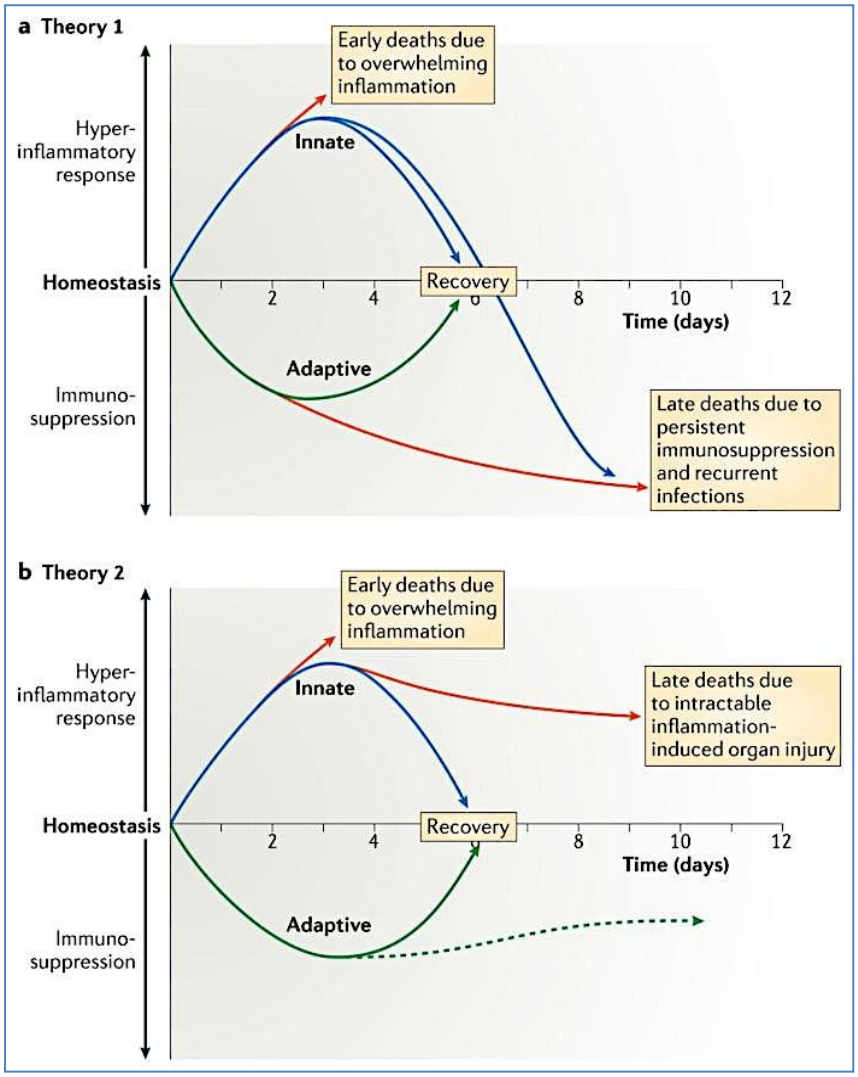
Σχήμα 40. Επίδραση της σήψης στην ενδογενή και προσαρμοστική ανοσία

Η σήψη προκαλεί μαζική απώλεια $CD4^+$ and $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων όπως και Β κυττάρων. Τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) είναι πιο ανθεκτικά στην απόπτωση κι έτσι μεγάλος αριθμός κυττάρων Treg υπάρχουν στην κυκλοφορία, σε σχέση με άλλες ομάδες λεμφοκυττάρων (σχήμα 40). Αυτό συντελεί ακόμα περισσότερο σε ένα ανοσοφαινότυπο ανοσοκαταστολής. Τα $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ κύτταρα που επιβιώνουν αλλάζουν φαινότυπο από προφλεγμονώδη με Th1 cell είτε σε αντιφλεγμονώδη με Th2 cell ειτε αναπτύσσουν φαινότυπο εξαντλημένο (“exhaustive” phenotype) ο οποίος χαρακτηρίζεται από προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και μειωμένη έκκριση κυτοκινών. Τα $CD4^+$ Τ κύτταρα έχουν μειωμένη έκφραση CD28 και μειωμένους υποδοχείς (T cell receptor (TCR) diversity), τα οποία και συμβάλλουν σε μειωμένη αντιμικροβιακή απάντηση στα διεισδυτικά παθογόνα (75).

Αντιθετικές θεωρίες της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή στη σήψη (σχήμα 41,42)

<u>Θεωρία 1η</u> : Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση τόσο των προ- όσο και των αντι-φλεγμονωδών ανοσοαποκρίσεων συμβαίνει αμέσως μετά την έναρξη της σήψης. Τα κύτταρα του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος - μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα- απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες προ-φλεγμονωδών κυτοκινών που προκαλούν φλεγμονή (μπλε γραμμή - ημέρες 1-3). Η ένταση της αρχικής φλεγμονώδους απόκρισης ποικίλει από ασθενή σε ασθενή και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το φορτίο του παθογόνου και τη διεισδυτικότητα, τις συν-νοσηρότητας και τη γενετική προδιάθεση

του ατόμου(34). Οι πρώιμοι θάνατοι στη σήψη (κορυφαία κόκκινη γραμμή - ημέρα 3) συμβαίνουν εξαιτίας μιας υπερ-φλεγμονής και μιας 'καταιγίδας' κυτοκινών με πυρετό, ανθεκτικό σοκ, οξέωση και υπερκαταβολισμό. Ένα παράδειγμα σ΄ αυτό το σενάριο είναι νεαρό άτομο που πεθαίνει από σύνδρομο τοξικού σοκ ή μηνιγγοκοκκαιμία. Οι περισσότεροι ασθενείς όμως αποκαθιστούν την ενδογενή και την προσαρμοστική ανοσία και επιβιώνουν από μια λοίμωξη (ανάκτηση – ημέρα 6). Εάν όμως η σήψη επιμένει, και η ενδογενής και προσαρμοστική ανοσία του ασθενή δεν αποκατασταθεί ο ασθενής μπαίνει σε μια βαριά ανοσοκατατσολή (μπλε και κόκκινες γραμμές - μετά την 6η ημέρα). Οι θάνατοι τότε οφείλονται σε δευτερογενείς λοιμώξεις (σχήμα 42) (75).



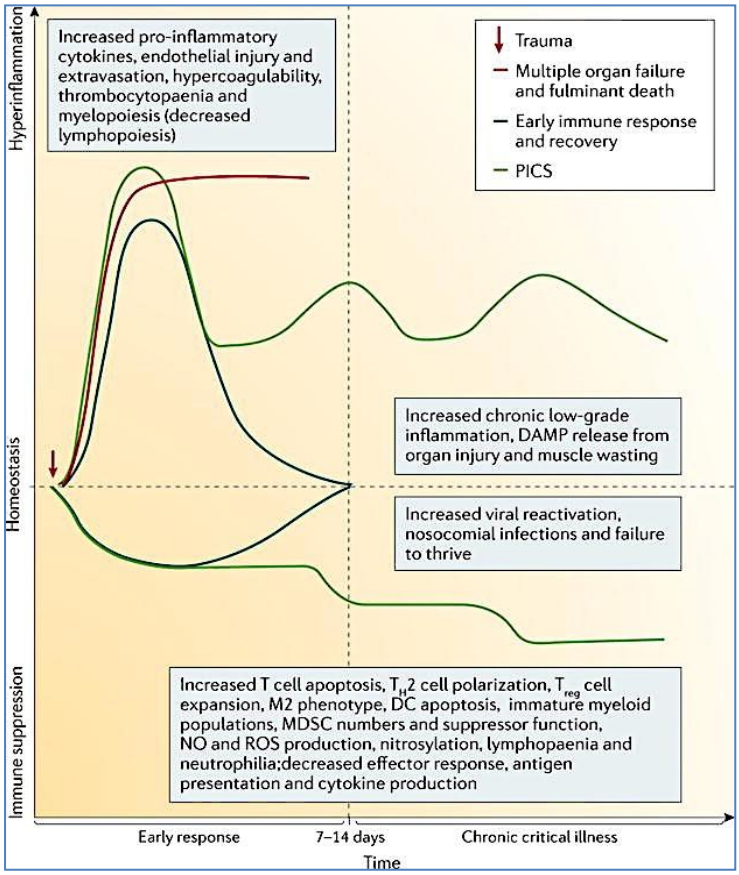
θεωρία 1: (*blue line – days 1*–3) (*recovery – day 6*). (*blue and red lines –after day 6*). θάνατοι οφείλονται σε δευτερογενείς λοιμώξεις

θεωρία 2: θάνατοι στη σήψη οφείλονται σε επίμονη ενεργοποίηση της ενδογενούς ανοσίας που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη φλεγμονή και βλάβη οργάνων

Inflamm Res. 2016 Nov 1;65(11):853–68

Σχήμα 42. Θάνατοι από σήψη

Θεωρία 2η: Μια άλλη θεωρία της παθοφυσιολογίας της σήψης υποστηρίζει ότι υπάρχει πρώιμη ενεργοποίηση της ενδογενούς ανοσίας και καταστολή της προσαρμοστικής ανοσίας. Αυτή η θεωρία υποστηρίζει ότι οι θάνατοι στη σήψη οφείλονται σε επίμονη ενεργοποίηση της ενδογενούς ανοσίας που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη φλεγμονή και βλάβη οργάνων (75).

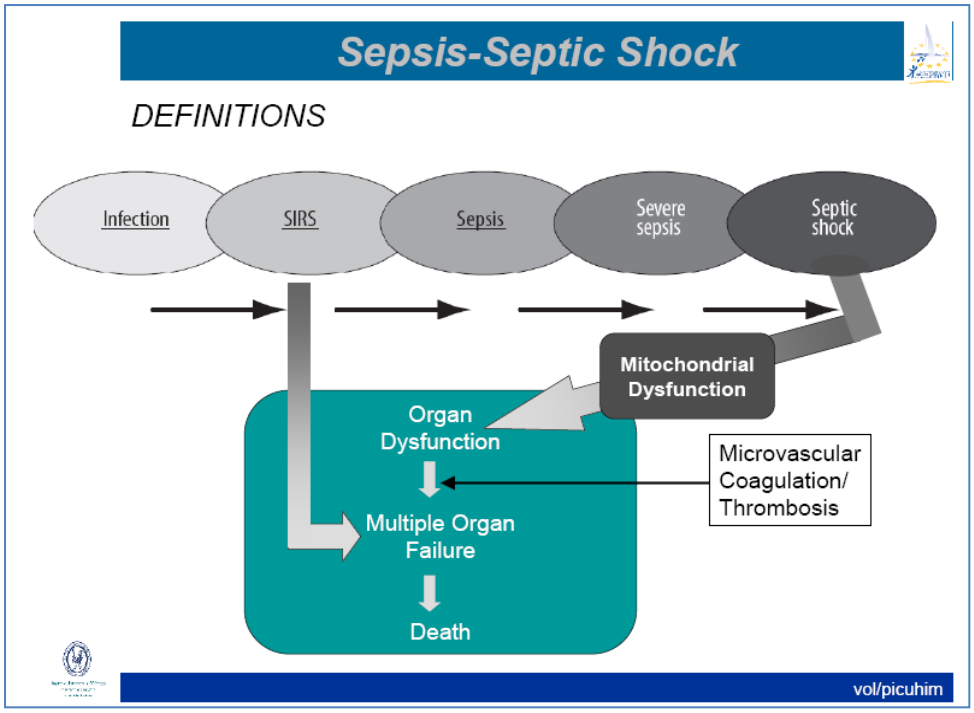


DAMP, damage-associated molecular pattern; DC, dendritic cell; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; T_H2, T helper 2.

Nat Rev Dis Primers, PMC 2017 Aug 1

Σχήμα 43. Ομοιόσταση στη σήψη

Στη σοβαρή σήψη (severe sepsis/septic shock, SS) αλλά και στο Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Απάντησης (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) που σχετίζεται με το τραύμα, η θνητότητα σχετίζεται με την κυτταρική βλάβη και την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (Multiple Organ System Failure, MOSF) (σχήμα 44)(76)(64).



Σχήμα 44. Θάνατος λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στη σήψη

Στην ανάπτυξη ανεπάρκειας οργάνων εμπλέκονται όλο και περισσότερο η επηρεασμένη κυτταρική λειτουργία, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (19) καθώς και οι τροποποιημένοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου (π.χ. απόπτωση, apoptosis, NETosis και πυρόλυση-pyroptosis) (12) (20). Η παθοφυσιολογία της δυσλειτουργίας είναι παρόμοια για όλα τα όργανα και περιλαμβάνει σύνθετους αιμοδυναμικούς και κυτταρικούς μηχανισμούς. Στη σήψη είναι σπάνια η δυσλειτουργία ενός μόνο οργάνου. Συνήθως επηρεάζονται διάφορα όργανα, και η θνητότητα συσχετίζεται με τον αριθμό των οργάνων που έχουν επηρεαστεί.

Μέχρι σήμερα, ο συνδυαστικός ρόλος της φλεγμονώδους ορμονικής και ανοσιακής απόκρισης, με τις μεταβολικές διαταραχές σε μιτοχονδριακό επίπεδο και τις διαχρονικές μεταβολές της βιοενέργειας και στις δυο ομάδες υψηλού κινδύνου ασθενών δεν έχει επαρκώς μελετηθεί (77) (78).

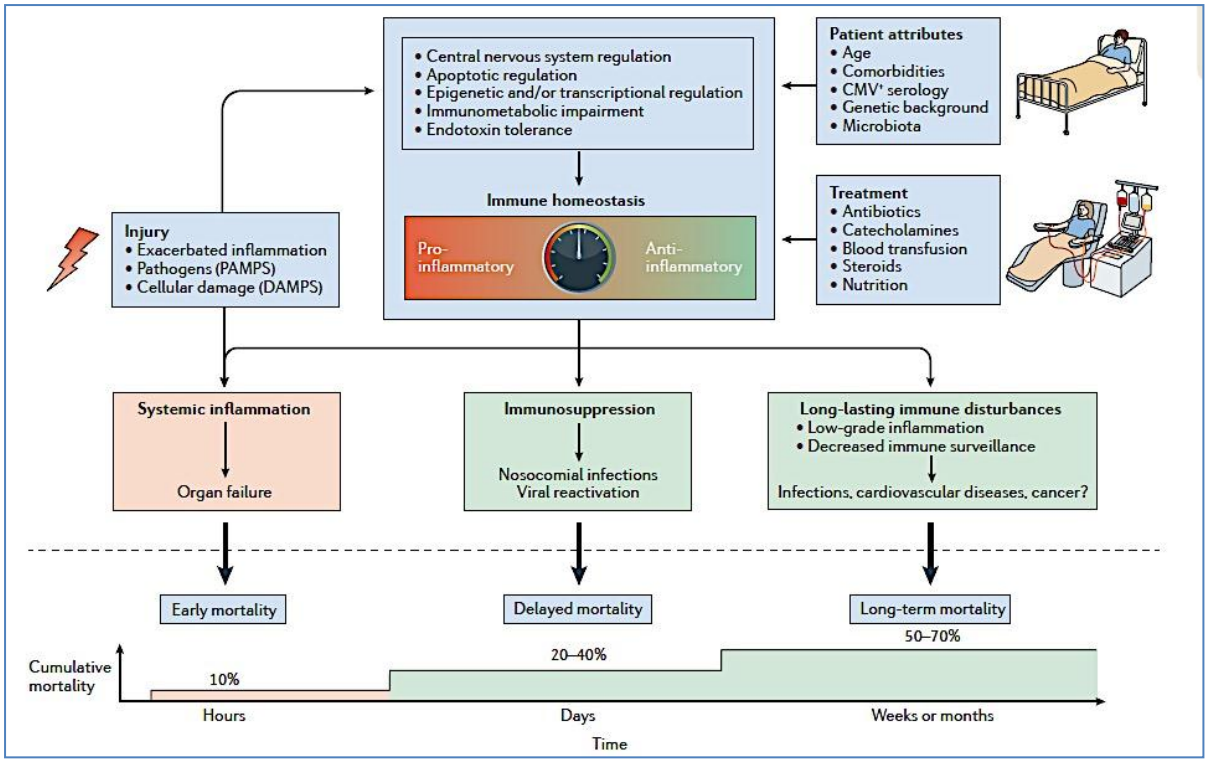
Η δυσλειτουργία των περισσοτέρων οργάνων στη σήψη μπορεί να είναι αναστρέψιμη. Ο πρώτος στόχος στην πρόληψη της δυσλειτουργίας οργάνων είναι η αποκατάσταση και η διατήρηση επαρκούς μεταφοράς οξυγόνου στα κύτταρα, ο γρήγορος έλεγχος της λοίμωξης, η αιμοδυναμική σταθεροποίηση και η στήριξη οργάνων έως την ανάκτηση της λειτουργίας τους (25). Το σημερινό μοντέλο της πορείας της σήψης, εμπλέκει όσον αφορά την πρόγνωση, μαζί τις φλεγμονώδεις και τις ανοσοκατασταλτικές απαντήσεις του ξενιστή. Λιγότεροι ασθενείς φαίνεται να πεθαίνουν στην πρώιμη περίοδο αν τύχουν πρωιμότερης αναγνώρισης και καλύτερης εφαρμογής βέλτιστων κλινικών πρακτικών. Η πρώιμη και αποτελεσματική αντιμετώπιση είναι εκείνη που οδηγεί στην έξοδο από τη μονάδα εντατικής θεραπείας. Ασθενείς που εμφανίζουν πρώιμα έντονη φλεγμονώδη αντίδραση,

φαίνεται ότι οδηγούνται σε ανεπάρκεια οργάνων και στο θάνατο. Κάποιοι από όσους καταφέρνουν και επιβιώνουν από μια πρώιμη φλεγμονώδη απάντηση, είναι πιθανό να παραμείνουν σε μια χρόνια κρίσιμη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από επίμονη φλεγμονή, ανοσοκαταστολή και σύνδρομο αυξημένου καταβολισμού (PICS) με αναζωπύρωση λανθανουσών ιογενών λοιμώξεων, και είναι εκείνοι που εκδηλώνουν νοσοκομειακές λοιμώξεις και μακροχρόνιες λειτουργικές και γνωστικές εκπτώσεις (16) (29).

ΕΚΒΑΣΗ ΣΟΒΑΡΗΣ ΝΟΣΟΥ

Δυνητικά η αντιφλεγμονώδης απάντηση στη σήψη (77) επηρρεάζεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι η διεισδυτικότητα του παθογόνου, το μέγεθος της εισόδου, του ενοφθαλμισμού, τις συνοσηρότητες ή άλλους δυσμενείς παράγοντες. (Α) Παρόλο που η προφλεγμονώδης και αντιφλεγμονώδης απάντηση ξεκινάει άμεσα με την έναρξη της σήψης, η αρχική απόκριση σε προηγουμένως υγιείς ασθενείς με σοβαρή σήψη χαρακτηρίζεται από υπερφλεγμονώδη απάντηση με πυρετό, υπερδυναμική κυκλοφορία και καταπληξία. Οι θάνατοι σε αυτή την πρώιμη φάση της σήψης γενικά οφείλονται σε καρδιαγγειακή καταπληξία, μεταβολικές διαταραχές και δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων.

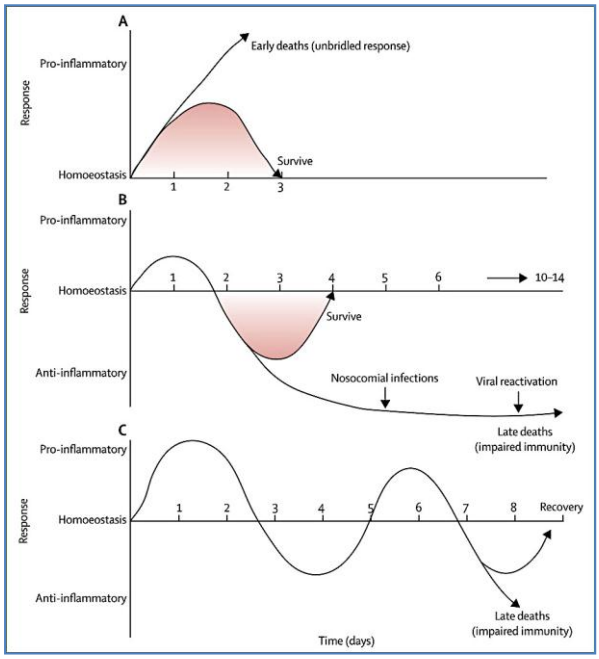
Αν και βραχείας δράσης αντιφλεγμονώδη έναντι των κυτοκινών άφησαν σημαντικές υποσχέσεις σε πειραματικό επίπεδο, δεν δείχθηκαν τελικά να βελτιώνουν την επιβίωση σε μελέτες φάσης 3. (Β) Πολλοί ασθενείς που αναπτύσσουν σήψη είναι ηλικιωμένοι με πολλές συννοσηρότητες που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση. Σε αντίθεση με παιδιά ή υγιή νεαρά άτομα, όταν αυτά τα άτομα αναπτύσσουν σηψαιμία, εκδηλώνουν μια μειωμένη ή απούσα υπερφλεγμονώδη φάση με συνέπεια οι ασθενείς γρήγορα να αναπτύσσουν έκπτωση στην ανοσία τους και μια αντιφλεγμονώδη κατάσταση. Η ανοσοενισχυτική θεραπεία χρειάζεται σ αυτή τη φάση. (Γ) Μια τρίτη θεωρητικά ανοσολογική απόκριση στη σήψη χαρακτηρίζεται από εναλλαγή υπερ-φλεγμονωδών και υποφλεγμονωδών καταστάσεων. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι ασθενείς που αναπτύσσουν σήψη έχουν αρχικά μια υπερφλεγμονώδη απόκριση που ακολουθείται από μια υποφλεγμονώδη. Όταν συμβεί μια νέα δευτερογενής λοίμωξη, οι ασθενείς εμφανίζουν επαναλαμβανόμενη υπερφλεγμονώδη απάντηση από την οποία είτε καταφέρνουν να αναρρώσουν ή επανεισέρχονται σε υποφλεγμονώδη απάντηση. Οι ασθενείς μπορούν να καταλήξουν οποιαδήποτε στιγμή. Δεν υπάρχουν αποδείξεις γι αυτή τη θεωρία και όσο πιο πολύ διαρκεί η σήψη, τόσο πιο πιθανό είναι ένας ασθενής να αναπτύξει σοβαρή ανοσοκαταστολή (σχήμα 45). Οι μηχανισμοί ανοσοπαράλυσης στη σήψη (35) φαίνονται παρακάτω.



CMV, κυτταρομεγαλοϊό; DAMP, μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με ζημιές. PAMPs, σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά μοτίβα

Nat Rev Nephrol. 2018 Feb;14(2):121–37 (35)

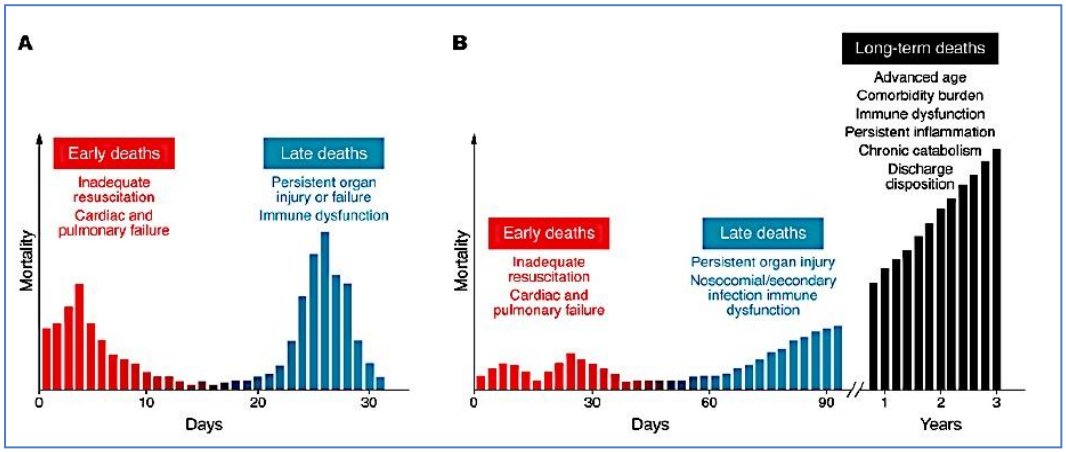
Σχήμα 45 . Μηχανισμοί ανοσοκαταστολής στη σήψη-Κατανομή θανάτων από σήψη



Inflamm Res. 3016 Nov 1;65(11):853-68

Σχήμα 46. Ιστορική κατανομή θανάτων στη σήψη (75) (23)

Οι θάνατοι από σήψη ακολουθούν μια διφασική κατανομή (σχήμα 49)

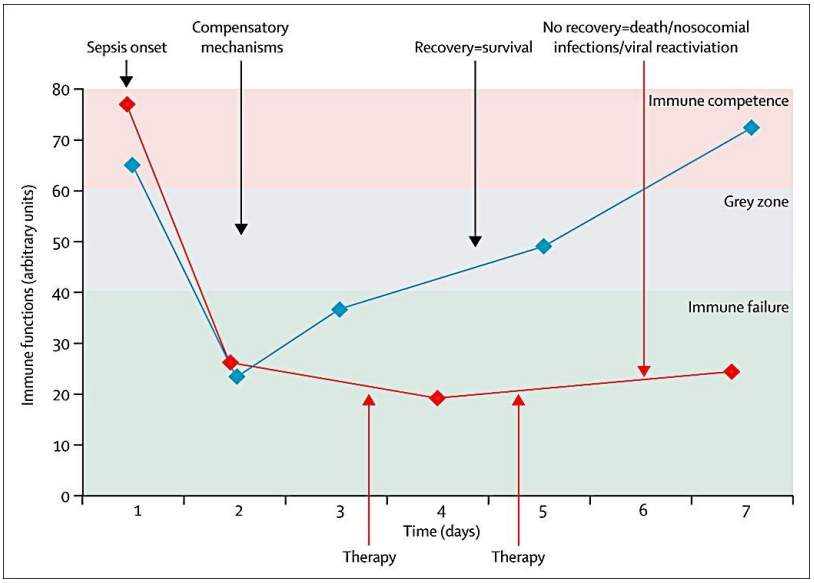


Nat Rev Immunol. 2013 Dec;13(12):862-74

Σχήμα 47. Οι θάνατοι στη σήψη κατανέμονται σε μια διφασική κατανομή (23)

(Α) πρώιμα στην αρχή λόγω ανεπαρκούς ανάνηψης, μετά από καρδιοαναπνευστική ανακοπή, και μια όψιμη, αρκετές εβδομάδες μετά, εξαιτίας ανεπάρκειας και έκπτωσης οργάνων. (Β) Παραμένουν οι δύο πρώτες κορυφές της θνητότητας με πολύ μικρότερο μέγεθος. Η τρίτη κορυφή εμφανίζεται περίπου 60 έως 90 ημέρες μετά τη σήψη και συνεχίζει να αυξάνεται στο χρόνο. Αυτή η καθυστερημένη αύξηση στη θνητότητα από σήψη είναι η συνέπεια της εξελισσόμενης φροντίδας της ΜΕΘ που διατηρεί στη ζωή ηλικιωμένους και υπερήλικες με υποκείμενα νοσήματα παρά τις συνεχιζόμενες ανοσολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές διαταραχές (23).

Νέες μέθοδοι με μέτρηση βιοδεικτών για την ποσοτικοποίηση του βαθμού της ανοσοκαταστολής σε σηπτικούς ασθενείς χρησιμοποιούνται σήμερα. Για παράδειγμα, ποσοτική μέτρηση έκφρασης HLA-DR μονοκυττάρων αίματος με κυτταρομετρία ροής έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ασθενών που θα ανταποκρίνονταν σε χορήγηση παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων μακροφάγων (GM-CSF). Στο μέλλον, άλλοι βιοδείκτες, όπως εκείνοι που χρησιμοποιούνται σήμερα στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, πιθανά θα χρησιμοποιηθούν. Η έκφραση του προγραμματισμένου συνδέσμου κυττάρου-θανάτου-1 (PD-L1) των μονοκυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να καθοδηγήσει πιθανή θεραπεία με αντίσωμα anti-PD-1. Ασθενείς με επίμονα χαμηλό αριθμό λεμφοκυττάρων θα μπορούσαν να είναι υποψήφιοι για θεραπεία με ιντερλευκίνη-7. Οι ασθενείς με λοιμώξεις από ασθενή παθογόνα όπως η Candida spp ίσως είναι υποψήφιοι για ανοσοθεραπεία. Η θεραπεία θα μπορούσε να περιλαμβάνει παρεμβάσεις ανοσοδιέγερσης, για τους πιο σοβαρά ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, που αναγνωρίζονται κατά την παρακολούθηση της ανοσολογικής τους κατάστασης (σχήμα 48) (77).

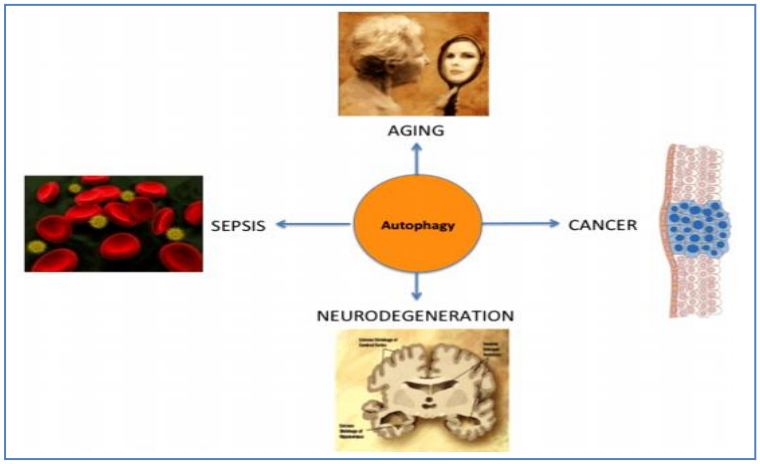


Lancet Infect Dis. PMC 2013 Nov 1

Σχήμα 48. Ανοσοδιεγερτική θεραπεία στη σήψη: μια νέα προσέγγιση

Η εξακρίβωση των ακριβών μηχανισμών που διέπουν τον φλεγμονώδη επαναπρογραμματισμό και την ανοσοπαράλυση στη σήψη, θα μπορούσε πραγματικά να οδηγήσει σε ανεύρεση τρόπου ρύθμισης της αυτοφαγίας autoregulation ώστε να βελτιωθεί η φλεγμονώδης απάντηση, η λειτουργία των ανοσοκυττάρων και η επιβίωση (42). Καταστελμένη ή ανεπαρκής αυτοφαγία οδηγεί σε δυσλειτουργία και ανεπάρκεια ανοσοκυττάρων με συνοδό διαταραγμένη ανοσία και αυξημένη θνητότητα σε καταστάσεις σήψης (78)(79).

Η αυτοφαγία, επομένως η οποία μάλιστα εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως στον σακχαρώδη διαβήτη, στην ογκολογία και νευροεκφυλιστικές νόσους (σχήμα 49)(80), θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μελλοντικό θεραπευτικό στόχο και στη σήψη.



Rom J Morphol Embryol 2017, 58(1):27–31

Σχήμα 49. Αυτοφαγία και νόσος

Συνοπτική γνώση από τη βιβλιογραφία

Στο SIRS που σχετίζεται με τραύμα αλλά και στη σήψη, η θνητότητα έχει συσχετιστεί με την κυτταρική βλάβη και την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (Multiple Organ System Failure, MOSF) (76)(64). Παρά τα όσα πλέον γνωρίζουμε για την ανοσοπαθολογία της, δεν διαθέτουμε γι αυτήν ακόμα αποτελεσματική θεραπεία.

Σήμερα πλέον υποστηρίζεται η άποψη ότι στη βαριά νόσο, το οξειδωτικό στρες μέσω κυτοκινών οδηγεί σε καταστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, σε πολυεπίπεδη διαταραχή του μεταβολισμού και κατανάλωσης ενέργειας (81)(82), ενεργειακή δυσλειτουργία κυττάρων και οργάνων, βιοενεργειακή ανεπάρκεια και τελικά ενεργειακή έκπτωση, απόπτωση κυττάρων, ανοσοκαταστολή που οδηγεί σε πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο (79)(78). Η διαταραχή στο μεταβολισμό επηρεάζει κυρίως τα ανοσοκύτταρα, για αυτό και ονομάζεται ανοσομεταβολισμός. Μεγάλη σημασία για την προσαρμοστική ανοσία του ασθενή έχουν τα Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία και επηρεάζονται μέσα στις τρεις πρώτες ώρες της σήψης, ενώ τα ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) είναι εκείνα που ευθύνονται για την ανοσοκαταστολή στα όψιμα στάδια της σήψης. Επεμβαίνοντας στο ανοσομεταβολισμό αυτών των Τ λεμφοκυττάρων, θα μπορούσαμε στο μέλλον να είμαστε σε θέση να παρέμβουμε και να τροποποιήσουμε την πορεία της σήψης (28). Η τροποποίηση του ανοσομεταβολισμού στους βαρέως πάσχοντες, ενήλικες και παιδιά συμβαίνει στην οξεία φάση ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για την πορεία αυτής της διαδικασίας στις επόμενες ημέρες εξέλιξης της νόσου.

Δεν έχουν επίσης μελετηθεί οι διαχρονικές μεταβολές της βιοενέργειας, της ενδογενούς ανοσίας, μέσω των HSPs, του μεταβολισμού και της φλεγμονώδους ορμονικής αντίδρασης, μέσω συγκεντρώσεων ορμονών του μεταβολισμού, όπως η ρεζιστίνη και αντιπονεκτίνη, αλλά ούτε και οι επιπτώσεις αυτών των μεταβολων στη δυσλειτουργία οργάνων στην οξεία φάση σοβαρής νόσου ή τραύματος σε ενήλικες ή παιδιά.

Μέρος των ως άνω ερωτημάτων επιχειρεί να προσεγγίσει για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία η παρούσα ερευνητική προσπάθεια.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΠΟΘΕΣΗ-ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Το κυτταρικό στρες λόγω σοβαρής σήψης (severe sepsis, SS) ή εξαιτίας συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) εκδηλώνεται με οξείες φλεγμονώδεις, μεταβολικές, ορμονικές, ανοσολογικές διαταραχές και μεταβολές βιοενέργειας, αποτέλεσμα διαταραχών σε κυτταρικό επίπεδο που έχουν να κάνουν κυρίως με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων τους. Οι διαταραχές αυτές εκφράζονται με μεταβολές στις συγκεντρώσεις ενδοκυττάριων και εξωκυττάριων πρωτεϊνών (HSPs), αμινοξέων, ορμονών ή άλλων προϊόντων μεταβολισμού, αλλαγές στην κατανάλωση οξυγόνου (VO_2), την παραγωγή CO_2 (VCO_2) και την κατανάλωση ενέργειας (ΕΕ), στην παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) και την παραγωγή ATP. Ασθενείς με σοβαρή σήψη ή SIRS εμφανίζουν αυτήν τη συνεχιζόμενη φλεγμονώδη 'απάντηση' κυρίως κατά τις πρώτες ημέρες νόσου, όπως καθορίζεται από το γενετικό τους προφίλ και πιθανότατα είναι εκείνη που σχετίζεται και καθορίζει και την έκβαση της κατάστασής τους. Τα ερωτήματα που τίθενται και τα οποία δεν έχουν έως σήμερα εκτενώς μελετηθεί είναι:

- Ποιες είναι οι διαχρονικές μεταβολές (μεταβολικές, ανοσολογικές, βιοενέργειας) στη σοβαρή νόσο;
- Είναι διαφορετικές οι μεταβολές αυτές αν το αίτιο είναι λοιμώδες (SS) ή μη (π.χ. SIRS από τραύμα);
- Είναι οι μεταβολές αυτές ίδιες σε παιδιά και ενήλικες;
- Πώς είναι η διακύμανση των παραπάνω παραμέτρων σε ασθενείς, ενήλικες και παιδιά, με SS και SIRS την πρώτη ημέρα νοσηλείας τους, και ποια είναι η σχέση τους με αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες υγιών ασθενών;
- Πώς εξελίσσονται αυτές οι μεταβολές στην πορεία της νόσου, διαχρονικά, από τη πρώτη ημέρα δηλαδή νοσηλείας, στην τρίτη ημέρα και έως και την πέμπτη ημέρα νόσου;
- Είναι η ίδια αυτή η πορεία των μεταβολών σε ενήλικες και παιδιά, με SS ή SIRS?
- Πώς σχετίζονται αυτές οι αλλαγές με την έκβαση της κάθε νόσου;
- Μπορεί η πρώιμη παρακολούθηση των μεταβολών αυτών ή/και της τάσης των μεταβολών αυτών να βοηθήσει στον εντοπισμό ασθενών με αυξημένη πιθανότητα κακής έκβασης, ώστε να είναι δυνατή, με κατάλληλη τροποποίηση της θεραπείας η επίτευξη βελτίωσης της πρόγνωσης της νόσου?

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της προοπτικής αυτής μελέτης ήταν να μελετηθούν οι διαχρονικές μεταβολές φλεγμονώδους και ορμονικής απάντησης, ενδογενούς ανοσίας, βιοενέργειας και μεταβολισμού, σε ενήλικες και παιδιά στην οξεία φάση σοβαρής σήψης (SS) και SIRS, που νοσηλεύτηκαν σε μονάδα εντατικής θεραπείας σε μηχανικό αερισμό, και να γίνει σύγκριση με αντίστοιχη ηλικιακή ομάδα υγιών ατόμων.

Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά, απ' ότι γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, μελετήθηκε η διαφοροποίηση του συνδυασμού των οξέων αυτών μεταβολών στη σήψη και το τραύμα διαχρονικά, από την πρώτη, στην τρίτη και την πέμπτη ημέρα νόσου.

Αναλυτικά στον σχεδιασμό της έρευνας, στόχοι ήταν:

- να μετρηθούν διαχρονικά τις 5 πρώτες ημέρες νόσου:
    - οι μεταβολές ενδογενούς ανοσίας, μεταβολισμού και φλεγμονώδους ορμονικής αντίδρασης μέσω των συγκεντρώσεων HSPs, αμινοξέων, και ορμονικών μεταβολών της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης
    - η διαχρονική κατανάλωση οξυγόνου (VO_2), παραγωγή CO_2 (VCO_2), ενεργειακή κατανάλωση (ΕΕ)
    - οι διαχρονικές μεταβολές βιοενέργειας
- να συγκριθούν διαχρονικά οι μεταβολές αυτές με αντίστοιχες ομάδας υγιών παιδιών και ενηλίκων
- να εξεταστούν διαχρονικά οι διαφορές μεταξύ ασθενών με σήψη και ασθενών με τραύμα (SIRS), τόσο στα παιδιά όσο και σε ενήλικες
- να συσχετιστούν οι δείκτες φλεγμονής, βιοενέργειας ή μεταβολικού προφίλ με τους δείκτες κλινικής βαρύτητας σε ενήλικες και παιδιά με σήψη ή SIRS την $1^η$, $3^η$ και $5^η$ ημέρα της νόσου.
- να συσχετιστεί η όποια δυσμενής έκβαση με πρώιμα κλινικά δεδομένα, με πρώιμες τιμές φλεγμονωδών βιοδεικτών (γαλακτικό, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)), με την ανοσολογική απάντηση και την κατανάλωση ενέργειας, αλλά κυρίως με την πορεία των διαχρονικών μεταβολών του μεταβολικού και βιοενεργητικού προφίλ που παρουσιάζουν ασθενείς, ενήλικες και παιδιά, στην πορεία της νόσου τους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πρόδρομη αυτή κλινική ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στις δύο Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, Ενηλίκων και Παίδων στο Πανεπιστημιακό Γενικού Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης σε χρονικό διάστημα δύο ετών, από το Δεκέμβριο του 2012 έως το Σεπτέμβριο του 2015, μετά από έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου μας (Έγκριση IRB October 26, 2011, No 14494/2011) και έγγραφη συναίνεση των συνοδών ή των κηδεμόνων των ασθενών. Όλα τα δεδομένα ήταν ανώνυμα.

Στη μελέτη μας συμπεριελήφθησαν εκατό σαράντα επτά (147) ασθενείς, 79 ενήλικες και 68 παιδιά (ηλικία <18 ετών), ενώ νοσηλεύονταν διασωληνωμένοι σε μονάδα εντατικής νοσηλείας και πληρούσαν τα κριτήρια της Sepsis-3 για ενήλικες ή σοβαρής σήψης/σηπτικού σοκ για παιδιά, ή SIRS μετά από τραύμα για ενήλικες και παιδιά (17). Ασθενείς που αρνήθηκαν να δώσουν συγκατάθεση, αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Σαν ομάδα ελέγχου (control), χρησιμοποιήθηκε για τους μεν ενήλικες, ομάδα με 33 υγιείς ενήλικες εθελοντές, για τα δε παιδιά, ομάδα από 27 υγιή- περίπου ίδιας κατανομής φύλου και ηλικίας παιδιά - που προσήλθαν για προεγχειρητικό έλεγχο για προγραμματισμένο χειρουργείο. Πέραν των υγιών, στα 68 παιδιά (≤ 18 ετών) που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, 23 ήταν με SIRS λόγω σοβαρής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης, 18 με σήψη/σοβαρή σήψη. Από τους 79 ενήλικες, 23 ασθενείς ήταν σε καθεμιά από τις παραπάνω ομάδες αντίστοιχα, ενώ 33 ήταν υγιείς.

Αναλυτικά τα δημογραφικά χαρακτηριστικά παιδιών και ενηλίκων φαίνονται στον **Πίνακα 1**

Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη ήταν: α) παρουσία πρώιμου σηπτικού σοκ (≤ 48 ώρες από την εισαγωγή στη ΜΕΘ) και β) ασθενείς με τραύμα που πληρούσαν τουλάχιστον 2 κριτήρια SIRS (≤ 48 ώρες μετά το τραύμα). Χρησιμοποιήθηκαν οι ορισμοί της σήψης, της σοβαρής σήψης/σηπτικής καταπληξίας και του SIRS, σύμφωνα με τα ισχύοντα κριτήρια από τις νέες κατευθυντήριες οδηγίες που περιγράφησαν στο γενικό μέρος.

Από τη μελέτη αποκλείσθηκαν ασθενείς με όψιμη σήψη ή SIRS (>48-hours), αυτοάνοσο νόσημα, κακοήθεια, ανοσοανεπάρκεια, μεταβολικό ή χρόνιο νόσημα ή ενδοκρινοπάθειες (Σακχαρώδης διαβήτης, Υπερχοληστερολαιμία, κλπ).

Κανένας από τους ασθενείς δεν ελάμβανε παρεντερική διατροφή και η εντερική διατροφή η οποία ξεκινούσε μετά από την πρώτη αιμοληψία, με ρυθμό 5-10ml/kg/day σε συνεχή χορήγηση από ρινογαστρικό σωλήνα, με απώτερο στόχο να χορηγείται, το ήμισυ των ενεργειακών αναγκών του κάθε ασθενούς έως και τη δεύτερη μέρα νοσηλείας και πλήρη κάλυψη των αναγκών έως και την ημέρα 4-5, αν αυτή ήταν ανεκτή.

Μέθοδοι

Καταγραφή, Δείκτες Κλινικής Βαρύτητας

Για την εκτίμηση της κλινικής βαρύτητας των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για τους παιδιατρικούς ασθενείς οι δείκτες βαρύτητας νόσου Pediatric Logistic Organ Dysfunction (PELOD), Acute Physiology and Pediatric risk of mortality (PRISMIII) and Therapeutic Intervention Scoring System (TISS) οι οποίοι και υπολογίστηκαν για κάθε ασθενή ανάλογα με την ηλικία του. Για τους ενήλικες χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες βαρύτητας νόσου APACHE II (Acute Physiologíc and Chronic Health Evaluation) (12) (83), *(88),* (84), SOFA και SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) (85) (αναλυτικά οι πίνακες βαθμονόμησης στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

Δείκτης Μάζας Σώματος (Body mass index, BMI)

Ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body mass index, BMI) και τα αντίστοιχα παιδιατρικά z-scores υπολογίστηκαν με βάση τις διεθνείς προτεινόμενες αναφορές από τον WHO (86) και οι προβλεπόμενοι ρυθμοί βασικού μεταβολισμού PBMR (Predicted Basic Metabolic Rate) με τη χρήση των εξισώσεων Harris Benedict και Schofield (87).

Καταγράφηκαν τα κλινικά δεδομένα καθώς και η καρδιακή συσταλτικότητα όπως εκείνη εκτιμήθηκε με υπερηχογραφικό έλεγχο, μετρώντας το κλάσμα εξώθησης μυοκαρδίου (myocardial ejection fraction, EF) και το κλάσμα βράχυνσης (shortening fraction, SF), κατά την νοσηλεία στην εντατική.

Αιμοληψία

Λήψη είκοσι τεσσάρων ml αίματος γινόταν από κεντρικό αρτηριακό καθετήρα, εντός των πρώτων 24 ωρών από την εισαγωγή των ασθενών στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και πριν την έναρξη εντερικής ή παρεντερικής σίτισης, καθώς και στις ημέρες 3 και 5 της νοσηλείας τους. Πραγματοποιούνταν οι κατάλληλες προετοιμασίες και τα δείγματα φυλάσσονταν στο προβλεπόμενο περιβάλλον (κατάψυξη -80°C), μέχρι τις προγραμματισθείσες εργαστηριακές αναλύσεις. Ταυτόχρονα γινόταν καταγραφή των συνήθων βιοχημικών παράμετρων (αλβουμίνη, γλυκόζη, γαλακτικό, CRP, και δεικτών λειτουργίας οργάνων).

Για τη μέτρηση NOx, επιπέδων ATP (βιοενέργεια), δεικτών οξειδωτικού στρες (oxidative stress marker) (TBARS) και Biliverdin reductase (BVR) activity, δείγματα πλάσματος, αίματος και λευκοκυττάρων από ηπαρινισμένο ολικό αίμα, μεταφέρονταν στο υπεύθυνο εργαστήριο σε ξηρό πάγο και αποθηκεύονταν στους - 80 ° C μέχρι την ανάλυση.

Η απομόνωση λευκοκκυττάρων γινόταν μετά από επεξεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα υποτονικού χλωριούχου αμμωνίου, και φυγοκέντρηση.

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, τα δείγματα αίματος λαμβάνονταν σε ηπαρινισμένα σωληνάρια τα οποία διατηρούνταν σε πάγο μέχρι να φυγοκεντρηθούν μέσα σε 30min

(2000g for 10 min at 4 °C). Στη συνέχεια το πλάσμα αποθηκευόταν στους − 80 °C μέχρι να γίνει η ανάλυσή τους με τη χρήση χρωματογραφίας HPLC. Η ανάλυση γινόταν με αυτοματοποιημένη χρωματογραφία HPLC, μετά από επεξεργασία με τριχλωρποξεικό οξύ (TCA) 30%. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν σε ξηρό πάγο. Για την ανάλυση των δειγμάτων, 300μl πλάσματος αναμιγνύονταν με 30μl σταθεροποιητικού 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) σε 35% SSA σε σωληνάρια Eppendorf. Τα αμινοξέα διαχωρίζονταν σε αναλυτή Hitachi Aminoacid analyzer (L 8900, JP) με σταθερή ροή σε ειδικό κύλινδρο σταθερής ροής (constant flow on a high-resolution cation-exchange column) (NEOLAB S.A, Athens, Greece).

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προσδιορισμός εξωκυττάριων Hsp-72 και Hsp 90α

Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Τα επίπεδα πρωτεΐνης HSP72 και HSP90α στο πλάσμα/ορό προσδιορίσθηκαν με ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) με kits του εμπορίου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [Enzo Life Sciences-Lausen, Switzerland]. Ειδικότερα, τα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) της προς προσδιορισμό τσαπερόνης και ορός του κάθε δείγματος προστέθηκαν σε προαριθμημένα βοθρία. Τα βοθρία ήταν προ-επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για HSP72 ή HSP90α αντίστοιχα. Τα δείγματα είχαν αραιωθεί 1:25 για την HSP90α και 1:1 για την HSP72. Μετά την έκπλυση για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων ουσιών πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για HSP90α και συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση προστέθηκε στα βοθρία. Για την HSP72 η φάση αυτή πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (πρώτα προστέθηκε το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα και μετά από επώαση και πλύση, προστέθηκε το διάλυμα ραφανιδικής υπεροξειδάσης). Ακολούθησε πάλι πλύση για την απομάκρυνση οποιουδήποτε μη ειδικά συνδεδεμένου αντιδραστηρίου και προστέθηκε το διάλυμα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναλόγου χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της HSP72 και HSP90α σε κάθε δείγμα. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε στα 450 nm σε φωτόμετρο ειδικό για μικροπλάκα. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν εις διπλούν. Η ευαισθησία των μετρήσεων ήταν 50 pg/mL για την Hsp90α και 90 pg/mL για την Hsp72.

Προσδιορισμός ενδοκυττάριων Hsp-72 και Hsp 90α

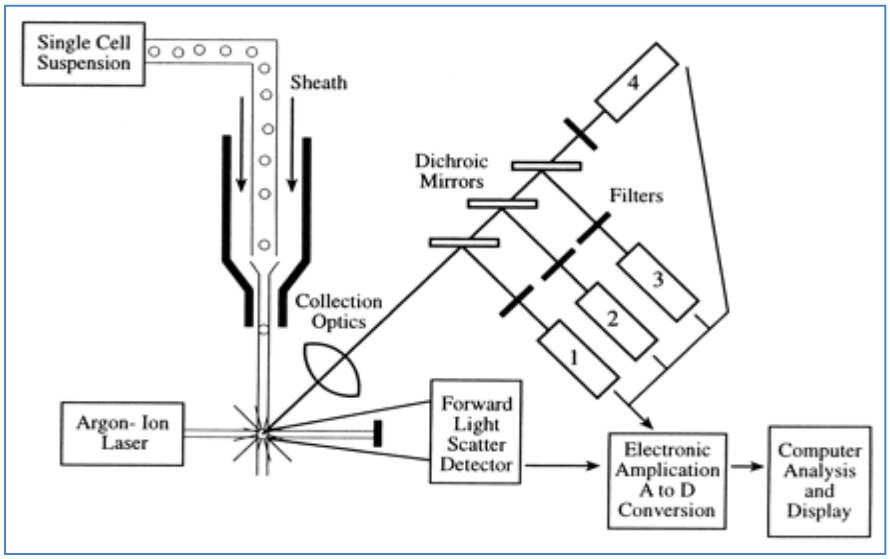
Για τον προσδιορισμό των ενδοκυττάριων πρωτεϊνών θερμικού HSP72 και HSP90α στα μονοπύρηνα και πολυμορφοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής. Ολικό αίμα επωάστηκε με μονοκλωνικά αντισώματα CD33-PeCy5 (phycoerythrin-Cy5) και CD45-PeCy7 (phycoerythrin-Cy7) και στη συνέχεια έγινε ενδοκυττάρια χρώση με τα αντίστοιχα αντισώματα. Αρχικά, απομονώθηκαν τα κύτταρα σύμφωνα με την έκφραση CD45 και προσδιορίστηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων με

βάση την έκφραση του CD45 και την πλάγια σκέδαση. Ακολούθησε διαχωρισμός των πληθυσμών των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων με βάση τη σήμανση με το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα. Καταγράφηκε η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity-MFI) της HSP72 & HSP90a στα μονοπύρηνα και ουδετερόφιλα κύτταρα περιφερικού αίματος. Για να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητα των τιμών της MFI, υπήρχε μέριμνα για διατήρηση σταθερών των ρυθμίσεων του κυτταρομετρητή ροής και διενεργούσαμε τακτικό ποιοτικό έλεγχο του οργάνου με σφαιρίδια συγκεκριμένης έντασης φθορισμού.

Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μέθοδος ανάλυσης κυτταρικών πληθυσμών προερχόμενων από σχεδόν οποιοδήποτε τύπο νωπού, μη μονιμοποιημένου ιστού ή σωματικού υγρού, σεσημασμένου με ειδικά φθοριοχρώματα, τα οποία υπόκεινται σε ανάλυση από ένα ειδικό μηχάνημα, τον κυτταρομετρητή ροής (σχήμα 50) (88). Στην κυτταρομετρία ροής απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος ώστε ένα-ένα να εστιάζεται στο σημείο ανάλυσης όπου γίνεται η μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων του.

Σχήμα 50. Κυτταρομετρία ροής



Ο κυτταρομετρητής ροής είναι μια σχετικά πολύπλοκη συσκευή, η οποία αποτελείται από τρία βασικά στοιχεία:

Α) το σύστημα ροής υπεύθυνο για την οδήγηση του υπό εξέταση υλικού στο σημείο ανάλυσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την έγχυση του υλικού σε ένα άλλο αδρανές υγρό. Το υπό εξέταση υλικό καθώς βρίσκεται στον πυρήνα του υγρού οδηγείται προς το σημείο ανάλυσης. Με ειδικές υδροδυναμικές ρυθμίσεις επιτυγχάνεται η γραμμική ροή των κυττάρων στο κέντρο της ροής. Η διάμετρος του αυλού μειώνεται σταδιακά, πλησιάζοντας

προς το σημείο ανάλυσης, όπου ένα κύτταρο σε υδροδυναμική εστίαση έρχεται σε επαφή με μια ακτίνα που εκπέμπεται από μια ή περισσότερες πηγές φωτός (συνήθως λέιζερ)

Β) το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει την πηγή φωτός, η οποία χρησιμεύει στη διέγερση των φθοριοχρωμάτων που είναι συζευγμένα με τα αντισώματα, το σύστημα κατόπτρων το οποίο συγκλίνει την ακτίνα στους ειδικούς ανιχνευτές και τους ίδιους τους ειδικούς ανιχνευτές (βολταϊκοί δίοδοι) που μετατρέπουν τα εκλύοντα φωτόνια σε ηλεκτρικά κύματα, ανάλογα με την ένταση της ακτίνας φωτός.

Το μήκος κύματος της δέσμης που εκπέμπει η πηγή παίζει σημαντικό ρόλο γιατί καθορίζει ποιες φθορίζουσες ουσίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν ανιχνευτές, εφόσον αυτές διεγείρονται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Στο σημείο της υδροδυναμικής εστίασης η ακτίνα φωτός «χτυπά» τα μεμονωμένα κύτταρα με αποτέλεσμα τη σκέδαση της ακτίνας. Ο όρος σκέδαση αναφέρεται στη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, μετά τη σύγκρουσή της με το κύτταρο, προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Το «σκεδαζόμενο» φως ανιχνεύεται από διαφορετικές γωνίες ανάλογα με τη διάταξη των ειδικών βολταϊκών διόδων, οι οποίες μετρούν την έντασή του. Αν η φωτοδίοδος βρίσκεται μπροστά από το κύτταρο μετράται το οριζόντιο σκεδαζόμενο φως (forward light scatter – FS). Αν η φωτοδίοδος είναι κάθετη ως προς τη προσπίπτουσα ακτινοβολία ανιχνεύεται η κάθετη σκέδαση του φωτός (side scatter – SS). Το οριζόντιο σκεδαζόμενο φως μας δίνει πληροφορίες για το μέγεθος ενός κυττάρου, ενώ το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική κοκκίωση. Τα φωτεινά σήματα συλλέγονται από τις βολταϊκές φωτοδιόδους, δημιουργώντας ένα ρεύμα παλμού, του οποίου το ύψος, η διάρκεια, το σχήμα και η μαθηματική του ολοκλήρωση μας δίνουν τις πληροφορίες για το κύτταρο. Από την ταξινόμηση των χιλιάδων αυτών σημάτων σε μερικά δευτερόλεπτα δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των παραμέτρων. Έτσι έχουμε κατανομές συχνότητας μιας παραμέτρου όταν το αναλογικό σήμα που μετριέται εκφράζει ένα μόνο χαρακτηριστικό του κυττάρου. Όταν εξετάζονται δύο χαρακτηριστικά έχουμε τις διπαραμετρικές κατανομές, ενώ όταν εξετάζονται περισσότερα χαρακτηριστικά έχουμε τις πολυπαραμετρικές κατανομές. Η πολυπαραμετρική ανάλυση βασίζεται στην εφαρμογή διαδοχικών διαχωρισμών σε διπαραμετρικές κατανομές έτσι ώστε να απομονώνεται ένας καθαρός υποπληθυσμός ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα υποβάλλονται σε νέα συσχέτιση. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να εξεταστούν δεκάδες παράμετροι στην επιφάνεια των κυττάρων και να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα.

Γ) το ηλεκτρονικό και το υπολογιστικό σύστημα το οποίο περιλαμβάνει την κεντρική υπολογιστική μονάδα και το κατάλληλο λογισμικό για την ανάλυση και ερμηνεία των μετρήσεων ενώ παράλληλα επιτρέπει και την άμεση «παραμετροποίηση» της μέτρησης καθώς και τον έλεγχο των ρυθμίσεων του κυτταρομετρητή.

Προσδιορισμός Αμινοξέων

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναλυτής (Hitachi AminoacidanalyzerL 8900) όπου το δείγμα εξετάστηκε υπό συνεχή ροή σε στήλη ανταλλαγής κατιόντων υψηλής ανάλυσης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος και σε συνθήκες διαβάθμισης θερμοκρασίας. Στο έκπλυμα της προστέθηκε νινυδρίνη και διεξήχθη αντίδραση στους 135°C. Η απορρόφηση των προϊόντων της αντίδρασης μετρήθηκε στα 570 και 440 nm και υπολογίστηκε ο λόγος των τιμών (570/440). Τα αμινοξέα ταυτοποιήθηκαν μετά από σύγκριση των τιμών του χρόνου κατακράτησης και του λόγου των τιμών απορρόφησης κάθε δείγματος με τα αντίστοιχα προτύπων ουσιών αναφοράς. Το δείγμα προετοιμάστηκε με 300 μl πλάσματος και 30 μl του εσωτερικού προτύπου AEC σε 35% SSA αναμείχτηκαν σε σωληνάριο τύπου Eppendorf. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση, επώαση για 30 min σε ψυγείο και μετά φυγοκέντρηση (11.000x g επί 10 λεπτά) σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο διηθήθηκε σε φίλτρο 0.2 μm. Σε 140 μl του διηθήματος προστέθηκαν 140 μl ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού λιθίου 1 (P-21) και έγινε έντονη ανάδευση (Vortex). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε ψυχόμενο αυτόματο δειγματολήπτη, όπου παρέμεινε σταθερό 3 ημέρες.

Μέτρηση Κατανάλωσης Ενέργειας (EE/Energy Expenditure)

Η *μέτρηση κατανάλωσης ενέργειας (Energy Expenditure, EE)* υπολογίστηκε με έμμεση θερμιδομετρία, με μόνιτορ εκτίμησης μεταβολικού προφίλ E-COVX (GE Healthcare/Datex-Ohmeda 2000), που μετατρέπει την κατανάλωση οξυγόνου (VO_2) και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (VCO_2) σε κατανάλωση ενέργειας (energy expenditure [kcal/d]) (78), (91), (89). Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το φορητό μόνιτορ μεταβολισμού E-COVX (GEHealthcare/Datex-Ohmeda) που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 51 (77).

Σχήμα 51.

E-COVX - Módulo de gases (CO2, O2, Espirometria e Calorimetria)

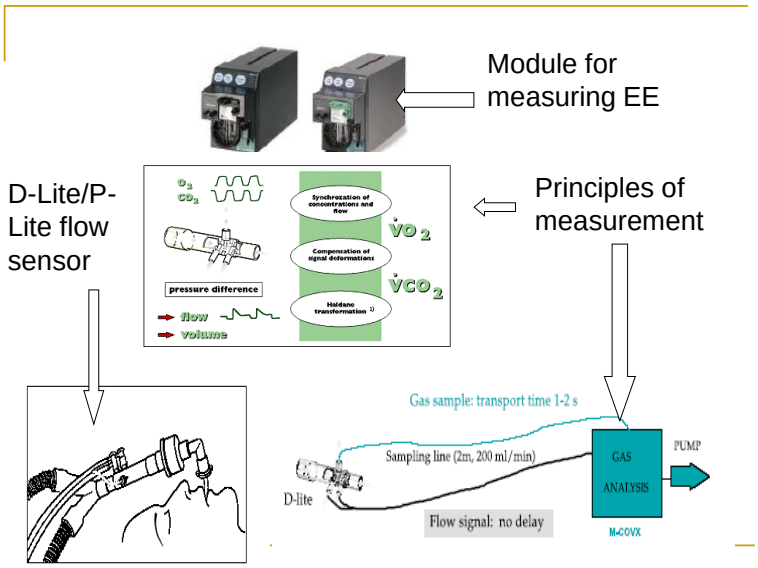
Módulo de gases (CO2, O2, Espirometria e Calorimetria)

Η έμμεση θερμιδομετρία είναι η πλέον αποδεκτή μέθοδος ως μέθοδος αναφοράς για την μέτρηση της ενέργειας που καταναλώνει ο ασθενής**.** Στηρίζεται στην αρχή σύμφωνα με την οποία η παραγόμενη ενέργεια στον οργανισμό είναι ευθέως ανάλογη της κατανάλωσης

οξυγόνου, η μέτρηση της οποίας γίνεται με τη χρήση ενός ειδικού αναπνευστικού θερμιδομετρητή. Σύμφωνα με τους νόμους της θερμοδυναμικής, όταν ένα υλικό μετασχηματίζεται με χημικές ή φυσικές αντιδράσεις τότε παράγεται ενέργεια με μορφή θερμότητας ή έργου. Η μέτρηση της θερμότητας αυτής λέγεται Θερμιδομετρία.

Η έμμεση θερμιδομετρία μετρά τη θερμότητα που παράγεται από το μεταβολισμό των ζωικών οργανισμών, υπολογίζοντας το οξυγόνο που καταναλώνουν (VO2) για την καύση των θρεπτικών υποστρωμάτων που τους παρέχονται (σίτιση) (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη), το παραγόμενο από την καύση αυτή CO2 (VCO2) και την απώλεια αζώτου (με τη μορφή ουρίας), εξασφαλίζοντας έτσι ένα μέτρο του μεταβολικού τους ρυθμού. Μεγάλος αριθμός εργασιών έχει δείξει ότι η μέθοδος αυτή είναι ακριβής στην εκτίμηση του μεταβολικού ρυθμού και μπορεί να προβλέψει τις ενεργειακές ανάγκες των βαρέως πασχόντων ασθενών της ΜΕΘ (μηχανικά αεριζόμενων και μη), δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να σχεδιαστεί μια εξισορροπημένη διατροφική υποστήριξή τους.

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, το E-COVX βασίζεται στη μέτρηση του εισπνεόμενου όγκου για τον υπολογισμό της κατανάλωσης Οξυγόνου (VO_2) σε διασωληνωμένο ασθενή όπως φαίνεται στο σχήμα 52:



Σχήμα 52. Θερμιδομετρία σε διασωληνωμένο ασθενή

Η συσκευή επιτρέπει συνεχόμενη, αναπνοή προς αναπνοή, παρακολούθηση του καταναλισκόμενου Οξυγόνου και του παραγόμενου Διοξειδίου του Άνθρακα (VCO_2). Το λογισμικού του E-COVX χρησιμοποιεί τον τύπο Weir, ώστε να υπολογίζει από τις μετρήσεις VO_2 και VCO_2 την Κατανάλωση Ενέργειας σε κατάσταση ηρεμίας, καθώς και το αναπνευστικό πηλίκο (respiratory quotient, RQ*), με βάση* τον τύπο :

ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΠΗΛΙΚΟ (respiratory quotient, RQ) = VCO2 / VO2

Το αναπνευστικό πηλίκο αντανακλά το χρησιμοποιούμενο για καύσεις θρεπτικό υπόστρωμα, που έχει χαρακτηριστική τιμή (πρωτεΐνες 0,8 - λίπη 0,7 – υδατάνθρακες 1,0). Για μια κλασσική διατροφή δυτικού τύπου το RQ είναι 0,65-1,25, ανάλογα με τη σύνθεση των θρεπτικών υποστρωμάτων (90)(78). Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφορα όργανα θερμιδομετρίας με δύο από αυτά, το Deltatrac II και το M-COVX να αναφέρονται σε επιστημονικές εργασίες με συγκρίσιμα αποτελέσματα (91), σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς.

Οι σημαντικότερες προϋποθέσεις είναι:

Ο ασθενής να είναι ήρεμος σε ύπτια θέση για τουλάχιστον 30 λεπτά, αποφεύγοντας οποιαδήποτε δραστηριότητα ή κοπιώδη δράση που θα μπορούσε να επηρεάσει τις ενεργειακές ανάγκες ηρεμίας (κίνηση, φυσιοθεραπεία, αναρρόφηση κ.α.)

Ασθενείς που έχουν διαλείποντα γεύματα μελετώνται 4 ώρες μετά, ενώ αυτοί σε συνεχή στάγδην σίτιση πρέπει να έχουν σταθερό ρυθμό έγχυσης για τουλάχιστον 12 ώρες.

Στο περιβάλλον να είναι θερμο-ουδέτερο (20-25°C) και ήσυχο. Επιπρόσθετες πηγές χορήγησης συμπληρωματικού οξυγόνου (μάσκες, ρινικοί καθετήρες) διακόπτονται όπου είναι δυνατόν.

Το FiO2 πρέπει να είναι σταθερό κατά τη μέτρηση, ενώ μεταβολές στις ρυθμίσεις του αναπνευστήρα απαιτούν καθυστέρηση της μέτρησης για 90 λεπτά.

Να μην υπάρχουν διαρροές στον αναπνευστήρα και στο σύστημα μέτρησης και όλα τα δεδομένα να συλλέγονται σε σταθερές συνθήκες (steady state, όταν η ανταλλαγή των αερίων σε κυτταρικό επίπεδο είναι ίση με αυτή που μετρείται στις αεροφόρους οδούς και προϋποθέτει σταθερό αερισμό και αιμάτωση κατά τη μέτρηση) σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες:

- Αποφυγή χορήγησης γενικής αναισθησίας για τουλάχιστον 6-8 ώρες πριν
- Χορήγηση αναλγησίας ή καταστολής τουλάχιστον 30 λεπτά πριν 3-4 ώρες μετά από αιμοκάθαρση και 1 ώρα μετά από επώδυνη διαδικασία

Μετά τη σύνδεση με το θερμιδόμετρο, απαιτούνται 5 λεπτά για τη λήψη των πρώτων δεδομένων, μετά από έλεγχο για λάθη και ενδείξεις μη σταθερής κατάστασης (calibration) Στη συνέχεια για 15 λεπτά συλλέγονται δεδομένα και τερματίζεται η μέτρηση.

Σφάλματα μέτρησης μπορούν να προκύψουν από:

- Διαφυγές αερίων από το κύκλωμα ασθενή-αναπνευστήρα (λάστιχα συνδετικά, γύρω από τον αεροθάλαμο των τραχειοσωλήνων, διαμέσου σωλήνων θωρακικών παροχετεύσεων ή βρογχοπνευμονικών συριγγίων) που παρεμποδίζουν τη συλλογή των αερίων

- Κατά την περιτοναϊκή κάθαρση ή την αιμοκάθαρση λόγω απομάκρυνσης του CO2 από τη μεμβράνη του φίλτρου
- Κακή βαθμονόμηση (calibration) του μηχανήματος
- Παρουσία υδρατμών, αναισθητικών αερίων ή άλλων εκτός από το O2 ή το CO2
- Εσωτερικές διαρροές του θερμιδόμετρου
- Μικρή διάρκεια μέτρησης

Η προβλεπόμενη ενεργειακή κατανάλωση και τα μεταβολικά πρότυπα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους τύπους που συνιστώνται (95).

Υπολογίστηκε το κλάσμα of EE/PBMR για να καθοριστεί η κατηγορία του κάθε ασθενούς με βάση το EE όπως έχει καθοριστεί από τη βιβλιογραφία (92). Υπερκαταβολικοί ήταν οι ασθενείς με EE/PBMR ratios >1.1, νορμοκαταβολικοί με 0.9–1.1 και υπομεταβολικοί με <0.9.

Το VCO_2 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του κυψελιδικού νεκρού χώρου και στη διερεύνηση των αιτιών αυξημένων απαιτήσεων κατά λεπτό αερισμού (93).

Το RQ καθορίζει το μίγμα των θρεπτικών συστατικών που καλύπτουν το REE, και το οποίο μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον ασθενή, την απάντηση στο στρες, την υποκείμενη πνευμονική νόσο, τις διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας και τη χρήση φαρμάκων όπως η προποφόλη (94). Ο υποσιτισμός ελαττώνει το RQ.

Το εύρος τιμών των μετρούμενων παραμέτρων είναι (94):

VO2 : 250 ml/min (3 - 4 ml/min/kg ιδανικού βάρους σώματος, Ideal Body Weight - IBW) ± 5% από τη μέση τιμή)

VCO2 : 220ml/min (2 - 3 ml/min/kg IBW) ± 5% από τη μέση τιμή και κατά λεπτό αναπνεόμενος όγκος ± 10% από τη μέση τιμή)

Το REE αντιπροσωπεύει τον αριθμό των kcal που καίει ο ασθενής και πρέπει να αναπληρωθούν: **REE = 3,91 VO2 + 1,1 VCO2 - 3,34 UN**

Στην περίπτωση υπολογιζόμενης REE (Harris Benedict)

Για <u>άντρες</u>: Resting energy expenditure (REE) = 66.5 + 13.75 × (ΒΣ kilograms) + 5 × (ΥΨΟΣ centimeters) − 6.76 × (ΗΛΙΚΙΑ σε χρόνια)

▪

Για <u>γυναίκες</u>: REE = 655 + 9.56 × (ΒΣ σε kilograms) + 1.86 × (ΥΨΟΣ σε centimeters) − 4.68 × (ΗΛΙΚΙΑ σε χρόνια)

Τα δεδομένα που συλλέγονται χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό της θρεπτικής υποστήριξης του ασθενούς. Έτσι η θερμιδική πρόσληψη στη ΜΕΘ πρέπει να καλύπτει ή σχεδόν να καλύπτει την REE, χωρίς επιπρόσθετες kcal για το στρες και τη δραστηριότητα,

εφ' όσον υπάρχει επαρκής πρωτεϊνική κάλυψη (1,5-2 gr/kgr/d) με εξισορροπημένα μίγματα θρεπτικών ουσιών (31). Για την αποφυγή αρνητικών συνεπειών από υπερ-θρεψία και με στόχο τη διατήρηση της μυικής μάζας, δεν συνιστάται η χορήγηση περισσότερων θερμίδων (kcal) από τη μετρηθείσα REE. Αν η REE μετρείται σε ασθενείς με διαλείποντα γεύματα τότε προστίθεται το 5% των θερμίδων για τη θερμική δράση της πέψης, πράγμα που δεν απαιτείται στις ΜΕΘ, όπου η σίτιση είναι κατεξοχήν συνεχής. Πολύ συχνά παρατηρείται υπερβολική χορήγηση υδατανθράκων σε ασθενείς που βρίσκονται σε μηχανικό αερισμό, κάτι που οδηγεί σε αυξημένη λιπογέννεση, αυξημένη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, και επομένως σε παραμονή και εξάρτηση από τον αναπνευστήρα. Απαραίτητη συνεπώς είναι η μέτρηση της REE και RQ προκειμένου να υποβοηθηθεί η εξισορρόπηση των διαλυμάτων θρεπτικών συστατικών που χορηγούνται στον ασθενή διευκολύνοντας την γρήγορη αποδέσμευσή του από τον αναπνευστήρα (59) (95).

Προσδιορισμός προϊόντων οξείδωσης (NO /NitricOxide /Οξειδίου του Αζώτου)

Τα δείγματα πλάσματος μεταφέρονταν σε γυάλινο δοχείο μέσω διαφράγματος (septum into the glass vessel), όπου το νιτρικό ή το νιτρώδες (nitrite or nitrate) μετατρέπονταν με τη δράση ειδικού αντιδραστηρίου σε μονοξείδιο του αζώτου, NO το οποίο ανιχνευόταν στη συνέχεια με αντίδραση χημειοφωταύγειας chemiluminescence with ozone.

Για τον προσδιορισμό των παραγώγων μονοξειδίου του αζώτου (NOx) στον ορό (νιτρικά, νιτρώδη, S- Νιτροδοθειόλες (RSNOs)) χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i). Η μέτρηση των Οξειδίων του Αζώτου NOx {Νιτρικό, Νιτρώδες και Θειονιτρώδες}, παραγώγων οξείδωσης του NO ή διαφορετικά NOx πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας Χλωριούχο Βανάδιο (III) σε Υδροχλωρικό οξύ στους 90 °C (37). Το Νιτρικό προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας Ιωδιούχο και Οξεϊκό Οξύ σε θερμοκρασία δωματίου (96) ενώ το άθροισμα νιτρώδους και θειονιτρώδους προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας Ιωδιούχο/Ιώδιο και Οξεϊκό οξύ (97).

Προσδιορισμός Τριφωσφωρικής Αδενοσίνης (ATP/Adenosine Triphosphate)

Για τον προσδιορισμό της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) τα κύτταρα του αίματος αναμιγνύονταν με αντιδραστήριο 100uL ATP assay (PromegaCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Austria). Πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων αίματος με χρήση υπερήχων. Το περιεχόμενο των κυττάρων αυτών τοποθετήθηκε σε διαφανή πλάκα και αναμίχθηκε με 100uL αντιδραστηρίου για δοκιμασία ATP (Promega Cell Titer - GloLuminescent Cell Viability Assay, Austria) για 2 λεπτά. Το παραπάνω υλικό παρέμενε για επώαση 10 λεπτά ακόμα, και στη συνέχεια στα δείγματα μετρήθηκε η φωταύγεια με τη βοήθεια ειδικού φωτομέτρου (SPECTRAstarOmega, Germany). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων συγκρίθηκαν τελικά με διαβάθμισμένο ATP (1nM-1000nM) που διενεργούνταν παράλληλα.

Προσδιορισμός ενδοκυττάριων προιόντων οξείδωσης λιπιδίων (Lipid peroxidation products) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Τα Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Kozlov et al (103). Δείγμα αίματος (0.25 ml) αναμιγνυόταν με 3 ml από 1.5% (v/v) φωσφορικό οξύ και 1.0 ml 0.5% (v/v) TBA. Τα δείγματα επωάζονταν στους 100°C για 45 min, στη συνέχεια ψύχονταν και το προϊόν της αντίδρασης λαμβανόταν σε n-butanol. Καταγραφόταν στη συνέχεια η απορρόφηση στην περιοχή των 500 to 600nm με φασματοφωτόμετρο UV-1800 Shimadzu.

Δραστικότητα Ρεδουκτάσης της Μπιλιβερδίνης (Biliverdin reductase activity)

Η δραστικότητα της Ρεδουκτάσης της Μπιλιβερδίνης (BVR activity) καθορίστηκε σε ομογενοποιημένα σφαιρίδια λευκοκυττάρων μετά από προσθήκη (44) Tris-Buffer (20mM TRIS, 300mM sucrose, and 2mM EDTA; pH of 7.4). Η συγκέντρωση της πρωτεϊνης καθοριζόταν μετά από προσθήκη αντιδραστηρίου Bradford. Τα ομογενοποιήματα επωάζονταν με μπιλιβερδίνη (biliverdin) (50nmol; Sigma) και NADPH (250nmole; Sigma) σε ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικό κάλιο και φωσφορικό νάτριο (100 mM) και 1 mM EDTA, pH:7.4 στους 37°C για 30 min. Το σχηματιζόμενο προϊόν (BR) μεταφερόταν σε βενζένιο και η συγκέντρωση του καθοριζόταν με φασματοφωτομετρία (photospectroscopy). Η δραστικότητα του ενζύμου εκφραζόταν με τον αριθμό των nmol του προϊόντος (BR) που παραγόταν ανά mg πρωτεϊνης στα 30’ (nmol BR/mg prot/30min).

Μέτρηση αντιπονεκτίνης και ρεζιστίνης (Adiponectin and resistin evaluation) (ELISA)

Τα επίπεδα ορού αντιπονεκτίνης (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και ρεζιστίνη (R&D Systems, Abingdon UK) προσδιορίστηκαν με ανάλυση ELISA assay σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλες οι μετρήσεις έγιναν δυο φορές. Η ευαισθησία των μετρήσεων ήταν 100 pg/mL για την αντιπονεκτίνη και 0.026 ng/mL για τη ρεσιστίνη.

Στατιστική Ανάλυση :

Όλες οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 22.0 (IBMCorp., Chicago, Illinois, USA).

Χρησιμοποιήθηκε το Levene’s test για την ομογενοποίηση των ομάδων των τιμών (homogeneity of group variances), για να καθοριστεί η κατανομή των δεδομένων των μετρήσιμων μεταβλητών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή±SEM (standard error of mean) ή διάμεση τιμή (IQR, interquartile range) για παραμετρικές ή μη παραμετρικές τιμές αντίστοιχα. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με ανάλυση ANOVA με τη διόρθωση Welch και Games-Howell και Bonferroni post hoc tests ή με το Kruskal Wallis με το Mann Whitney U-test για ανεξάρτητα δείγματα. Οι κατηγορικές μεταβλητές ελέγθηκαν με τη δοκιμασία x^2 ενώ για τη συσχέτιση μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο

συντελεστής Spearman rank correlation. Τιμή p μικρότερη του 0,05 στα συγκρινόμενα αποτελέσματα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ασθενείς

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται για τα παιδιά στον **Πίνακα 1** και για τους ενήλικες στον **Πίνακα 2.**

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά <u>ασθενών-παιδιών</u> (<18 ετών) της μελέτης

ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΥΓΙΕΙΣ (ομάδα ελέγχου)	SIRS	ΣΟΒΑΡΗ ΣΗΨΗ	P τιμή
	N=27	N=23	N=18	
Ηλικία (έτη), median (IQR)	11 (8-13)	10 (6-14.5)	6.3 (1.8-12.5)	0.06
Άρρενα/θήλεα, n (%)	21/6 (78/22%)	21/2 (91/9%)	7/11 (39/61%) [a b]	0.001
BMI, mean±SE		18.8±1	16.2±1.2	0.06
PRISM III, median (IQR)		11 (9-15)	20 (15-29) [b]	0.000
PRISM III probability of death, (%), median (IQR)		13 (10-21)	36 (21-67) [b]	0.000
PELOD, median (IQR)		2 (2-15)	18 (2-52) [b]	0.011
Ενδονοσοκομειακή θνητότητα, n (%)		1 (4%)	4[#] (22%) [b]	0.016
Μέρες νοσηλείας LOS, median (IQR)		6 (4-13)	18 (6.5-66)	0.06
Σφύξεις, bpm, mean±SE		92±4.3	114±5.5 [b]	0.003
MAP, mmHg, mean±SE		80.8±2.6	67.9±3.2 [b]	0.003
EF, %, mean±SE		67.8±2.1	56.5±3.4 [b]	0.006
SF, %, mean±SE		34±1.3	28.2±1.8 [b]	0.02
Θερμοκρασία Sampling time, ºC, mean±SE		36.8±0.16	37.7±0.2 [b]	0.005
Ύψος z-scores, median (IQR)		0.67 (-0.48-1.7)	0.54 (-0.63-1.4)	0.75
Βάρος z-scores, median (IQR)		0.23 (-0.13-1.76)	-0.45 (-3.32-1.1) [b]	0.04
BMI z-scores, median (IQR)		0.22 (-1.7-1.65)	-0.83 (-3.26-0.73) [b]	0.048

Τα δεδομένα εκφράζονται σε αριθμό n (%) ασθενών για κατηγορηματικές παραμέτρους p <0,05; * σημαίνει γενικά *ANOVA or Kruskal-Wallis H test p-values;* [a- b] *σημαίνει ANOVA Bonferroni post hoc tests or Kruskal-Wallis post hoc Dunn's pairwise tests με Bonferroni διορθώσεις, κατά περίπτωση:* [a] *Sepsis vs. Healthy-Controls,* [b] *Sepsis vs. SIRS.*

PICU, Pediatric Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; BMI, body mass index; PRISM, Pediatric Risk of Mortality; PELOD, Pediatric Logistic Organ Dysfunction; TISS, the Therapeutic Intervention Scoring System; LOS, Length Of Stay; MAP, Mean Arterial Pressure; EF, Ejection Fraction; SF, Shortening Fraction; BMI, body mass index. [#] *Συνοσηρότητες παιδιατρικών ασθενών που κατέληξαν στο νοσοκομείο μετά την έξοδό τους από τη ΜΕΘΠ: 1) βρεφική εγκεφαλοπάθεια, 2) τρισωμία-12 – συγγενής καρδιοπάθεια, 3) βρεφική νωτιαία μυική ατροφία, και 4) λευκοδυστροφία.*

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών-ενηλίκων (>18 ετών) της μελέτης

ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΥΓΙΕΙΣ (ομάδα ελέγχου)	SIRS	ΣΟΒΑΡΗ ΣΗΨΗ	P τιμή
Ασθενείς (n)	33	23	23	
Ηλικία (έτη)	33 (27.5-37)	41 (20-50)	68 (58-75) [a b]	<0.001
Φύλο άρρεν, n (%)	18 (54.5%)	18 (78.3%)	14 (60.9%)	0.19
BMI (kg/m ^{2})		27±7	29±11	0.5
MUST RISK 2 score		7 (30.4%)	2 (8.7%)	0.5
Obese, overweight, underweight, n (%)		4/4/0 (17.4/17.4/0%)	7/7/2 (30.4/30.4/8.7%)	0.09
Pediatric height z scores				
Pediatric weight z scores				
Pediatric BMI z scores				
Energy Intake (kCal/kg/d)		16±10	11.6±7	0.4
APACHE II or PRISM III score		14±5	23.8±7 [b]	<0.001
APACHE II or PRISM III predicted mortality %		12.9 (7.6-23.5)	47.8 (29-68) [b]	<0.001
SOFA score**		8.7±2.5	9.8±3.3	0.2
SAPS 3 or PELOD score		45±11	75±13 [b]	<0.001
SAPS 3 predicted mortality %		14.7±16	61.7±21 [b]	<0.001
TISS28 score		48±7	46±7.7	0.7
GCS score		6.3±3.8	7.7±4	0.3
Temp Max 24hr (^{o}C)		35.1±7.6	37.8±1.2	0.14
HR (bits/min)		74.8±16	91.3±22 [b]	0.007
MAP (mmHg)		83±11	82±13	0.8
EF (%)		59±11	43±5 [b]	0.002
SF (%)		33±9	27±7.5	0.2
Noradrenaline, n (%) [patients received]		19 (82.6%)	20 (87%)	0.5
Hydrocortisone, n (%)		3 (13%)	12 (52.2%) [b]	0.005
Midazolam, n (%)		10 (43.5%)	3 (13%) [b]	0.024
Propofol, n (%)		21 (91.3%)	8 (34.8%) [b]	<0.001
Fentanyl, n (%)				
Remifentanyl, n (%)		20 (87%)	12 (52.2%) [b]	0.012
Antibiotics n (%) more>2		18 (78.3%)	14 (60.9%) [b]	<0.01
β-blockers, n (%)		0 (0%)	5 (21.7%) [b]	<0.02
ICU/PICU LOS (days)		14 (8-20)	12 (6-27)	0.6
Mortality ICU/PICU, n (%)		3 (13%)	7 (30.4%)	0.15
Mortality Hospital, n (%)		3 (13%)	9 (39%)	0.055

** υποδεικνύει τις γενικές τιμές ρ ANOVA ή Kruskal-Wallis H, a-b υποδεικνύουν τις δοκιμές post hoc ANOVA Bonferroni ή τις δοκιμές ζευγαρώματος του Kruskal-Valais post hoc Dunn με διορθώσεις Bonferroni, κατά περίπτωση:[a] Sepsis vs. Healthy-Controls, [b] Sepsis vs. SIRS.*

PICU, Pediatric Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; BMI, body mass index; PRISM, Pediatric Risk of Mortality; PELOD, Pediatric Logistic Organ Dysfunction; TISS, the Therapeutic Intervention Scoring System; LOS, Length Of Stay; MAP, Mean Arterial Pressure; EF, Ejection Fraction; SF, Shortening Fraction; BMI, body mass index MUST RISK 2 = Malnutrition Universal Screening Tool, APACHE II=Acute Physiology and Chronic Evaluation, PRISM III= Acute Physiology and Pediatric risk of mortality, SOFA=Sequential Organ Failure Assessment, SAPS 3=Simplified Acute Physiology Score-III, PELOD= Pediatric Logistic Organ Dysfunction, TISS=Therapeutic Intervention Scoring System, GCS = Glasgow Coma Scale, HR = Heart Rate, ICU LOS =Intensive Care Unit Length Of Stay

***Non-validated for use in children*

Διαχρονικά για τις ημέρες 1, 3 και 5, οι μετρήσεις ενδεικτικές της λειτουργίας οργάνων: ορμονικές, μεταβολικές και μετρήσεις θρέψης και βιοενέργειας φαίνονται στον **Πίνακα 3** για τα παιδιά και στον **Πίνακα 4** για τους ενήλικες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συγκριτικές μετρήσεις λειτουργίας οργάνων: ορμονικές, μεταβολικές και μετρήσεις θρέψης και βιοενέργειας σε ΠΑΙΔΙΑ της μελέτης, στις ημέρες 1, 3, 5.

	ΜΕΡΑ 1				ΜΕΡΑ 3			ΜΕΡΑ 5		
Μεταβλητές	**ΥΓΙΕΙΣ**	**SIRS**	**ΣΟΒΑΡ**	**P**	**SIRS**	**ΣΟΒΑΡΗ**	**P**	**SIRS**	**ΣΟΒΑΡΗ**	**P**
	n=27	n=23	n=18		n=23	n=18		n=23	n=18	
Εντερική σίτιση ,					610±86.9	643±122	0.82	950±170	628±128	0.15
Ενέργεια, kCal/kg/d,					9.8 (0-21)	20 (2-67)	0.21	18.75	23 (7.5-	0.25
VO_2, ml/min,		183±14	137±14 [b]	0.03	184±13,13	152±24.22	0.22	192±14.3	139±24.4 [b]	0.04
VCO_2, ml/min,		154±12.	117±11 [b]	0.04	154±11.9	133±20.78	0.35	169±13.1	129±22.9	0.11
RQ, mean±SE		0.85±0.	0.86±0.0	0.65	0.83±0.02	0.89±0.02	0.12	0.86±0.01	0.92±0.01	0.01
Energy Expenditure,		81±6	56.5±5 [b]	0.00	82.18±4.8	66.07±11.	0.15	17.3±4.2	34.9±10.3	0.90
Metabolic pattern,		104±7.	83.6±6.3	0.05	112±10.4	85±10	0.44	113±8.8	91±11.1	0.13
Lactate, mg/dL,		11.9±3.	36±9 [b]	0.02	7.11±0.82	33.2±9.35	0.00	6.6±1.2	34.7±9.9 [b]	0.00
SID, mean±SE		33.4±.9	32±1	0.4	33.3±0.8	33.2±0.83	0.94	33.3±.0.7	32.3±3.27	0.73
Anion Gap,		12.5±0.	13.8±0.9	0.06	12.5±0.89	12.9±1.17	0.76	13.3±0.84	17.12±3.5	0.23
BUN, mg/dL,		24 (18-	22	0.4	19 (15.8 -	16.5	0.63	23 (18-27)	16 (9-39)	0.64
Creatinine, mg/dL,		0.61±0.	0.54±0.1	0.5	0.62±0.4	0.45±0.06	0.03	0.58±0.05	0.44±0.06	0.11
Glucose, mg/dL,		112±10	113±5.4	0.9	113±5.11	99±4.3	0.06	107±3.8	100±4.34	0.28
Albumin, g/dL,		3.5±0.6	3±0.2 [b]	0.02	3.12±0.09	2.72±0.07	0.00	3±0.08	2.9±0.12	0.32
LDH, U/L, median		313	357	0.2	277 (229-	311	0.72	316 (261-	444.5	0.62
Troponin, ng/mL,		0.01	0.025	0.3	0.007	0.016	0.24	0.006	0.019	0.31
CRP, mg/dL,		4.9±1.3	13.7±2.1	0.00	6.9±1.32	11.46±2.3	0.08	5.9±1.34	6.6±1.9	0.78
Resistin, ng/ml,	9.4 (7.4-	16.5	38.5	0.00	20.8	48.7 (18-	0.03	20.74	33.45 (14-	0.64
Adiponectin, μg/ml,	17.9±1.6	13.7±2.	13.5±2.3	0.2	12±1.2	17.2±3.5	0.13	11.4±1.46	15.06±2.5	0.20
mHSP72, MFI,	17.9 (9.2-	17.5	12.3	0.02	18.6 (12-	10.5 (7-	0.02	25.9	32.7	0.14
mHSP90α, MFI,	25.3±4.6	29.6±4.	30.5±5	0.7	31.7±6.4	25.9±5.78	0.52	26±6.3	22.6±5.9	0.70
nHSP72, MFI,	31.7±5	39.4±5.	23.1±3.8	0.15	27.5±3.8	26.5±4.2	0.86	27.7±2.6	21.9±5.3	0.28
nHSP90α. MFI,	8.9 (5.1-	8.8 (5.8-	11.1	0.03	11.4±2.1	17.4±4.4	0.19	11.4±2.6	12.2±2.3	0.84
eHSP72, ng/ml,	0.29	0.34	0.54	0.00	0.19	0.45	0.04	0.26	0.57	0.36
eHSP90α, ng/ml,	118 (80-	144	546	0.00	193±30	405±59 [b]	0.00	234 (88-	693 (490-	0.00
ATP nM/1000WBC,	36.8±21	16.9±3.	7.1±2.1 [a]	0.05	41±22.5	5±2.27 [b]	0.03	43±24.4	25±23.4	0.64
NO2, nM, mean±SE	148±22	174±28	161±17	0.7	159±21.36	175±34	0.69	162±22.5	144±28.6	0.62
NO3, nM, mean±SE	22811	13669	32419	0.01	19736±30	39414±72	0.01	26505±60	31140±64	0.60
TBARS, nM,	18±1	10.9±1.	13.3±1 [a]	0.00	14.3±1.8	11.2±1.3	0.22	13.2±2.2	11.7±0.88	0.62
BVR,	2.7±0.3	2.8±0.2	2.4±0.28	0.6	2.37±0.42	4.6±1.21	0.08	2.39±0.38	2.1±0.48	0.65

** υποδηλώνει ANOVA or Kruskal-Wallis H test p-values; [a- b] δηλώνει ANOVA Bonferroni post hoc tests or Kruskal-Wallis post hoc Dunn's pairwise tests with Bonferroni corrections, κατά περίπτωση: [a] Sepsis vs. Healthy-Controls, [b] Sepsis vs. SIRS, [c] SIRS vs. Healthy-Controls.*

SIRS, systemic inflammatory response syndrome; BMI, body mass index; RQ, Respiratory Quotient; SID, Strong Anion Difference; BUN, Blood Urea Nitrogen; LDH, Lactate Dehydrogenase; CRP, C-Reacting Protein; VO_2, Oxygen Consumption; VCO_2, Carbon Dioxide Production; RQ, Respiratory Quotient; EE, Energy Expenditure; HSP, Heat shock protein; MFI, Mean Fluorescence Intensity; n, Neutrophis; m, Monocytes; ATP, Adenosine Triphosphate; TBARS, Thiobarbituric Acid Relative Substances; NO, Nitric Oxide; BVR, biliverdin reductase

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Συγκριτικές μετρήσεις λειτουργίας οργάνων: ορμονικές, μεταβολικές και μετρήσεις θρέψης και βιοενέργειας σε ΕΝΗΛΙΚΕΣ της μελέτης, στις ημέρες 1, 3, 5.

	ΜΕΡΑ 1				ΜΕΡΑ 3			ΜΕΡΑ 5		
Μεταβλητές	**ΥΓΙΕΙΣ**	**SIRS**	**SEPSIS**	**P**	**SIRS**	**SEPSIS**	**P**	**SIRS**	**SEPSIS**	**P**
	n=27	n=23	n=18		n=23	n=18		n=23	n=18	
Energy Intake,		2.8±0,83	4.5±1.5	0.33	9.8 (0-21)	20 (2-67)	0.942	18.75	23 (7.5-	0.22
VO_2, ml/min,		254±8.82	175±6.5 [b]	0.00	224±6	213±5.7	0.179	236.58±8	206.74±1	0.03
VCO_2, ml/min,		226±9.58	150±7.9 [b]	0.00	202±6.8	190±6.67	0.200	212.86±6	182.64±8	0.00
RQ, mean±SE		0.88±0.01	0.86±0.022	0.41	0.90±0.01	0.90±0.0	0.902	0.90±	0.89±0.0	0.64
EE,		26.17	19.15 ±2.84	0.04	21.11±2.0	21.92±2.	0.785	22.33±1.	21.96±2.	0.08
Metabolic pattern,		117.32±7	85.03±5.92 [b]	0.00	94.30±8.5	104.46±5	0.332	101.49	101.52±8	0.99
Lactate, mg/dL,		17.8±2.8	32.2±4.2 [b]	0.00	7.11±0.82	33.2±9.3	0.007	6.6±1.2	34.7±9.9	0.01
SID, mean±SE		32.72±0.6	30±0.83	0.06	33.3±0.8	33.2±0.8	0.044	33.79±0.	30.84 ±	0.03
Anion Gap,		12.02±0.5	14±0.73 [b]	0.04	10.4±0.59	12.8±0.6	0.011	12.68	13.27±	0.66
Na, mEq/L,		143 (141-	138 (137-	0.00	148.35±1.	142.42±1	0.002	145±1.77	143.17±1	0.46
Cl, mEq/L, median		113 (111-	107.5 (105-	0.00	117.55±1.	110.80±1	0.003	113.06±2	111.35±1	0.54
BUN, mg/dL,		21 (17-	68 (37-101) [b]	0.00	33.45 ±	73.17 ±	0.002	36.43±6.	71 ± 6.62	0.00
Creatinine, mg/dL,		0.8 (0.75-	1.15 (0.7-	0.00	0.62±0.4	0.45±0.0	0.002	0.58±0.0	0.44±0.0	0.05
Glucose, mg/dL,		150±8.76	128±6.24 [b]	0.04	127±5.47	123±	0.602	107±3.8	100±4.34	0.27
Albumin, g/dL,		3.31±0.16	2.5±0.08 [b]	0.00	3.12±0.09	2.72±0.0	0.001	2,84 ±	2.25 ±	0.00
LDH, IU/L,		371.77±	453.45 ±	0.30	288 ±	367 ±	0.145	323 ±	348 ±	0.68
Troponin, ng/mL,		0.26 ±	0.31 ± 0.109	0.72	0.09 ±	0.30 ±	0.191	0.006	0.019	0.01
CRP, mg/dL,		9.3±1.7	20.8±1.98 [b]	0.00	11.86	14.99±	0.286	10.91±	13.98±	0.33
Resistin, ng/ml,	9.38	28.34	57.38	0.00	24 (17-28)	55.8 (37-	0.001	29.08 ±	46.85 ±	0.00
Adiponectin,	10.69	10.08	12.02 (7.73-	0.14	7.4 (6.5-	12.2 (10-	0.002	9.7±0.89	16.9±2.5	0.01
mHSP72, MFI,	14.69±1.	25.33±2.8	13.6±1.79 [a b]	0.00	11.6 (7.5-	17.4	0.462	20.26 ±	22.73 ±	0.69
mHSP90α, MFI,	26.14±3	29.16±4.6	30.521.06±5	0.39	19.92±	18.95±	0.853	26.33 ±	25.13	0.87
nHSP72, MFI,	29.04	41.11±6.0	22.89±4.9 [b]	0.02	27.52±	26.67±	0.901	33.69 ±	35.10±	0.91
nHSP90α. MFI,	8.81±0.8	9.94	11.7±2.217	0.37	11.30±2.6	10.50±	0.771	12.99 ±	14.97±	0.62
eHSP72, ng/ml,	0.14	0.18	0.38 (0.07-	0.32	0.13	0.36	0.004	0.095	0.26	0.00
eHSP90α, ng/ml,	92.86	151.94	348 (222.48-	0.00	100.4	266.8	0.001	177.72 ±	293.56 ±	0.04
ATP	3.06	12 (5.2-	8.3 (2-2.37)	0.31	9.2 (6.8-	3.7 (1.8-	0.041	10.7 (8-	2.1 (0.96-	0.27
NO2, nM,	181±16.	126.5±14.	193±23.65 [b]	0.02	180.41±30	226±26.1	0.257	144 (110-	246 (177-	0.00
NO3, nM, median	24406	17169	33496	0.02	90879±55	94909±3	0.946	63591.3	64651.6±	0.98
TBARS, nM,	15.12	12.28	17.35	0.18	9.94±1.35	16.96±2.	0.014	12.59 ±	14.85 ±	0.32
BVR,	1.39	1.32	2.49 (1.9-3) [a]	0.02	2.01± 0.21	1.94±	0.805	1.69	1.68 ±	0.96

Συντομογραφίες: VO_2=Oxygen Consumption, VCO_2=Carbon Dioxide Production, RQ=Respiratory Quotient, EE=Energy Expenditure, PEE=Predicted Energy Expenditure, PBMP=Predicted Basal Metabolic Rate, SID=Strong Ion Difference, SIDa=Apparent SID, LDH=Lactate Dehydrogenase, Tn=Troponin, CRP=C-reactive protein, WBC=White Blood Cells, PLT=Platelets, INR=International Normalized Ratio, BUN=Blood Urea Nitrogen, Cr=Creatinine, HSP=Heat shock protein, MFI=Mean Fluorescence Intensity, n=Neutrophis, m=Monocytes

*Τα δεδομένα δίδονται σαν μέση τιμή, mean±Std. Deviation, medians (25th- 75th percentiles) ή αριθμό ασθενών n (%). One-way ANOVA or Kruskal-Wallis H test χρησιμοποιήθκαν για να γίνει σύγκριση ομάδων με τιμές παραμετρικές και μη, κατά περίπτωση. Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία χ^2 test για κατηγορικές παραμέτρους: p<0.05; * υποδηλώνει γενικά ANOVA or Kruskal-Wallis H test p-values; [a- c] δηλώνει ANOVA Bonferroni post hoc tests or Kruskal-Wallis post hoc Dunn's pairwise tests με Bonferroni corrections, κατά περίπτωση: [a] Sepsis vs. Healthy-Controls, [b] Sepsis vs. SIRS, [c] SIRS vs. Healthy-Controls*

Οι κύριοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν στους ασθενείς με σήψη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.** Κύρια αιτία σήψης στα παιδιά ήταν η πνευμονία (55.6%) και ακολουθούσαν η μηνιγγίτιδα (16.7%), η περιτονίτιδα (11.1%), οι χειρουργικές λοιμώξεις (5.6 %), και άλλα αίτια (5.5%). Ενώ στους ενήλικες επικρατούσαν η πνευμονία και η περιτονίτιδα η καθεμιά με ποσοστό 34.8%, και ακολουθούσαν άλλα αίτια.

Πίνακας 5: Κλινικές διαγνώσεις και κύριοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν σε σηπτικούς ασθενείς

Κλινική Διάγνωση	**Ενήλικες**	**Παιδιά**
Πνευμονία	34.8%	55.6%
Περιτονίτιδα	34.8%	11.1%
Μικροβιαιμία σχετιζόμενη με καθετήρα	8.9%	4.3%
Μηνιγγίτιδα	4.3%	16.7%
Λοίμωξη ουροποιητικού	4.3%	1.1%
Χειρουργικές λοιμώξεις	8.6%	5.6%
Άλλες	4.3%	5.6%
Πηγή απομόνωσης		
Αίμα	26.1%	16.7%
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα	17.4%	11.1%
ΕΝΥ	4.3%	6%
ΚΥΡΙΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ		
Pseudomonas aeruginosa	4.3%	16.7%
Klebsiella pneumonia	8.7 %	5.6%
Enterococcus fecalis	8.7 %	5.6%
Staphylococcus aureus	8.7 %	11.1%
Acinetobacter Baumannii	8.7 %	5.6%

Οι τιμές αμινοξέων ορού υγιών (1η ημέρας) και διαχρονικά των ασθενών στις ημέρες 1, 3 και 5 φαίνονται στους **Πίνακες 6** για τα παιδιά και στον **Πίνακα 7** για τους ενήλικες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6:

Συγκεντρώσεις αμινοξέων ορού υγιών παιδιών και παιδιών-ασθενών με μη λοιμώδες SIRS και σοβαρή σήψη (SS) την πρώτη μέρα εισαγωγής στη ΜΕΘΠΑΙΔΩΝ και τις μέρες νοσηλείας 3 και 5.

	Day 1				Day 3			Day 5		
AMINO ACIDS (μmol/L)	**HEALTHY CONTROLS (n=27)**	**SIRS (n=23)**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**	**SIRS (n=23)**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**	**SIRS (n=23)1**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**
Lysine	159.38±56.53	136.89±49.59	168.14±72.13	0.292	166.76±11.97	173.75±12.84	0.707	183.5±11.7	157.5±14.69	0.190
Threonine	139.11±65.09	138.84±48.65	120.76±55.69	0.672	120.15±11.46	154.87±16.33	0.090	164.58±11.09	136.85±18.61	0.189
Serine	125.61±31.38	118.73±34.89	113.60±41.25	0.503	106.07±7.40	135.5±5.31 [b]	0.011	116.25±6.67	132.57±13.28	0.237
Taurine	48.34±24.42	73.52±20.68 [a]	62.88±33.69	0.006	72.07±7.93	56.87±11.27	0.272	61.25±6.29	52±7.99	0.380
Aspartic acid	11.00±10.66	7.78±5.96	10±3.34	0.289	9.23±2.51	6.62±1.91	0.473	9.5±1.21	10.14±3.43	0.835
Asparagine	45.57±20.11	50.31±16.87	54.00±24.74	0.486	57.76±7	51.12±5.58	0.514	66±4.75	54.42±7.61	0.191
Proline	152.42±59.98	131.47±47.30	112.80±40.29	0.115	111.69±11.84	137.37±19.97	0.251	150±21.32	140.42±20.41	0.769
Cysteine	35.53±16.67	37.23±14.30	32.78±14.76	0.775	34.27±4.58	38.12±4.32	0.563	44.5±3.94	39±3.57	0.342
Ornithine	62.50±31.83	54.94±22.17	54.93±14.45	0.572	58±5.27	51±5.57	0.390	65.41±7.60	66.14±8.95	0.953
Histidine	65.69±12.45	68.68±17.63	76.65±23.04	0.215	68.3±4.44	68±4.42	0.964	70.91±4.51	74.57±7.65	0.664
Glycine	189.95±95.67	96.73±78.73 [a]	157.77±99.50	0.005	138.92±39.7	194.62±36.85	0.353	130.49±29.9	195.93±47.64	0.236
Arginine	38.62±18.28	32.62±14.46	33.64±16.52	0.459	37.53±4.91	26.69±4.96	0.159	34.86±4.76	39.12±6.21	0.593
Citrulline	22.1±9.42	18.04±9	16.6±5.68	0.152	37.43±4.68	37.94±6.28	0.949	37.50±5.77	38.5±8.06	0.912
Alanine	244.95±112.48	132.07±84.72 [a]	169.08±101.39	0.002	172.58±40.43	217.29±38.10	0.464	170.38±36.97	189.57±43.31	0.748
Valine	90.07±21.00	86.17±41.37	83.29±26.14	0.813	101.14±13.97	72.08±6.72	0.137	98.73±13.72	75.86±15.86	0.307
Glutamic acid	34.32±7.40	33.58±16.38	32.59±9.77	0.921	36.76±4.83	32±3.44	0.490	39.43±7.29	29.95±2.47	0.349
Leucine	125.77±50.95	154.40±52.55	144.25±86.87	0.274	144.49±17.09	132.83±32.66	0.731	148.51±16.07	158.41±35.56	0.775
Isoleucine	70.43±22.66	48.54±11.37 [a]	54.26±23.61	0.018	60.52±6.94	40.22±5.4	0.156	46.15±5.74	34.43±5.82	0.299
Methionine	15.03±4.44	9.24±3.65 [a]	11.48±4.00	0.000	12.69±1.81	14.41±1.75	0.532	11.9±1.81	12.3±2.12	0.889
Phenylalanine	36.69±11.35	30.87±10.70	42.02±9.25 [b]	0.031	37.75±5.19	38.49±4.9	0.925	34.29±3.83	42.50±6.46	0.258
Tyrosine	49.73±24.74	34.18±16.90	42.69±22.37	0.072	42.62±8.33	38.3±7.08	0.724	34.19±4.64	35.82±8.27	0.854
Glutamine	473.46±110.7	528.36±86.92	455.46±74.14	0.093	726.8±97.95	410.52±45.14 [b]	0.026	691.62±69.09	426.85±42.05 [b]	0.014

Data given are mean ± SEM. ANOVA p values. Bonferroni post hoc tests, p<0.05: [a] SIRS vs. H, [b] SS vs. SIRS

PICU, Pediatric Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Συγκεντρώσεις αμινοξέων ορού υγιών ενηλίκων και ενηλίκων-ασθενών με μη λοιμώδες SIRS, και σοβαρή σήψη (SS) την πρώτη μέρα εισαγωγής στη ΜΕΘ και τις μέρες νοσηλείας 3 και 5.

	Day 1				Day 3			Day 5		
AMINO ACIDS (μmol/L)	**HEALTHY CONTROLS (n=27)**	**SIRS (n=23)**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**	**SIRS (n=23)**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**	**SIRS (n=23)1**	**SEVERE SEPSIS (n=18)**	**p value**
Lysine	171.35±8.79	224.14±48.8	147.76±8.002	0.072	165.76±10.99	155.10±12.61	0.528	144.73±9.19	149.62±11.16	0.738
Threonine	156.21±12.63	161.19±21.66	139.14±9.42	0.449	147.82±14.01	130.05±11.90	0.340	121.26±11.99	134.12±11.29	0.442
Serine	119.92±5.93	137.95±16.27	118.71±7.45	0.557	123.49±9.46	116.89±6.57 [b]	0.570	105.53±6.97	125.12±7.19	0.060
Taurine	61.66±5.46	65.18±6.22 [a]	67.76±6.36	0.766	67.77±6.62	57.36±6.25	0.261	55.20±7.20	55.87±6.41	0.784
Aspartic acid	6.89±0.66	9.53±1.23	7.8±0.98	0.182	8.47±1.93	7.78±1.61	0.786	6.86±1.14	8.50±1.97	0.481
Asparagine	56.29±4.14	55.78±7.40	50.28±5.05	0.645	50.04±4.39	47±4.55	0.634	46.20±4.45	43.25±3.621	0.612
Proline	130.25±8.83	173.04±24.23	165.14±47.78	0.232	82(76.5-165.5)	99 (74-113)	0.048	122.06±9.18	119.37±10.56	0.849
Cysteine	41.22±2.58	35.12±2.12	34.62±2.81	0.148	36.60±3.41	40.41±3.32	0.431	33.33±2.23	35.14±2.88	0.624
Ornithine	64.50±4.93	79.73±20.78	56.80±4.20	0.335	57.92±4.36	52.21±7.28	0.506	51.66±5.36	55.68±4.62	0.574
Histidine	69.47±3.49	79.51±10.80	71.57±4.60	0.669	68.86±3.17	68.10±4.20	0.887	68.73±3.18	62.43±3.74	0.210
Glycine	176.46±21.02	140.79±23.08 [a]	136.63±24.27	0.385	132.15±20.84	148.16±24.27	0.620	156.92±28.79	149.75±27.04	0.857
Arginine	42.95 (34.11-59.20)	32.94(23.55-51.73)	31.78(16.99-54.27)	0.029	50.34±7.90	47.79±8.63	0.828	53.10±5.85	48.64±6.47	0.613
Citrulline	58.80 (40.38-69.88)	27.52 (19.69-48.36)	38.36 (12.74-51.3)	0.000	39.57±3.81	40.16±6.44	0.938	40.8(34.16-50.85)	26.38(17.39-47.27)	0.692
Alanine	250.08±20.19	198.25±23.35 [a]	202.99±21.09	0.171	173.87±25.02	190.99±17.30	0.577	225.07±43.31	202.85±25.61	0.663
Valine	95.28 (83.69-113.48)	66.06(48.88-79.54)	68.65(47.04-141.74)	0.021	82.78±5.78	83.95±7.47	0.902	104.25±11.09	112.92±10.14	0.568
Glutamic acid	38.34(31.71-60.06)	35.65(24.93-48.91)	39.10(17.81-55.64)	0.014	35.32±2.67	40±4.53	0.381	44.30±5.19	40.93±4.82	0.638
Leucine	154.51±11.52	115.30±13.40	129.44±13.28	0.089	128.07±18.24	151.53±18.09	0.367	121.40±16.01	133.90±19.81	0.628
Isoleucine	63.93±4.52	49.09±5.33 [a]	53.55±6.92	0.115	50.83±3.18	56.81±3.46	0.217	63.61±4.28	74.63±14.73	0.488
Methionine	17.67±1.72	11.51±1.26 [a]	15.23±2.02	0.020	14.41±1.22	14.01±1.17	0.813	19.69±2.92	15.22±1.69	0.199
Phenylalanine	41.56±2.58	34.64±2.42	48.92±4.20 [b]	0.014	36.04±1.97	43.98±3.08	0.038	44.68±4.27	53.56±5.31	0.204
Tyrosine	28.04(19.11-34.65)	23.71(16.77-26.55)	23.61(14.55-44.24)	0.109	41.96±4.24	38.38±4.78	0.579	62.29±19.30	40.80±4.01	0.293
Glutamine	595.28±50.55	504.74±51.25	594.77±53.34	0.372	592(373-765)	497(430.5-580.5) [b]	0.472	619.18±73.51	727.72±137.28	0.493

Data given are mean ± SEM. ANOVA p values. Bonferroni post hoc tests, p<0.05: [a] SIRS vs. H, [b] SS vs. SIRS
ICU, Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome

Διαχρονική απόκριση ξενιστή στο στρες (μεταβολικές, ορμονικές αλλαγές)

ΠΑΙΔΙΑ

- **Φλεγμονή και ορμόνες μεταβολισμού.** Διαχρονικά η ρεσιστίνη και το γαλακτικό – αλλά όχι η CRP - ήταν σταθερά υψηλότερα στη σηψαιμία σε σύγκριση με το SIRS (σχήμα 53a). Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου τα παιδιά με SIRS, επίσης είχαν υψηλά επίπεδα ρεσιστίνης. Η αντιπονεκτίνη δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων διαχρονικά.

Μόρια-σήματα κινδύνου (The danger signals). Οι εξωκυττάριες eHSP72 και 90α ήταν αυξημένες στη σήψη σε σύγκριση με το SIRS την ημέρα 1 και παρέμειναν υψηλές στις ημέρες 3-5. Αν και η HSP72 είχε μια μειωτική τάση την ημέρα 5, δεν σημειώθηκαν διαχρονικά διαφορές μεταξύ των ομάδων (σχήμα 53b).

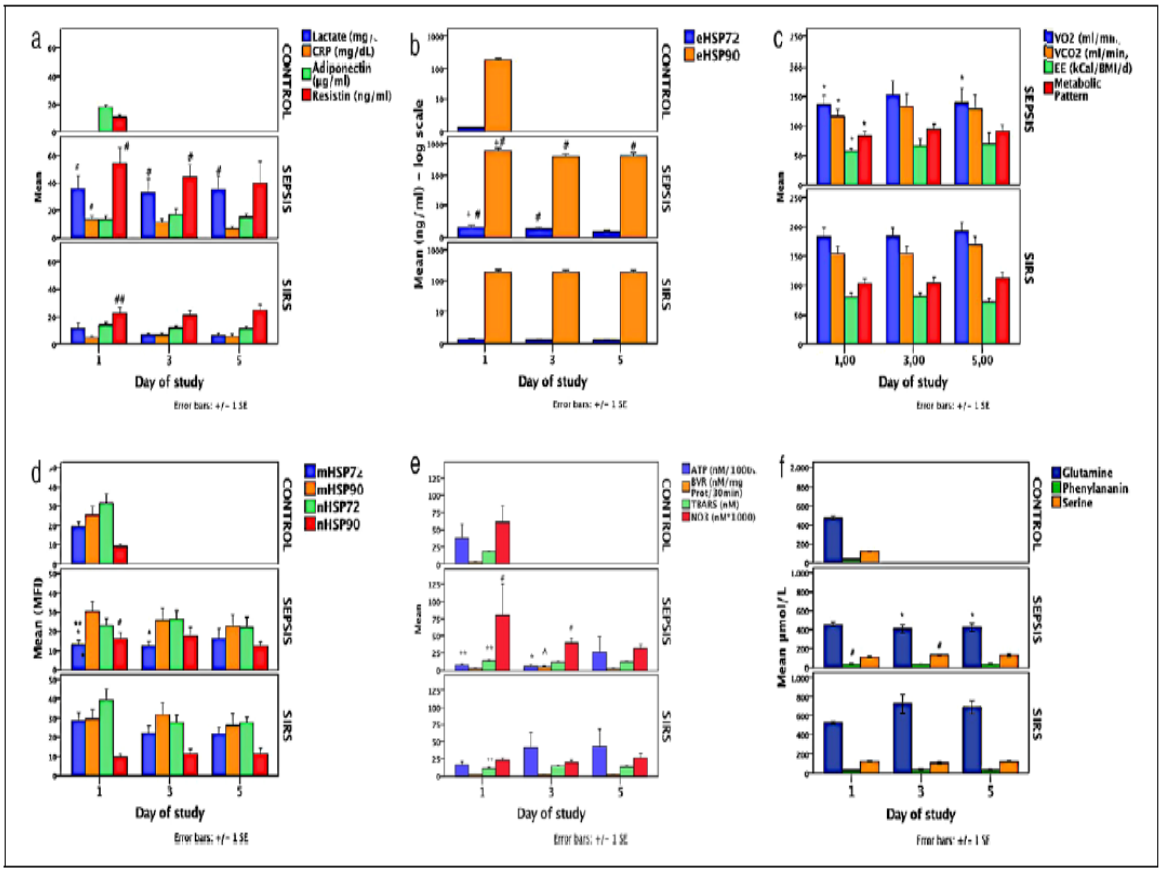
- **Μεταβολισμός.** Την ημέρα-1 τα VO_2, VCO_2, EE και το μεταβολικό πρότυπο ήταν κατασταλμένα στη σήψη σε σύγκριση με το SIRS (σχήμα 3c). Παρατηρήθηκε μια προοδευτική ανάκαμψη της ενεργειακής έκπτωσης στη σήψη, αλλά διαχρονικά οι διαφορές στην κατανάλωση ενέργειας και στο μεταβολικό πρότυπο στις ημέρες 3 και 5 δεν ήταν σημαντικές, ενώ η VO_2 παρέμενε σταθερά χαμηλή την ημέρα 5 (σχήμα 53c). Την ημέρα 5, τα παιδιά με σήψη είχαν υψηλότερο RQ σε σχέση με εκείνα με SIRS **(Πίνακας 2).**

- **Ενδογενής Ανοσία** Στη σήψη η έκφραση της mHSP72 ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την ομάδα SIRS και control, στις ημέρες 1-3. Η nHSP72 εμφάνισε όμοιες μη σημαντικές τάσεις**,** η nHPS90 ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με το SIRS την ημέρα 1 και παρέμεινε έτσι διαχρονικά, αλλά μη στατιστικά σημαντικά (σχήμα 53d).

- **Βιοενέργεια και αντιοξειδωτική κατάσταση** Τα σηπτικά παιδιά είχαν χαμηλότερα επίπεδα ATP και TBARS συγκριτικά με τους υγιείς την ημέρα 1 και χαμηλότερο ATP σε σύγκριση με το SIRS την ημέρα 3. Τα παιδιά με SIRS είχαν χαμηλότερο TBARS σε σύγκριση με τους υγιή (σχήμα 53e). Διαχρονικά στη σήψη, υπήρχε μια ανάκτηση και παροδική αύξηση της δραστηριότητας BVR την ημέρα 3, κι επιπλέον μια σταθερή αύξηση επιπέδων NO3 πλάσματος από την ημέρα 1 στην 3, σε σχέση με το SIRS.

- **Αμινοξέα.** Στην ομάδα SIRS, βρέθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκίνης, αλανίνης, ισολευκίνης, μεθειονίνης αλλά υψηλότερες ταυρίνης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου – control. Τα επίπεδα φαινυλαλανίνης ήταν υψηλότερα στη σήψη από ότι στην ομάδα με SIRS. Διαχρονικά τα παιδιά με σήψη εμφάνισαν χαμηλότερες

συγκεντρώσεις γλουταμίνης σε σύγκριση με εκείνα με SIRS στις ημέρες 3-5 και υψηλότερα επίπεδα σερίνης την ημέρα 3 (σχήμα 53f).



Σχήμα 53. **Ασθενείς-Παιδιά** Cross-sectional διαφορές (ημέρα 1) (day-1) και διαχρονικά (ημέρες 1-3-5) μεταξύ σηψαιμίας, SIRS και ομάδας ελέγχου

**Indicates p<0.05 between SIRS and H; **indicates p<0.05 between severe sepsis and H; # indicates p<0.05 between SIRS and severe sepsis (ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests); SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome CRP, C-Reacting Protein; VO_2, Oxygen Consumption; VCO_2, Carbon Dioxide Production; EE, Energy Expenditure; HSP, Heat shock protein; MFI, Mean Fluorescence Intensity; e, Extracellular; m, Monocytes; n, Neutrophils; ATP, Adenosine Triphosphate; TBARS, Thiobarbituric Acid Relative Substances; NO_3, Nitric Oxide Total; BVR act, Biliverdin reductase activity*

Συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων μετρήσεων σε ομάδες παιδιών (σχήμα 54)

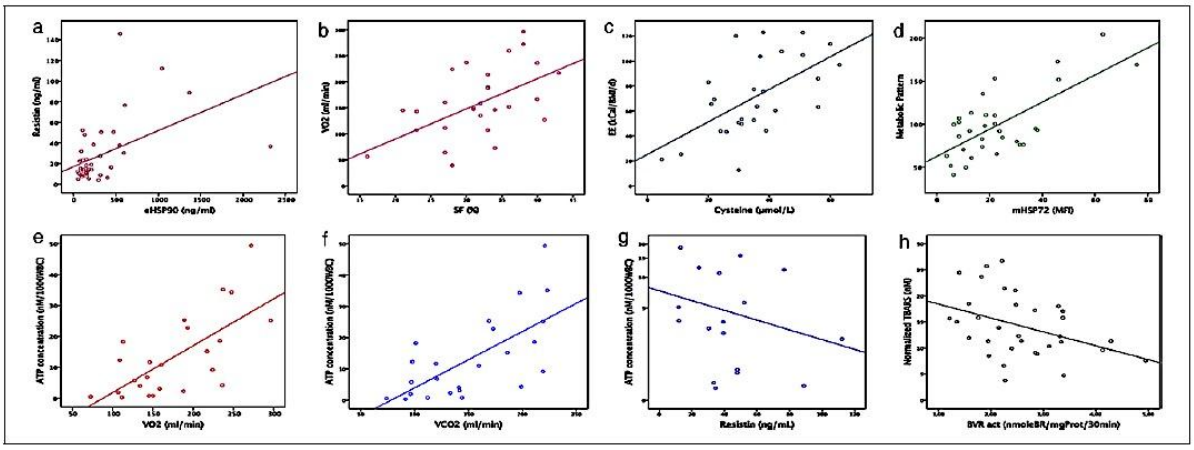
- **Μεταβολικές ορμόνες:** Η ρεσιστίνη συσχετίστηκε με γαλακτικό (r=0.52, p<0.01), eHSP90 (r=0.48, p<0.002) **(σχήμα 54a)**, με την ιστιδίνη (r=0.37, p<0.03) και την ασπαραγινάση (r=0.44, p<0.01), και η αντιπονεκτίνη με την EE (r = -0.59, ρ <0.002) και την ταυρίνη (r = -0.35, ρ <0.04).

- **Μεταβολισμός:** Η VO_2 συσχετίστηκε με το SF (r=0.53, p<0.003) **(σχήμα 54b),** τη MAP (r=0.36, p<0.03), τη λυσίνη (r=-0.45, p<0.02), και το γλουταμικό οξύ (r=0.45, p<0.02), η VCO_2 με το SF (r=0.45, p<0.02), τη MAP (r=0.34, p<0.04), τη λυσίνη (r=-

0.47, p<0.01), και το γλουταμικό οξύ (r=0.40, p<0.03) και η EE with την ταυρίνη (r=0.56, p<0.04), την κυστεϊνη (r=0.59, p<0.001) **(σχήμα 54c),** τη γλυκίνη (r=-0.55, p<0.003), την αλανίνη (r=-0.55, p<0.002) και την τυροσίνη (r=-0.45, p<0.02).

- **Ενδογενής ανοσία:** Η πρωτεϊνη m-HSP72 συσχετίστηκε θετικά με την EE (r=0.64, p<0.001), το μεταβολικό πρότυπο (r=0.70, p<0.001) **(σχήμα 54d),** το BMI και το βάρος σώματος (weight z-scores) (r=0.64, p<0.07), και αντίστροφα με την αλανίνη (r=-0.41, p<0.004), τη γλυκίνη (r=-0.44, p<0.01), τη λυσίνη (r=-0.33, p<0.02), τη μεθειονίνη (r=-0.43, p<0.002) και την τυροσίνη (r=-0.33, p<0.03) Η m-HSP90 έδειξε όμοια αντίστροφες συσχετίσεις με τα ίδια αμινοξέα.

- **Βιοενέργεια και αντιοξειδωτική κατάσταση:** Το ATP συσχετίστηκε με την VO_2 (r=0.69, p<0.001) και τη VCO_2 (r=0.67, p<0.001) **(σχήμα 54e-f) Τ**ο NO_3 με τη ρεσιστίνη (r=0.49, p<0.001) **(σχήμα 54g),** την EE (r=0.36, p<0.05), τη γλυκίνη (r=0.35, p<0.02) και την ιστιδίνη (r=0.43, p<0.002) τα TBARS συσχετίστηκαν αντίστροφα με την δραστικότητα BVR (r=-0.40, p<0.03) **(σχήμα 54h),** την mHSP72 (r=-0.36, p<0.04), την ταυρίνη (r=-0.37, p<0.02), τη σερίνη (r=-0.89, p<0.008) και θετικά με τη γλυκίνη (r=0.42, p<0.01), την αλανίνη (r=0.48, p<0.002) και τη μεθειονίνη (r=0.36, p<0.03) και η δραστικότητα BVR με τη φαινυλαλανίνη (r=0.31, p<0.05) και την ορνιθίνη (r=0.37, p<0.02).



Σχήμα 54. *Χαρακτηριστικές συσχετίσεις ταυτόχρονων μετρήσεων βιοενέργειας, μεταβολισμού και βιομορίων οξέος στρες, μεταβολικών ορμονών, συγκεντρώσεων αμινοξέων και κλινικών δεικτών βαρύτητας, σε μηχανικά αεριζόμενα σοβαρά πάσχοντα παιδιά την ημέρα 1:a. Η ρεσιστίνη συσχετίστηκε με το γαλακτικό (r=0.52, p<0.01); b. η VO_2 με το SF (r=0.53, p<0.003); c. η EE με την κυστείνη (r=0.59, p<0.001); d. η mHSP72 με το μεταβολικό προφίλ (r=0.70, p<0.001) e. το ATP με την VO_2 (r=0.69, p<0.001); f. το ATP με την VCO_2 (r=0.67, p<0.001); g. το NO_3 με τη ρεσιστίνη (r=0.49, p<0.001); h. τα TBARS με τη δραστικότητα BVR act (r=-0.40, p<0.03);*

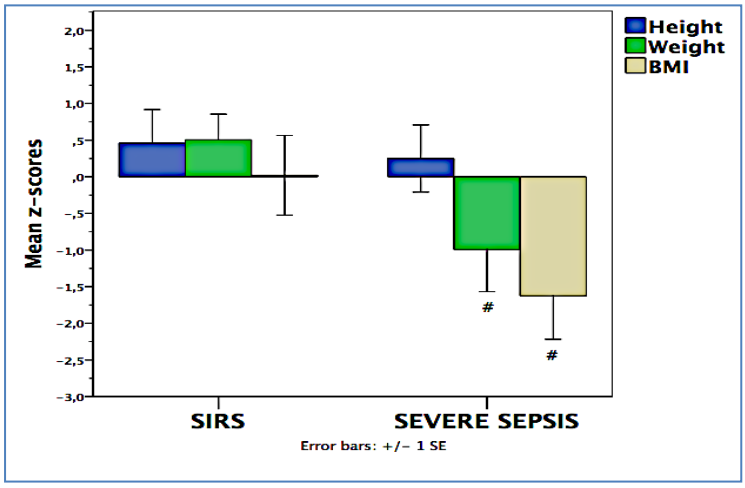
VO_2, Oxygen Consumption; VCO_2, Carbon Dioxide Production; EE, Energy Expenditure; HSP, Heat shock protein; MFI, Mean Fluorescence Intensity; m, Monocytes; ATP, Adenosine Triphosphate; TBARS, Thiobarbituric Acid Relative Substances; NO_3, Nitric Oxide Total; BVR act, Biliverdin reductase activity; SF, Shortening Fraction

Πολυπαραγοντικές αναλύσεις σε παιδιά

Σε πολυπαραγοντικό μοντέλο ανάλυσης (multivariable logistic regression Model), η mHSP72 (OR = 0.89, 95%CI = 0.8–0.98), η eHSP90α(OR = 1.07, 95%CI = 1.01–1.2) και η ρεσιστίνη (OR = 1.1, 95%CI = 1.03–1.2) συσχετίζονταν ανεξάρτητα με τη σήψη. Σε ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών γραμμικής παλινδρόμησης (multivariable linear regression analysis), τα TBARS (β = 0.31, p = 0.019) and VO_2 (β = –0.58, p<0.001) συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με την ανεπάρκεια οργάνων (PELOD).

Διαφορές μεταξύ ενηλίκων και παιδιών

Ασθενείς με σοβαρή σήψη, είχαν υψηλότερη θνητότητα και σοβαρότητα της νόσου και μειωμένο κλάσμα εξώθησης του μυοκαρδίου (EF) (Πίνακες 1,2). Οι ενήλικες σηπτικοί ασθενείς ήταν οι περισσότεροι παχύσαρκοι, ενώ τα περισσότερα από τα παιδιά με σήψη, ήταν υποσιτισμένα/υποθρεπτικά συγκριτικά με εκείνα με SIRS (σχήμα 55)



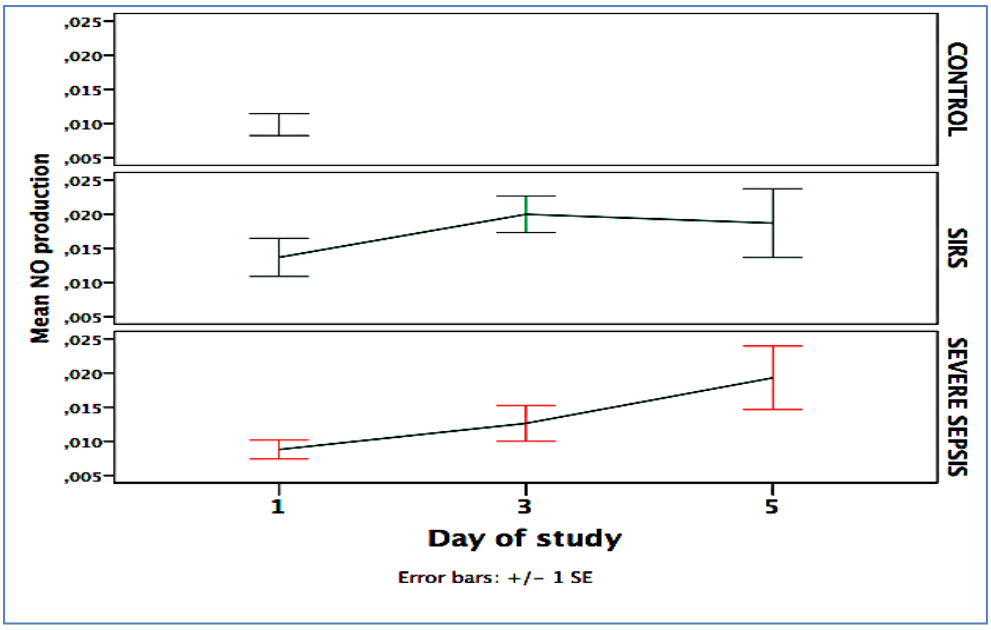
Σχήμα 55: Ύψος, βάρος και BMI z-scores σε **παιδιά-ασθενείς** με trauma-related SIRS και severe sepsis/septic shock κατά την εισαγωγή

 # indicates p<0.05 between SIRS and Severe Sepsis (ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests); SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; BMI, Body Mass Index.

Οι βαθμολογίες βαρύτητας νόσου, η μέγιστη θερμοκρασία, ο καρδιακός ρυθμός (HR), η πρωτεΐνη CRP, το γαλακτικό, η ρεζιστίνη και η εξωκυττάρια HSP (eHSP) 90 ήταν υψηλότερα στη σήψη σε σχέση με το SIRS ($p < 0.05$), ενώ η HSP72 των μονοκυττάρων (mHSP72), η VO_2, η VCO_2, η EE, το μεταβολικό προφίλ και η αλβουμίνη ήταν αντίστοιχα χαμηλότερα ($p < 0.05$) και στις δυο ηλικιακές ομάδες (ενήλικες και παιδιά) (Πίνακες 1,2).

Διαχρονικά ενήλικες με SIRS αλλά και παιδιά και ενήλικες με τραύμα λάμβαναν λιγότερη ενέργεια, παρόλο που και στις δυο ομάδες συνταγογραφόταν ίδια ποσότητα εντερικής σίτισης (Πίνακες 2 και 3).

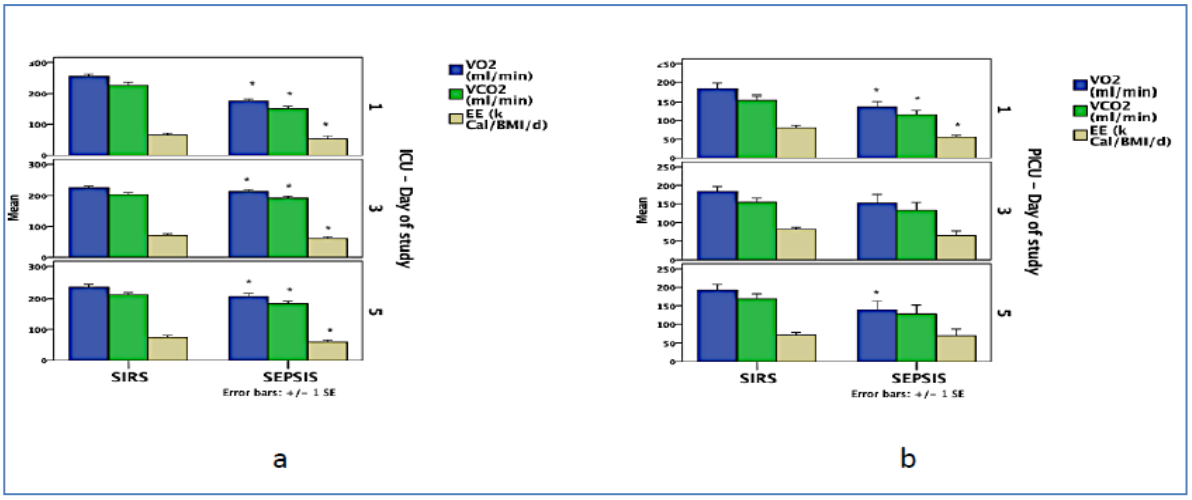
Το νιτρικό και το νιτρώδες αυξανόταν διαχρονικά σε σοβαρά πάσχοντες ενήλικες ασθενείς (σχήμα 55) ($p < 0.05$)

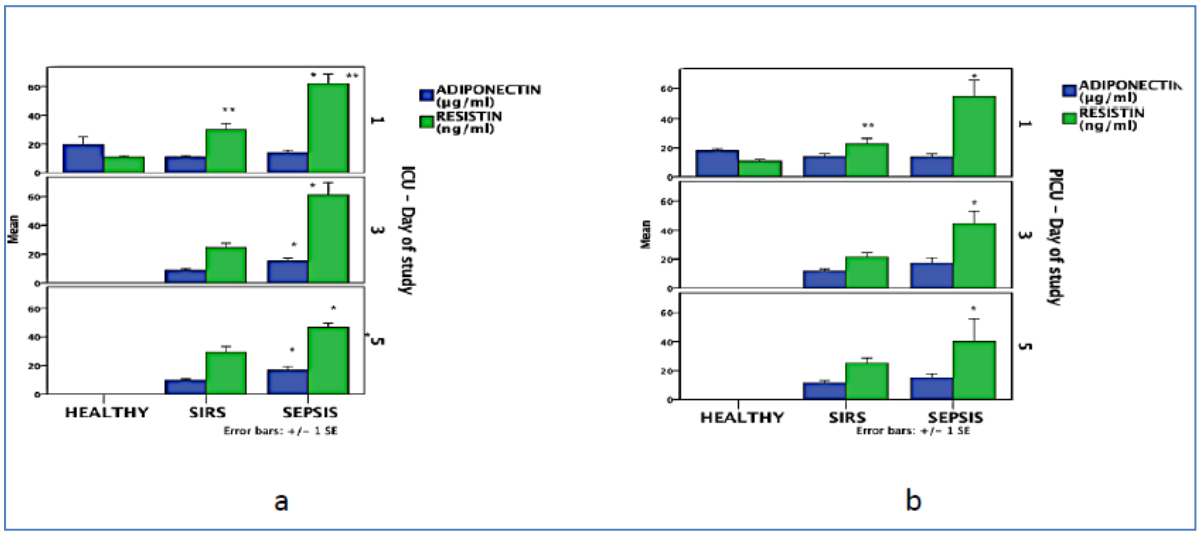


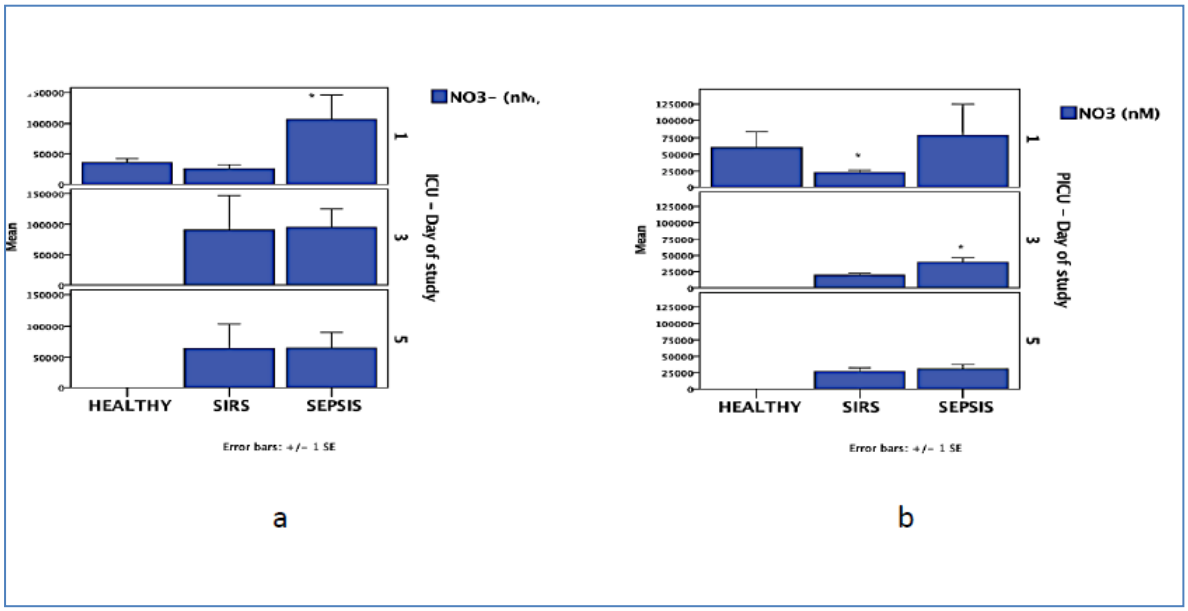
Σχήμα 55. Νιτρικό και νιτρώδες σε σοβαρά πάσχοντες ενήλικες ασθενείς

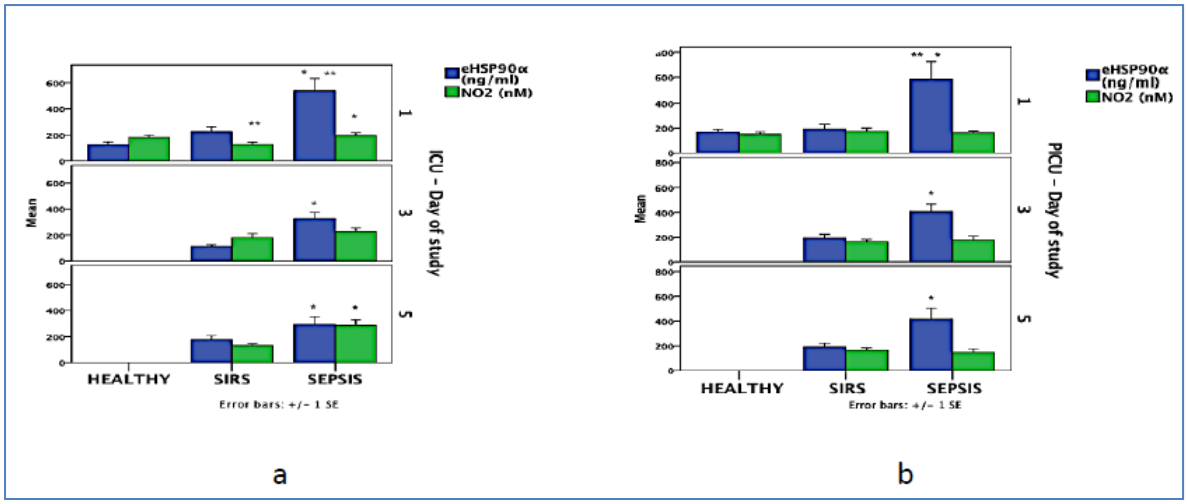
Από τα αποτελέσματα μας επομένως είναι φανερό ότι οι παράμετροι που μελετήθηκαν ακολουθούν διαχρονικά από την $1^{η}$ στην $3^{η}$ και $5^{η}$ ημέρα νόσου, διαφορετικές μεταβολές στη σήψη από το SIRS, αλλά παρόμοιες και στις δυο ομάδες ενηλίκων και παιδιών. Οι τιμές των παραμέτρων αυτών VO_2, VCO_2 (mL/min), EE, ρεζιστίνης, αντιπονεκτίνης, NO_3, NO_2, και εξωκυττάριας HPS72 και 90α, και TBARS παρουσιάζονται στο σχήμα 56 συγκριτικά τις 3 ημέρες μελέτης παράλληλα σε παιδιά και ενήλικες.

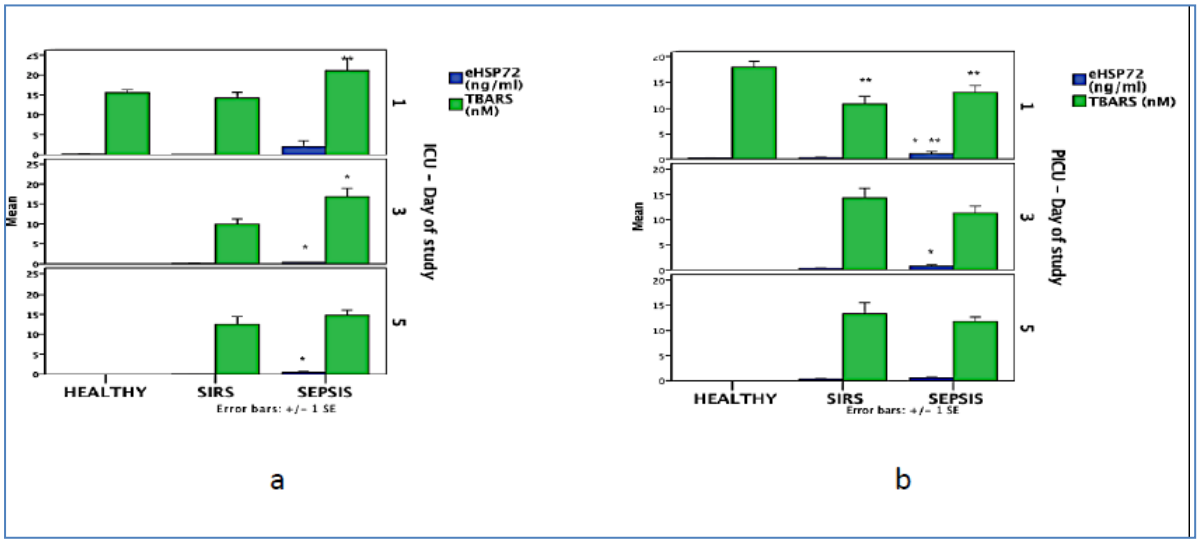
Διαχρονικά τόσο σε ενήλικες (ICU) όσο και σε παιδιά (PICU) οι τιμές ρεζιστίνης, αντιπονεκτίνης, εξωκυττάριας HPS72 και 90α παρουσίαζαν σταθερό πρότυπο διέγερσης σε όλη την οξεία φάση των 5 ημερών. Την ίδια χρονική περίοδο, οι παράμετροι μεταβολισμού VO_2, VCO_2, EE παρουσίασαν ένα σταθερό υπομεταβολικό προφίλ, ίδιο σε ενήλικες και παιδιά. Η αυξημένη έκφραση των NO_3, NO_2, TBARS και αντιπονεκτίνης στη σήψη παρουσίασαν μια πιο ασταθή εικόνα όσον αφορά τη διαχρονική τους έκφραση ανά ηλικιακή ομάδα (σχήμα 56)


VO2 (ml/min)
VCO2 (ml/min)
EE (k Cal/BMI/d)
ICU - Day of study
PICU - Day of study
Mean
SIRS
SEPSIS
Error bars: +/- 1 SE
a
b


ADIPONECTIN (μg/ml)
RESISTIN (ng/ml)
ICU - Day of study
PICU - Day of study
Mean
HEALTHY
SIRS
SEPSIS
Error bars: +/- 1 SE
a
b


NO3 (nM)
ICU - Day of study
PICU - Day of study
Mean
HEALTHY
SIRS
SEPSIS
Error bars: +/- 1 SE
a
b





Σχήμα 56. Παράμετροι μεταβολισμού σε ενήλικες και παιδιά

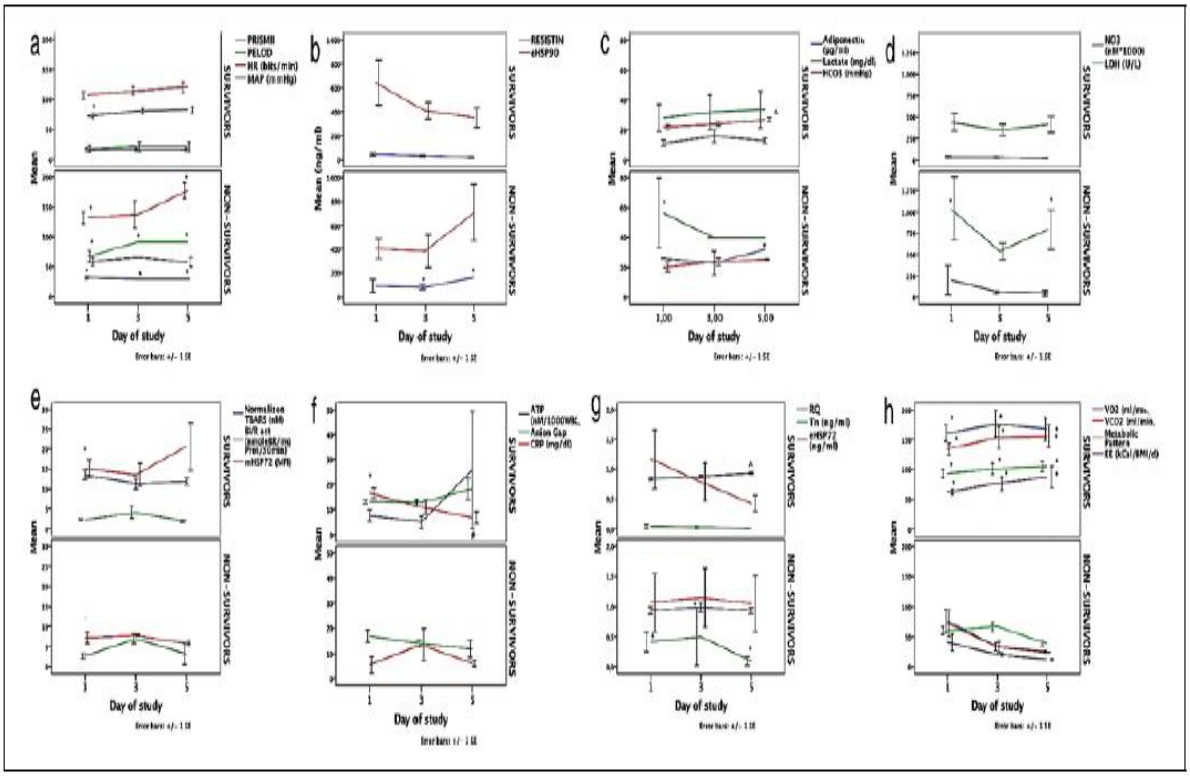
Η μικρή διαφοροποίηση στη σήψη και στο SIRS, μεταξύ μετρήσεων VO_2 και VCO_2 (mL/min), παιδιών και ενηλίκων, αποδίδονται στις διαφορές μεγέθους σώματος μεταξύ ενηλίκων και παιδιών.

Έκβαση - Cross-sectional και διαχρονικές διαφορές

Παιδιά

Παρά τις αυξανόμενες τάσεις της ενδογενούς ανοσίας (mHSP72) και του ATP και τις μειούμενες τάσεις των ορμονών του στρες (eHSP90, 72), δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε εκείνους που επιβίωσαν με σήψη, εκτός από την αύξηση των RQ, HCO_3 και τη μείωση του Cl και της CRP (σχήμα 57a-f).

Σε όσα παιδιά δεν επιβίωσαν με σήψη, η αρχικά καταγεγραμμένη καταστολή του μεταβολισμού καθώς και η καταστολή των ορμονών μεταβολισμού/μεταβολικών ορμονών διατηρήθηκαν διαχρονικά (σχήμα 57a-f). Εκείνοι που επιβίωσαν57ε SIRS παρουσίαζαν διαχρονικά μείωση της αλβουμίνης και βελτίωση του SF ($p<0.05$). Δεν καταγράφηκαν διαφορές εντός των ομάδων σε παιδιά-ασθενείς με σήψη που δεν επιβίωσαν. Μη επιβιώσαντες είχαν a. χαμηλότερη MAP την ημέρα 1,υψηλότερο HR στις ημέρες 1 και 5, και υψηλότερες βαμολογίες βαρύτητας νόσου PRISM and PELOD διαχρονικά; b. υψηλότερη ρεσιστίνη στις ημέρες 3 και 5; c. υψηλότερο γαλακτικό την ημέρα 1 και αντιπονεκτίνη την ημέρα 5; d. υψηλότερη LDH τις ημέρες 1 και 5; e. χαμηλότερη mHSP72 την ημέρα 1; f. υψηλότερη CRP την ημέρα 1,το ATP είχε αυξανόμενη τάση στους επιβιώσαντες, αλλά δεν μπορούσε να μετρηθεί σε >1 μη επιβιώσαντα την ημέρα 1 και δεν αναλύθηκε; g. υψηλότερο RQ την ημέρα 3, χαμηλότερη Tn την ημέρα 5; h. χαμηλότερα VO_2, VCO_2, EE, και μεταβολικό πρότυπο διαχρονικά (ημέρες 1 και 5).



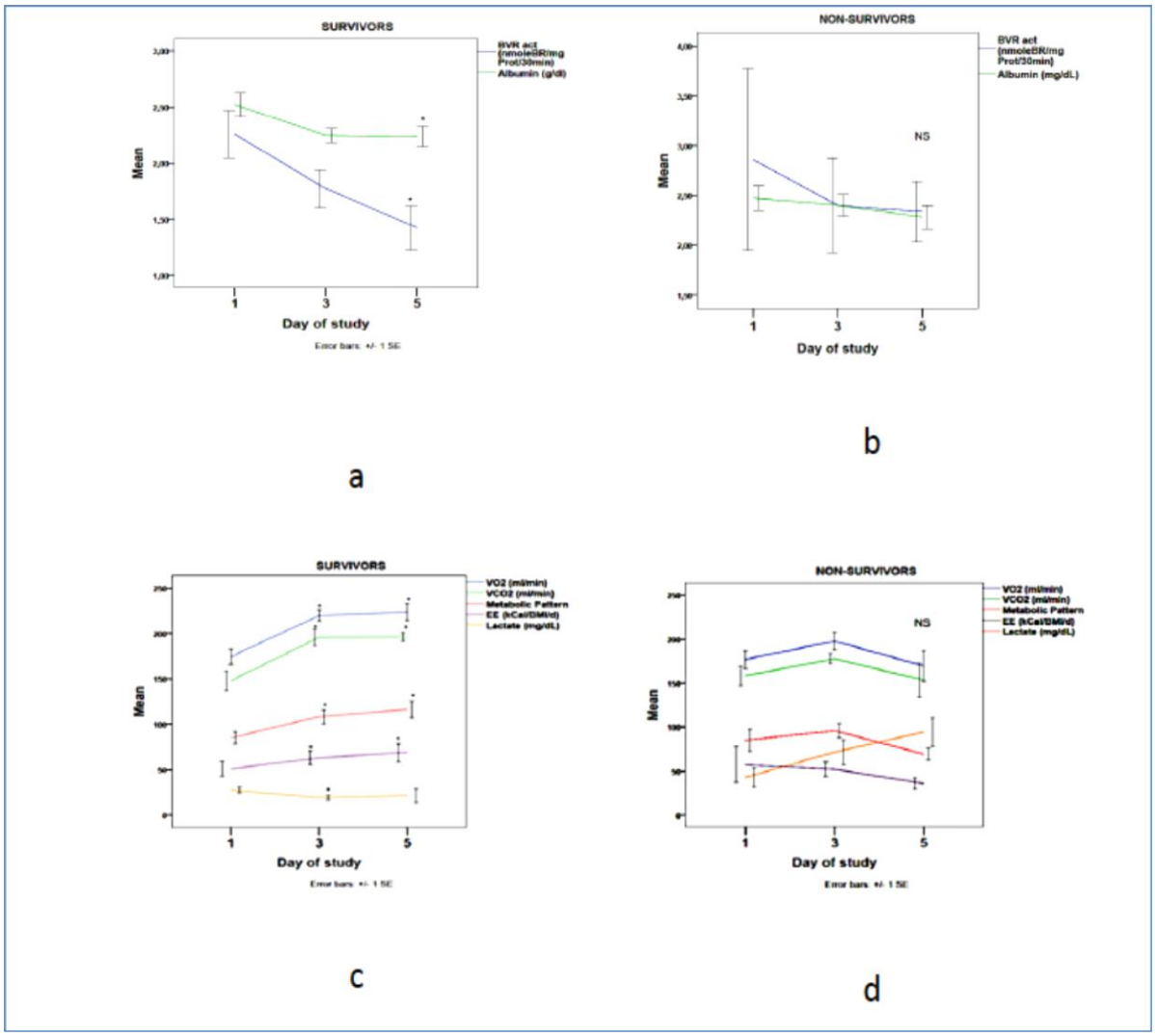
*Indicates cross-sectional increase $p<0.05$ for that day; ˆ ˆindicates $p<0.05$ longitudinal increase (day 5 vs day 1);(ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests). ATP, adenosine triphosphate; BVR act, biliverdin reductase activity; CRP, C-reacting protein; e, extracellular; EE, energy expenditure; HR, heart rate; HSP, heat shock protein; LDH, lactate dehydrogenase; m, monocytes; MAP, mean arterial pressure; MFI, mean fluorescence intensity; NO3, nitric oxide total; PELOD, pediatric logistic organ dysfunction; PRISM, pediatric risk of mortality; RQ, respiratory quotient; SF, shortening fraction; TBARS, thiobarbituric acid relative substances; Tn, troponin; VO2, oxygen consumption; VCO2, carbon dioxide production.

Σχήμα 57 : Cross-sectional και διαχρονικά διαφορές στη σοβαρή σήψη

Ενήλικες

Ενήλικες ασθενείς που επιβίωσαν παρουσίαζαν σημαντική διαφοροποίηση των αρχικών τιμών BVR, γαλακτικού, EE, VO_2, VCO_2 και μεταβολικού προφιλ σε σύγκριση με ασθενείς που πέθαναν και έδειξαν αδυναμία ανάκαμψης του υπομεταβολισμού ή της αντιοξειδωτικής κατάστασης την $5^{η}$ ημέρα (σχήμα 58a-d).

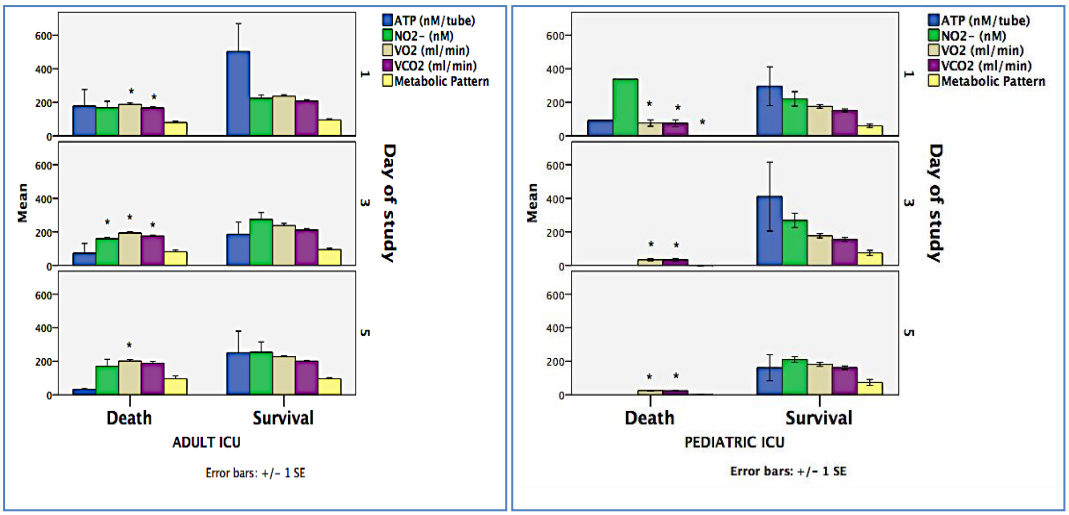
Μη επιβιώσαντες είχαν: a-b. Σταθερά καταπιεσμένες τιμές BVR και αλβουμίνης στις ημέρες 1 έως 5; c-d. αυξανόμενο γαλακτικό την ημέρα 5 και διαχρονικά καταπιεσμένο μεταβολισμό σε σύγκριση με την ανάκαμψη από τον υπομεταβολισμό στους επιβιώσαντες την ημέρα 5 ($p<0.05$).



Σχήμα 58 : Διακύμανση μεταβολικού αντιοξειδωτικού προφίλ σε ενήλικες ασθενείς με σήψη διαχρονικά (ημέρες 1-5) σχετιζόμενης με την έκβαση.

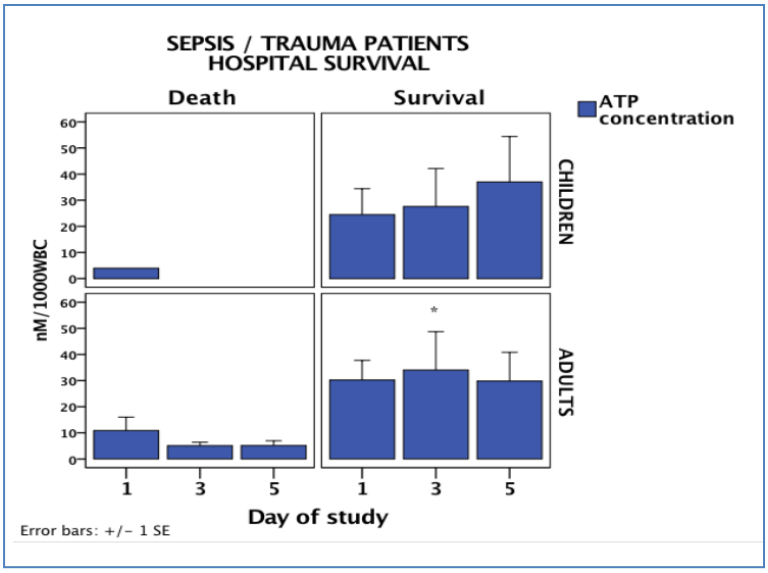
Θνητότητα και διαχρονικές συσχετίσεις

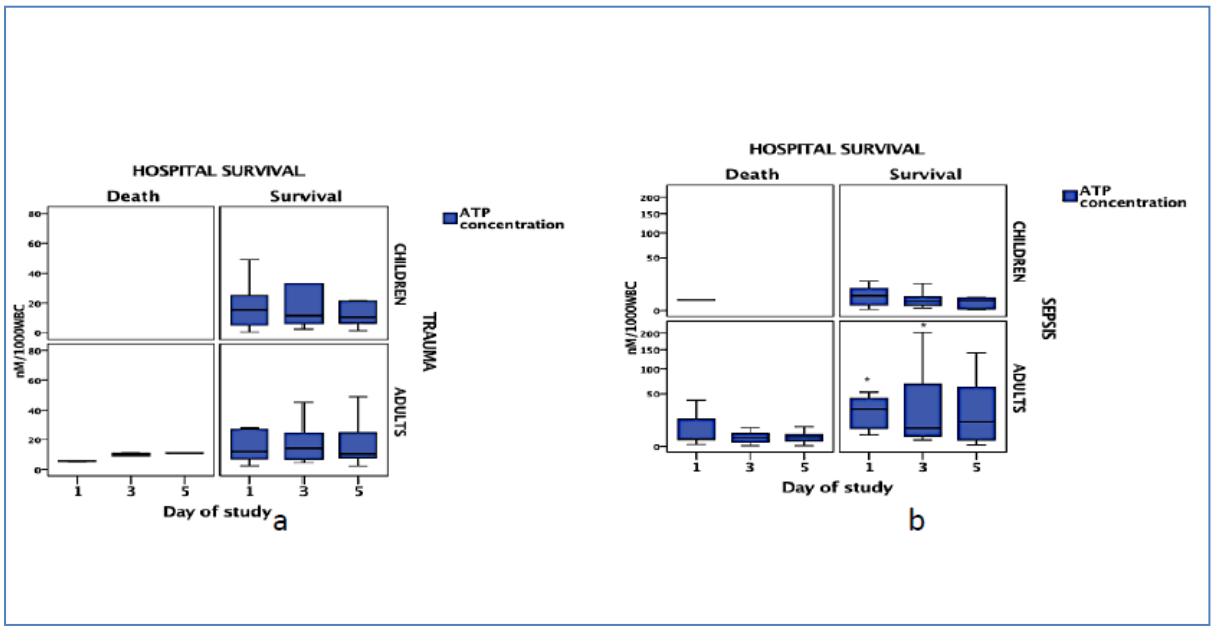
Η βιοενέργεια των μιτοχονδρίων ήταν διαχρονικά μειωμένη σε ενήλικες κα παιδιά που δεν επιβίωσαν σε σχέση με εκείνους που επιβίωσαν, και συνοδεύοταν από σημαντικά μειωμένο μεταβολισμό και υπομεταβολικά πρότυπα την 3η και 5η ημέρα σε παιδιά και ενήλικες ($p<0.05$) (σχήμα 59).



Σχήμα 59. Βιοενέργεια και μεταβολισμός μιτοχονδρίων τις ημέρες 1-5 σε πάσχοντες ενήλικες και παιδιά

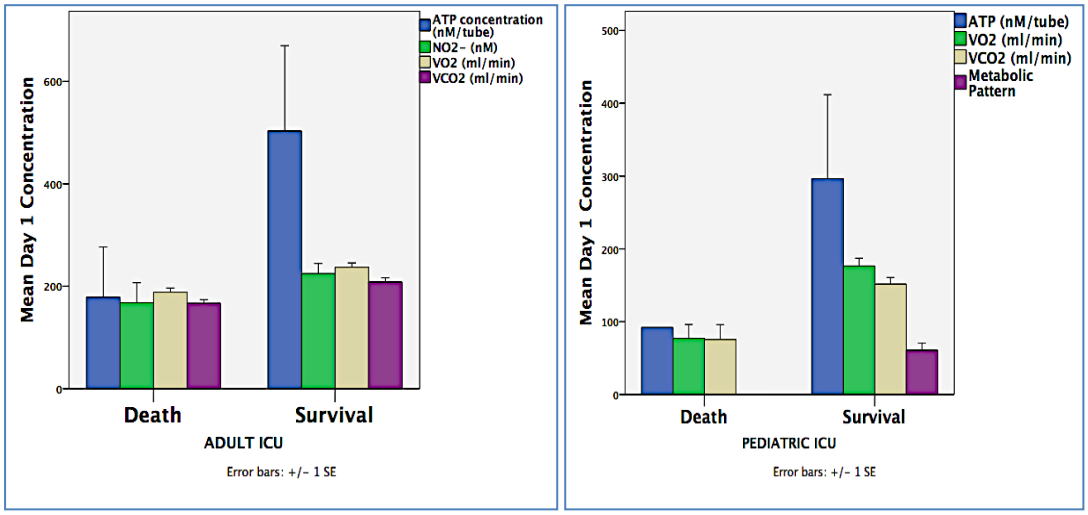
- Η συγκέντρωση ATP των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν διαχρονικά μειωμένη σε ενήλικες κα παιδιά που δεν επιβίωσαν σε σχέση με εκείνους που επιβίωσαν, με στατιστικά σημαντική διαφορά την 3η μέρα για τους ενήλικες ($p<0.05$). Οι διαφορές αυτές επιβεβαιώθηκαν σε ασθενείς με σήψη στις δύο ηλικιακές ομάδες αλλά και σχετιζόμενο με τραύμα SIRS (σχήμα 60).

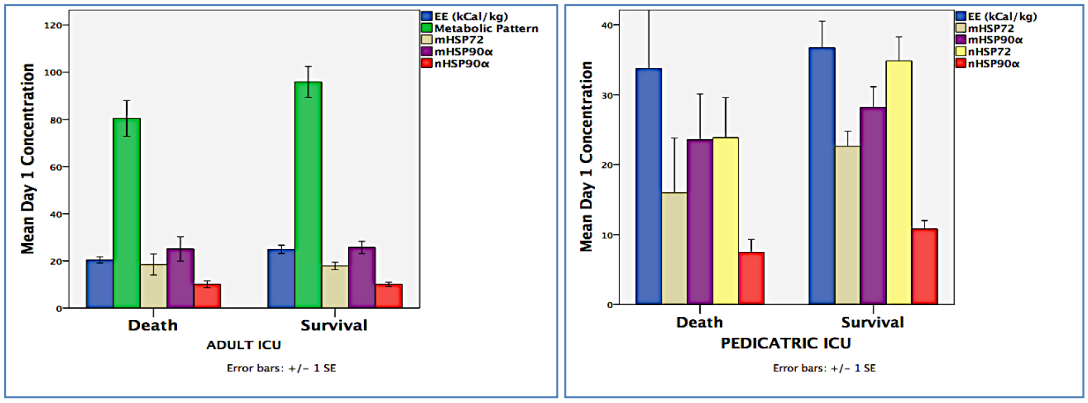




Σχήμα 60. Εμμένουσα διαχρονική διαφοροποίηση της βιοενέργειας (ATP) μιτοχονδρίων μεταξύ επιβιωσάντων και μη, στην οξεία φάση του στρες σε ενήλικες και παιδιά.

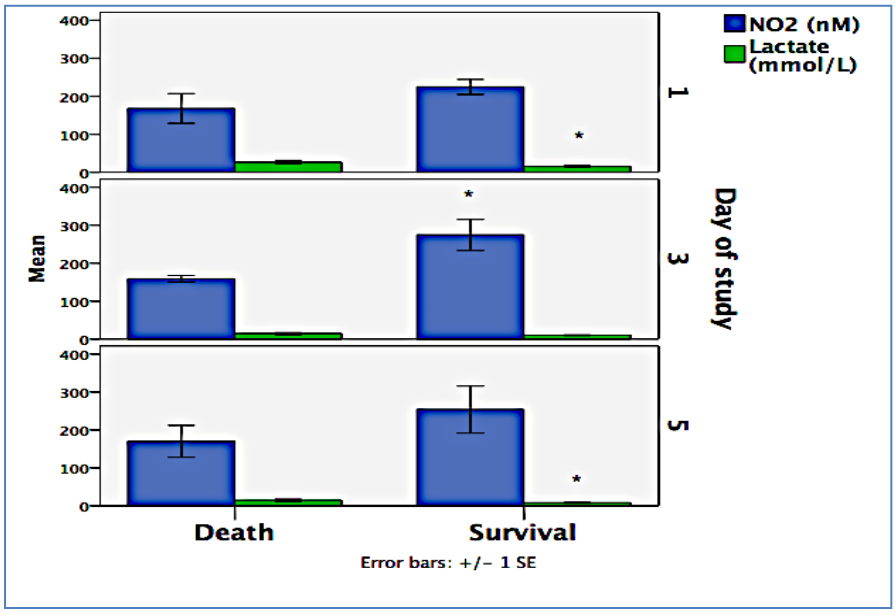
- Ασθενείς (ενήλικες και παιδιά) που επιβίωσαν είχαν υψηλότερες τιμές ενός συνδυαστικού προτύπου (pattern) βιοενέργειας και μεταβολισμού (ATP, NO_3 ($p< 0.04$), NO_2 ($p< 0.04$), VO_2 ($p< 0.0001$), VCO_2 ($p< 0.0001$), HSP72, EE) ($p< 0.04$) ήδη από την ημέρα *1* του στρες (σχήμα 61)





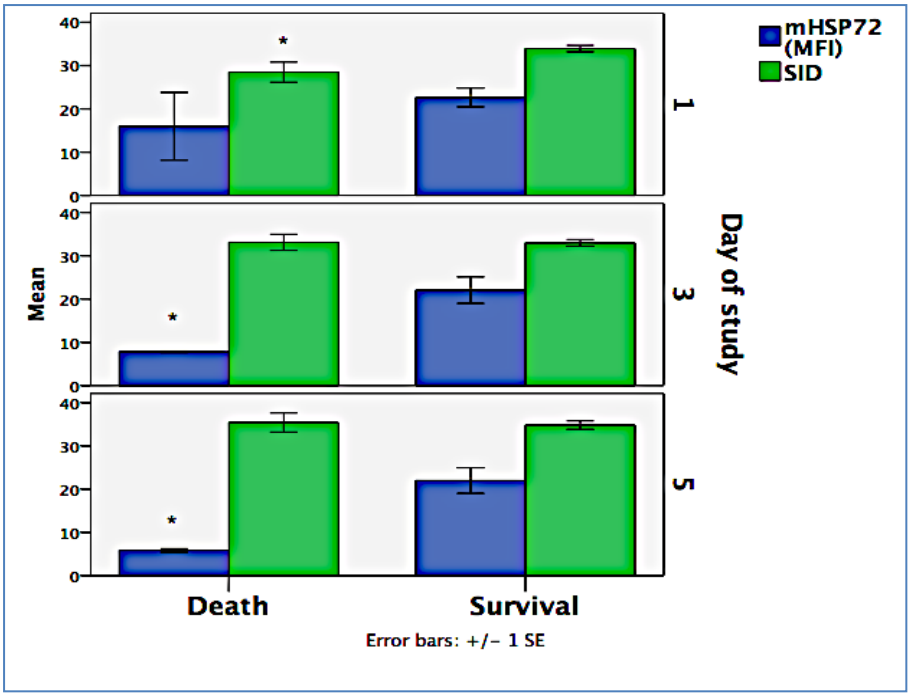
Σχήμα 61. Μεταβολικά πρότυπα σε ασθενείς που επιβίωσαν σε σχέση με εκείνους που κατέληξαν

Ασθενείς ενήλικες που δεν επιβίωσαν είχαν χαμηλότερο NO2 την ημέρα 3 ($p< 0.05$) και υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού ($p< 0.03$). Δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η πρώιμη ενεργειακή ανεπάρκεια και η μείωση της σύνθεσης του NO στα λευκοκύτταρα του αίματος είναι πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, που εμπλέκονται και σχετίζονται με αυξημένη θνητότητα (σχήμα 62).



Σχήμα 62. Μη επιβιώσαντες ασθενείς με σήψη είχαν χαμηλότερο NO_2 την ημέρα 3 και υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού τις ημέρες 1 και 5.

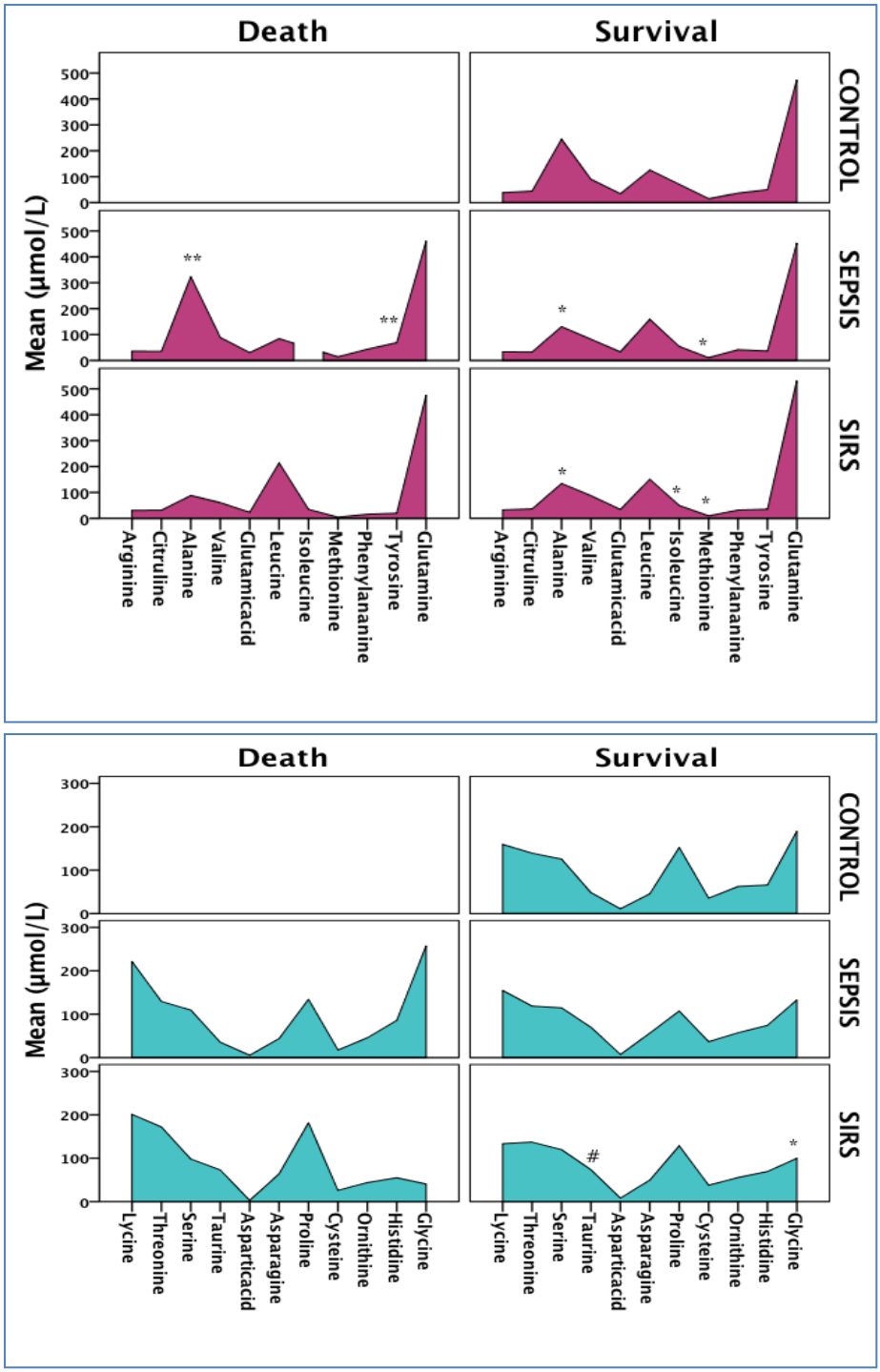
Παιδιά που δεν επιβίωσαν είχαν χαμηλότερο SID την ημέρα 1 (28±5 vs. 34±4, $p< 0.03$) και mHSP72 διαχρονικά στις ημέρες 1 - 5 (16±13 vs. 23±15MFI, $p< 0.05$) (σχήμα 63).



Σχήμα 63. Παιδιά με σήψη που δεν επιβίωσαν είχαν οξέωση (χαμηλότερο SID) την ημέρα 1 συνδυάζοντας την με μειωμένη έκφραση της mHSP72 διαχρονικά στις ημέρες 1 – 5.

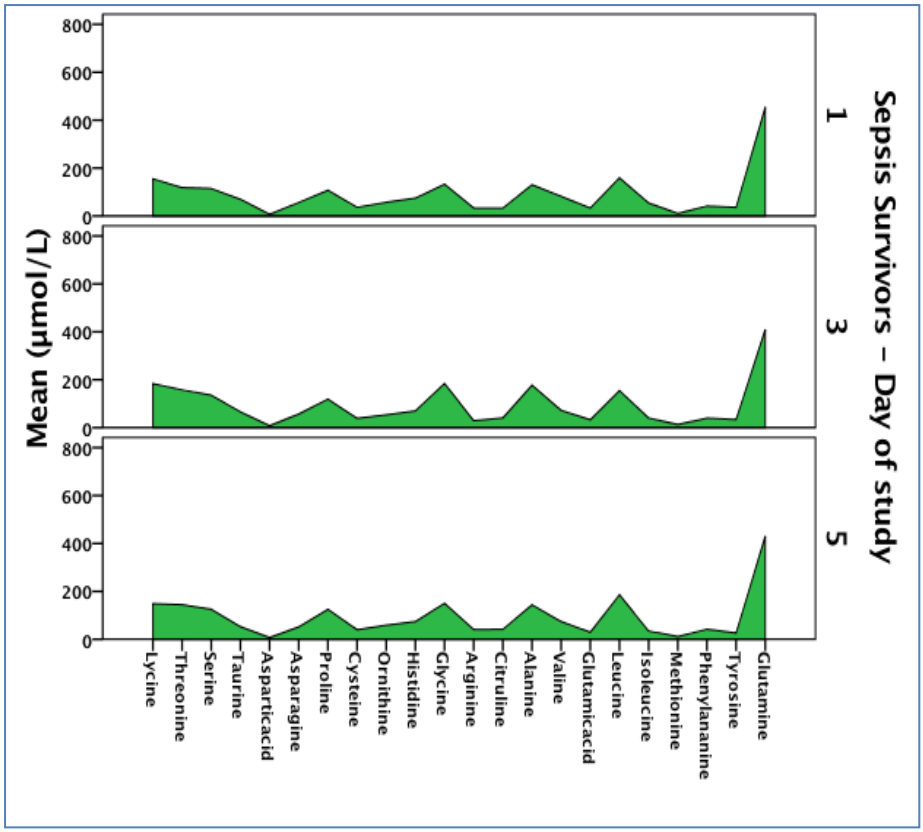
Αμινοξέα

Όταν αναλύθηκαν οι συγκεντρώσεις αμινοξέων σε σχέση με την έκβαση, παρατηρήθηκαν σημαντικές διασταυρούμενες διαφορές (Σχήμα 64).

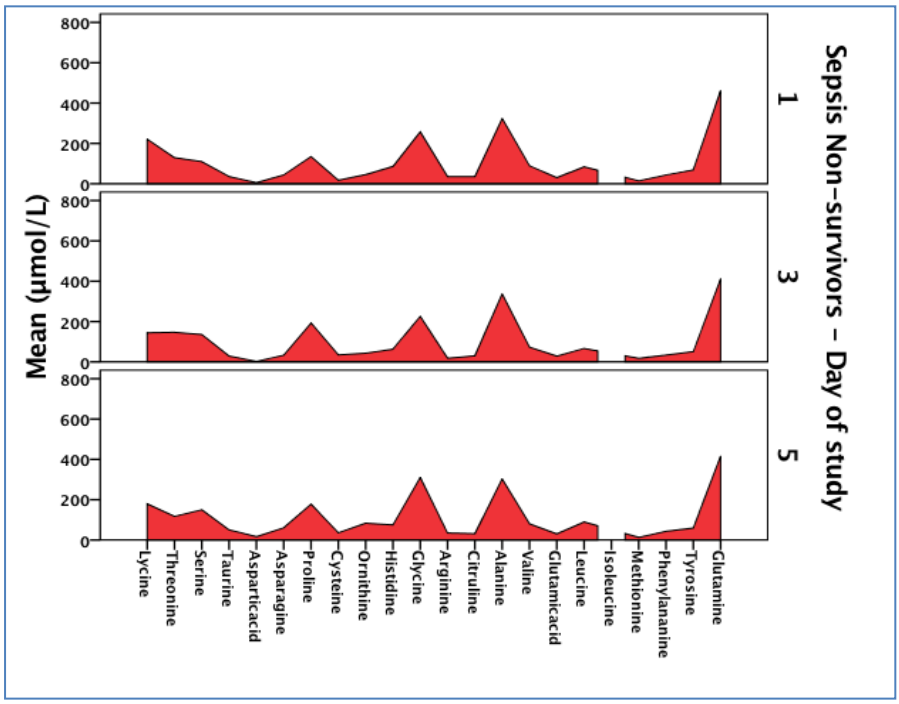


Σχήμα 64 . Συγκεντρώσεις αμινοξέων σε σχέση με την έκβαση

Διαχρονικά, οι σηπτικοί ασθενείς, επιζώντες και μη, δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5 (σχήμα 65, 66).

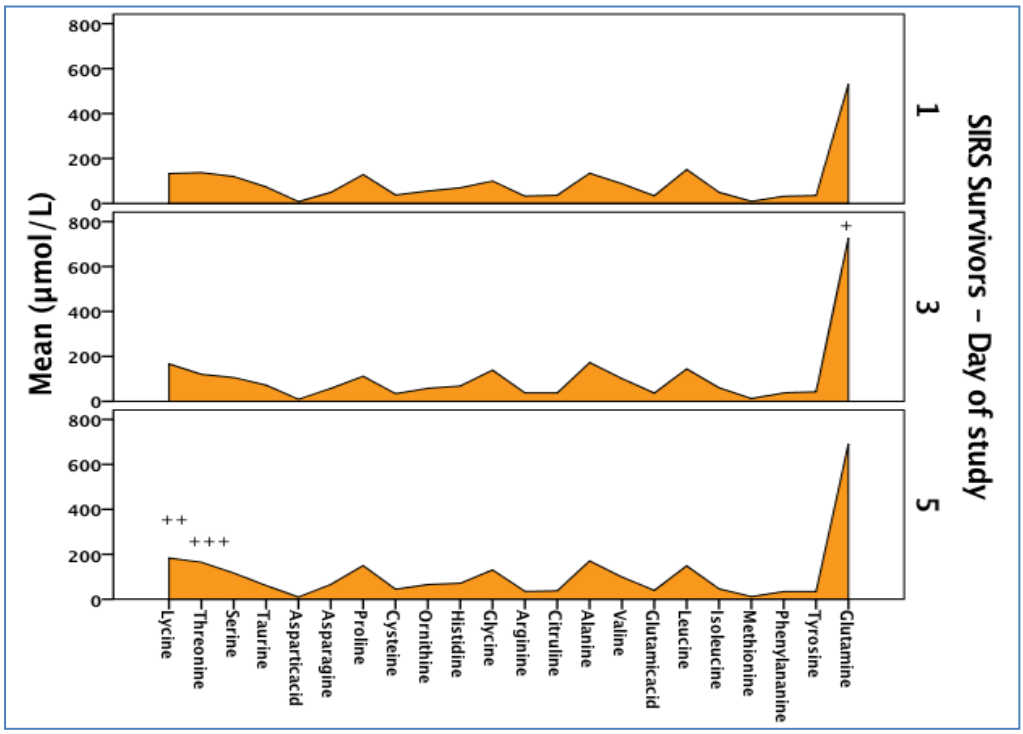


Σχήμα 65. Διαχρονικά συγκεντρώσεις αμινοξέων σε σηπτικούς ασθενείς που επιβίωσαν

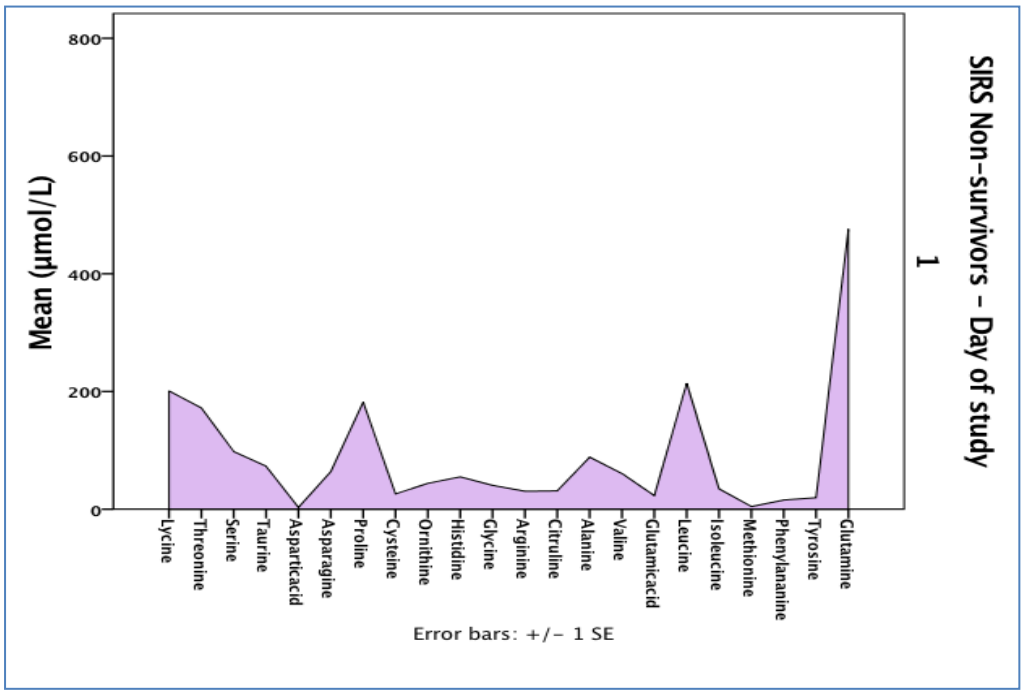


Σχήμα 66. Διαχρονικά συγκεντρώσεις αμινοξέων σε **σηπτικούς** ασθενείς που κατέληξαν

Εκείνοι που επιβίωσαν με SIRS αύξησαν την γλουταμίνη την 3η ημέρα και τη λυσίνη και θρεονίνη την 5η ημέρα (Σχήμα 67).



Σχήμα 67 . Διαχρονικά συγκεντρώσεις αμινοξέων σε ασθενείς με **SIRS** που <u>επιβίωσαν</u>



Σχήμα 68 . Διαχρονικά συγκεντρώσεις αμινοξέων σε παιδιά με **SIRS** που <u>κατέληξαν</u>

Το ένα παιδί με **SIRS** απεβίωσε πριν από την ημέρα 3 **(Σχήμα 68)**.

Αποτελέσματα –συγκεντρωτικά /συμπερασματικά

Διαφορές στην απάντηση ξενιστή σε ασθενείς ανά ηλικία

Στους σηπτικούς ενήλικες, το βάρος σώματος δεν επηρέαζε τη θνητότητα. Τα υποσιτισμένα/υποθρεπτικά όμως σηπτικά παιδιά είχαν υψηλότερη ενδονοσοκομειακή θνητότητα, σε σύγκριση με τα υγιή ή τα παχύσαρκα παιδιά-ασθενείς ($p<0,02$).

Στους ενήλικες με σήψη ή SIRS, οι εξωκυτταρικές HPS72 και 90α ήταν σημαντικά υψηλότερες σε μη επιβιώσαντες, σε σύγκριση με τους επιζώντες ($p <0,05$), ενώ είχαν μη σημαντικές τάσεις στα παιδιά-ασθενείς (Σχήματα 69a-b). Σημαντικά χαμηλότερες τιμές EE, VO2 και VCO2 καταγράφηκαν μεταξύ εκείνων που δεν επιβίωσαν και στις δύο ομάδες.

Καθοριστές θνητότητας- έκβασης

Από τους συχνά χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες (τσαπεροκίνες, αντιποκίνες ή άλλους μεταβολικούς δείκτες) που σχετίζονται με τη σήψη, αναζητήθηκαν εκείνοι που θα μπορούσαν - με τη χαμηλότερη τιμή σημαντικότητας (p) - να προβλέψουν μια δυσμενή έκβαση, σε ενήλικες και παιδιά με σοβαρή νόσο.

Η χαμηλή αλβουμίνη, τα μεταβολικά πρότυπα, οι τιμές VO2 και VCO2 και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος φαίνεται να καθορίζουν καλύτερα την ενδονοσοκομειακή θνητότητα ($p <0,05$), και στα παιδιά και στους ενήλικες (Πίνακας 4). Στους σηπτικούς ενήλικες ασθενείς, οι eHSP90α, eHSP72 και η resistin, ήταν ισχυροί παράγοντες πρόγνωσης θνητότητας μέσα στη μονάδα ή στο νοσοκομείο με ($p <0,05$) (Πίνακας 4). Το VO2, το μεταβολικό πρότυπο και οι τιμές z-BMI ήταν ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες ενδονοσοκομειακής θνητότητας στα παιδιά ($p <0.05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη σοβαρή σήψη, η απορρύθμιση και η ανισορροπία της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή οδηγεί σε συνεχιζόμενη, μη αναστρέψιμη μιτοχονδριακή βλάβη, προοδευτική έκπτωση βιοενέργειας, κυτταρική υποξία, τροποποίηση κυτταρικού μεταβολισμού, απόπτωση, δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων και θάνατο.

Η μελέτη μας είναι η πρώτη στη βιβλιογραφία που μελετά διαχρονικά το τι συμβαίνει στη σοβαρή νόσο.

Στη παρούσα συμπεριελήφθησαν εκατό σαράντα επτά (147) ασθενείς, 79 ενήλικες (σύνολο 1760 ασθενείς/ετήσια νοσηλεία ΜΕΘ Ενηλίκων: 520/έτος) και 68 παιδιά (σύνολο 503 νοσηλευόμενα παιδιά, ετήσια νοσηλεία ΜΕΘ Παίδων:125 /έτος) (ηλικία <18 ετών), ενώ νοσηλεύονταν διασωληνωμένοι σε μονάδα εντατικής νοσηλείας και πληρούσαν τα κριτήρια της Sepsis-3 για ενήλικες ή σοβαρής σήψης/σηπτικού σοκ για παιδιά, ή SIRS μετά από τραύμα για ενήλικες και παιδιά (17). Ασθενείς που αρνήθηκαν να δώσουν συγκατάθεση, αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Για πρώτη φόρα στη διεθνή βιβλιογραφία τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι η ρεσιστίνη και η eHSP90a ήταν υψηλότερες ενώ οι mHSP72, VO2, VCO2, EE, και τα μεταβολικά πρότυπα ήταν χαμηλότερα στη σήψη σε σύγκριση με τα SIRS, τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιατρικούς ασθενείς. Οι διαφορές αυτές παρακολουθούσαν παρόμοιες διαφορές μεταξύ των ομάδων όσον αφορά τα σκορ βαρύτητας, τη θερμοκρασία, HR, CRP, γαλακτικό, αλβουμίνη και EF.

Αναλυτικά η ρεζιστίνη, η εξωκυττάρια HSP72-90 και το NO_3 παραμένουν διαχρονικά υψηλότερα σε ασθενείς με σήψη, σε σύγκριση με εκείνους με SIRS. Οι ενδοκυττάριες mHSP72 και nHSP72, τα VO2, VCO2, EE και το μεταβολικό πρότυπο καταστέλλονται στη σήψη, σε σύγκριση με το SIRS σε όλη τη διάρκεια της οξείας φάσης, με κάποια τάση ανάκαμψης με την πάροδο του χρόνου. Σε σύγκριση με υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη είχαν χαμηλότερα επίπεδα ATP και TBARS στα λευκοκύτταρά τους, μαζί με μια παροδική αύξηση της δραστηριότητας της BVR την 3η ημέρα. Παρά την τάση για ανάκτηση και παροδική αύξηση της δραστηριότητας BVR την ημέρα 3, καμιά σημαντική διαχρονική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των ομάδων. Οι σηπτικοί ασθενείς, ενήλικες και παιδιά, είχαν υψηλότερα επίπεδα φαινυλαλανίνης την ημέρα 1, αλλά χαμηλότερα επίπεδα γλουταμίνης σε σύγκριση με εκείνα με SIRS την ημέρα 3. Μεγάλος αριθμός συσχετίσεων πραγματοποιήθηκε μεταξύ αμινοξέων, μεταβολικών δεικτών, βιοενέργειας, HSPs και μεταβολικών ορμονών, αναζητώντας αλληλεπιδράσεις των διαφορετικών οδών του στρες (ορμονική φλεγμονώδη απάντηση - ενδογενή ανοσοαπόκριση - διαφοροποίηση του μεταβολισμού - διαταραγμένη βιοενέργεια) που συμβάλλουν στην κλινική εκδήλωση της σήψης.

Καταστολή του μεταβολισμού και της mHSP72, επαγωγή της ρεζιστίνης και αντιπονεκτίνης μαζί με αυξημένα γαλακτικό, LDH, και τροπονίνη και μαζί με υποθρεψία, συσχετίστηκαν με χαμηλή μέση αρτηριακή πίεση και σοβαρότερη ανεπάρκεια οργάνων σε σηπτικούς ασθενείς που δεν επιβίωσαν.

Μη επιβιώσαντες είχαν σταθερά καταπιεσμένες τιμές BVR και αλβουμίνης στις ημέρες 1 έως 5, αυξανόμενο γαλακτικό την ημέρα 5 και διαχρονικά καταπιεσμένο μεταβολισμό σε σύγκριση με την ανάκαμψη από τον υπομεταβολισμό στους επιβιώσαντες την ημέρα 5 ($p<0.05$).

Η κλινική πορεία στη σήψη σχετίζεται, όπως είναι γνωστό, με τη λοιμογόνο δράση του παθογόνου παράγοντα, την ανοσολογική επάρκεια του ασθενούς και την ικανότητα προσαρμογή της λειτουργίας όλων των συστημάτων του, προκειμένου για την αντιμετώπιση του αιτίου και της κατάστασης απορρύθμισης της ομοιόστασης και της ισορροπίας του.

Φαίνεται από τα δεδομένα της μελέτης μας ότι ειδικά στη σήψη και στο σηπτικό σοκ, ξεχωριστά από το τραύμα, επικρατεί μια παθοβιολογία ίσως μοναδική, που χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω, η πορεία της οποίας καθορίζει την εξέλιξη της νόσου και την έκβαση της κρίσιμης αυτής κατάστασης.

Πρόσφατα έχει δειχθεί, σε σηπτικούς ενήλικες, αύξηση των εξωκυττάριων συγκεντρώσεων eHSP90α και eHSP72 και καταστολή της ενδοκυττάριας έκφρασης της HSP72 στα μονοκύτταρα οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη έκφραση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης, κορτιζόλης, και προλακτίνης και αντίστοιχης έκφρασης των πρωτεϊνικών υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδώ (98). Παλαιότερα έχει δεικτεί ότι η HSP7 έχει προστατευτικές επιδράσεις σε πειραματικά μοντέλα σήψης, αλλά όχι σε κλινικές μελέτες (99). Η κατασταλμένη έκφραση mHSP72 σε σηπτικούς ενήλικες και παιδιά συμφωνεί με αποτελέσματα πρόσφατων μελετών σε ενήλικες (100), που έδειξαν κατασταλμένη έκφραση των CD14 /αντιγόνου-D σχετιζόμενο με HLA και ενδοκυττάριες HSP72 και HSP90α στη σήψη (101). Μειωμένη έκφραση της HSP, επίσης έχει δειχθεί να επιδεινώνει την πειραματική εξέλιξη της νόσου (102). Σε in vitro μελέτες φάνηκε ότι η HSP72 ήταν υψηλότερη σε σήψη και SIRS συγκρινόμενη με υγιείς μάρτυρες (103), ενώ η HSP72 ήταν αυξημένη και η HSP90α σταθερά αυξημένη σε σηπτικό ορό (104). Στην μελέτη μας, η eHSP90α φάνηκε, εκτός από το γαλακτικό και τη ρεζιστίνη, να μπορεί να διακρίνει καλύτερα τη σήψη και το SIRS σε παιδιά και ενήλικες. Η eHSP72 ήταν ισχυρός διακριτικός παράγοντας σήψης στα παιδιά. Οι eHSP72 και eHSP90α φαίνεται να απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα στη σοβαρή αυτή κατάσταση στρες, και αντιπροσωπεύουν «σήματα κινδύνου» που ενεργοποιούν την εγγενή, επίκτητη αντίδραση του ξενιστή (105).

Με την δική μας ερευνητική δουλειά, αναδείξαμε μια παρόμοια κινητική τις ημέρες 1, 3 και 5 στο μεταβολικό προφίλ και το προφίλ βιοενέργειας στην πρώιμη φάση της σήψης, διακριτή αντίστοιχων μεταβολών σε ασθενείς με μη φλεγμονώδες SIRS, τόσο στα παιδιά

όσο και στους ενήλικες. Αν και η παρούσα μελέτη δεν εξέτασε τα παραπάνω βήματα από τη ματιά της μοριακής βιολογίας, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες HSP72, HSP90*α*, και η μειωμένη βιοενέργεια, ίσως όλα μαζί να αποτελούν κομμάτια του ίδιου παζλ στα μονοπάτια της σήψης.

Ιδιαίτερο εύρημα της παρούσας μελέτης, κοινό σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς, είναι ότι η ρεζιστίνη, μια ορμόνη που προέρχεται από τα μακροφάγα στον άνθρωπο (106) και τον λιπώδη ιστό στα ποντίκια, αυξάνεται νωρίς στη σήψη και παραμένει αυξημένη κατά τη διάρκεια της οξεία φάσης της νόσου, σχετίζεται δε με καθοριστικούς δείκτες στη σήψη (sepsis discriminators) (107), το γαλακτικό, την eHSP90α καθώς και με την ιστιδίνη και την ασπαραγίνη. Σε μια μελέτη follow-up η αντιπονεκτίνη φάνηκε να αυξάνεται κι η ρεζιστίνη να μειώνεται στη σήψη, και μόνο η ρεζιστίνη συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της σήψης και το βαθμό της αντιφλεγμονώδους απάντησης (108). Στη δική μας μελέτη και η ρεζιστίνη και η αντιπονεκτίνη ήταν σημαντικά αυξημένες σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς που δεν επιβίωσαν κι αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη που έδειξε μείωση της αντιπονεκτίνης σε μη επιβιώσαντες από σήψη (109). Η ρεζιστίνη έχει δειχτεί να εμπλέκεται σε μεταβολικές διαταραχές (110) που συχνά συσχετίζονται με αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ρεζιστίνη εμπλέκεται στη μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων και στην επηρεασμένη μιτοχονδριακή λειτουργία σε παιδιά (111). Τα αυξημένα επίπεδα ρεζιστίνης και η αντίστροφη σχέση της με τα επίπεδα ATP των λευκοκυττάρων που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσαν ίσως να εξηγήσουν και την κατασταλμένη βιοενέργεια στα λευκοκύτταρα στους ασθενείς μας.

Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας έρευνας ήταν ότι τα επίπεδα των μορίων κινδύνου από το στρες (stress alarmins), οι εξωκυττάριες eHSP90*α* και eHSP72 ήταν αυξημένες διαχρονικά τόσο στους ενήλικες όσο και στους παιδιατρικούς ασθενείς που κατέληξαν, ενώ είχαν μειωτική τάση σε εκείνους που επιβίωσαν. Οι τάσεις αυτές συσχετίστηκαν με κατασταλμένη ενδογενή ανοσία (mHSP72) και με μια πρώιμη βιοενεργειακή ανεπάρκεια (early-onset bioenergetics failure). Πολύ σημαντικό είναι ότι οι αλλαγές αυτές επιφέρουν μιτοχονδριακή έκπτωση, η οποία ανακάμπτει σε εκείνους που επιβιώνουν, οδηγώντας σε αυξημένη κατανάλωση ενέργειας, αύξηση-ενεργοποίηση μεταβολισμού και των επιπέδων κυτταρικού ATP. Η υπόθεση αυτή, “danger hypothesis” υποστηρίζει την απελευθέρωση HSPs μέσω εξω ή ενδο-λυσοσωμιακών μονοπατιών (exosome or endo-lysosomal pathway) από πολλά κύτταρα που έχουν υποστεί στρες, με συνέπεια οι εξωκυττάριες αυτές πρωτείνες του στρες (HSPs) να λειτουργούν σαν σήμα κινδύνου (alarmins) στα γειτονικά κύτταρα (112). Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει μια ξεκάθαρη προστατευτική δράση της HSP72 σε πειραματική σήψη. Όμως μελέτες in-vivo και in-vitro για την HSP72 στη σήψη είναι αδιευκρίνιστες (113). Επικίνδυνα υψηλά επίπεδα εξωκυττάριων HSP72 και HSP90α έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο ανεπάρκειας πολλών οργάνων (98) και με τη θνητότητα σε ασθενείς ενήλικες (52) και παιδιά (114).

Δείξαμε επίσης για πρώτη φορά μια συνεχιζόμενη διαχρονικά επαγωγή των eHSP72- 90, με ταυτόχρονη κατασταλμένη ενδοκυττάρια HSP72 σε παιδιά και ενήλικες με σήψη, με ταυτόχρονη συσχέτισή τους με τη βαρύτητα της σήψης και την επαγωγή μεταβολικών ορμονών. Οι υψηλές συγκεντρώσεις eHSP72-90 στον ορό των σηπτικών (115) (52) εμφανίζονται στην ουσία σαν «σήματα κινδύνου», που απελευθερώνονται στα πλαίσια μιας πρώιμης απόκρισης των κυττάρων, σε σχετιζόμενα με παθογόνα μόρια κινδύνου (PAMPS) (112).

Αν και το τραύμα επίσης έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε απελευθέρωση της εξωκυττάριας eHSP72 και άλλων μορίων danger-associated molecular patterns (DAMPs) που σχετίζεται με την οξεία αντιφλεγμονώδη απάντηση και την ανοσοκαταστολή (116), στη μελέτη μας δεν ανιχνεύτηκε μια τέτοια διαχρονική αύξηση. Σε πειραματική σήψη, μια προς τα κάτω ρύθμιση των ενδοκυττάριων HSPs που εξαρτώνται από το ATP, σχετίστηκε με επιδείνωση της σήψης και μειωμένη απόπτωση (117), ενώ επαγωγή της HSP72 από αδενοιό έδειξε να μειώνει τα αποπτωτικά μονοπάτια και να προφύλασσει από τη βλάβη πνεύμονα (ALI, Acute Lung Injury) λόγω σήψης (118). Και σε προηγούμενη μας μελέτη δείξαμε ότι οι σηπτικοί ασθενείς είναι υπομεταβολικοί (119) (120). Οι συσχετίσεις μεταξύ ενδογενούς ανοσίας (ενδοκυττάριες HSPs), μεταβολισμού (EE, VO_2, VCO_2), και χαμηλών επιπέδων κυτταρικού ATP, υποστηρίζουν τον ρόλο της ενδογενούς ανοσίας στην τροποποίηση του μεταβολισμού και της βιοενέργειας. Μια προοδευτική μείωση των ενδοκυττάριων HSP72 και HSP90α στη σήψη, μια ουσιαστικά εξάντληση ενδογενούς ανοσίας λόγω της σήψης (sepsis-induced innate immunity exhaustion) έχει πρόσφατα δειχτεί να σχετίζεται με προοδευτική μείωση των HLA-DR στα CD14+ μονοκύτταρα (Papadopoulos P, et al. *Crit Care*. 2015). Μια αντίστροφη σχέση μεταξύ ενδοκυττάριων HSPs και αμινοξέων, που έδειξε η μελέτη μας έρχεται να προστεθεί στο μεταβολικό πρότυπο, που έχει ήδη αναφερθεί στη σήψη και το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό υψηλής γλυκόζης και τριγλυκεριδίων, με χαμηλή χοληστερόλη, HDL και LDL (121).

Από τις συσχετίσεις των μετρήσεων με τη θνητότητα, φάνηκε ότι άτομα που δεν επιβίωσαν είχαν χαμηλότερες τιμές EE, VO_2 και VCO_2 . Ασθενείς με σήψη είχαν αυξημένα επίπεδα NO_3 (αυξημένη παραγωγή - δείκτης φλεγμονής) και μειωμένα επίπεδα ATP συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες ή ασθενείς με SIRS, ενήλικες και παιδιά. Ιδιαίτερα μειωμένα ήταν τα επίπεδα ATP σε ασθενείς που κατέληξαν, υποδηλώνοντας αναστολή και μείωσης σύνθεσης ATP, συνδέοντας την κακή έκβαση με κατάσταση υπομεταβολισμού. Κατά τη φλεγμονώδη απάντηση, η δράση της συνθετάσης του NO (NOS) αυξάνεται-ρυθμίζεται προς τα πάνω, με αποτέλεσμα την υπερβολική παραγωγή NO (122). Το NO που παράγεται αναστέλλει την αναπνευστική αλυσίδα στο σύμπλοκο IV, αναστέλλει τη σύνθεση ATP, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα ATP σε σηπτικούς ασθενείς. Σε μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με σηπτικό σοκ, βρέθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων των ανοσοκυττάρων, χωρίς να διαφέρουν τα επίπεδα ATP σε διάφορες σειρές των ανοσοκυττάρων, παρόλο που δεν συσχετίστηκαν με τα επίπεδα των κυτοκινών (123). Το εύρημα της μελέτης μας για το ATP, που συνδέει τον υπομεταβολισμό με τη θνητότητα,

συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν μειωμένη σύνθεση ATP μεταξύ ασθενών που δεν επιβιώνουν (124). Με βάση τις διαχρονικές αυτές μετρήσεις φάνηκε ότι επιβιώνουν εκείνοι οι ασθενείς που καταφέρουν να ξεπεράσουν τον αρχικό αυτό υπομεταβολισμό, να ανακάμψουν και να επιζήσουν (διαδικασία fight or flight).

Όσον αφορά τις μεταβολές της βιοενέργειας, καταγράφηκε στη σήψη μια παροδική αύξηση της ικανότητας των λευκοκυττάρων να μετατρέπουν τη BV σε BR και μια αντίστροφη σχέση με το TBARS, ενός ευαίσθητου δείκτη οξειδωτικού στρες, ο οποίος εμπλέκεται στην παθογένεση της δυσλειτουργίας οργάνων. Σε μια προηγούμενη μελέτη δείχθηκε ότι η BR σε συνδυασμό με το BVR διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες και ότι το BR στο πλάσμα προστατεύει αποτελεσματικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου- και το υπεροξείδιο του αζώτου (125). Η αυξημένη δραστηριότητα της BVR που βρέθηκε στους ασθενείς μας με σήψη (ενήλικες 1^{η} ημέρα, παιδιά 3^{η} ημέρα), μπορεί να ερμηνευτεί ως άμυνα ενάντια στο έντονο οξειδωτικό στρες.

Τα ευρήματά μας, για υψηλότερα επίπεδα TBARS στους ενήλικες ασθενείς με σήψη σε σχέση με τις ομάδες controls και SIRS (ημέρα 3^{η}) είναι σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, που δείχνουν αυξημένα TBARS (126). Η καταγραφείσα πτωτική τάση στους παιδιατρικούς ασθενείς της μελέτης μας είναι σε σύγκρουση με προηγούμενη έρευνα που έδειξε μια αυξητική τάση σε νεογνά. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην μελέτη μας, τα TBARS μετρήθηκαν στο ολικό πλάσμα που περιλαμβάνει δύο μέρη, εκείνα που βρίσκονται στην υδάτινη φάση κι εκείνα που είναι συνδεδεμένα με αλβουμίνη, ενώ στην προαναφερόμενη μελέτη μετρήθηκε μόνο η υδάτινη μορφή (126).

Παράλληλα, όπως απεικονίστηκε στα αμινογράμματα της παρούσας μελέτης, στην οξεία φάση της σοβαρής νόσου, ποικιλία αλλαγών συμβαίνει στα αμινοξέα του πλάσματος, που χαρακτηρίζεται από μειούμενες και αυξανόμενες τάσεις ή και καθόλου αλλαγές, σε σχέση με τις τιμές που βρέθηκαν στα υγιή άτομα, ενήλικες και παιδιά. Αυτές οι πρώιμες αλλαγές στα αμινοξέα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, η οποία υποστηρίζει ότι καθώς εξελίσσεται ή επιδεινώνεται μια σοβαρή νόσος, τα επίπεδα διαφορετικών αμινοξέων σταδιακά μειώνονται, αυξάνονται ή αυξομειώνονται στο χρόνο (127). Οι πολλαπλές συσχετίσεις μεταξύ αμινοξέων, μεταβολικών δεικτών, βιοενέργειας, HSPs, μεταβολιτών που εμπλέκονται στην οξειδωτική πρόκληση και μεταβολικών ορμονών αναδεικνύουν μια ακολουθία γεγονότων και αλληλεπιδράσεων που οδηγούν τάχιστα στην κλινική εκδήλωση της σήψης και διαρκούν καθ' όλη τη διάρκεια της οξείας φάσης των πρώτων ημερών. Οι διαχρονικές άλλωστε συσχετίσεις της χαμηλής μέσης αρτηριακής πίεσης με την καταστολή της βιοενέργειας και του μεταβολισμού και την επαγωγή της ρεζιστίνης και της αντιπονεκτίνης με την αυξημένη βαρύτητα νόσου μεταξύ εκείνων που δεν επιβίωσαν, υποστηρίζουν ιδιαίτερα την κλινική σημασία των ευρημάτων μας.

Φαίνεται ότι η σήψη εκδηλώνεται με παρόμοιο τρόπο σε ενήλικες και παιδιά, εμπλέκοντας πρώιμες μεταβολές σε συγκεκριμένες οδούς φλεγμονής, ενδοκρινολογίας, εγγενούς

ανοσίας, μεταβολισμού και συσταλτικότητας μυοκαρδίου. Ένα μικρό "παράθυρο" της παθοφυσιολογίας της σήψης φαίνεται να διαφέρει από το SIRS σε ενήλικες και παιδιά Περισσότερες μελέτες χρειάζονται ώστε να επιβεβαιωθούν περαιτέρω τα παραπάνω και να προχωρήσουμε σε μια μοναδική για τη σήψη προσέγγιση σε όλες τις ηλικίες στο μέλλον. Οδηγίες για εστιασμένη, στοχευμένη αντιμετώπιση στις κατευθυντήριες οδηγίες της σήψης και της σηπτικής καταπληξίας από τη “Surviving Sepsis Campaign” μπορεί στο μέλλον να καταφέρουν τη βελτίωση της έκβασης της σήψης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Περιληπτικά αυτή τη μελέτη για πρώτη φορά μελετά διαχρονικά την ορμονική φλεγμονώδη απάντηση μέσω της έκφρασης πρωτεϊνών στρες, τροποποίηση μεταβολισμού, αλλαγές στην κινητικότητα αμινοξέων και επηρεασμένης βιοενέργειας όλα είναι μέρη μια οξείας πρώιμης προσπάθειας προσαρμογής στη σήψη. Συνδυάζοντας τις μεταβολικές αλλαγές στην πρώιμη φάση της σήψης σε ενήλικες και παιδιά, αλλά και τις διαφοροποιημένες εκφράσεις της φλεγμονώδους απάντησης στο στρες, θα μπορούσαμε να διαχωρίζαμε τους σοβαρά πάσχοντες ασθενείς σε ομάδες με διαφορετικό κίνδυνο βιοενέργειας και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Τα ιδιαίτερα πρότυπα των διαχρονικών αυτών μεταβολών στη σήψη και το τραύμα, θα μπορούσαν πιθανά να καθοδηγήσουν σε μια πιο εξατομικευμένη παρέμβαση στην επείγουσα προσέγγισή της όποιας βαρύτητας σήψης ασθενούς οποιασδήποτε ηλικίας, με απώτερο στόχο την ανάκαμψη της μιτοχονδριακής – μεταβολικής λειτουργίας και βελτίωση της έκβασης. Καθώς απουσιάζουν μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, στοχευμένες ερευνητικές προσπάθειες στη σήψη με διαφορετικής έντασης στρες, ανοσοπαράλυσης και οξείας έκπτωσης ενεργειακών μονοπατιών, ίσως αποδειχθούν στο μέλλον υψίστης αναγκαιότητας, αναζητώντας τρόπους ενεργειακής υποστήριξης σε κυτταρικό επίπεδο.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Εξαιτίας των αυστηρών κριτηρίων αποκλεισμού ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια στους πληθυσμούς μας και εξαιτίας της σπανιότητας των ανοσοεπαρκών ασθενών με σοβαρή σήψη, το μέγεθος των δειγμάτων μας και με δεδομένο ότι προέρχονται από ένα μόνο κέντρο, είναι σχετικά μικρό. Ο περιορισμός βέβαια αυτός, μερικώς έχει εξισορροπηθεί με τις μετρήσεις οι οποίες ήταν συνεχιζόμενες και μετά την πρώτη μέρα και μέχρι και την πέμπτη ημέρα νόσου.

Μεγάλος περιορισμός της μελέτης αποτελεί επίσης ο μικρός αριθμός ασθενών, κυρίως όσον αφορά τα παιδιά καθώς και ο μικρός, ευτυχώς, αριθμός των θανόντων κυρίως αυτής

της ηλικιακής ομάδας, που περιορίζει τη συσχέτιση της θνητότητας με βιοδείκτες και προφίλ. Η θνητότητα στη μονάδα μας είναι εξαιρετικά χαμηλή (4,3%).

Περισσότερες μελέτες, με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος κυρίως δείγματος σήψης και διευρυμένα πολυπαραγοντικά μοντέλα συσχέτισης και αναλύσεις είναι απαραίτητα, προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Ιδιαίτερα οι ακραίες ηλικιακές ομάδες, οι οποίες δεν εξετάστηκαν στην παρούσα διαχρονική μελέτη, και η γονιδιακή προδιάθεση του κάθε ασθενούς, θα πρέπει να συσχετιστούν με την κλινική πορεία και την έκβαση. Κάτω από το πρίσμα αυτό, στο μέλλον ίσως να υπάρχει μια εξατομικευμένη αντιμετώπιση του κάθε ασθενούς, ανάλογα με τον φαινότυπο, αλλά το πιθανότερο ανάλογα με την προδιάθεση που φέρει στο γενετικό του υλικό, φόρτο ή διευκόλυνση κι ελάφρυνση.

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ…ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ….

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι οι διαχρονικές μεταβολές εξωκυττάριων και ενδοκυττάριων πρωτεϊνών του στρες, μεταβολικών ορμονών, μεταβολισμού, βιοενέργειας, και ανοσολογικής απάντησης που προκαλεί η σήψη στην οξεία φάση ακολουθούν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο, διακριτό από το σχετιζόμενο με το τραύμα SIRS, σε ενήλικες και παιδιά. Μια διαφορετική διαχρονική πορεία παθοφυσιολογικών μηχανισμών, εξηγεί πιθανά και τη συσχέτιση των διαχρονικών αυτών μεταβολών με την έκβαση.

Φαίνεται ότι, όπως σε όλες τις καταστάσεις στρες, τα κύτταρα του οργανισμού ενεργοποιούν διαδικασίες-μηχανισμούς έντονης απόκρισης στο αίτιο, προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιοστασία τους, των κυττάρων δηλαδή και των οργάνων τους. Αν η ενεργοποίηση αυτή είναι υπερβολική ή επίμονη, αν αυτή η ανοσοαπόκριση απορρυθμιστεί, αντί να αποκαταστήσει τη διαταραχή, προκαλεί επιπλέον βλάβη γιατί στρέφεται εναντίον του ίδιου του οργανισμού. Έτσι μια φυσιολογική ανοσοαπόκριση γίνεται καταστροφική. Η απορρύθμιση αυτή είναι που οδηγεί σε τροποποίηση ανοσολογικών απαντήσεων, μη αναστρέψιμη μιτοχονδριακή βλάβη, μιτοχονδριακή έκπτωση, ενεργειακή αποτυχία, τροποποίηση κυτταρικού μεταβολισμού, κυτταρική υποξία, κυτταρική έκπτωση, απόπτωση, έκπτωση βιοενέργειας, δυσλειτουργία οργάνων και θάνατο.

Πολλές μελέτες τόσο από διαφορετικούς ερευνητές όσο και από τη δική μας ερευνητική ομάδα (Briassoulis G, Briassouli E, Vardas et al) έχουν δείξει αύξηση των εξωκυττάριων συγκεντρώσεων eHSP90α και eHSP72 και καταστολή της ενδοκυττάριας έκφρασης της HSP72 στα μονοκύτταρα σε σηπτικούς ενήλικες, συσχετίζοντας μάλιστα τις αλλαγές αυτές με αυξημένη έκφραση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης, κορτιζόλης, και προλακτίνης και μιας αντίστοιχης έκφρασης των πρωτεϊνικών υποδοχέων τους (98). Ασφαλώς η πορεία αυτή θα συνεχισθεί με μεγαλύτερη ένταση στο μέλλον, στοχεύοντας στην ανάδειξη των

διαχρονικά κρίσιμων βημάτων των βιοενεργειακών – μεταβολικών – ανοσολογικών μονοπατιών της οξείας φάσης του στρες, που θα οδηγήσουν σε εκείνες τις αποτελεσματικές παρεμβάσεις που θα μπορούν να επηρεάσουν την κλινική πορεία και έκβαση της σήψης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ziesmann MT, Marshall JC. Multiple Organ Dysfunction: The Defining Syndrome of Sepsis. Surg Infect. 2018 Mar;19(2):184–90.

2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644–55.

3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003 Apr 17;348(16):1546–54.

4. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med. 2007 May;35(5):1244–50.

5. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med. 1992 Jun;20(6):864–74.

6. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. 2013 Feb;41(2):580–637.

7. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med. 2003 Apr;29(4):530–8.

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

9. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S, et al. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis - the relation to mortality. Clin Nutr Edinb Scotl. 2014 Feb;33(1):179–82.

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

11. Freund Y, Lemachatti N, Krastinova E, Van Laer M, Claessens Y-E, Avondo A, et al. Prognostic Accuracy of Sepsis-3 Criteria for In-Hospital Mortality Among Patients With Suspected Infection Presenting to the Emergency Department. JAMA. 2017 17;317(3):301–8.

12. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996 Jul;22(7):707–10.

13. Vincent J-L. Organ dysfunction in patients with severe sepsis. Surg Infect. 2006;7 Suppl 2:S69-72.

14. Bhattacharjee P, Edelson DP, Churpek MM. Identifying Patients With Sepsis on the Hospital Wards. Chest. 2017;151(4):898–907.

15. Maitra S, Som A, Bhattacharjee S. Accuracy of quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA) score and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria for predicting mortality in hospitalized patients with suspected infection: a meta-analysis of observational studies. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Mar 29;

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

17. Shime N, Kawasaki T, Nakagawa S. Proposal of a New Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score for Possible Validation. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2017 Jan;18(1):98–9.

18. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis. 2008 Jan;8(1):32–43.

19. Skibsted S, Bhasin MK, Aird WC, Shapiro NI. Bench-to-bedside review: future novel diagnostics for sepsis - a systems biology approach. Crit Care Lond Engl. 2013 Oct 4;17(5):231.

20. PubMed entry [Internet]. [cited 2018 Feb 22]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29360419

21. Czura CJ. “Merinoff symposium 2010: sepsis”-speaking with one voice. Mol Med Camb Mass. 2011 Feb;17(1–2):2–3.

22. word_processor_plugin_installation [Zotero Documentation] [Internet]. [cited 2017 Jan 12]. Available from: https://www.zotero.org/support/word_processor_plugin_installation

23. Bhan C, Dipankar P, Chakraborty P, Sarangi PP. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. Inflamm Res. 2016 Nov 1;65(11):853–68.

24. O’Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. Gut. 1998 Jan;42(1):29–35.

25. Lelubre C, Vincent J-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. Nat Rev Nephrol. 2018 Apr 24;

26. Newman TB, Draper D, Puopolo KM, Wi S, Escobar GJ. Combining immature and total neutrophil counts to predict early onset sepsis in term and late preterm newborns: use of the I/T2. Pediatr Infect Dis J. 2014 Aug;33(8):798–802.

27. Wu B, Walker J, Spur B, Rodriguez A, Yin K. Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2015 Mar;94:55–64.

28. Kumar V. T cells and their immunometabolism: A novel way to understanding sepsis immunopathogenesis and future therapeutics. Eur J Cell Biol. 2018 May 5;

29. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Semin Immunopathol. 2017;39(5):517–28.

30. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki D-M, Plati I, Apostolou K, Tavladaki T, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies--a hypothetical “comparative” study. BioMed Res Int. 2014;2014:101023.

31. Pratt WB, Morishima Y, Gestwicki JE, Lieberman AP, Osawa Y. A model in which heat shock protein 90 targets protein-folding clefts: rationale for a new approach to neuroprotective treatment of protein folding diseases. Exp Biol Med Maywood NJ. 2014 Nov;239(11):1405–13.

32. Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, Goukos D, Psarra K, Botoula E, et al. Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90α in severe sepsis and SIRS. BioMed Res Int. 2014;2014:803561.

33. Flom G, Weekes J, Johnson JL. Novel interaction of the Hsp90 chaperone machine with Ssl2, an essential DNA helicase in Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet. 2005 Jun;47(6):368–80.

34. Langouche L, Vander Perre S, Frystyk J, Flyvbjerg A, Hansen TK, Van den Berghe G. Adiponectin, retinol-binding protein 4, and leptin in protracted critical illness of pulmonary origin. Crit Care Lond Engl. 2009;13(4):R112.

35. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jun;92(6):2272–9.

36. Potz BA, Sellke FW, Abid MR. Endothelial ROS and Impaired Myocardial Oxygen Consumption in Sepsis-induced Cardiac Dysfunction. J Intensive Crit Care. 2016;2(1).

37. Galkin A, Higgs A, Moncada S. Nitric oxide and hypoxia. Essays Biochem. 2007;43:29–42.

38. Duvigneau JC, Kozlov AV. Pathological Impact of the Interaction of NO and CO with Mitochondria in Critical Care Diseases. Front Med [Internet]. 2017 Dec 22;4. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5743798/

39. Levy B, Fritz C, Tahon E, Jacquot A, Auchet T, Kimmoun A. Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. Crit Care Lond Engl. 2018 Feb 27;22(1):52.

40. Green P, Theilla M, Singer P. Lipid metabolism in critical illness. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2016 Mar;19(2):111–5.

41. Bermudes ACG, de Carvalho WB, Zamberlan P, Muramoto G, Maranhão RC, Delgado AF. Changes in lipid metabolism in pediatric patients with severe sepsis and septic shock. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 2018 Mar;47:104–9.

42. Soeters MR, Soeters PB. The evolutionary benefit of insulin resistance. Clin Nutr Edinb Scotl. 2012 Dec;31(6):1002–7.

43. Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser J-C. Stress hyperglycaemia. Lancet Lond Engl. 2009 May 23;373(9677):1798–807.

44. Briassoulis G, Venkataraman S, Thompson AE. Energy expenditure in critically ill children. Crit Care Med. 2000 Apr;28(4):1166–72.

45. Faisy C, Lerolle N, Dachraoui F, Savard J-F, Abboud I, Tadie J-M, et al. Impact of energy deficit calculated by a predictive method on outcome in medical patients requiring prolonged acute mechanical ventilation. Br J Nutr. 2009 Apr;101(7):1079–87.

46. Giner M, Laviano A, Meguid MM, Gleason JR. In 1995 a correlation between malnutrition and poor outcome in critically ill patients still exists. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 1996 Jan;12(1):23–9.

47. Weijs PJM, Looijaard WGPM, Beishuizen A, Girbes ARJ, Oudemans-van Straaten HM. Early high protein intake is associated with low mortality and energy overfeeding with high mortality in non-septic mechanically ventilated critically ill patients. Crit Care Lond Engl. 2014 Dec 14;18(6):701.

48. Klein CJ, Stanek GS, Wiles CE. Overfeeding macronutrients to critically ill adults: metabolic complications. J Am Diet Assoc. 1998 Jul;98(7):795–806.

49. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. J Nutr. 2000 Sep;130(9):2222–7.

50. Heidegger CP, Berger MM, Graf S, Zingg W, Darmon P, Costanza MC, et al. Optimisation of energy provision with supplemental parenteral nutrition in critically ill patients: a randomised controlled clinical trial. Lancet Lond Engl. 2013 Feb 2;381(9864):385–93.

51. Neu J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action. J Nutr. 2001 Sep;131(9 Suppl):2585S–9S; discussion 2590S.

52. Briassouli E, Goukos D, Daikos G, Apostolou K, Routsi C, Nanas S, et al. Glutamine suppresses Hsp72 not Hsp90α and is not inducing Th1, Th2, or Th17 cytokine responses in human septic PBMCs. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 2014 Oct;30(10):1185–94.

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

54. Jordan I, Balaguer M, Esteban ME, Cambra FJ, Felipe A, Hernández L, et al. Glutamine effects on heat shock protein 70 and interleukines 6 and 10: Randomized trial of glutamine supplementation versus standard parenteral nutrition in critically ill children. Clin Nutr Edinb Scotl. 2016 Feb;35(1):34–40.

55. Stahel PF, Flierl MA, Moore EE. “Metabolic staging” after major trauma - a guide for clinical decision making? Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2010 Jun 17;18:34.

56. Lord JM, Midwinter MJ, Chen Y-F, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. Lancet Lond Engl. 2014 Oct 18;384(9952):1455–65.

57. Peiseler M, Kubes P. Macrophages play an essential role in trauma-induced sterile inflammation and tissue repair. Eur J Trauma Emerg Surg Off Publ Eur Trauma Soc. 2018 Apr 17;

58. Stoecklein VM, Osuka A, Lederer JA. Trauma equals danger--damage control by the immune system. J Leukoc Biol. 2012 Sep;92(3):539–51.

59. Rogobete AF, Sandesc D, Papurica M, Stoicescu ER, Popovici SE, Bratu LM, et al. The influence of metabolic imbalances and oxidative stress on the outcome of critically ill polytrauma patients: a review. Burns Trauma. 2017;5:8.

60. Cuthbertson DP. The metabolic response to injury and other related explorations in the field of protein metabolism: an autobiographical account. Scott Med J. 1982 Apr;27(2):158–71.

61. Wilmore DW. From Cuthbertson to fast-track surgery: 70 years of progress in reducing stress in surgical patients. Ann Surg. 2002 Nov;236(5):643–8.

62. Santos L. Stress response in critical illness. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2013 Dec;43(10):264–72.

63. McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2016 Feb;40(2):159–211.

64. Sanches ACS, Góes CR de, Bufarah MNB, Balbi AL, Ponce D. Resting energy expenditure in critically ill patients: Evaluation methods and clinical applications. Rev Assoc Medica Bras 1992. 2016 Oct;62(7):672–9.

65. Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. Am J Clin Nutr. 1990 Feb;51(2):241–7.

66. Swinamer DL, Grace MG, Hamilton SM, Jones RL, Roberts P, King EG. Predictive equation for assessing energy expenditure in mechanically ventilated critically ill patients. Crit Care Med. 1990 Jun;18(6):657–61.

67. Picolo MF, Lago AF, Menegueti MG, Nicolini EA, Basile-Filho A, Nunes AA, et al. Harris-Benedict Equation and Resting Energy Expenditure Estimates in Critically Ill Ventilator Patients. Am J Crit Care Off Publ Am Assoc Crit-Care Nurses. 2016 Jan;25(1):e21-29.

68. Weir JBDB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. J Physiol. 1949 Aug;109(1–2):1–9.

69. Walker RN, Heuberger RA. Predictive equations for energy needs for the critically ill. Respir Care. 2009 Apr;54(4):509–21.

70. Briassoulis G, Briassouli E, Tavladaki T, Ilia S, Fitrolaki DM, Spanaki AM. Unpredictable combination of metabolic and feeding patterns in malnourished critically ill children: the malnutrition-energy assessment question. Intensive Care Med. 2014 Jan;40(1):120–2.

71. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. Crit Care Med. 2007 Oct;35(10):2408–16.

72. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006 Feb;34(2):344–53.

73. Sakr Y, Lobo SM, Moreno RP, Gerlach H, Ranieri VM, Michalopoulos A, et al. Patterns and early evolution of organ failure in the intensive care unit and their relation to outcome. Crit Care Lond Engl. 2012 Nov 16;16(6):R222.

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

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

76. Proulx F, Joyal JS, Mariscalco MM, Leteurtre S, Leclerc F, Lacroix J. The pediatric multiple organ dysfunction syndrome. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2009 Jan;10(1):12–22.

77. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. Lancet Infect Dis. 2013 Mar;13(3):260–8.

78. Lin C-W, Lo S, Hsu C, Hsieh C-H, Chang Y-F, Hou B-S, et al. T-cell autophagy deficiency increases mortality and suppresses immune responses after sepsis. PloS One. 2014;9(7):e102066.

79. Oami T, Watanabe E, Hatano M, Sunahara S, Fujimura L, Sakamoto A, et al. Suppression of T Cell Autophagy Results in Decreased Viability and Function of T Cells Through Accelerated Apoptosis in a Murine Sepsis Model. Crit Care Med. 2017 Jan;45(1):e77–85.

80. Fîlfan M, Sandu RE, Zăvăleanu AD, GreşiŢă A, Glăvan DG, Olaru DG, et al. Autophagy in aging and disease. Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol. 2017;58(1):27–31.

81. Druml W, Heinzel G, Kleinberger G. Amino acid kinetics in patients with sepsis. Am J Clin Nutr. 2001 May;73(5):908–13.

82. Fitrolaki D-M, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G. CD64-Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. BMC Pediatr. 2013;13:31.

83. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med. 1985 Oct;13(10):818–29.

84. Lee H, Lim CW, Hong HP, Ju JW, Jeon YT, Hwang JW, et al. Efficacy of the APACHE II score at ICU discharge in predicting post-ICU mortality and ICU readmission in critically ill surgical patients. Anaesth Intensive Care. 2015 Mar;43(2):175–86.

85. Moon BH, Park SK, Jang DK, Jang KS, Kim JT, Han YM. Use of APACHE II and SAPS II to predict mortality for hemorrhagic and ischemic stroke patients. J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas. 2015 Jan;22(1):111–5.

86. Kuba VM, Leone C, Damiani D. 2000 CDC or 2007 WHO - what is the most sensitive anthropometric reference for determination of overweight and cardio-metabolic risk in children aged 6-10 years? Arch Endocrinol Metab. 2015 Jun;59(3):220–5.

87. Schofield WN. Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous work. Hum Nutr Clin Nutr. 1985;39 Suppl 1:5–41.

88. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem. 2000 Aug;46(8 Pt 2):1221–9.

89. Briassoulis G, Briassouli E, Tavladaki T, Ilia S, Fitrolaki DM, Spanaki AM. Unpredictable combination of metabolic and feeding patterns in malnourished critically ill children: the malnutrition-energy assessment question. Intensive Care Med. 2014 Jan;40(1):120–2.

90. Brandi LS, Grana M, Mazzanti T, Giunta F, Natali A, Ferrannini E. Energy expenditure and gas exchange measurements in postoperative patients: thermodilution versus indirect calorimetry. Crit Care Med. 1992 Sep;20(9):1273–83.

91. Singer P, Singer J. Clinical Guide for the Use of Metabolic Carts: Indirect Calorimetry--No Longer the Orphan of Energy Estimation. Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr. 2016 Feb;31(1):30–8.

92. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoisel C, Singer M, Payen D. Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. Crit Care Med. 2007 Dec;35(12):2702–8.

93. Smyrnios NA, Curley FJ, Shaker KG. Accuracy of 30-minute indirect calorimetry studies in predicting 24-hour energy expenditure in mechanically ventilated, critically ill patients. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1997 Jun;21(3):168–74.

94. Mehta NM, Skillman HE, Irving SY, Coss-Bu JA, Vermilyea S, Farrington EA, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Pediatric Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2017 Jul;18(7):675–715.

95. Martinez EE, Mehta NM. The science and art of pediatric critical care nutrition. Curr Opin Crit Care. 2016 Aug;22(4):316–24.

96. Castegnaro M, Massey RC, Walters CL. The collaborative evaluation of a procedure for the determination of N-nitroso compounds as a group. Food Addit Contam. 1987 Mar;4(1):37–43.

97. Samouilov A, Zweier JL. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. Anal Biochem. 1998 May 1;258(2):322–30.

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

99. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki D-M, Plati I, Apostolou K, Tavladaki T, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies--a hypothetical “comparative” study. BioMed Res Int. 2014;2014:101023.

100. Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, Goukos D, Psarra K, Botoula E, et al. Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90α in severe sepsis and SIRS. BioMed Res Int. 2014;2014:803561.

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

102. Banduseela VC, Chen Y-W, Kultima HG, Norman HS, Aare S, Radell P, et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. Physiol Genomics. 2013 Jun 17;45(12):477–86.

103. Briassouli E, Tzanoudaki M, Goukos D, Routsi C, Nanas S, Vardas K, et al. Glutamine may repress the weak LPS and enhance the strong heat shock induction of monocyte and

lymphocyte HSP72 proteins but may not modulate the HSP72 mRNA in patients with sepsis or trauma. BioMed Res Int. 2015;2015:806042.

104. Briassouli E, Goukos D, Daikos G, Apostolou K, Routsi C, Nanas S, et al. Glutamine suppresses Hsp72 not Hsp90α and is not inducing Th1, Th2, or Th17 cytokine responses in human septic PBMCs. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 2014 Oct;30(10):1185–94.

105. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. Open Inflamm J. 2011 Oct 7;4:49–60.

106. Tavladaki T, Spanaki AM, Dimitriou H, Kondili E, Choulaki C, Georgopoulos D, et al. Similar Metabolic, Innate Immunity, and Adipokine Profiles in Adult and Pediatric Sepsis Versus Systemic Inflammatory Response Syndrome-A Pilot Study. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2017 Nov;18(11):e494–505.

107. Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, Orfanos SE, Nikitas N, Armaganidis A, et al. Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations with sepsis phase, severity, and circulating cytokine levels. J Crit Care. 2012 Aug;27(4):400–9.

108. Hillenbrand A, Xu P, Zhou S, Blatz A, Weiss M, Hafner S, et al. Circulating adipokine levels and prognostic value in septic patients. J Inflamm Lond Engl. 2016;13(1):30.

109. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. Br J Pharmacol. 2012 Feb;165(3):622–32.

110. Zhou L, Yu X, Meng Q, Li H, Niu C, Jiang Y, et al. Resistin reduces mitochondria and induces hepatic steatosis in mice by the protein kinase C/protein kinase G/p65/PPAR gamma coactivator 1 alpha pathway. Hepatol Baltim Md. 2013 Apr;57(4):1384–93.

111. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. Open Inflamm J. 2011 Oct 7;4:49–60.

112. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki D-M, Plati I, Apostolou K, Tavladaki T, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies--a hypothetical “comparative” study. BioMed Res Int. 2014;2014:101023.

113. Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. Shock Augusta Ga. 2011 May;35(5):466–70.

114. Wheeler DS, Fisher LE, Catravas JD, Jacobs BR, Carcillo JA, Wong HR. Extracellular hsp70 levels in children with septic shock. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2005 May;6(3):308–11.

115. Briassouli E, Tzanoudaki M, Goukos D, Routsi C, Nanas S, Vardas K, et al. Glutamine may repress the weak LPS and enhance the strong heat shock induction of monocyte and lymphocyte HSP72 proteins but may not modulate the HSP72 mRNA in patients with sepsis or trauma. BioMed Res Int. 2015;2015:806042.

116. Timmermans K, Kox M, Vaneker M, van den Berg M, John A, van Laarhoven A, et al. Plasma levels of danger-associated molecular patterns are associated with immune suppression in trauma patients. Intensive Care Med. 2016 Apr;42(4):551–61.

117. Banduseela VC, Chen Y-W, Kultima HG, Norman HS, Aare S, Radell P, et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. Physiol Genomics. 2013 Jun 17;45(12):477–86.

118. Aschkenasy G, Bromberg Z, Raj N, Deutschman CS, Weiss YG. Enhanced Hsp70 expression protects against acute lung injury by modulating apoptotic pathways. PloS One. 2011;6(11):e26956.

119. Tavladaki T, Spanaki AM, Dimitriou H, Briassoulis G. Alterations in metabolic patterns in critically ill patients-is there need of action? Eur J Clin Nutr. 2017;71(4):431–3.

120. Briassoulis G, Briassouli E, Tavladaki T, Ilia S, Fitrolaki DM, Spanaki AM. Unpredictable combination of metabolic and feeding patterns in malnourished critically ill children: the malnutrition-energy assessment question. Intensive Care Med. 2014 Jan;40(1):120–2.

121. Fitrolaki D-M, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G. CD64-Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. BMC Pediatr. 2013 Mar 1;13:31.

122. Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Venkatesh B. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. Anesth Analg. 2005 Aug;101(2):488–98.

123. Merz TM, Pereira AJ, Schürch R, Schefold JC, Jakob SM, Takala J, et al. Mitochondrial function of immune cells in septic shock: A prospective observational cohort study. PloS One. 2017;12(6):e0178946.

124. Japiassú AM, Santiago APSA, d'Avila J da CP, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, et al. Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. Crit Care Med. 2011 May;39(5):1056–63.

125. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. Pediatrics. 2004 Jun;113(6):1776–82.

126. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, Constantino L, Machado R, Ritter C, et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc. 2009 Jul;10(4):467–71.

127. Su L, Li H, Xie A, Liu D, Rao W, Lan L, et al. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis. PloS One. 2015;10(4):e0121933.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Pediatric logistic organ dysfunction score

Organ dysfunction and variable	Scoring system			
	0	1	10	20
Neurological*				
Glasgow coma score	12-15 and	7-11	4-6 or	3
Pupillary reactions	Both reactive	NA	Both fixed	NA
Cardiovascular†				
Heart rate (beats/min)				
<12 years	<=195	NA	>195	NA
12 years	<=150	NA	>150	NA
SBP (mm Hg)				
<1 month	>65	NA	35-65	<35
1 month-1 year‡	>75	NA	35-75	<35
1-12 years‡	>85	NA	45-85	<45
12 years	>95	NA	55-95	<55
Renal				
Creatinine (mol/L)				
<7 days	<140	NA	140	NA
7 days-1 year‡	<55	NA	55	NA
1-12 years‡	<100	NA	100	NA
12 years	<140	NA	140	NA
Respiratory§				
PaO_2(mmHg)/FiO_2	>70	NA	<=70	NA
$PaCO_2$(mmHg)	<=90	NA	>90	NA
Mechanical ventilation§	No ventilation	Ventilation	NA	NA
Hematological				
White blood cell count (10^9/L)	4.5 and	1.5-4.4 or	<1.5	NA
Platelets (10^9/L)	>or=35	<35	NA	NA
Hepatic				
Aspartate transaminase (IU/L)	<950 and	950 or	NA	NA
Prothrombin time# (or INR)	>60 (<140)	60 (140)	NA	NA

*Glasgow coma score: Use lowest value. If patient is sedated, record estimated Glasgow coma score before sedation. Assess patient only with known or suspected acute central nervous system disease. Pupillary reactions: Nonreactive pupils must be >3 mm. Do not assess after iatrogenic pupillary dilatation; †Heart rate and SBP: Do not assess during crying or iatrogenic agitation; ‡Strictly less than; §PaO_2: Use arterial measurement only. #Percentage of activity: PaO_2/FiO_2 ratio, which cannot be assessed in patients with intracardiac shunts, is considered as normal in children with cyanotic heart disease. $PaCO_2$ may be measured from arterial, capillary, or venous samples. Mechanical ventilation: The use of mask ventilation is not counted as mechanical ventilation. PaO_2: Arterial oxygen pressure; FiO_2: Fraction of inspired oxygen; $PaCO_2$: Arterial carbon dioxide pressure; INR: International normalized ratio; NA: Not available; SBP: Systolic blood pressure

Pediatric risk of mortality III score

Organ dysfunction and variable	Scoring system			
	0	1	10	20
Neurological*				
Glasgow coma score	12-15 and	7-11	4-6 or	3
Pupillary reactions	Both reactive	NA	Both fixed	NA
Cardiovascular†				
Heart rate (beats/min)				
<12 years	<=195	NA	>195	NA
12 years	<=150	NA	>150	NA
SBP (mm Hg)				
<1 month	>65	NA	35-65	<35
1 month-1 year‡	>75	NA	35-75	<35
1-12 years‡	>85	NA	45-85	<45
12 years	>95	NA	55-95	<55
Renal				
Creatinine (mol/L)				
<7 days	<140	NA	140	NA
7 days-1 year‡	<55	NA	55	NA
1-12 years‡	<100	NA	100	NA
12 years	<140	NA	140	NA
Respiratory§				
PaO_2(mmHg)/FiO_2	>70	NA	<=70	NA
$PaCO_2$(mmHg)	<=90	NA	>90	NA
Mechanical ventilation§	No ventilation	Ventilation	NA	NA
Hematological				
White blood cell count (10^9/L)	4.5 and	1.5-4.4 or	<1.5	NA
Platelets (10^9/L)	>or=35	<35	NA	NA
Hepatic				
Aspartate transaminase (IU/L)	<950 and	950 or	NA	NA
Prothrombin time# (or INR)	>60 (<140)	60 (140)	NA	NA

*Glasgow coma score: Use lowest value. If patient is sedated, record estimated Glasgow coma score before sedation. Assess patient only with known or suspected acute central nervous system disease. Pupillary reactions: Nonreactive pupils must be >3 mm. Do not assess after iatrogenic pupillary dilatation; †Heart rate and SBP: Do not assess during crying or iatrogenic agitation; ‡Strictly less than; §PaO_2: Use arterial measurement only. #Percentage of activity: PaO_2/FiO_2 ratio, which cannot be assessed in patients with intracardiac shunts, is considered as normal in children with cyanotic heart disease. $PaCO_2$ may be measured from arterial, capillary, or venous samples. Mechanical ventilation: The use of mask ventilation is not counted as mechanical ventilation. PaO_2: Arterial oxygen pressure; FiO_2: Fraction of inspired oxygen; $PaCO_2$: Arterial carbon dioxide pressure; INR: International normalized ratio; NA: Not available; SBP: Systolic blood pressure

The APACHE II Score

Physiologic Variable	High Abnormal Range						Low Abnormal Range		
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Rectal Temp (°C)	≥41	39-40.9		38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≤29.9
Mean Arterial Pressure (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Heart Rate	≥100	140-179	110-139		70-109		50-69	40-54	≤39
Respiratory Rate	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
Oxygenatation a) $FIO_2 \geq 0.5$ record A-aDO_2 b) $FIO_2 < 0.5$ record PaO_2	≥500	350-499	200-349		<200 PO_2>70	PO_2 61-70		PO_2 55-60	PO_2<55
Arterial pH	≥7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
HCO_3 (mEq/l)	≥52	41-51.9		32-40.9	22-31.9		18-21.9	15-17.9	<15
K (mEq/l)	≥7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5
Na (mEq/l)	≥100	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
S. Creat (mqm/dl)	≥3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hematocrit (%)	≥60		50-59.9	46-49.9	30.45.9		20-29.9		<20
TLC (10^3/cc)	≥40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		<1
GCS									

Age -score

<44 → 0
45-54 → 2
55-64 → 3
65-74 → 5
≥75 → 6

GCS:

15 → 0 | 14 → 1 | 13 → 2
12 → 3 | 11 → 4 | 10 → 5
9 → 6 | 8 → 7 | 7 → 8
6 → 9 | 5 → 10 | 4 → 11
3 → 12

JAMA 1993;270(24):2957-2963

fppt.com

The APACHE II Severity of Disease Classification System

Physiologic Variable		+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperature - rectal (°C)		≥41	39-40.9		38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≤29.9
Mean Arterial Pressure (mm Hg)		≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Heart Rate		≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Respiratory Rate (nonventilated or ventilated)		≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
Oxygenation (mmHg) a. $FiO_2 > 0,5$ use A-aDO_2	a	≥500	350-499	200-349		<200				
b. $FiO_2 < 0,5$ use PaO_2	b					> 70	61-70		55-60	<55
Arterial pH		≥7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
Serum Sodium (mmol/l)		≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Serum Potassium (mmol/l)		≥7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5
Serum Creatinine (mg/dl, Double point score for acute renal failure)		≥3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hematocrit (%)		≥60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		<20
White Blood Count (in 1000/mm³)		≥40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		<1
Glasgow-Coma-Scale (GCS)		Score = 15 minus actual GCS								
Serum HCO_3 (venous, mmol/l, use if no ABGs)		≥52	41-51.9		32-40.9	22-31.9		18-21.9	15-17.9	<15
A = Total Acute Physiology Score APS		Sum of the 12 individual variable points								

B = Age Points		C = Chronic Health Points
≤44 years	0 points	If the patient has a history of severe organ system insufficiency or is immunocompromised assign points as follows:
45-54 years	2 points	a. For nonoperative or emergency postoperative patients – 5 points
55-64 years	3 points	b. For elective postoperative patients – 2 points
65-74 years	5 points	
≥75 years	6 points	

APACHE II Score = Sum of A (APS points) + B (Age points) + C (Chronic Health points)

(From: Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 1985;13(10):818-29)

Original Communication

Journal of Parenteral and Enteral Nutrition
Volume 00 Number 0
xxx 2018 1–14
© 2018 American Society for Parenteral and Enteral Nutrition
DOI: 10.1002/jpen.1050
wileyonlinelibrary.com
WILEY

Longitudinal Profiles of Metabolism and Bioenergetics Associated with Innate Immune Hormonal Inflammatory Responses and Amino-Acid Kinetics in Severe Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome in Children

Anna Maria Spanaki, MD[1,*]; Theonymfi Tavladaki, MD[1,*]; Helen Dimitriou, PhD[2]; Andrey V. Kozlov, MD, PhD[3]; J. Catharina Duvigneau, PhD[4]; Eftychia Meleti, BSc[2]; Adelheid Weidinger, PhD[3]; Evangelos Papakonstantinou, MD[5]; and George Briassoulis, MD, PhD[1]

Abstract

Background: Experimental data indicate that sepsis influences the mitochondrial function and metabolism. We aim to investigate longitudinal bioenergetic, metabolic, hormonal, amino-acid, and innate immunity changes in children with sepsis. *Methods:* Sixty-eight children (sepsis, 18; systemic inflammatory response syndrome [SIRS], 23; healthy controls, 27) were enrolled. Plasma amino acids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC); flow-cytometry expressed as mean fluorescence intensity (MFI) of heat shock protein (HSP) levels from monocytes (m) and neutrophils (n); resistin, adiponectin, and extracellular (e) HSPs evaluated by ELISA; ATP levels in white blood cells by luciferase luminescent assay; lipid peroxidation products (TBARS) by colorimetric test; nitrite and nitrate levels by chemiluminescent assay; biliverdin reductase (BVR) activity by enzymatic assay; and energy-expenditure (EE) by E-COVX. *Results:* Resistin, eHSP72, eHSP90α, and nitrate were longitudinally higher in sepsis compared with SIRS ($p<0.05$); mHSP72, nHSP72, VO_2, VCO_2, EE, and metabolic pattern were repressed in sepsis compared with SIRS ($p<0.05$). Septic patients had lower ATP and TBARS compared with controls on day 1, lower ATP compared with SIRS on day 3 ($p<0.05$), but higher levels of BVR activity. Sepsis exhibited higher phenylalanine levels on day 1, serine on day 3; lower glutamine concentrations on days 3 and 5 ($p<0.05$). Resistin, inversely related to ATP, was independently associated with sepsis, along with mHSP72 and eHSP90α ($p<0.05$); TBARS and VO_2 were independently associated with organ failure ($p<0.05$)). Septic nonsurvivors had malnutrition, persistently repressed metabolism, mHSP72, and induced resistin and adiponectin ($p<0.05$). *Conclusions:* A pattern of early longitudinal induction of metabolic-hormones and eHSP72/HSP90α, repression of bioenergetics and innate immunity, hypo-metabolism, and amino-acid kinetics changes discriminate sepsis from SIRS; malnutrition, hypo-metabolism, and persistently increased resistin and adiponectin are associated with poor outcome. (*JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2018;00:1–14)

Keywords

pediatrics; calorimetry; amino acids; nitric oxide; heat shock proteins; ATP; resistin; adiponectin; sepsis; trauma

Clinical Relevancy Statement

Experimental data indicate that sepsis influences the mitochondrial function, bioenergetics, metabolism, and innate immunity. There are few data on the correlation of metabolic profiles with relevant parameters of bioenergetics, metabolic hormones, stress proteins, amino acids, and the severity of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or severe sepsis. This study provides new data on the compound bioenergetics-metabolic pathways in early-onset sepsis or SIRS. Combined "bioenergetics-metabolic models" are assumed, which might further clarify the acute-stress mechanisms in these critical illnesses. It demonstrates that combined early induction of metabolic hormones and heat shock proteins along with longitudinal (days 1–5) repression of bioenergetics, metabolism, and innate immunity characterize severe sepsis in children. These changes, along with early-onset alterations of amino-acid kinetics, discriminate sepsis metabolomics from SIRS; their persistence is associated with poor outcome. Our findings have clinical implications for early nutrition strategies, since monitoring of early longitudinal changes may identify "key" biomolecules that might be able to independently immune-modulate septic shock or severe trauma and affect the outcome. Furthermore, appropriate adapting energy and protein intakes to a persistent hypo-metabolism and amino-acid kinetics changes might ameliorate organ dysfunction in children with sepsis.

Common abbreviations (in alphabetical order)

ATP: adenosine triphosphate
BMI: body mass index
BUN: blood urea nitrogen
BVR: biliverdin reductase
CRP: C-reacting protein
EF: ejection fraction
HSP: heat shock protein
LDH: lactate dehydrogenase
LOS: length of stay
MAP: mean arterial pressure
MOSF: multiple organ system failure
PBMR: predicted basal metabolic rate
PELOD: pediatric logistic organ dysfunction
PRISM: pediatric risk of mortality
RQ: respiratory quotient
RSNOs: S-nitrosothiols
SF: shortening fraction
SID: strong anion difference
SIRS: systemic inflammatory response syndrome
TBARS: thiobarbituric acid reactive substances
TISS: the Therapeutic Intervention Scoring System

Introduction

An overshooting and unregulated systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in sepsis or trauma can cause serious tissue injury and multiple organ system failure (MOSF). Results of studies in children suggest that patients at risk for increased protein breakdown or repressed energy expenditure (EE) have a higher incidence of MOSF and a higher probability of death,[1] whereas optimization of protein and energy balance in critically ill patients may improve nitrogen balance and outcome.[2]

Pilot studies indicate that different degrees of sepsis severity and MOSF differently influence the mitochondrial function,[3] intracellular,[4] and extracellular heat shock protein (HSP) concentrations,[5] resistin and adiponectin hormone levels,[6] and thiobarbituric acid-reactant substances (TBARS), a product of lipid peroxidation, as an index of oxidative stress. Also heme metabolism is affected in sepsis and SIRS.[7] Biliverdin reductase (BVR) is part of the heme degradation pathway and plays an important role in the antioxidant cycle of biliverdin and bilirubin (BR).[8] However, little is known about BVR activity in white blood cells (WBC) in sepsis and SIRS patients.

Correlation of metabolic profiles with relevant parameters of metabolic hormones, bioenergetics, innate immunity, inflammation, and the severity of SIRS or severe sepsis, as well as validation of these combined "models" in an early-onset critical illness patient population, might further clarify acute-stress mechanisms in these critical illnesses. Additionally, monitoring of early longitudinal changes of these combined markers could identify "key" biomolecules that might be able to independently immune-modulate septic shock or severe trauma and affect outcome.[9]

Longitudinal profiles of metabolism and bioenergetics and their association with acute phase changes of innate immunity and hormonal inflammatory responses and amino-acid kinetics in severe sepsis and trauma in children have not been attempted so far. We hypothesized that septic patients present early with significantly increased inflammatory and hormonal response with simultaneous repressed innate immunity, bioenergetics, and metabolism compared with SIRS patients (cross-sectional data, day 1). Also, we hypothesized that these different pathways persist during the acute phase of stress longitudinally and that their trends differ between survivors and nonsurvivors. Accordingly, in this study, we assessed early longitudinal changes of EE, oxygen consumption (VO_2), CO_2 production (VCO_2), HSP, resistin, adiponectin, bioenergetics, products of nitric oxide metabolism, and plasma concentration of 22 amino acids, along with metabolic and inflammatory biomarkers, in critically ill children with severe sepsis compared with patients with SIRS (trauma) and healthy controls. Correlations between blood levels of relevant

From the [1]Pediatric Intensive Care Unit, University Hospital, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece; [2]Pediatric Hematology — Oncology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece; [3]Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology in the AUVA, Vienna, Austria; [4]Institute for Medical BiochemistryVeterinary University, Vienna, Austria; and [5]Metabolic Laboratory ISO 15189, NEOLAB S.A, Athens, Greece.

*These authors contributed equally.

Conflicts of interest: None declared.

Financial disclosure: None declared.

Received for publication August 26, 2017; accepted for publication November 7, 2017.

This article originally appeared online on xxxx 0, 2017.

Corresponding Author:
George Briassoulis, MD, PhD, Professor, Medical School, University of Crete, Head, Pediatric Intensive Care Unit, University Hospital, 71500 Voutes, Heraklion, Crete, Greece.
Email: ggbriass@otenet.gr

biomolecules, clinical data, and outcome endpoints were also attempted.

Patients and Methods

Setting and Research Ethics

This prospective clinical research study was conducted in the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) of the University Hospital, Heraklion, Crete, between January 2013 and December 2015. The Ethical Committee of the University Hospital approved the study (approval ID14494/2011/9-1-2012). Written informed consent was obtained from patients' guardians before inclusion in this study. All data were deidentified.

Patients

Eighteen patients fulfilling the criteria of severe sepsis/septic shock and 23 patients with SIRS due to trauma consecutively admitted to the PICU were enrolled in the study within 48 hours of admission. Inclusion criteria for the participating patients were: (a) age ≤18 years and (b) presence of early severe sepsis/septic shock according to the International Pediatric Sepsis Consensus Conference definitions[10] or presence of SIRS in patients with trauma without infection who met at least 2 of the conventional criteria of SIRS.[10] Also, blood was sampled from 27 healthy children undergoing screening tests for minor elective surgery and comprised the control group. Patients with late severe sepsis or SIRS (>48 hours in PICU), autoimmune diseases, malignancies, immunodeficiencies, metabolic and chronic diseases, or endocrinopathies were excluded.

Recordings, Calculations, Blood Sampling

Blood samples were taken from central arterial catheters within 24 hours of admission and repeated on days 3 and 5 thereafter. Pediatric logistic organ dysfunction (PELOD) and acute physiology and pediatric risk of mortality (PRISM III) scores were calculated for each patient. Body mass index (BMI) z-scores were calculated based on the international reference population proposed by WHO and PBMR using the Schofield equations. The compact modular metabolic monitor "E-COVX" (GE Healthcare) was used for indirect calorimetric assessment.[11] The ratio of the measured EE divided by the predicted, for child's age and sex, basal metabolic rate (PBMR) was calculated to determine the pattern of metabolism. EE/PBMR ratios of >1.1, 0.9–1.1, and <0.9 were classified as hypermetabolic, normometabolic, and hypometabolic patterns, respectively, as previously defined.[12] Mitochondrial function was inferred by analyzing metabolic pattern, EE, VO_2, and VCO_2 and by determining ATP levels in circulating WBC. None of the patients was receiving parenteral nutrition; enteral nutrition (EN) was started after the first blood sampling at 5–10 mL/kg/day through continuous nasogastric feeding and was escalated to meet half of energy needs by day 2 while full EN was achieved by day 4–5, as tolerated.

Plasma Amino Acids Determination

Blood samples for plasma amino-acids determination were obtained in heparinized tubes, kept on ice, and centrifuged within 30 min (2000 g for 10 min at 4°C). The analyses were performed by automated online high-performance liquid chromatography (HPLC) after deproteinization with trichloroacetic acid (TCA) 30%. The amino acids were separated in an amino-acid analyzer (Hitachi Aminoacid analyzer L 8900, JP) at a constant flow on a high-resolution cation-exchange column (NEOLAB S.A, Athens, Greece). The post-column derivatization reaction with the ninhydrin reagent was carried out at 135°C and the absorbance of the reaction products was read at both 570 and 440 nm.

Determination of NOx, ATP Levels (Bioenergetics), and Oxidative Stress Marker (TBARS) and BVR Activity

The plasma, blood, and WBC samples were generated from heparinized whole blood. WBC were obtained after hemolysis in hypotonic ammonium chloride buffer and pelleted by centrifugation. All samples were shock frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C pending analysis.

Products of NO metabolism. The determination of nitric oxide derivatives (NO_2, NO_3) in serum was performed using the Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i, GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA). Plasma samples were injected through a septum into the glass vessel, where NO species were converted by a specific redox active reagent converting NO_2 or NO_3 into NO, which was detected by chemiluminescence upon reaction with ozone.

ATP levels in blood cells. For the determination of adenosine triphosphate (ATP), the frozen WBC pellets were sonicated; obtained lysate was mixed with 100 μL of ATP assay reagent (PromegaCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Austria) and after incubation luminescence was measured according to the manufacturer´s manual with a photometer (SPECTRAstar Omega, Germany). Sample concentrations were compared with an ATP standard calibration (1 nM–1000 nM).

Lipid peroxidation products. Thiobarbituric acid reactive substances were determined in accordance to Mihara after Kozlov's modifications.[13] Absorption spectra were recorded in the region of 500–600 nm with a UV-1800 Shimadzu

spectrophotometer. The magnitude of peak at 535 nm was determined.

Biliverdin reductase activity. BVR activity was determined in homogenated WBC pellets after sonication in Tris-Buffer (20 mM TRIS, 300 mM sucrose, and 2mM EDTA; pH of 7.4). Homogenates were incubated with biliverdin (50 nM; Sigma), and NADPH (250 nM; Sigma) in a potassium phosphate buffer (100 mM and 1 mM EDTA; pH: 7.4) at 37°C for 30 min. The formed amount of BR was extracted into benzene and the concentration of BR was determined by photospectroscopy. Enzyme activity was expressed as nmol BR/mg prot/30 min.

Flow Cytometry for Intracellular Heat Shock Proteins

Whole blood was incubated in the dark with monoclonal antibodies CD33-PeCy5 (Phycoerythrin-Cy5) and CD45-PeCy7 (Phycoerythrin-Cy7), both from Biolegend, San Diego, CA, USA. Cells were then fixed and intracellularly stained with monoclonal antibodies HSP70/HSP72-FITC (Fluorescein isothiocyanate) and HSP90α-PE (Phycoerythrin), both from Enzo-Life Sciences, NY, USA. Analysis was performed on EPICS Coulter cytometer (CYTOMICS FC500). Cells were initially gated according to their CD45 expression. The mean fluorescence intensity (MFI) of HSP70 and HSP90α was calculated on monocytes (m) and neutrophils (n) on a scattergram generated by combining CD33 and the corresponding antigen. At least 40,000 events were acquired for each analysis.

Extracellular Protein Levels of HSP90α and HSP72 (ELISA)

Extracellular protein levels of HSP90α and HSP72 were determined by ELISA commercial kits obtained from Enzo Life Sciences (Lausanne, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. All measurements were performed in duplicate. The sensitivities of the assays were 50 pg/mL for HSP90α and 90 pg/mL for HSP72.

Adiponectin and Resistin Evaluation (ELISA)

Serum levels of adiponectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and resistin (R&D Systems, Abingdon, UK) were analyzed by ELISA assay according to the manufacturer's instructions. All measurements were performed in duplicate. The sensitivities of the assays were 100 pg/mL for adiponectin and 0.026 ng/mL for resistin.

Ultrasonography-Laboratory Evaluations

Left ventricle ejection (EF) and shortening fractions (SF), which have previously been shown to be associated with repressed metabolism in sepsis,[14] were measured each day of the study. Longitudinally, WBC, Troponin (Tn), and C-reactive protein (CRP) levels were also measured. Particularly, CRP has been previously shown to relate significantly with Interleukins (IL).[15] Along with IL-6, CRP has been previously shown to be correlated with increased glucocorticoid receptor expression and cortisol concentrations in sepsis.[16] CRP assay was performed on the immunonephelometer Dade Behring BN II (Dade Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ). CRP concentrations >0.8mg/dL were considered abnormal.

Statistical Analysis

Levene's test of the homogeneity of group variances was used to determine the data distribution from measured variables. All continuous parameters are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) and median (interquartile range), for normally distributed values and non-Gaussian values, respectively. Categorical variables are expressed as frequencies. ANOVA with Welch correction and Bonferroni or Games-Howell post hoc tests, or the Kruskal-Wallis and Dunn-Bonferroni pairwise comparisons, were used to perform comparisons between groups as continuous parametric and nonparametric tests variables for normally and non-normally distributed variables, respectively. Between-group comparisons were conducted using the χ^2 test for categorical parameters and Spearman rank correlation coefficient for correlation between 2 continuous variables. After having run univariate models, variables that had shown a relaxed p-value ≤ 0.1 were included in multivariable models. A multivariable logistic regression (backward LR) was adopted to examine whether any of the studied variables were independent discriminators of sepsis; a multivariable linear regression analysis (stepwise) was used to examine independent associations with organ failure. Because of the small cohort of nonsurvivors, performing regression analysis regarding outcome could not be justified. A 2-sided significance level of 0.05 was used for statistical inference, and all statistical tests were 2-tailed. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics (version 22.0; Chicago, IL).

Results

Patients

Patients' demographic and clinical characteristics are presented in Table 1. The main sepsis diagnoses were meningitis (16.7%), peritonitis (11.1%), pneumonia (55.6%), surgical infections (11.1%), and other (5.5%). Patients with sepsis had higher mortality and severity of illness but repressed EF and were malnourished compared with SIRS patients (Figure S1). Longitudinally, trauma patients received less

Table 1. Baseline Demographic and Patient Characteristics on Study Enrollment.

Variables	Healthy Control N = 27	SIRS N = 23	Severe Sepsis/Septic Shock N = 18	*P* Value
Age, years, median (IQR)	11 (8–13)	10 (6–14.5)	6.3 (1.8–12.5)	0.06
Males/females, n (%)	21/6 (78/22%)	21/2 (91/9%)	7/11 (39/61%) [a,b]	0.001
BMI, mean±SE		18.8±1	16.2±1.2	0.06
PRISM III, median (IQR)		11 (9–15)	20 (15–29)[b]	0.000
PRISM III probability of death, (%), median (IQR)		13 (10–21)	36 (21–67)[b]	0.000
PELOD, median (IQR)		2 (2–15)	18 (2–52)[b]	0.011
Hospital mortality, n (%)		1 (4%)	4 (22%)[b]	0.016
LOS, days, median (IQR)		6 (4–13)	18 (6.5–66)	0.06
Heart rate, bpm, mean±SE		92±4.3	114±5.5[b]	0.003
MAP, mmHg, mean±SE		80.8±2.6	67.9±3.2[b]	0.003
EF, %, mean±SE		67.8±2.1	56.5±3.4[b]	0.006
SF, %, mean±SE		34±1.3	28.2±1.8[b]	0.02
Temp. sampling time, °C, mean±SE		36.8±0.16	37.7±0.2[b]	0.005
Height z-scores, median (IQR)		0.67 (–0.48–1.7)	0.54 (–0.63–1.4)	0.75
Weight z-scores, median (IQR)		0.23 (–0.13–1.76)	–0.45 (–3.32–1.1)[b]	0.04
BMI z-scores, median (IQR)		0.22 (–1.7–1.65)	–0.83 (–3.26–0.73)[b]	0.048

Data are expressed as mean±SE (standard error of mean) or median (IQR, interquartile range) for normally distributed values and non-gaussian values, respectively. Data are expressed as n (%) of patients for categorical parameters. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis H test were used to perform comparisons among continuous parametric or nonparametric groups, as appropriate. Between-group comparisons were conducted using the χ^2 test for categorical parameters: $p<0.05$.
* indicates general ANOVA or Kruskal-Wallis H test p-values; [a-b] indicate ANOVA Bonferroni post hoc tests or Kruskal-Wallis post hoc Dunn's pairwise tests with Bonferroni corrections, as appropriate: [a] Sepsis vs healthy controls, [b] Sepsis vs SIRS.
BMI, body mass index; EF, ejection fraction; LOS, length of stay; MAP, mean arterial pressure; PELOD, pediatric logistic organ dysfunction; PICU, Pediatric Intensive Care Unit; PRISM, pediatric risk of mortality; SF, shortening fraction; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; TISS, the Therapeutic Intervention Scoring System.

energy, although both groups were prescribed almost the same amount of EN (Table 2).

Group Differences and Longitudinal Profiles

Inflammation and metabolic hormones. Longitudinally, resistin and lactate concentrations, but not CRP, were steadily higher in septic patients compared with children with SIRS (Figure 1a). Compared with healthy controls, patients with SIRS also had higher resistin levels. Adiponectin did not differ between groups and longitudinally.

The danger signal. Extracellular HSPs were increased in sepsis compared with healthy and SIRS groups on day 1 and remained so on days 3 and 5. Although HSP72 showed a declining trend on day 5, no significant longitudinal differences were observed in each diagnostic group (Figure 1b).

Metabolism. Day-1 VO_2, VCO_2, EE, and metabolic pattern were repressed in sepsis compared with SIRS. A progressive recovery of energy failure in sepsis made the longitudinal EE and metabolic pattern differences nonsignificant on days 3 and 5, while VO_2 remained still lower on day 5 (Figure 1c). On day 5, septic patients had higher RQ levels compared with SIRS patients (Table 2).

Innate immunity. In sepsis, mHSP72 expression was lower compared with SIRS and controls on days 1 and 3; nHSP72 showed similar nonsignificant trends (Figure 1d). Neutrophil HPS90 was higher compared with SIRS on day 1 and remained nonsignificantly so longitudinally.

Bioenergetics and oxidant phenotype/or antioxidant status. Septic patients had lower ATP cell levels and TBARS plasma levels compared with healthy controls on day 1, and lower ATP compared with SIRS on day 3. Also, patients with SIRS had lower TBARS compared with controls (Figure 1e). Longitudinally, septic patients showed a transient increase in their BVR activity levels on day 3 and retained higher NO_3 plasma levels on days 1 and 3 compared with SIRS patients.

Amino-acid concentrations. Day-1 amino-acid concentrations are presented in Table 3. Lower concentrations of glycine, alanine, isoleucine, and methionine, but higher taurine, were found in SIRS compared with control; phenylalanine levels were higher in sepsis compared with SIRS. Longitudinally, patients with sepsis exhibited lower

Table 2. Comparative Organ Function, Nutritional, Hormonal, Metabolic Data, and Bioenergetics on Study Enrollment and Longitudinally in Critically Ill Mechanically Ventilated Patients with Sepsis or SIRS.

	Day 1				Day 3			Day 5		
Variables	Healthy Control N = 27	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value
Enteral nutrition prescribed, mL/day, mean±SE					610 ± 86.9	643 ± 122	0.825	950 ± 170	628 ± 128	0.152
Energy intake, kCal/kg/d, median (IQR)					14 (9–24)	30 (15–74)[b]	0.026	28.8 (19–37)	42 (10–73)	0.059
VO_2, mL/min, mean ± SE		183 ± 14	137 ± 14[b]	0.03	184 ± 13,13	152 ± 24.22	0.225	192 ± 14.3	139 ± 24.4[b]	0.046
VCO_2, mL/min, mean ± SE		154 ± 12.6	117 ± 11[b]	0.04	154 ± 11.9	133 ± 20.78	0.354	169 ± 13.1	129 ± 22.9	0.113
RQ, mean ± SE		0.85 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.65	0.83 ± 0.023	0.89 ± 0.021	0.126	0.86 ± 0.01	0.92 ± 0.01[b]	0.018
Energy expenditure, kCal/BMI/d, mean ± SE		81 ± 6	56.5 ± 5[b]	0.008	82.18 ± 4.8	66.07 ± 11.56	0.157	17.3 ± 4.2	34.9 ± 10.3	0.900
Metabolic pattern, mean ± SE		104 ± 7.9	83.6 ± 6.3[b]	0.05	112 ± 10.4	85 ± 10	0.443	113 ± 8.8	91 ± 11.1	0.135
Lactate, mg/dL, mean ± SE		11.9 ± 3.6	36 ± 9[b]	0.02	7.11 ± 0.82	33.2 ± 9.35[b]	0.002	6.6 ± 1.2	34.7 ± 9.9[b]	0.003
SID, mean ± SE		33.4 ± .9	32 ± 1	0.4	33.3 ± 0.8	33.2 ± 0.83	0.949	33.3 ± .0.7	32.3 ± 3.27	0.736
Anion Gap, mean ± SE		12.5 ± 0.7	13.8 ± 0.9[b]	0.06	12.5 ± 0.89	12.9 ± 1.17	0.762	13.3 ± 0.84	17.12 ± 3.5	0.239
BUN, mg/dL, median (IQR)		24 (18–28)	22 (13.5–34)	0.4	19 (15.8–28)	16.5 (12.6–40)	0.632	23 (18–27)	16 (9–39)	0.646
Creatinine, mg/dL, mean ± SE		0.61 ± 0.4	0.54 ± 0.1	0.5	0.62 ± 0.4	0.45 ± 0.065[b]	0.038	0.58 ± 0.05	0.44 ± 0.06	0.112
Glucose, mg/dL, mean ± SE		112 ± 10	113 ± 5.4	0.9	113 ± 5.11	99 ± 4.3	0.064	107 ± 3.8	100 ± 4.34	0.280
Albumin, g/dL, mean ± SE		3.5 ± 0.6	3 ± 0.2[b]	0.02	3.12 ± 0.09	2.72 ± 0.076[b]	0.006	3 ± 0.08	2.9 ± 0.12	0.329
LDH, U/L, median (IQR)		313 (234–384)	357 (248–949)	0.2	277 (229–358)	311 (199.8–589)	0.723	316 (261–373)	444.5 (197–765.75)	0.625
Troponin, ng/mL, median (IQR)		0.01 (0.0–0.6)	0.025 (0.1–0.25)	0.3	0.007 (0.0–0.02)	0.016 (0.04–0.08)	0.243	0.006 (0.0–0.4)	0.019 (0.007–0.325)	0.317
CRP, mg/dL, mean ± SE		4.9 ± 1.3	13.7 ± 2.1[b]	0.001	6.9 ± 1.32	11.46 ± 2.38	0.085	5.9 ± 1.34	6.6 ± 1.9	0.789
Resistin, ng/mL, median (IQR)	9.4 (7.4–12)	16.5 (18–28)[c]	38.5 (27–83)[b]	0.001	20.8 (11.6–26.3)	48.7 (18–55)[b]	0.031	20.74 (16.14–30.75)[c]	33.45 (14–39.39)[a]	0.647
Adiponectin, μg/mL, mean ± SE	17.9 ± 1.6	13.7 ± 2.3	13.5 ± 2.3	0.2	12 ± 1.2	17.2 ± 3.5	0.134	11.4 ± 1.46	15.06 ± 2.5	0.207
mHSP72, MFI, median (IQR)	17.9 (9.2–25.7)	17.5 (9.7–39.3)	12.3 (6.3–18.6)[a, b]	0.02	18.6 (12–47)	10.5 (7–14.8)[b]	0.02	25.9 (15.3–42.2)	32.7 (24.5–58.5)	0.143
mHSP90α, MFI, mean ± SE	25.3 ± 4.6	29.6 ± 4.5	30.5 ± 5	0.7	31.7 ± 6.4	25.9 ± 5.78	0.52	26 ± 6.3	22.6 ± 5.9	0.700
nHSP72, MFI, mean ± SE	31.7 ± 5	39.4 ± 5.7	23.1 ± 3.8	0.15	27.5 ± 3.8	26.5 ± 4.2	0.86	27.7 ± 2.6	21.9 ± 5.3	0.284

(*continued*)

Table 2. (continued)

Variables	Day 1				Day 3			Day 5		
	Healthy Control N = 27	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value	SIRS N = 23	Severe Sepsis/ Septic Shock N = 18	*P* Value
nHSP90α. MFI, median (IQR)	8.9 (5.1–12)	8.8 (5.8–12)	11.1 (5.1–20.7)[b]	0.03	11.4 ± 2.1	17.4 ± 4.4	0.196	11.4 ± 2.6	12.2 ± 2.3	0.840
eHSP72, ng/mL, median (IQR)	0.29 (0.16–0.45)	0.34 (0.19–0.42)	0.54 (0.49–0.84)[a, b]	0.005	0.19 (0.16–0.23)	0.45 (0.27–0.91)[b]	0.04	0.26 (0.18–0.54)	0.57 (0.27–0.93)	0.364
eHSP90α, ng/mL, median (IQR)	118 (80–179)	144 (100–330)	546 (278–1043)[a, b]	0.001	193 ± 30	405 ± 59[b]	0.002	234 (88–368)	693 (490–988)[b]	0.006
ATP nM/1000WBC, mean ± SE	36.8 ± 21	16.9 ± 3.8	7.1 ± 2.1[a]	0.05	41 ± 22.5	5 ± 2.27[b]	0.03	43 ± 24.4	25 ± 23.4	0.648
NO2, nM, mean ± SE	148 ± 22	174 ± 28	161 ± 17	0.7	159 ± 21.36	175 ± 34	0.696	162 ± 22.5	144 ± 28.6	0.623
NO3, nM, mean ± SE	22811 (21558–31719)	13669 (13046–20991)	32419 (21729–46248)[b]	0.01	19736 ± 3044	39414 ± 7247[b]	0.012	26505 ± 6099	31140 ± 6429	0.609
TBARS, nM, mean ± SE	18 ± 1	10.9 ± 1.4[c]	13.3 ± 1[a]	0.001	14.3 ± 1.8	11.2 ± 1.3	0.223	13.2 ± 2.2	11.7 ± 0.88	0.620
BVR act, nM BR/mg Prot/30min, mean ± SE	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.25	2.4 ± 0.28	0.6	2.37 ± 0.42	4.6 ± 1.21	0.089	2.39 ± 0.38	2.1 ± 0.48	0.655

Data are expressed as mean ± SE (standard error of mean) or median (IQR, interquartile range) for normally distributed values and non-Gaussian values, respectively. Data are expressed as n (%) of patients for categorical parameters. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis H test were used to perform comparisons among continuous parametric or nonparametric groups, as appropriate. Between-group comparisons were conducted using the χ^2 test for categorical parameters: $p<0.05$.
* indicates general ANOVA or Kruskal-Wallis H test p-values;[a, b] indicate ANOVA Bonferroni post hoc tests or Kruskal-Wallis post hoc Dunn's pairwise tests with Bonferroni corrections, as appropriate: [a] Sepsis vs Healthy controls, [b] Sepsis vs SIRS, [c] SIRS vs Healthy controls.
ATP, adenosine triphosphate; BMI, body mass index; BUN, blood urea nitrogen; BVR act, biliverdin reductase activity; CRP, C-reacting protein; EE, energy expenditure; EF, ejection fraction; HSP, heat shock protein; LDH, lactate dehydrogenase; LOS, length of stay; m, monocytes; MAP, mean arterial pressure; MFI, mean fluorescence intensity; n, neutrophils; NO, nitric oxide; PELOD, pediatric logistic organ dysfunction; PICU, Pediatric Intensive Care Unit; PRISM, pediatric risk of mortality; RQ, respiratory quotient; SF, shortening fraction; SID, strong anion difference; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; TBARS, thiobarbituric acid relative substances; TISS, the Therapeutic Intervention Scoring System; VCO_2, carbon dioxide production; VO_2, oxygen consumption.

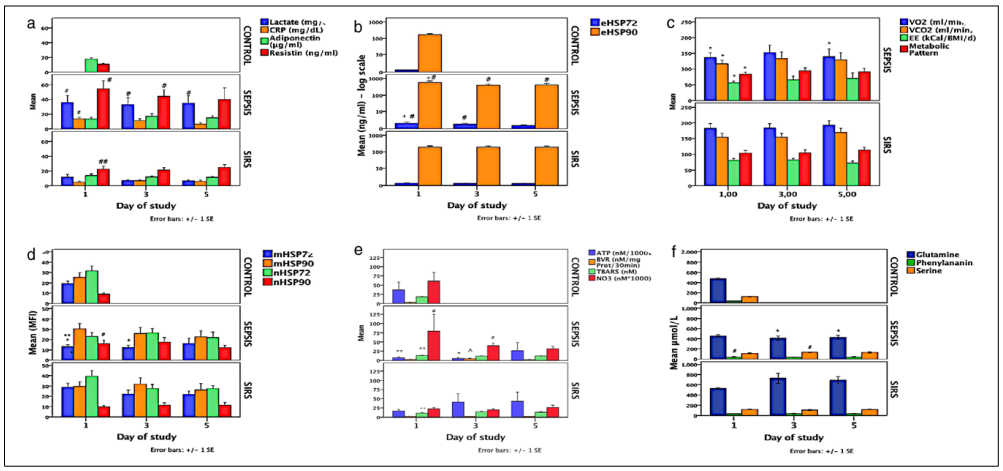


Figure 1. Cross-sectional (day 1) and longitudinal (days 1, 3, and 5) differences between sepsis, SIRS, and control groups: **a.** resistin and lactate were steadily higher in sepsis compared with SIRS; **b.** eHSP72 and 90 were increased in sepsis compared with healthy and SIRS groups on day 1 and remained so on days 3 and 5; **c.** day-1 VO_2, VCO_2, EE, and metabolic pattern were repressed in sepsis compared with SIRS; **d.** mHSP72 expression was lower compared with SIRS and controls on days 1 and 3; nHSP72 showed similar nonsignificant trends; nHPS90 was higher compared with SIRS on day 1; **e.** septic patients had lower ATP cell expression and TBARS compared with healthy controls on day 1, and lower ATP compared with SIRS on day 3; patients with SIRS had lower TBARS compared with controls; **f.** in sepsis, glutamine was lower compared with SIRS on days 3 and 5 and serine higher on day 3; despite some trends for recovery and a transient increase in BVR activity on day 3, no significant longitudinal differences were observed for any of the studied variables in each diagnostic group.
*Indicates $p<0.05$ between SIRS and H; **indicates $p<0.05$ between severe sepsis and H; #indicates $p<0.05$ between SIRS and severe sepsis (ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests).
ATP, adenosine triphosphate; BVR act, Biliverdin reductase activity; CRP, C-reacting protein; e, extracellular; EE, energy expenditure; HSP, heat shock protein; m, monocytes; MFI, mean fluorescence intensity; n, neutrophils; NO_3, nitric oxide total; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; TBARS, thiobarbituric acid relative substances; VCO_2, carbon dioxide production; VO_2, oxygen consumption.

concentrations of glutamine compared with SIRS on days 3 and 5 and higher levels of serine on day 3 (Figure 1f).

Correlations

Metabolic hormones. Resistin was related with lactate ($r = 0.52$, $p<0.01$), eHSP90α ($r = 0.48$, $p<0.002$) (Figure 2a), histidine ($r = 0.37$, $p<0.03$), and asparagine ($r = 0.44$, $p<0.01$); and adiponectin with EE ($r = -0.59$, $p<0.002$) and taurine ($r = -0.35$, $p<0.04$).

Metabolism. VO_2 was related with SF ($r = 0.53$, $p<0.003$) (Figure 2b), MAP ($r = 0.36$, $p<0.03$), lysine ($r = -0.45$, $p<0.02$), and glutamic acid ($r = 0.45$, $p<0.02$); VCO_2 with SF ($r = 0.45$, $p<0.02$), MAP ($r = 0.34$, $p<0.04$), lysine ($r = -0.47$, $p<0.01$), and glutamic acid ($r = 0.40$, $p<0.03$); and EE with taurine ($r = 0.56$, $p<0.04$), cysteine ($r = 0.59$, $p<0.001$) (Figure 2c), glycine ($r = -0.55$, $p<0.003$), alanine ($r = -0.55$, $p<0.002$), and tyrosine ($r = -0.45$, $p<0.02$).

Innate immunity. Monocyte-HSP72 was positively related with EE ($r = 0.64$, $p<0.001$), metabolic pattern ($r = 0.70$, $p<0.001$) (Figure 2d), and BMI and weight z-scores ($r = 0.64$, $p<0.07$), and inversely with alanine ($r = -0.41$, $p<0.004$), glycine ($r = -0.44$, $p<0.01$), lysine ($r = -0.33$, $p<0.02$), methionine ($r = -0.43$, $p<0.002$), and tyrosine ($r = -0.33$, $p<0.03$); mHSP90α showed similar inverse relations with the same amino acids.

Bioenergetics and oxidant phenotypelor antioxidant status. ATP was related with VO_2 ($r = 0.69$, $p<0.001$), VCO_2 ($r = 0.67$, $p<0.001$) (Figure 2e, f), resistin ($r = -0.74$, $p = 0.037$), (Figure 2g), EE ($r = 0.36$, $p<0.05$), glycine ($r = 0.35$, $p<0.02$), and histidine ($r = 0.43$, $p<0.002$); TBARS correlated inversely with BVR activity ($r = -0.40$, $p<0.03$) (Figure 2h), mHSP72 ($r = -0.36$, $p<0.04$), taurine ($r = -0.37$, $p<0.02$), serine ($r = -0.89$, $p<0.008$), and positively with glycine ($r = 0.42$, $p<0.01$), alanine ($r = 0.48$, $p<0.002$), and methionine ($r = 0.36$, $p<0.03$); and BVR activity

Table 3. Comparison of Amino Acid Serum Concentrations Among the Normal Control, Noninfectious SIRS, and Severe Sepsis Groups on the Day of PICU Admission and PICU Days 3 and 5.

	Day 1				Day 3			Day 5		
Amino Acids (μmol/L)	Healthy Controls (n = 27)	SIRS (n = 23)	Severe Sepsis (n = 18)	*P* Value	SIRS (n = 23)	Severe Sepsis (n = 18)	*P* Value	SIRS (n = 23)	Severe Sepsis (n = 18)	*P* Value
Lysine	159.38 ± 56.53	136.89 ± 49.59	168.14 ± 72.13	0.292	166.76 ± 11.97	173.75 ± 12.84	0.707	183.5 ± 11.7	157.5 ± 14.69	0.190
Threonine	139.11 ± 65.09	138.84 ± 48.65	120.76 ± 55.69	0.672	120.15 ± 11.46	154.87 ± 16.33	0.090	164.58 ± 11.09	136.85 ± 18.61	0.189
Serine	125.61 ± 31.38	118.73 ± 34.89	113.60 ± 41.25	0.503	106.07 ± 7.40	135.5 ± 5.31[b]	0.011	116.25 ± 6.67	132.57 ± 13.28	0.237
Taurine	48.34 ± 24.42	73.52 ± 20.68[a]	62.88 ± 33.69	0.006	72.07 ± 7.93	56.87 ± 11.27	0.272	61.25 ± 6.29	52 ± 7.99	0.380
Aspartic acid	11.00 ± 10.66	7.78 ± 5.96	10 ± 3.34	0.289	9.23 ± 2.51	6.62 ± 1.91	0.473	9.5 ± 1.21	10.14 ± 3.43	0.835
Asparagine	45.57 ± 20.11	50.31 ± 16.87	54.00 ± 24.74	0.486	57.76 ± 7	51.12 ± 5.58	0.514	66 ± 4.75	54.42 ± 7.61	0.191
Proline	152.42 ± 59.98	131.47 ± 47.30	112.80 ± 40.29	0.115	111.69 ± 11.84	137.37 ± 19.97	0.251	150 ± 21.32	140.42 ± 20.41	0.769
Cysteine	35.53 ± 16.67	37.23 ± 14.30	32.78 ± 14.76	0.775	34.27 ± 4.58	38.12 ± 4.32	0.563	44.5 ± 3.94	39 ± 3.57	0.342
Ornithine	62.50 ± 31.83	54.94 ± 22.17	54.93 ± 14.45	0.572	58 ± 5.27	51 ± 5.57	0.390	65.41 ± 7.60	66.14 ± 8.95	0.953
Histidine	65.69 ± 12.45	68.68 ± 17.63	76.65 ± 23.04	0.215	68.3 ± 4.44	68 ± 4.42	0.964	70.91 ± 4.51	74.57 ± 7.65	0.664
Glycine	189.95 ± 95.67	96.73 ± 78.73[a]	157.77 ± 99.50	0.005	138.92 ± 39.7	194.62 ± 36.85	0.353	130.49 ± 29.9	195.93 ± 47.64	0.236
Arginine	38.62 ± 18.28	32.62 ± 14.46	33.64 ± 16.52	0.459	37.53 ± 4.91	26.69 ± 4.96	0.159	34.86 ± 4.76	39.12 ± 6.21	0.593
Citrulline	22.1 ± 9.42	18.04 ± 9	16.6 ± 5.68	0.152	37.43 ± 4.68	37.94 ± 6.28	0.949	37.50 ± 5.77	38.5 ± 8.06	0.912
Alanine	244.95 ± 112.48	132.07 ± 84.72[a]	169.08 ± 101.39	0.002	172.58 ± 40.43	217.29 ± 38.10	0.464	170.38 ± 36.97	189.57 ± 43.31	0.748
Valine	90.07 ± 21.00	86.17 ± 41.37	83.29 ± 26.14	0.813	101.14 ± 13.97	72.08 ± 6.72	0.137	98.73 ± 13.72	75.86 ± 15.86	0.307
Glutamic acid	34.32 ± 7.40	33.58 ± 16.38	32.59 ± 9.77	0.921	36.76 ± 4.83	32 ± 3.44	0.490	39.43 ± 7.29	29.95 ± 2.47	0.349
Leucine	125.77 ± 50.95	154.40 ± 52.55	144.25 ± 86.87	0.274	144.49 ± 17.09	132.83 ± 32.66	0.731	148.51 ± 16.07	158.41 ± 35.56	0.775
Isoleucine	70.43 ± 22.66	48.54 ± 11.37[a]	54.26 ± 23.61	0.018	60.52 ± 6.94	40.22 ± 5.4	0.156	46.15 ± 5.74	34.43 ± 5.82	0.299
Methionine	15.03 ± 4.44	9.24 ± 3.65[a]	11.48 ± 4.00	0.000	12.69 ± 1.81	14.41 ± 1.75	0.532	11.9 ± 1.81	12.3 ± 2.12	0.889
Phenylalanine	36.69 ± 11.35	30.87 ± 10.70	42.02 ± 9.25[b]	0.031	37.75 ± 5.19	38.49 ± 4.9	0.925	34.29 ± 3.83	42.50 ± 6.46	0.258
Tyrosine	49.73 ± 24.74	34.18 ± 16.90	42.69 ± 22.37	0.072	42.62 ± 8.33	38.3 ± 7.08	0.724	34.19 ± 4.64	35.82 ± 8.27	0.854
Glutamine	473.46 ± 110.7	528.36 ± 86.92	455.46 ± 74.14	0.093	726.8 ± 97.95	410.52 ± 45.14[b]	0.026	691.62 ± 69.09	426.85 ± 42.05[b]	0.014

Data given are mean ± SEM. ANOVA p values. Bonferroni post hoc tests, $p<0.05$: [a] SIRS vs H, [b] SS vs SIRS.
PICU, Pediatric Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

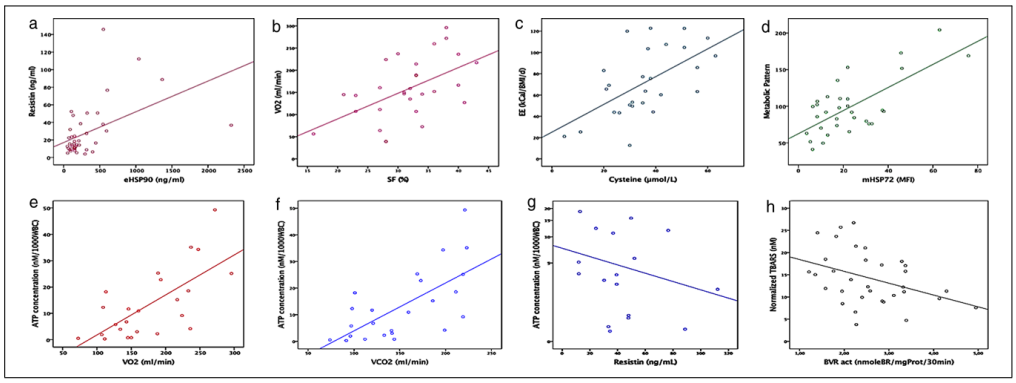


Figure 2. Characteristic correlations of day-1 simultaneously measured bioenergetics, metabolic and acute-stress biomolecules, metabolic hormones, amino-acid concentrations, and clinical severity indices in mechanically ventilated critically ill children: **a.** resistin was related with lactate ($r = 0.52$, $p<0.01$); **b.** VO_2 with SF ($r = 0.53$, $p<0.003$); **c.** EE with cysteine ($r = 0.59$, $p<0.001$); **d.** mHSP72 with metabolic pattern ($r = 0.70$, $p<0.001$); **e.** ATP with VO_2 ($r = 0.69$, $p<0.001$); **f.** ATP with VCO_2 ($r = 0.67$, $p<0.001$); **g.** ATP with resistin ($r = -0.74$, $p = 0.037$); **h.** TBARS with BVR act ($r = -0.40$, $p<0.03$).
ATP, adenosine triphosphate; BVR act, biliverdin reductase activity; EE, energy expenditure; HSP, heat shock protein; m, monocytes; MFI, mean fluorescence intensity; NO_3, nitric oxide total; SF, shortening fraction; TBARS, thiobarbituric acid relative substances; VCO_2, carbon dioxide production; VO_2, oxygen consumption.

correlated with phenylalanine ($r = 0.31$, $p<0.05$) and ornithine ($r = 0.37$, $p<0.02$).

Multivariable analyses. In a multivariable logistic regression model, mHSP72 (OR = 0.89, 95%CI = 0.8–0.98), eHSP90α (OR = 1.07, 95%CI = 1.01–1.2), and resistin (OR = 1.1, 95%CI = 1.03–1.2) were independently associated with sepsis. In a multivariable linear regression analysis, TBARS ($\beta = 0.31$, $p = 0.019$) and VO_2 ($\beta = -0.58$, $p<0.001$) were independently associated with organ failure (PELOD).

Outcome

Cross-sectional and longitudinal differences. In sepsis survivors, the innate immunity (mHSP72) and ATP exhibited increasing, longitudinal trends, whereas the alarmins eHSP90α and eHSP72 showed decreasing trends; RQ ($p = 0.031$) and HCO_3 ($p = 0.025$) were increasing and Cl ($p = 0.024$) and CRP ($p = 0.017$) decreased longitudinally among septic survivors (Figure 3a–f). In sepsis nonsurvivors, the initially recorded repression of metabolism and the induction of metabolic-hormones were sustained longitudinally (Figure 3). SIRS survivors showed a longitudinal decline in albumin ($p = 0.017$) and improvement of SF ($p = 0.032$). No within-group differences in septic nonsurvivors were recorded.

Amino acidograms. When analyzed according to outcome status, significant cross-sectional differences were evident (Figure 4a, b). Longitudinally, septic patients, either survivors or nonsurvivors, did not exhibit significant within-group differences from day 1 to day 5 (Figure 4c, d). SIRS survivors increased glutamine on day 3 and lysine and threonine on day 5 (Figure 4e). The SIRS nonsurvivor died before day 3 (Figure 4f).

Discussion

In this study, we showed that children present with a distinct metabolic–bioenergetics profile during the early phase of severe sepsis. We showed that the metabolic hormone resistin, extracellular HSP72-90, and NO_3 are longitudinally higher in septic patients compared with patients with SIRS. We also showed that the intracellular mHSP72 and nHSP72 expressions, VO_2, VCO_2, EE, and the metabolic pattern are repressed in sepsis compared with SIRS, showing some recovery trends over time. Compared with healthy children, septic patients have lower ATP levels and TBARS in WBC, which is accompanied by a transient increase in their BVR activity on day 3. Longitudinally, patients with sepsis exhibit higher phenylalanine levels on day 1 and serine on day 3, but lower concentrations of glutamine compared with SIRS on days 3 and 5. The high number of correlations between amino acids, metabolic indices, bioenergetics, HSPs, and metabolic hormones suggest multiple convergent stress pathways (hormonal inflammatory response – innate immune response – modulation of metabolism – impaired bioenergetics) contributing to the clinical manifestation of sepsis. Low

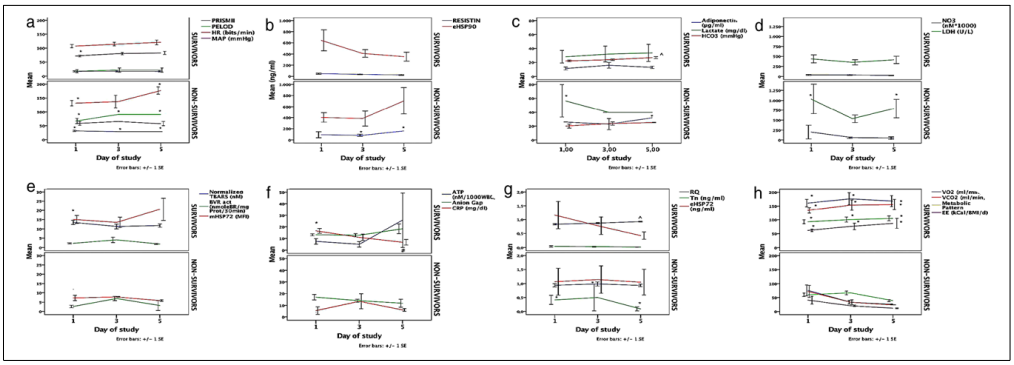


Figure 3. Cross-sectional and longitudinal differences in severe sepsis outcome groups. Nonsurvivors had **a**. lower MAP on day 1, higher HR on days 1 and 5, and higher severity of illness PRISM and PELOD longitudinally; **b.** higher resistin on days 3 and 5; **c.** higher lactate on day 1 and adiponectin on day 5; **d.** higher LDH on days 1 and 5; **e.** lower mHSP72 on day 1; **f.** higher CRP on day 1, ATP showed an increasing trend in survivors, but could not be measured in >1 nonsurvivor on day 1 and was not analyzed; **g.** higher RQ on day 3, lower Tn on day 5; **h.** lower VO_2, VCO_2, EE, and metabolic pattern longitudinally (days 1 and 5).
*Indicates cross-sectional increase $p<0.05$ for that day; ^indicates $p<0.05$ longitudinal increase (day 5 vs day 1); #indicates $p<0.05$ longitudinal decrease (day 5 vs day 1); (ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests).
ATP, adenosine triphosphate; BVR act, biliverdin reductase activity; CRP, C-reacting protein; e, extracellular; EE, energy expenditure; HR, heart rate; HSP, heat shock protein; LDH, lactate dehydrogenase; m, monocytes; MAP, mean arterial pressure; MFI, mean fluorescence intensity; NO_3, nitric oxide total; PELOD, pediatric logistic organ dysfunction; PRISM, pediatric risk of mortality; RQ, respiratory quotient; SF, shortening fraction; TBARS, thiobarbituric acid relative substances; Tn, troponin; VO_2, oxygen consumption; VCO_2, carbon dioxide production.

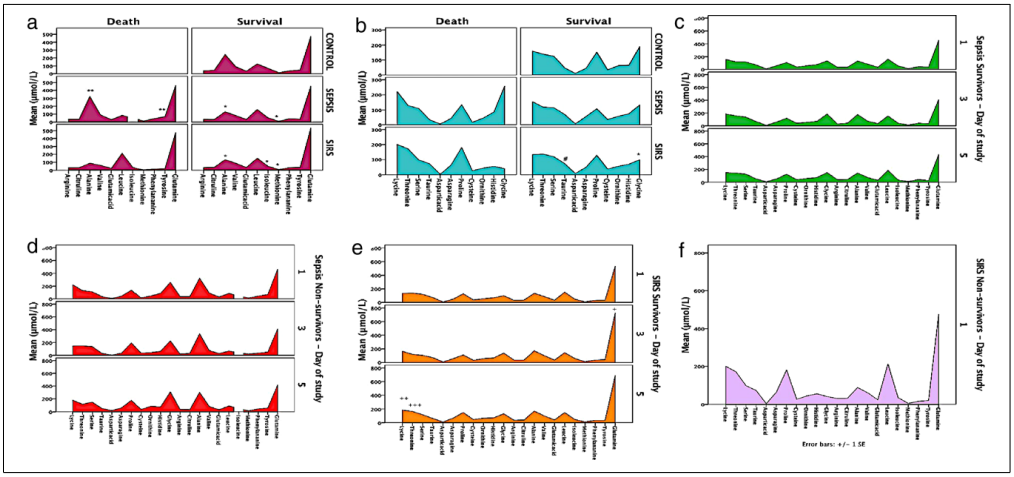


Figure 4. Cross-sectional and longitudinal amino-acidograms between diagnostic and outcome groups: **a–b**. survivors had lower concentrations of alanine and methionine in sepsis and SIRS compared with controls on day 1. Also, SIRS had lower levels of glycine and isoleucine and higher of taurine compared with controls. Nonsurvivors had higher tyrosine and alanine concentrations in sepsis compared with SIRS; **c.** sepsis survivors did not show any significant longitudinal differences; **d.** sepsis nonsurvivors did not exhibit longitudinal within-group differences; **e.** SIRS survivors exhibited increasing levels of lysine, threonine, and glutamine on days 3 and 5; **f.** day-1 SIRS nonsurvivor showed similar profile to one of day-1 survivors.
*indicates lower S or SIRS vs H, **higher S vs SIRS; #higher SIRS vs controls; +day 3 vs day 1; ++day 5 vs day 1;+++day 5 vs day 3 (ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests); SIRS, systemic inflammatory response syndrome

MAP and severity or organ failure scores among sepsis nonsurvivors are associated with repressed metabolism and mHSP72 and induced resistin and adiponectin, along with increased lactate, LDH, troponin, and malnutrition.

We found that resistin, which is a hormone derived from macrophages in humans[17] and adipose tissue in rodents, increases early in sepsis and remains increased during the acute phase of stress, related with the sepsis discriminators[18] lactate and eHSP90α and also histidine and asparagine. In a follow-up study, adiponectin increased, and resistin decreased during sepsis, but only the resistin related to the severity of sepsis and the degree of inflammatory response.[19] In our series, both resistin and adiponectin levels were significantly increased among nonsurvivors. This finding is in accordance with a previous study showing that decreasing adiponectin levels are associated with survival in sepsis.[20] Resistin was shown to be involved in metabolic disorders,[21] which are frequently associated with changes in mitochondrial function. A recent study showed that resistin mediated a decrease in mitochondrial content and impaired mitochondrial function.[22] The increased levels of resistin and its inverse relation to ATP levels in WBC, which we have detected, may thus explain the depressed bioenergetic status in the WBC found in our patient population.

In this study, the levels of stress alarmins, extracellular eHSP90α, and eHSP72 showed longitudinally increasing trends among nonsurvivors but were decreasing among survivors. These trends were associated with repressed intracellular innate immunity (mHSP72) and an early-onset bioenergetics failure. Importantly, these changes infer mitochondrial failure, which is recovered in survivors, leading to increased EE, metabolism, and cellular ATP levels. The "danger hypothesis" suggests the release of HSPs through exosome or endo-lysosomal pathway from viable severely stressed cells serves as a danger signal to neighboring cells.[23] Various animal studies have shown a clear protective effect of HSP72 in experimental sepsis. However, human *in-vivo and in-vitro* studies with HSP72 in sepsis have been inconclusive.[24] Alarming extracellular HSP72 and HSP90α levels have been previously correlated to MOSF[15] and mortality in critically ill adults[25] and children.[26] We showed for the first time a sustained longitudinal induction of eHSP72-90 with simultaneous repressed intracellular HSP72 in pediatric sepsis, related to sepsis severity and metabolic hormones induction. The higher eHSP72-90 concentrations in septic supernatants[4,26] appear to represent "danger signals" released from an early cell response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPS).[23] Although trauma has also been reported to result in a prompt release of eHSP72 and other danger-associated molecular patterns (DAMPs) associated with acute anti-inflammatory response and immune suppression,[27] in our time series such an increase could not be detected.

In experimental sepsis, downregulation of the ATP-dependent intracellular HSPs was associated with exacerbation of sepsis and impaired core autophagy,[28] whereas adenovirus-induced HSP72 impaired apoptotic cellular pathways and protected against sepsis-induced lung injury.[29] Verifying our previous work,[30-31] septic patients were hypometabolic. The correlations between the repressed innate immunity (intracellular HSPs), metabolism (EE, VO_2, VCO_2), and the low cellular ATP levels further support a chaperoning role of innate immunity in modulating metabolism and bioenergetics. A progressively decreased intracellular-HSP72-90 in sepsis (sepsis-induced innate immunity exhaustion) has been recently reported to be associated with a progressive decline of HLA-DR on CD14+ monocytes.[32] The inverse relations of intracellular HSPs to amino-acid metabolic profiles shown in this study expand the reported sepsis metabolic pattern characterized by a combination of high glucose and triglycerides and low cholesterol, HDL, and LDL.[33]

Upon inflammatory response, inducible NO synthase (NOS) is up-regulated, resulting in excessive NO production.[34] Induced NO reversibly inhibits the respiratory chain at complex IV, inhibiting ATP synthesis and decreasing ATP levels in septic patients. In a recent study in patients with septic shock, large variations in mitochondrial enzymatic activities of immune cells were detected, although cellular ATP content did not differ among different immune cell-lines and was not correlated with the tested cytokine levels.[35] Our finding of ATP being linked with hypometabolism, which is associated with mortality, however, is in agreement with the reported reduced ATP synthesis among nonsurvivors.[36]

We found a transient increased capacity of septic WBC to convert BV to BR and an inverse relation to TBARS, a sensitive index of oxidative stress, which is implicated in the pathogenesis of organ dysfunction. In a previous study, it was shown that BR in conjunction with BVR possesses potent antioxidative capacities and that BR in plasma effectively protects endothelial cells against hydrogen peroxide– and peroxynitrite-mediated death.[37] Thus, the increased activity of BVR present in our sepsis patients may be interpreted as a defense against the enhanced oxidative stress.

Our finding of lower TBARS in septic patients compared with controls contrasts with previous reports showing increased TBARS in neonatal sepsis.[38] This might be because in this study we determined the total plasma pool of TBARS comprising two pools, one occurring in plasma, one is in the water phase, and another bounding to albumin, while in the study mentioned above only the soluble pool was determined.

We showed that the acute phase of a critical illness is associated with variable patterns of plasma amino acid changes, characterized by decreasing, increasing trends or

no changes in plasma levels compared with the values found in healthy children (supplementary content). These early amino-acid alterations are in accordance with the dramatic metabolic spectrum of amino-acid changes during the acute phase of adult sepsis. As the disease progressed or deteriorated, the levels of different amino acids gradually decreased, increased, or fluctuated over time.[39]

Because of the strict exclusion criteria applied to assure population homogeneity and the rarity of immune-competed patients with severe sepsis, our single-center sample sizes are relatively small. This limitation, however, has been partially balanced by extending all the first-day measurements in each patient longitudinally up to the fifth day of hospitalization in PICU. Linking metabolic derangements with early onset of stress or inflammatory states might help to stratify distinct critically ill populations at different bioenergetics risks and to develop specific reversal approach of mitochondrial dysfunction, which may significantly improve clinical outcome. Trials in those areas, where different stress states meet opposing metabolic derangements, are still missing and thus are urgently awaited.

Conclusions

In summary, this study indicates for the first time that longitudinal hormonal inflammatory responses, expression of stress proteins, modulation of the metabolism, changes in amino-acid kinetics, and impaired bioenergetics are all part of an acute adaptation in early-onset sepsis. Although this study did not examine pathways in a series of steps the way molecular biology does, our results suggest that HSP72, HSP90α, and impaired bioenergetics might all be parts of critical pathophysiology pathways in sepsis. These results demonstrated multiple correlations between amino acids, metabolic indices, bioenergetics, HSPs, metabolites involved in the oxidative challenge, and metabolic hormones, suggesting possible roles of these biomolecules in the pathological sequelae leading to the manifestation of clinical sepsis. Finally, the associations of the lower MAP with repressed bioenergetics and metabolism and of induced resistin and adiponectin with increased severity of illness among nonsurvivors further support the clinical importance of our findings. Thereby, results of this study indicate that severe sepsis or septic shock might mainly represent a bioenergetics/energy pathway failure in the face of an acute (days 1 and 5) infection-related organ failure (inflammatory – hormonal – innate immunity deregulation). Further studies should focus on examining ways of appropriately supporting energy at the cell level.

Acknowledgments

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

The authors acknowledge Sergiu Dumitrescu for establishing chemiluminescent assay for detection and quantification of nitric oxide metabolites and Katrin Virgolini for establishing the assay and performing the measurement of the BVR activity as well as Tanja Stoegerer and Isaak Amirian for excellent assistance in the determination of TBARS and nitrogen species. The authors acknowledge as well Drs. Evaggelos Blevrakis, Pediatric Surgeon, and Popi Fountouli, Head, University Hospital Blood Bank, for their continuous support on the project and their invaluable help with the collection of samples and analysis. Also, the authors gratefully acknowledge the continuous support of Julieta Perez along with the ICU and PICU medical and nurse staff of the University Hospital of Heraklion, without whose help this study would not have been possible.

Statement of Authorship

A.M. Spanaki contributed to the conception and design of the research; G. Briassoulis, T. Tavladaki, H. Dimitriou, and A. Kozlov contributed to design of the research; A.M. Spanaki, T. Tavladaki, H. Dimitriou, and E. Meleti contributed to the acquisition and analysis of the data; J. C. Duvigneau, E. Meleti, A. Weidinger, and E. Papakonstantinou, contributed to the analysis of the data; A.M. Spanaki, T. Tavladaki, H. Dimitriou, A. Kozlov and G. Briassoulis, contributed to the interpretation of the data; A.M. Spanaki and G. Briassoulis drafted the manuscript; and H. Dimitriou, A. Kozlov and J. C. Duvigneau, critically revised the manuscript. All authors agree to be fully accountable for ensuring the integrity and accuracy of the work and read and approved the final manuscript.

Supplementary Information

Additional supporting information may be found online in the supporting information tab for this article.

References

1. Briassoulis G, Venkataraman S, Thompson A. Cytokines and metabolic patterns in pediatric patients with critical illness. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:354047.
2. Briassoulis GC, Zavras NJ, Hatzis MD TD. Effectiveness and safety of a protocol for promotion of early intragastric feeding in critically ill children. *Pediatr Crit Care Med*. 2001;2(2):113-121.
3. Herminghaus A, Barthel F, Heinen A, et al. Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion*. 2015;24:122-128.
4. Briassouli E, Tzanoudaki M, Goukos D, et al. Glutamine may repress the weak LPS and enhance the strong heat shock induction of monocyte and lymphocyte HSP72 proteins but may not modulate the HSP72 mRNA in patients with sepsis or trauma. *Biomed Res Int*. 2015;2015:806042.
5. Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, et al. Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90α in severe sepsis and SIRS. *Biomed Res Int*. 2014;2014:803561.
6. Kaplan JM, Denenberg A, Monaco M, Nowell M, Wong H, Zingarelli B. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma

activity in children with septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36(1):123-130.
7. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;2(51):51ra71.
8. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(25):16093-16098.
9. Mickiewicz B, Tam P, Jenne CN, et al. Integration of metabolic and inflammatory mediator profiles as a potential prognostic approach for septic shock in the intensive care unit. *Crit Care*. 2015;19:11.
10. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013;39(2):165-228.
11. Briassoulis G, Michaeloudi E, Fitrolaki DM, Spanaki AM, Briassouli E. Influence of different ventilator modes on Vo(2) and Vco(2) measurements using a compact metabolic monitor. *Nutrition*. 2009;25(11–12):1106-1114.
12. Briassoulis G, Venkataraman S, Thompson AE. Energy expenditure in critically ill children. *Crit Care Med*. 2000;28(4):1166-1172.
13. Kozlov AV, Panasenko OM, Yegorov DY, Vol'nova TV, Vladimirov YA, Azizova OA. Antioxidant properties of albumin during the oxidation of linolenic acid and low density lipoproteins in the presence of ferrous ions. *Biomed Sci*. 1991;2(5):530-535.
14. Fitrolaki M-D, Dimitriou H, Venihaki M, Katrinaki M, Ilia S, Briassoulis G. Increased extracellular heat shock protein 90α in severe sepsis and SIRS associated with multiple organ failure and related to acute inflammatory-metabolic stress response in children. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(35):e4651.
15. Vardas K, Ilia S, Sertedaki A, et al. Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality. *Intensive Care Med Exp*. 2017;5(1):10.
16. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001;50(10):2199-2202.
17. Tavladaki T, Spanaki AM, Dimitriou H, et al. Similar metabolic, innate immunity, and adipokine profiles in adult and pediatric sepsis versus systemic inflammatory response syndrome-a pilot study. *Pediatr Crit Care Med*. August 2017.
18. Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, et al. Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations with sepsis phase, severity, and circulating cytokine levels. *J Crit Care*. 2012;27(4):400-409.
19. Hillenbrand A, Xu P, Zhou S, et al. Circulating adipokine levels and prognostic value in septic patients. *J Inflamm (Lond)*. 2016;13(1):30.
20. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):622-632.
21. Zhou L, Yu X, Meng Q, et al. Resistin reduces mitochondria and induces hepatic steatosis in mice by the protein kinase C/protein kinase G/p65/PPAR gamma coactivator 1 alpha pathway. *Hepatology*. 2013;57(4):1384-1393.
22. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric sepsis—Part V: extracellular heat shock proteins: alarmins for the host immune system. *Open Inflamm J*. 2011;4:49-60.
23. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki DM, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies—a hypothetical "comparative" study. *Biomed Res Int*. 2014;2014:101023.
24. Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*. 2011;35(5):466-470.
25. Wheeler DS, Fisher LE, Catravas JD, Jacobs BR, Carcillo JA, Wong HR. Extracellular hsp70 levels in children with septic shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(3):308-311.
26. Briassouli E, Goukos D, Daikos G, et al. Glutamine suppresses Hsp72 not Hsp90α and is not inducing Th1, Th2, or Th17 cytokine responses in human septic PBMCs. *Nutrition*. 2014;30(10):1185-1194.
27. Timmermans K, Kox M, Vaneker M, et al. Plasma levels of danger-associated molecular patterns are associated with immune suppression in trauma patients. *Intensive Care Med*. 2016;42(4):551-561.
28. Banduseela VC, Chen Y-W, Kultima HG, et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. *Physiol Genomics*. 2013;45(12):477-486.
29. Aschkenasy G, Bromberg Z, Raj N, Deutschman CS, Weiss YG. Enhanced Hsp70 expression protects against acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e26956.
30. Tavladaki T, Spanaki AM, Dimitriou H, Briassoulis G. Alterations in metabolic patterns in critically ill patients-is there need of action? *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(4):431-433.
31. Briassoulis G, Briassouli E, Tavladaki T, Ilia S, Fitrolaki DM, Spanaki AM. Unpredictable combination of metabolic and feeding patterns in malnourished critically ill children: the malnutrition-energy assessment question. *Intensive Care Med*. 2014;40(1):120-122.
32. Papadopoulos P, Pistiki A, Christodoulopoulou T, et al. Heat shock proteins 70/90 and associations with immunosuppression along with sepsis: preliminary data. *Crit Care*. 2015;19(Suppl 1):P42.
33. Fitrolaki D-M, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G. CD64-neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. *BMC Pediatr*. 2013;13:31.
34. Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Venkatesh B. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*. 2005;101(2):488-498.
35. Merz TM, Pereira AJ, Schürch R, et al. Mitochondrial function of immune cells in septic shock: a prospective observational cohort study. *PLoS ONE*. 2017;12(6):e0178946.
36. Japiassú AM, Santiago APSA, d'Avila J da CP, et al. Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. *Crit Care Med*. 2011;39(5):1056-1063.
37. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics*. 2004;113(6):1776-1782.
38. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med*. 2009;10(4):467-471.
39. Su L, Li H, Xie A, et al. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0121933.

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