



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΟΙ ΤΣΑΠΕΡΟΚΙΝΕΣ (ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ –
HEAT SHOCK PROTEINS) ΣΤΑ ΒΑΡΙΑ ΑΡΡΩΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ»**

ΝΤΙΑΝΑ-ΜΙΧΑΕΛΑ ΦΥΤΡΟΛΑΚΗ
Παιδίατρος- Εντατικολόγος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Μπριασούλης | Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παιδών,
Τομέας Μητέρας Παιδιού, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης
(επιβλέπων)

Δημήτρης Γεωργόπουλος | Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας,
Τομέας Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μαρία Βενυχάκη | Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τομέας
Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου
Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Μπριασούλης | Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Παίδων,
Τομέας Μητέρας Παιδιού, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης
(επιβλέπων)

Δημήτρης Γεωργόπουλος | Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας,
Τομέας Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μαρία Βενυχάκη | Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τομέας
Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου
Κρήτης

Εμμανουήλ Γαλανάκης | Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής-
Παιδιατρικών Λοιμώξεων, Τομέας Μητέρας Παιδιού, Τμήμα
Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ελένη Δημητρίου | Αναπληρωτής Καθηγήτρια Αιματολογίας-
Ογκολογίας Παίδων, Τομέας Μητέρας Παιδιού, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης | Καθηγητής Ογκολογίας-Παθολογίας με έμφαση
στις Λοιμώξεις, Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου
Κρήτης

Χρυσούλα Περδικογιάννη | Λέκτορας Παιδιατρικής, Τομέας
Μητέρας Παιδιού, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Στα παιδιά μου,
Άννα και Αλέξανδρο

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα : Φυτρολάκη Μιχαέλα-Ντιάνα
Ημ. Γέννησης: 28/11/1966 Ιάσιο Ρουμανίας
Διεύθυνση : Σύρου 4, Αμμουδάρα -Ηράκλειο
Τηλέφωνα: 2810-211206, κιν. 6980714546
E-mail: mdianaf@yahoo.gr

Ιατρική Εκπαίδευση

1985- 1991 Πανεπιστήμιο UNIVERSITATE de MEDICINA si FARMACIE
Τμήμα Ιατρικής – ΙΑΣΙΟ-Ρουμανίας

Επαγγελματική εμπειρία

01.01.91 - 04.12.92 Εργάστηκα ως ιατρός στην Γυναικολογική Κλινική του SPITAL CLINIC
OBSTETRICA-GINECOLOGIE “ CUZA-VODA” IASI

08.10.96 - 12.10.01 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό
Νοσοκομείο Ηρακλείου

11.03.03 - 18.03.04 Υπηρεσία υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Τυμπακείου.

22.06.04 -22.06.05 Επικουρική Επιμελήτρια Β στην Παιδιατρική Κλινική του Ν.Γ. Νοσοκομείο
Αγίου Νικολάου -Κρήτης

01.08.05- 31.12.05 Επικουρική Επιμελήτρια Β στην Παιδιατρική Κλινική του ΠΑΓΝΗ

01.01.06 -30.05.07	Επικουρική Επιμελήτρια Β στην ΜΕΘ Παίδων, ΠΑΓΝΗ
31.05.07- 31.05.09	Εξειδίκευση στην Εντατική Μονάδα Παίδων, ΠΑΓΝΗ
01.06.09-12.07.12	Επιμελήτρια Β στην ΜΕΘ Παίδων , ΠΑΓΝΗ (Τον Ιούλιο 2011-λήψη τίτλου εξειδίκευσης στην Εντατικολογία)
12.07.12-	Επιμελήτρια Α στην ΜΕΘ Παίδων, ΠΑΓΝΗ

Εκπαιδευτικό έργο

Α. Σεμινάρια

1. Μαθήματα με θέμα “ Προβλήματα εφηβείας – βασικές γνώσεις για παιδιά και εφήβους ηλικίας 8-14 ετών” στους μαθητές του 1^{ου} Δημοτικό σχολείου Μοιρών.
2. Εκπαιδευτικά Σεμινάρια: Φροντιστήριο Αναζωογόνησης Νεογνού- Βρέφους- Παιδιού. (10.03.01 και 02-03.04.05)
3. Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (APLS) 23-25.06.06 Ηράκλειο- Κρήτης.
4. Εκπαιδύτρια στο Σεμινάριο : Βασική Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (One-day PLS) ΠΑΓΝΗ- Ηρακλείου (12.01.08)
5. Εκπαιδύτρια στο Σεμινάριο :Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (APLS) Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης (9-11.05.08)
6. 16^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο με τίτλο « Βασικές Αρχές Μηχανικού Αερισμού»- διοργανώνεται από την Εταιρία Έρευνας και Μελέτης Βαρέως Πάσχοντος σε συνεργασία με την ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (12-13.12.09)
7. «Παροχή πρώτων βοηθειών στα παιδιά προσχολικής ηλικίας», σεμινάριο διοργανωμένο από 19^η Περιφέρεια Προσχολικής Αγωγής, Ηράκλειο, Κρήτης. (2-4.12.09)
8. Εκπαιδύτρια στο Σεμινάριο : Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (APLS) Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης (ιαν.2011, 2012,2013 ,2014)
9. Εκπαιδύτρια στο Σεμινάριο : Βασική Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (One-day PLS) ΠΑΓΝΗ- Ηρακλείου (2011,2012,2013,2014,2015)
10. Εκπαιδύτρια στο Σεμινάριο : Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (APLS) Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης (Μάρτης 2015)
11. Forum Εκπαίδευσης στην Γενική Ιατρική, Άγιος Νικόλαος (08.03.05)

12. Surviving Sepsis Campaign. Ελληνική Εταιρία Εντατικής Θεραπείας. Αθήνα (28-20.01.09)

B. Συνέδρια

Παρακολούθηση ελληνικών (80) και διεθνών (8) συνεδρίων.

Επιστημονικό έργο

A. Διδακτορική Διατριβή Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

B. Δημοσιεύσεις σε περιοδικά

Διεθνείς

1. Briassoulis G, Fitrolaki MD, Mihailidou E, Spanaki AM. Unexpected supraglottic injury following a frontal impact motor-vehicle accident . *Arch. Dis. Child.*2008; 93(4)

2. Mantzouranis E , Mathianaki K, Fitrolaki MD, Mihailidou E, Paspalaki P. A boy with recurrent pneumonia. *Breth* . 2011;8(1):71-6.

3. Briassoulis G, Fitrolaki DM, Tavladaki T, Voloudaki A, Ilia S. At the Beach: To Jump or Not to Jump? *Pediatr Emerg Care*. 2015 Sep 17.

4.Tavladaki T, Fitrolaki MD, Spanaki AM, Ilia S, et al. The sweet lung: chewing gummy bear aspiration .*Lung India* 2012;29(3):269-9.

5. Balan M, Dumitrescu G, Balan Fitrolaki MD, Chiselita R. Some histopathological aspects induced by experimental exposing to nikel. *The Journal of Preventive Medicine*.1994;2 (1-2)ISSN 1221-5260
6. Briassoulis G., Briassoulis P. ,Michaeloudi E,Fitrolaki MD, Spanaki AM, Briassouli E.The Effects of Endotracheal Suctioning on the Accuracy of Oxygen Consumption and Carbon Dioxid Production Measurements and Pulmonary Mechanics Calculated by a Compact Metabolic Monitor.*Anesthesia&Analgesia* 2009;109(3):873-9.
7. Briassoulis G, Michaeloudi E, Fitrolaki DM, Spanaki AM, Briassouli E. Influence of different ventilator modes on VO2 and VCO2 measurements using a compact metabolic monitor. *Nutrition* 2009;25(11-12):1106-1114.
8. Iliá S, Spanaki AM, Raisaki M, Spoulou VI, Fitrolaki MD ,Kanariou M,Tzanakaki G, Briassoulis G. Complicated pneumococcal meningitis in a fully vaccinated child: value of magnetic resonance imaging monitoring. *Neuropediatrics* 2011;42:240-244.
9. Fitrolaki DM, 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
10. Mantadakis E, Spanaki AM, Psaroulaki A, Fitrolaki D, Minadakis G, Michaeloudi E, Tselentis Y, Briassoulis G. Encephalopathy complicated by Guillain-Barre syndrome and hydrocephalus and associated with acute Bartonella Quintana infection. *Pediatr Infect Dis*.2007;26(9):860-2.
11. Fitrolaki MD , Dimitriou H ,Venihaki M, Katrinaki M, Briassoulis G. Alarming levels of heat shock proteins 72 and 90a in critically ill children .*Critical Care* 2015;19(Suppl1):P40 doi:10.1186/cc14120
12. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki DM, Plaiti I, Apostolou K, Tavladaki T, Spanaki AM. Heat Shock Protein 72 Expressing Stress in Sepsis: Unbridgeable Gap between Animal and Human Studies- A Hypothetical “Comparative” Study.*BioMed Research International* .volume 2014, Article ID 101023, 17pages .doi 10.1155/2014/101023.

13. Ilia S, Vasilaki E, Blevrakis E, Spanaki AM, Geromarkaki E, Tavladaki T, Fitrolaki MD, Briassoulis G. 424 Multiloculated Parapneumonic Effusions: Bedside Diagnosis and Treatment in Critically ill Children. *Arch Dis Child* 2012;97:A124-A125.
14. Briassoulis G, Spanaki AM, Vasilaki E, Fytrolaki D, Michaeloudi E. Potentially life-threatening bradycardia after remifentanil infusion in a child. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* .2007;51(8):1130.
15. 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 Medicine* 2014;40(1):120-122.
16. Ilia S, Spanaki AM, Michailidou E, Paspalaki P, Fitrolaki D, Briassoulis G. Life-threatening acute disseminated staphylococcal disease in a child. *Minerva Pediatrica* 2013;65(2):225-30.

Ελληνικές

1. Σαββίδου Α, Μπριασούλης Γ, Ραισάκη Μ, Σπανάκη ΑΜ, Φυτρολάκη Ν, Γαλανάκης Ε, Καλμαντή Μ. Κλινικό Κουιζ. Έκδοση της Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρείας 2008; 71(1)

Γ. Λοιπά

1. Ενεργός συμμετοχή σε προσυνεδριακά σεμινάρια σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια
2. Διδάσκουσα στο κατ' επιλογήν μάθημα της επείγουσας και εντατικής παιδιατρικής στο 10^ο εξάμηνο σε προπτυχιακούς φοιτητές
3. Εκπαιδευτής στα διεθνώς αναγνωρισμένα σεμινάρια APLS, PLS

4. Συμμετοχή σε μετεκπαιδευτικά προγράμματα της Παιδιατρικής Κλινικής και ΜΕΘ Παίδων του Πα.Γ.Ν.Η και σε βιβλιογραφικές ενημερώσεις

5. Μαθήματα με θέμα “ Προβλήματα εφηβείας – βασικές γνώσεις για παιδιά και εφήβους ηλικίας 8-14 ετών” στους μαθητές του 1^{ου} Δημοτικό σχολείου Μοιρών

6. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα Νοσηλευτικής Ειδικότητας (2012-2014)

7. Ξένες γλώσσες: Αγγλικά, Γαλλικά, Ρουμανικά

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
1.1. ΣΗΨΗ	24
1.1.1. Εισαγωγή	24
1.1.2. Ορισμοί	24
1.1.3. Παθοφυσιολογία της σήψης	25
1.1.4. Σήψη στα παιδιά: πρόγνωση-βιοδείκτες	28
1.2. ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ (SIRS)	29
1.2.1. Τραύμα	29
1.2.2. Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	30
1.3. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ	31
1.3.1. Διέγερση κυτταρικής ανοσίας	31
1.3.2. Κυτταροκίνες	32
1.3.3. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες	32
1.3.4. Αντιφλεγμονώδης αντίδραση	34
1.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΗΣ	35
1.4.1. CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη)	35
1.4.2. Προκαλσιτονίνη(PCT)	36
1.5. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ CD11b ΚΑΙ CD64	36
1.5.1. CD64	36
1.5.2. CD11b	38
1.6. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HSP)	38
1.6.1. HSP σε καταστάσεις στρες	38
1.7. HSP72	39
1.7.1. Δομή της HSP72	40
1.7.2. Ο μηχανισμός της εξαγωγής της HSP72	41
1.7.3. Ενδοκυττάρια HSP72	42
1.7.4. Εξωκυττάρια HSP72 (eHSP72)	43
1.7.5. Οι ανοσολογικές επιδράσεις της eHSP72	45
1.8. HSP90α	45
1.8.1. Η δομή της HSP90	46
1.8.2. Η έκκριση της HSP90α	47
1.8.3. Οι λειτουργίες «chaperone» της HSP90α	47
1.8.4. Λειτουργίες της εξωκυττάριας HSP90α	49
1.9. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ HSPs (EHSPs)	50
1.9.1. Ο ρόλος της HSP72 στη σήψη και το τραύμα	51
1.9.2. Ο ρόλος της HSP90α στη σήψη και το τραύμα	53
1.10. ΥΠΟΘΕΣΗ	54
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	55
2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56

2.2.1.	Βιοηθική και δεοντολογία της έρευνας.....	56
2.2.2.	Ασθενείς.....	56
2.2.3.	Αναλύσεις δειγμάτων	58
2.2.4.	Στατιστική ανάλυση.....	60
2.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
2.3.1.	Ο ρόλος των HSP72 και HSP90α στη σήψη και τραύμα	62
2.3.2.	CD11βκαι CD64 και μεταβολικά πρότυπα.....	68
2.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
2.4.1.	Κινητικότητα των HSPsστη σήψη και τραύμα.....	73
2.4.2.	Η εξωκυττάρια HSP72 στη σήψη και τραύμα.....	73
2.4.3.	Η εξωκυττάρια HSP90α στη σήψη και τραύμα.....	74
2.4.4.	Η σημασία της έκφρασης των CD64 στη σοβαρή σήψη.....	75
2.4.5.	Οι διαταραχές μεταβολισμού στη σήψη και το τραύμα	76
2.4.6.	Συσχετίσεις HSP72 και HSP90α με άλλους βιο-δείκτες στρες και μεταβολισμού.....	77
2.5.	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ	78
2.6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
2.7.	ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΟΡΙΖΟΝΤΕΣ – ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ	81
2.8.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ / ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	81
2.9.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	83
	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	84
3.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Κατά τη διάρκεια της οντογενετικής και φυλογενετικής εξέλιξης των φυτών και ζώων, η έκθεση σε «κίνδυνο» που θα μπορούσε να προσβάλει την ακεραιότητα του οργανισμού τους, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας εξειδικευμένης ομάδας πρωτεϊνών με σκοπό τη σηματοδότηση και καταπολέμηση του βλαπτικού παράγοντος.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία των τελευταίων 50 ετών, όλοι οι οργανισμοί, είτε ευκαρυωτικοί, είτε προκαρυωτικοί, διαθέτουν την ικανότητα να απαντήσουν σε ένα έντονο στρες (θερμικό, χημικό, βακτηριακό) διαμέσου μιας ομάδας πρωτεϊνών που ενδεικτικά ονομάστηκαν «πρωτεΐνες θερμικού σοκ», γνωστές ως heat shock proteins (HSP). Από την ανακάλυψη τους και έως σήμερα, μια σειρά μελετών «in vivo» και «in vitro» σε πειραματόζωα και ανθρώπους κατάφερε έως ένα σημείο να αποκρυπτογραφήσει τη λειτουργικότητα αυτών των πρωτεϊνών, τη δομή, τον ρόλο, και την εν δυνάμει θεραπευτική σημασία τους. Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος ταξινομούνται σε ομάδες (HSP 10, 60, 70, 90, 100) και δρουν ενδοκυττάρια ως «chaperones» (προστάτες-νταντάδες), ελέγχοντας τη σωστή σύνθεση των πρωτεϊνών «de novo» και απομακρύνοντας ταυτόχρονα τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι σε καταστάσεις στρες οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εξέρχονται στον εξωκυττάριο χώρο όπου πλέον, ως σήματα κινδύνου «danger signals», λειτουργούν ως κυτταροκίνες, εξ ου και η ονομασία «τσαπεροκίνες».

Στην παρούσα μελέτη, η προσοχή επικεντρώθηκε στις τσαπεροκίνες HSP72 και 90 που σύμφωνα με πειραματικές μελέτες ενέχονται στην αναγνώριση κινδύνου (danger hypothesis) και διέγερση της προ-φλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους διαδικασίας στην οξεία φάση του στρες. Έχει υποστηριχθεί ότι οι HSP72 και HSP90 είναι πιθανόν να σχετίζονται με μονοπάτια επέκτασης (προ-) ή και περιορισμού (αντι-) της φλεγμονής, με τη βαρύτητα της νόσου, οργανικές ανεπάρκειες και τελικά τη θνητότητα.¹ Έχοντας ως βάση τα προαναφερόμενα δεδομένα, η παρούσα μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση του ρόλου των HSP σε κρίσιμες για τη ζωή καταστάσεις, όπως σε νοσήματα που συνοδεύονται από έντονο στρες σε βαριά νοσήματα παιδιών (τα οποία και έχουν μειωμένη συν-νοσηρότητα συγκριτικά με ενήλικες) που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ Παίδων συγκριτικά με υγιείς ομήλικους. Προς τον σκοπό αυτό η παρούσα έρευνα οργανώθηκε ώστε να 1) να προσδιορίσει τα επίπεδα των εξωκυττάρια Hsp 70 & 90 και 2) να συγκρίνει την εκ των επιπέδων στον ορό εκτιμώμενη

απόκρισή τους στο στρες με τα αντίστοιχα επίπεδα ορού των TNF-α , προ- και αντι-φλεγμονωδών ιντερλευκινών (IL-6, IL-8,IL-10), των CD 11b, CD 64, PCT, CRP, και μεταβολικών δεικτών γλυκόζης και LDL/HDL στον ορό των παιδιών με σοβαρή σήψη (συμπεριλαμβανομένης της σηπτικής καταπληξίας), σήψη, τραύμα και 3) να συσχετίσει τα επίπεδά ορού των HSHP72 και HSP90 με τη βαρύτητα της νόσου (Pediatric Risk of Mortality II score, TISS και PELOAD), τη θνητότητα και άλλους δείκτες έκβασης στην ομάδα των ασθενών ΜΕΘ.

Η καινοτομία της παρούσας εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί την πρώτη ερευνητική εργασία που επικεντρώνεται σε παιδιά με τραύμα, σήψη και σοβαρή σήψη συγκριτικά με υγιή παιδιά. Η μελέτη αυτή επίσης είναι η πρώτη που επιχειρεί να συσχετίσει τα εξωκυττάρια επίπεδα των HSP72 και HSP90 με δείκτες φλεγμονής, μεταβολισμού, βαρύτητας της νόσου και έκβασης σε διαφορετικές ομάδες ασθενών ΜΕΘ (με σήψη και μη φλεγμονώδη συστηματική αντίδραση στο στρες).

Η ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Παιδιατρικής Αιματολογίας – Ογκολογίας (υπεύθυνη Αν. Καθηγήτρια κ Ελένη Δημητρίου και Κλινικής Χημείας (υπεύθυνη Επ. Καθηγήτρια κ Μαρία Βενυχάκη) του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα δείγματα της μελέτης προέρχονται από παιδιά που νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ Παίδων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου (Ηράκλειο, Κρήτης) και από φυσιολογικά παιδιά από το εξωτερικό παιδιατρικό ιατρείο και την Παιδοχειρουργική Κλινική προ-εγχειρητικά. Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτη έχει ανακοινωθεί σε διεθνή συνέδρια και έχει δημοσιευτεί σε διεθνή περιοδικά.

Ολοκληρώνοντας την διατριβή θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ Γεώργιο Μπριασούλη για την εμπιστοσύνη, υπομονή και βοήθεια που έδειξε στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω αυτό το έργο. Τον ευγνωμονώ για την πολύτιμη και επιστημονική του καθοδήγηση, για την ενθάρρυνση και ουσιαστική υποστήριξη στις στιγμές που όλα φαίνονταν βουνό. Πάντα με μια καλή κουβέντα, με συμβούλευε πώς να προχωρήσω, τι πρέπει να συμπληρώσω, που πρέπει να δώσω βάρος και πάνω απ' όλα να έχω πίστη και όλα θα πάνε καλά! Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελένη Δημητρίου, για την υψηλού επιπέδου βοήθεια στο εργαστηριακό κομμάτι, για τις επαγγελματικές της συμβουλές. Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ Μαρία Βενυχάκη και την συνεργάτισσα της κ. Μαρία Κατρινάκη για την βοήθεια και καθοδήγηση στο ανοσολογικό κομμάτι της έρευνας. Τέλος θέλω θερμά να ευχαριστήσω το προσωπικό της ΜΕΘ Παίδων, παιδιατρικής και

παιδοχειρουργικής, τους γονείς και τα παιδιά που οικειοθελώς συμμετείχαν, συμβάλλοντας στην αναζήτηση απαντήσεων για ένα τόσο σύνθετο και σημαντικό θέμα που αφορά όχι μόνο το βαρέως πάσχον παιδί, αλλά, κατ' επέκταση, και τον σε μεγάλο κίνδυνο από την αυξανόμενη επίπτωση της σοβαρής σήψης ευρισκόμενο άνθρωπο, ιδιαίτερα τον ασθενή της ΜΕΘ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γενικά: Η σήψη παραμένει ένα θέμα που απασχολεί εντατικά τον ιατρικό κόσμο λόγω της υψηλής της θνητότητας. Παρόλο που η θνητότητα έχει μειωθεί την τελευταία δεκαετία χάρη στην έγκαιρη διάγνωση, παρέμβαση, και υποστηρικτική φροντίδα, το ποσοστό της θνητότητας λόγω σοβαρής σήψης/σηπτικής καταπληξίας παραμένει υψηλό.

Η παθοφυσιολογία της σήψης παραμένει ένα πάζλ που του λείπουν ακόμα κομμάτια. Η σήψη είναι μια φλεγμονώδης διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας διάφοροι μεσολαβητές αλληλεπιδρούν, διαδραματίζοντας ένα σημαντικό ρόλο μεταξύ των μικροοργανισμών και του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή. Είναι γνωστό ότι η διέγερση των κυττάρων από παθογόνα έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη ενός καταρράκτη προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως είναι οι κυτταροκίνες, λιπιδιακοί βιοδείκτες και δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι μεσολαβητές αυτοί σε συνδυασμό προκαλούν αγγειοδιαστολή και αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, με αποτέλεσμα τριχοειδική διαφυγή, διαφυγή πλάσματος στον εξωκυττάριο χώρο, και ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης και λευκοκυττάρων σε ιστούς και όργανα. Επί πλέον, οι ενεργοποιημένοι μεσολαβητές διεγείρουν το σύστημα της πήξης, προκαλώντας διάχυτη ενδαγγειακή πήξη. Αυτή η αλληλουχία των γεγονότων έχει σαν αποτέλεσμα την υποαιμάτωση και ιστική υποξία που είναι αιτία της οργανικής δυσλειτουργίας και συχνά αντιπροσωπεύει το θανατηφόρο στάδιο της σήψης.²⁻³ Η υπερβολική ανοσολογική απάντηση στις λοιμώξεις (S, SS) ή στο μη-λοιμώδες Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Απάντησης (SIRS), καθώς προκαλείται από την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση των προφλεγμονωδών μεσολαβητών, μπορεί να οδηγήσει σε καταπληξία, πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων (MOSF), μη αναστρέψιμο σοκ και θάνατο.

Παρά τις σημαντικές προόδους των τελευταίων ετών, η ταυτοποίηση των υψηλού κινδύνου ασθενών και η έγκαιρη αντιμετώπιση της σοβαρής σήψης παραμένει μια συνεχής ερευνητική πρόκληση.³ Στη σήψη έχουν μελετηθεί και προταθεί διάφοροι δείκτες σοβαρότητας και θνητότητας όπως βακτηριακοί παράγοντες, πρωτεΐνες οξείας φάσης (πρωτεΐνη C, προκαλσιτονίνη, LBP-LPS-binding protein), παράγοντες πήξης (fibrin degrading products, αντιθρομβίνη III, dimerD), δείκτες κυτταρικής μεμβράνης (HLA-DR, CD-64, E-selectin), ορμόνες (cortisol, ACTH), διαλυτοί υποδοχείς (sCD-14, sTNFR1, sTNFR2) και κυτοκίνες (TNF, IL-6, IL-8, IL-10). Όλοι αυτοί οι βιοδείκτες συμβάλλουν στη

διάγνωση της σήψης, SIRS, και κάποιοι και προγνωστικά, χωρίς ωστόσο να έχουν την επιθυμητή ευαισθησία και ειδικότητα. Στη μελέτη μετρήθηκαν βιοδείκτες φλεγμονής και μεταβολικού προφίλ με σκοπό τόσο την επιβεβαίωση των ομάδων μη λοιμώδους SIRS, σήψης, και σηπτικής καταπληξίας, όσο και τη συσχέτισή τους με μοριακούς μεσολαβητές οι οποίοι παρέχουν προστασία έναντι του φλεγμονώδους στρες που είναι απειλητικό για τη ζωή. Βασιζόμενες στο γεγονός ότι οι HSP προάγουν τις ιντερλευκίνες (ILs) και διεγείρουν τα ανοσολογικά κύτταρα κατά την διάρκεια της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS), τελευταίες μελέτες επικεντρώνονται στις πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας ως μηχανισμών κύτταρο-προστασίας και πιθανώς ως δεικτών βαρύτητας της σήψης.

Σε αντίθεση με πειραματικές μελέτες σε ζώα που δείχνουν προστατευτική επίδραση της HSP72 στη σήψη, οι μελέτες *in vivo* ή *in vitro* σε ανθρώπους δεν είναι ξεκάθαρες, αναδεικνύοντας μια πιθανή προστατευτική σχέση ή μια συσχέτιση με την θνησιμότητα και τη νοσηρότητα. Παρόλο που η αυξημένη κυκλοφορία των HSP βοηθά στη μεταφορά των σημάτων κινδύνου στα φλεγμονώδη κύτταρα και στην ανοσολογική επιτήρηση, φαίνεται ότι οι HSP, κάτω από απροσδιόριστες συνθήκες, είναι πιθανόν να ασκούν βλαβερές επιδράσεις σε ορισμένες ασθένειες. Έτσι, η αύξηση των επιπέδων της εξωκυττάριας HSP72 που ανιχνεύθηκε στο πλάσμα παιδιών που εισήχθησαν σε ΜΕΘ Παίδων με σηπτικό σοκ συσχετίστηκε με χειρότερη έκβαση. Μια άλλη μεγάλου μοριακού βάρους (90kDa) επαγόμενη HSP (HSP90α), αλληλεπιδρά με 200 περίπου πρωτεΐνες πελάτες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής και μονοπάτια μεταγωγής σήματος των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών, ριβονουκλεοπρωτεϊνών, παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, παραγόντων μεταγραφής, και πρωτεϊνικών κινασών. Ο προστατευτικός ρόλος αυτής της σε αφθονία ευρισκόμενης στο κυτταρόπλασμα τσαπερόνης, είναι η έναρξη μιας ταχείας απάντησης σε αιφνίδιες προσβολές όπως το θερμικό σοκ, η υποξία, δραστικές μορφές οξυγόνου και αυξητικοί παράγοντες.

Σε παράλληλη πορεία με τις αντιφατικές μελέτες του ρόλου της HSP72 σε ανθρώπους, έχει πρόσφατα δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού HSP90/Akt επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, προκαλώντας αύξηση του ρυθμού απόπτωσης σε σηπτικά ποντίκια. Ωστόσο, απουσιάζουν από τη διεθνή βιβλιογραφία μελέτες συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων της εξωκυττάριας HSP90α και κλινικών δεικτών έκβασης κατά την διάρκεια της οξείας φάσης της σοβαρής σήψης (SS) ή SIRS ή με προ- ή αντι-φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες (IL), πρωτεΐνες της διαμεμβρανικής μεμβράνης πολυμορφοπυρήνων (nCD64), πρωτεΐνες οξείας φάσης ή με οξείες μεταβολικές διαταραχές στη φάση του στρες. Επίσης, δεν υπάρχουν

μελέτες σε παιδιά MEΘ που να συγκρίνουν τις HSP72 και HSP90α μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών σοβαρών νοσημάτων ασθενών, συμπεριλαμβανομένου του μη λοιμώδους SIRS, ή να συσχετίζουν τα επίπεδά τους με την έκφραση της nCD64 της οξείας φάσης ή με πρώιμες μεταβολικές διεργασίες, ποικίλες ιντερλευκίνες και την ανάπτυξη MOSF.

Σκοπός : Οι εξωκυττάριας HSP δρουν σαν επαγωγείς ιντερλευκινών και διεγέρτες των ανοσολογικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS). Οι σημερινές γνώσεις σχετικά με τα μονοπάτια συναγερμού και την έκλυση των εξωκυττάριας HSP72 και HSP90α κατά την διάρκεια της οξείας φάσης της σήψης (S) ή σοβαρής σήψης (SS) δεν είναι πλήρεις. Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν στον ορό τα επίπεδα των HSP90α, HSP72, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α και η έκφραση των CD64, CD11b σε παιδιά με σήψη ή σοβαρή σήψη σε σχέση με αυτά με τραύμα (SIRS) ή υγιή παιδιά (H). Η υπόθεση που εξέτασε η παρούσα έρευνα είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα HSP90α θα μπορούσαν να ανιχνευθούν στον ορό των σοβαρά άρρωστων παιδιών, ιδιαίτερα σε εκείνα με σοβαρή σήψη και / ή σηπτικό σοκ, καθώς σε ένα βαθμό και σε παιδιά με μη λοιμώδες-SIRS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Έτσι, συγκριτικά με την HSP72 που επίσης αναμένεται να είναι αυξημένη σε ασθενείς με SS, SIRS και MOSF, η εξωκυττάρια HSP90α θα μπορούσε να συσχετίζεται καλύτερα με το σύνδρομο πολυοργανικής ανεπάρκειας που χαρακτηρίζει τις βαρύτερες μορφές SS και SIRS, με το πρώιμο οξύ φλεγμονώδες και μεταβολικό στρες, με συστήματα βαθμολόγησης βαρύτητας νόσου, και χαρακτηριστικές παραμέτρους έκβασης. Ο σκοπός της μελέτης είναι να αναδείξει τη σημασία της αυξημένης έκφρασης των επιπέδων στον ορό ασθενών των HSP72 και 90, καθώς και τη συσχέτιση της αύξησης των αναφερόμενων δεικτών με το οξύ φλεγμονώδη και μεταβολικό στρες και με τη σοβαρότητα της νόσου.

Μεθοδολογία: Μελετήθηκαν παιδιά με σήψη (n=20), σοβαρή σήψη (n=22), SIRS (n=23) και υγιή παιδιά (n=25). Αμέσως μετά την εισαγωγή στη MEΘ Παίδων, ελήφθησαν καλλιέργειες αίματος, ούρων, φαρυγγικού, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) και άλλες καλλιέργειες ιστών ως επί ενδείξεως καθώς και δείγματα ορού για μελέτη δεικτών της φλεγμονής. Οι HSP μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA, οι ILs με χημειοφωταύγεια, και η έκφραση CD64 και CD11b σε ουδετερόφιλα με κυτταρομετρία ροής. Η σοβαρότητα της νόσου των παιδιών της μελέτης εκτιμήθηκε με τα συστήματα βαρύτητας νόσου Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM), Therapeutic Intervention Scoring System (TISS) τροποποιημένο για παιδιά, Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score (PELOAD) και το MOSF. Καταγράφηκαν χαρακτηριστικές παράμετροι έκβασης όπως η διάρκεια παραμονής στη MEΘ (length of stay,

LOS), ημέρες σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής (duration of mechanical ventilation, DOMV) και θνητότητα στη ΜΕΘ (PICU mortality). Η σήψη, σηπτική καταπληξία και SIRS ορίστηκαν σύμφωνα με την International Pediatric Consensus Conference. Η MOSF ορίστηκε με βάση τα κριτήρια του Wilkinson.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν αύξηση των επιπέδων των HSP90α και HSP72 συνοδευόμενα από παράλληλη αύξηση των IL-6, IL-8, IL10 και στις δυο ομάδες της σήψης σε σχέση με τα υγιή παιδιά. Στην ομάδα σοβαρής σήψης σημειώθηκε αύξηση HSP72, IL6 και TNF-α σε σχέση με το τραύμα(SIRS). Οι ασθενείς με SIRS παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα HSP90α, IL-6 και IL-8 σε σχέση με τους υγιείς (H). Η HSP72 σχετίστηκε αρνητικά με τους μεταβολικούς δείκτες και θετικά με τις TNF-α και nCD64. Μόνο η συσχέτιση με HDL ($r_s=-0.40$, $p<0.001$) παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα. Η HSP90α συσχέτιστηκε θετικά με τις nCD64 ($r_s=0.48$, $p<0.001$), διάφορες ιντερλευκίνες και πρωτεΐνες οξείας φάσης: IL-8 ($r_s=0.63$, $p<0.0001$), IL-10 ($r_s=0.70$, $p<0.0001$), CRP ($r_s=0.48$, $p<0.001$), PCT ($r_s=0.50$, $p<0.001$), PELOD ($r_s=0.72$, $p<0.0001$), και LOS ($r_s=0.60$, $p<0.001$), και αρνητικά με τις HDL ($r_s=-0.48$, $p<0.001$) και LDL ($r_s=-0.37$, $p<0.01$). Και οι δυο HSP αυξήθηκαν σημαντικά σε μη-επιζήσαντες και σε ασθενείς με MOSF. Οι HSP90α και HSP72 αυξήθηκαν στην ομάδα MOSF παράλληλα: α) με σημαντικές αυξήσεις των φλεγμονωδών βιοδεικτών nCD64, IL-6, CRP και PCT, β) με σημαντικές μειώσεις των μεταβολικών δεικτών (χοληστερόλης, HDL, LDL) αλλά όχι και γλυκόζης.

Συμπεράσματα: Οι εξωκυττάριας HSP72 και HSP90α είναι σημαντικά αυξημένες στα βαριά πάσχοντα παιδιά, ειδικότερα στη σοβαρή σήψη. Για πρώτη φορά καταδεικνύεται ότι οι εξωκυττάριας HSP90α είναι σημαντικά αυξημένες σε βαριά άρρωστα παιδιά με SIRS, ιδιαίτερα όμως σε παιδιατρικούς ασθενείς με SS. Καταγράφεται σημαντική συσχέτιση της εξωκυττάριας τσαπεροκίνης HSP90α με την ανάπτυξη MOSF, φλεγμονώδους στρες, με τη σοβαρότητα της νόσου, δυσλειτουργία οργάνων, τη διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ, ημέρες σε αναπνευστήρα και την προβλεπόμενη θνητότητα. Καθώς οι HSP90α και HSP72 σχετίζονται αντίστροφα με ένα μεταβολικό πρότυπο χαμηλής-LDL/χαμηλής-HDL πρώιμης φλεγμονώδους σηπτικής διαταραχής, η αυξημένη εξωκυττάρια έκκριση τους θα μπορούσε να διαδραματίζει το ρόλο ενός διαμεσολαβητή κατά την έναρξη της απάντησης του ξενιστή στη σοβαρή σήψη. Η τωρινή μελέτη ανοίγει το δρόμο για μελλοντικές μελέτες που θα διερευνήσουν περαιτέρω την κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανοσολογική αντίδραση κατά τη διάρκεια της σοβαρής σήψης και SIRS με MOSF και ενδεχόμενα να

οδηγήσει στον εντοπισμό νέων διαγνωστικών, προγνωστικών ή θεραπευτικών στόχων στη σοβαρή σήψη και τη γενικευμένη φλεγμονώδη αντίδραση στο στρες.

ABSTRACT

BACKGROUND: Sepsis remains a critical problem that intensively employs the medical world due to high mortality. Although the rate has decreased over the last decade, thanks due to early detection, intervention and supportive care, the mortality rate of severe sepsis /septic shock remains high. The pathophysiology of sepsis remains a puzzle that's still has missing pieces. Sepsis is an inflammatory process during which various mediators such as cytokines play an important role among microorganisms and the immune system of the host. It's known that stimulation of cells by pathogens has as result the initiation of the cascade of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators such as cytokines, lipid markers and reactive oxygen species that together cause vasodilatation and increased permeability resulting in capillary leak, output of plasma and activation of leukocytes into tissues and organs.

Additionally, activated mediators stimulate the coagulation system causing disseminated intravascular coagulation. This sequence of tissue events results in hypoperfusion and hypoxia, which is the cause of the organic dysfunction, and which frequently represents the lethal phase of sepsis. An overwhelming immune response in infectious (S,SS) or non-infectious systemic inflammatory response syndrome (SIRS), as mediated by the uncontrolled release of pro-inflammatory mediators, can lead to shock, multiple organ system failure (MOSF), and even death. Identification of the high-risk patients and early treatment of severe sepsis remain a research challenge. Different biomarkers have been studied and proposed as indicators of severity and mortality in sepsis (bacterial agents, acute phase proteins (protein C, procalcitonin, LBP-LPS-binding protein), factors of coagulation (fibrin degrading products, antithrombin III, dimer D) cell membrane markers (HLA-DR, CD64, E-selectin), hormones (cortisol, ACTH) soluble receptors (sCD14, sTNFRI, sTRFRII) and cytokines (TNF, IL-6, IL-8, IL-10). Recent studies have concentrated on heat shock proteins as indicators of the severity of sepsis based on the fact that the HSPs induce the production of interleukins and stimulate immune cells during systemic inflammatory response. Contrasting to animal studies showing an HSP72 protective effect in experimental sepsis, human in vivo or in vitro studies are not conclusive, showing a possible relation to either protection or mortality and morbidity. Although increased circulation of stress proteins signals danger to inflammatory cells and aid in immune surveillance, they have also been liked to deleterious

role in some diseases. Thus, increased extracellular HSP72 levels were detected in the plasma of children admitted to the PICU with septic shock and correlated with worse outcome.

Another major molecular chaperone, 90-kDa family of HSP (inducible HSP90 α), has been shown to interact mainly with about 200 client proteins involved in transcription regulation and signaling-transduction pathways of glucocorticoid receptors, ribonucleoproteins, chromatin remodeling factors, transcription factors, and protein kinases. The guarding role of this abundant “chaperone” is to launch a rapid response to various insults such as heat, hypoxia, reactive oxygen species and injury-released growth factors. Following the contrasting HSP72 human studies, it has been recently shown that activation of the HSP90/Akt pathway induces caspase-3 activation provoking apoptosis in septic mice. Robust correlations, however, between extracellular HSP90 α levels with clinically relevant outcome variables during the acute phase of SS or SIRS or with pro- or anti-inflammatory interleukins (IL), nCD64 or metabolic derangements are missing. Similarly, no studies in children have been conducted comparing HSP72, an HSP90 α -machinery complement, among different PICU sub cohorts, including SIRS, or relating their levels to the acute phase nCD64 expression or early metabolic patterns, various interleukins, and MOSF.

OBJECTIVE: Extracellular heat-shock-proteins (HSP) act as inducers of interleukins (IL) and stimulants for immune cells during systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Little is known about the alarming roles of extracellular HSP72 and HSP90 α in acute phase of sepsis (S) or severe sepsis (SS). We hypothesized that increased HSP90 α levels could be detected in the serum of critically ill children, especially those with severe sepsis and/or septic shock and in SIRS compared to healthy controls (H), and that extracellular HSP90 α might better than the HSP72, also increased in SS, SIRS and MOSF, correlate with MOSF, early acute inflammatory and metabolic stress, severity of illness scores and outcome endpoints.

METHODS: Critically ill children with S (n=20), SS (n=22) or SIRS (n=23) and H (n=25) were enrolled in the study. Immediately after PICU admission, Blood and urine cultures, pharyngeal and deep tissue swabs, and bronchoalveolar lavage (BAL) were examined and blood samples were taken for study of indicators of inflammation. We determined serum HSP90 α , HSP72, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and neutrophil CD64 (nCD64) expression in children with S or SS compared to SIRS (trauma) or healthy children (H). ELISA was used to evaluate HSPs, chemiluminescence to measure IL, and flow-cytometry to evaluate nCD64

expression. The severity of the illness in studied children was assessed with PRISM (Pediatric Risk of Mortality Score), TISS (Therapeutic Intervention Scoring System) modified for children and PELOAD score (Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score) and MOSF. Length of stay (LOS), days on mechanical ventilation (DOMV) and PICU-mortality were the outcome endpoints recorded. Sepsis, severe sepsis, septic shock, and SIRS due to trauma were defined according to the International Pediatric Sepsis Consensus Conference definitions. The MOSF syndrome was defined using the criteria by Wilkinson.

RESULTS: Patients in both septic groups had elevated HSP90 α , HSP72, IL-6, IL-8 and IL-10 levels compared to H, where as SS had increased HSP72, IL6 and TNF- α compared to SIRS (TBI).SIRS patients presented increased HSP90 α , IL-6 and IL-8 compared to H. HSP72 related negatively to metabolic indices and positively to TNF- α and nCD64 only the relation to HDL reached a statistical significance ($p < 0.001$). HSP90 related positively ($p < 0.001$) to nCD64, IL-8, IL-10, CRP, PRISM, PELOD, TISS, and LOS and negatively to HDL ($p < 0.001$) and LDL ($p < 0.02$).HSP90 α has a positive relation to various interleukins and acute phase proteins. Both HSPs were dramatically increased among non-survivors. HSP90 α , along with HSP72, were dramatically increased among MOSF patients. The HSP90 α and HSP72 increases in the MOSF group paralleled: a) significant increases of the inflammatory biomarkers nCD64, IL-6, CRP, and PCT; b) significant decreases of nutritional indices cholesterol, HDL, and LDL, but not glucose.

CONCLUSION: Extracellular HSHP72 and HSP90 α are alarmingly elevated in critically ill children, especially in severe sepsis. For the first time we report that extracellular HSP90 α is significantly elevated in critically ill children with SIRS, especially in pediatric patients with SS. More importantly, we showed the extracellular “chaperokine” HSP90 α is associated with MOSF, inflammatory stress, severity of illness, organ dysfunction, length of stay, days on ventilator and predicted mortality. The HSP90 α and HSP72 inverse relations to the low-LDL/low-HDL early septic metabolic derangement might well imply a coordinator role for their increased extracellular expressions at the onset of the host response in severe sepsis. Since both HSP are inversely related to the low-LDL / low-HDL septic metabolic pattern, extracellular HSP72 and HSP90 α may also play a coordinator role in the host response during severe sepsis. Future studies will be required to further advance our understanding of mechanisms that regulate the immune response during severe sepsis and SIRS related MOSF that may lead to the identification of new diagnostic, prognostic or treatment targets.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΣΗΨΗ

1.1.1. Εισαγωγή

Η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στον κίνδυνο, όπως αυτός χαρακτηριστικά εκφράζεται από την προσβολή οργανικών συστημάτων από παθογόνους μικροοργανισμούς ή από την πρόκληση σοβαρού τραύματος, αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο βασικής και κλινικά εφαρμοσμένης έρευνας. Η αποτελεσματική ενδογενής ανταπόκριση του ξενιστή στον κίνδυνο συμβάλλει καθοριστικά στην τελική πρόγνωση, έτσι ώστε η ενίσχυσή της να διανοίγει νέες δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης στην αντιμετώπιση βαριάς νόσου.

Μια βασική βιολογική διαδικασία είναι η μετατροπή της αποθηκευμένης γενετικής πληροφορίας σε λειτουργικές πρωτεΐνες. Γραμμικά πρωτεϊνικά μόρια πρέπει να αναδιπλωθούν αναπτυσσόμενα σε τρισδιάστατη δομή ώστε να είναι σε θέση να αντιδράσουν διεγείροντας ενδοκυττάριους στόχους. Αυτή η διαδικασία εξαρτάται από μια ομάδα ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακές τσαπερόνες (chaperones). Στον εξωκυττάριο χώρο, οι τσαπερόνες αποκτούν ιδιότητες των κυτταροκινών, μεταμορφούμενες σε τσαπεροκίνες.

1.1.2. Ορισμοί

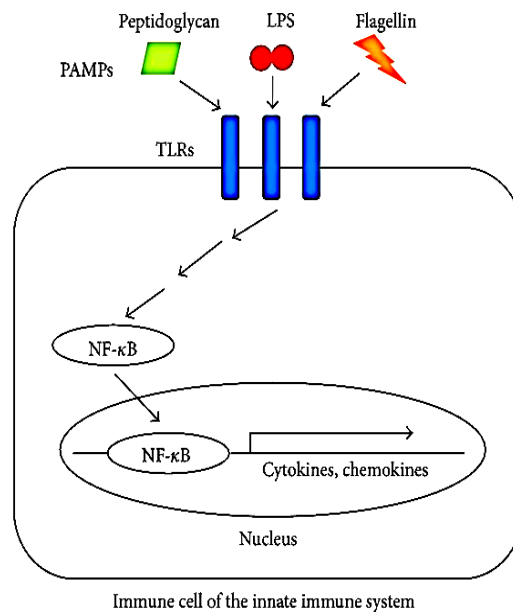
Η σήψη είναι μία συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση ως απάντηση σε παθογόνο μικροοργανισμό και διακρίνεται ανάλογα με την βαρύτητά της σε: σήψη, βαριά σήψη και σηπτική καταπληξία. Η αρχική αντίδραση χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση κυτταροκινών που επάγουν τη φλεγμονή (SIRS), για να ακολουθήσει η υπερβολική φλεγμονώδης αντίδραση της απελευθέρωσης κυτταροκινών (MARS) και τέλος το στάδιο της αντιρροπιστικής αντιφλεγμονώδους απάντησης (CARS) που χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (ανοσοπάρεση).⁴ Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση της σήψης και σηπτικής καταπληξίας για παιδιά και ενήλικες δημοσιεύθηκαν το 2013.⁵ Οι οδηγίες αυτές στηρίζονται στους ισχύοντες

ορισμούς της σήψης με βάση διεθνή διάσκεψη συναίνεσης του 2005. Οι ορισμοί αυτοί παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α.

1.1.3. Παθοφυσιολογία της σήψης

Η παθοφυσιολογία της σήψης μπορεί να διακριθεί στις εξής φάσεις: μικροβιακή εισβολή, διέγερση κυτταρικής ανοσίας, παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, παραγωγή ελεύθερων ριζών, άθροιση μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος, ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης, ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ενεργοποίηση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ενεργοποίηση πολυμορφοκυττάρων, αιμοδυναμικές διαταραχές και βλάβη οργανικών συστημάτων.

Οι εισβάλλοντες μικροοργανισμοί αναγνωρίζονται από το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα μέσω των PRRs (pathogen recognition receptors), υποδοχείς που εκφράζονται στους επιθηλιακούς φραγμούς όπως και στα ανοσολογικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα).⁶



Εικόνα 1. Η ανοσολογική απάντηση στη λοίμωξη. Τα ανοσολογικά κύτταρα του εγγενούς ανοσολογικού συστήματος αναγνωρίζουν τα παθογόνα δια μέσω Toll-like υποδοχών (TLRs). Τα PAMPs όπως πεπτιδογλυκάνη, λιποπολυσαχαρίτες (LPS), ή flagellin, συνδέονται στα TLRs και προάγουν σήμα για την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB). Ο NF-κB μεταφέρεται στον πυρήνα όπου προάγει την έκφραση των κυτταροκινών και χυμοκινών (Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets-An Update View. Mediators of Inflammation .2013, pg16)

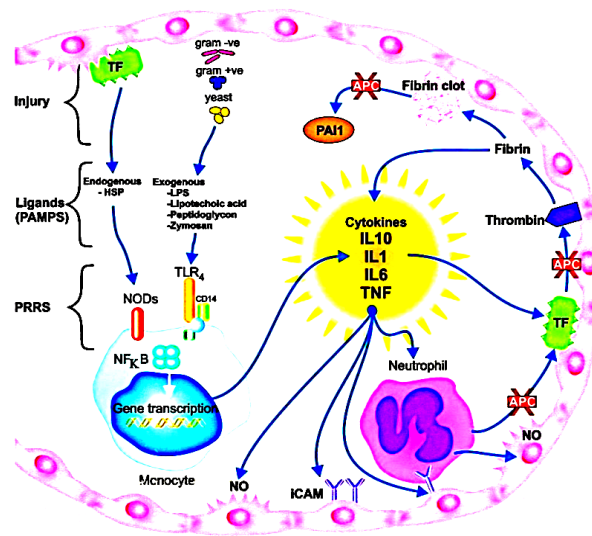
Μια εξειδικευμένη οικογένεια των PRRs, οι Toll-like υποδοχείς (TLRs), αναγνωρίζουν χαρακτηριστικά πρότυπα των μακρομοριακών δομών των μικροοργανισμών, τα λεγόμενα pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Εκτός των PAMPs, υπάρχουν επίσης άλλα ενδογενή μόρια, όπως το high-mobility group box-1 (HMGB-1), η hyaluronan, και οι μικροβιακές heat-shock proteins (HSPs) οι οποίες επίσης μπορούν να διεγείρουν την ανοσολογική απάντηση δια μέσω των PRRs. Τα ενδογενή ανάλογα PAMPs ονομάζονται alarmins και είναι φυσιολογικά συστατικά του κυττάρου που απελευθερώνονται είτε παθητικά (από νεκρωτικά κύτταρα) είτε ενεργά (από στρεσαρισμένα κύτταρα, σαν απάντηση στην κυτταρική προσβολή). Τόσο οι ενδογενείς alarmins όσο και τα εξωγενή PAMPs αντιπροσωπεύουν δύο υποομάδες της ευρύτερης κατηγορίας των σημάτων κινδύνου που ονομάζονται damage associated molecular patterns (DAMPs).⁷ Συνοπτικά, η [Εικόνα 1](#) παρουσιάζει την ανοσολογική απάντηση στα λεγόμενα DAMPs.

Η διέγερση των TLRs ή των NOD-like receptor (NLR) από τους PRRs έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη του καταρράκτη των σηματοδοτών. Ανάλογα με τον υποδοχέα που συμμετέχει, αυτή η διαδικασία οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας μεταγραφικής (transcriptional) απάντησης που περιλαμβάνει τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF-κB). Ακολουθεί η παραγωγή και απελευθέρωση κυτταροκινών, χυμοκινών και του μονοξειδίου του αζώτου (NO).^{8,9,10}

Ο TLR4 είναι ο υποδοχέας της LPS των Gram (-) βακτηριδίων και η διέγερση του επάγει την ενεργοποίηση του NF-κB μέσω φωσφορυλίωσης και αποδόμησης του αναστολέα του NF-κB (IκB). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας NF-κB μεταφέρεται στη συνέχεια στον πυρήνα του κυττάρου όπου επάγει την έκφραση μεγάλου αριθμού προ-φλεγμονωδών παραγόντων (TNF-α, IL-1b, PAF, NO) οι οποίοι προκαλούν διαταραχές της μικροκυκλοφορίας (αγγειοδιαστολή), ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και του συμπληρώματος, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, βλάβη του ενδοθηλίου, θρομβωτική διάθεση και κυτταρική απόπτωση ([Εικόνα 2](#)). Οι υποδοχείς TLR2 ενεργοποιούνται από Gram (+), μύκητες και μυκοβακτηρίδια, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή του TNF-α, που αν και δεν είναι το μοναδικό παραγόμενο μόριο, είναι ένας από τους πιο δυναμικούς υποκινητές της φλεγμονής.¹¹

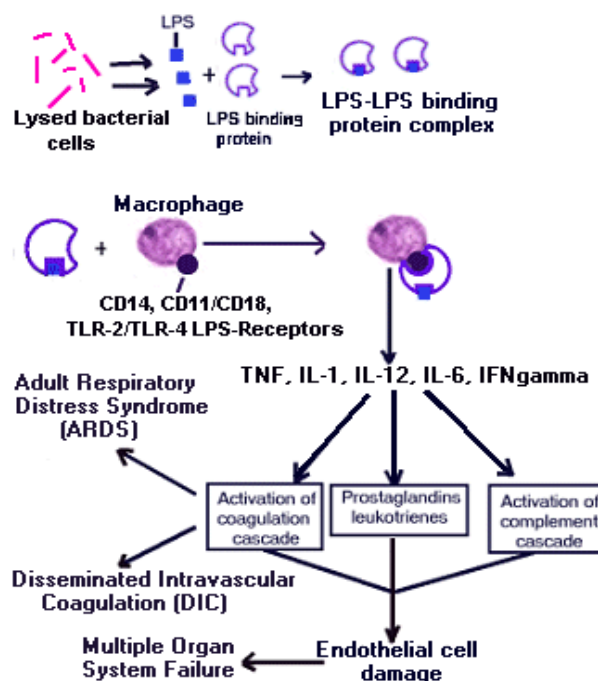
Η ανεξέλεγκτη πορεία του καταρράκτη της φλεγμονής έχει σαν αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία η οποία οδηγεί σε μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα, μειωμένη συστηματική αγγειακή αντίσταση, υπόταση, μεταβολική οξέωση και υπεργλυκαιμία και

τελικά στο σύνδρομο πολλαπλής ανεπάρκειας οργάνων και στον θάνατο. Αυτή η αλληλουχία των γεγονότων παρουσιάζεται περιληπτικά στην **Εικόνα 3**.



Εικόνα 2. Διάγραμμα της εγγενούς ανοσολογικής απάντησης σε λοίμωξη και ιστική βλάβη που εμπλέκει τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και τον καταρράκτη της πήξης (Holmes CL; Russel JA; Walley KR. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock: Role in Prognosis and Potential for Therapy Chest 2003; 124(3): 1103-11)

Η ακριβής αιτία της οργανικής ανεπάρκειας και του θανάτου στην πλειοψηφία των ασθενών που πεθαίνουν από σήψη παραμένει άγνωστη. Τα αποτελέσματα παθολογο-ανατομικών μελετών έχουν δείξει μια έντονη απόπτωση κυττάρων στα περισσότερα όργανα,¹² συνδέοντας τις οργανικές δυσλειτουργίες με την ανεπαρκή απάντηση της λεγόμενης χειμερίας νάρκης των κυττάρων (cellular hibernation response).¹³



Εικόνα3. Παθοφυσιολογία της σήψης (Balk RA, Casey LC. Sepsis and Septic Shock. Critical Care Clinics. 2000)

1.1.4. Σήψη στα παιδιά: πρόγνωση-βιοδείκτες

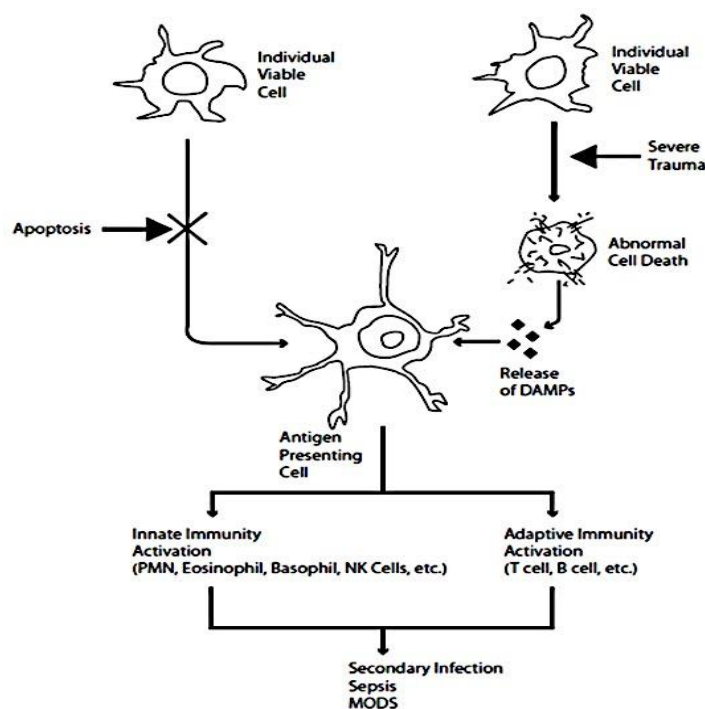
Σήψη καταγράφεται σε περισσότερους από 750.000 ασθενείς κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες¹⁴ και εμφανίζει ένα ποσοστό θνητότητας από 28% έως 48% ανάλογα με την ηλικία του ασθενή. Παρά τις σημαντικές μέχρι σήμερα προόδους στη βασική έρευνα, δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική θεραπεία της σήψης. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η θνητότητα για τη σήψη στα παιδιά παραμένει επίσης υψηλή, κυμαινόμενη από 9% έως 35%. Σύμφωνα με επιδημιολογική μελέτη στις ΗΠΑ, η σοβαρή σήψη προσβάλλει κάθε χρόνο 42.000 παιδιά που εισάγονται στα νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, με θνητότητα 10,2%.¹⁵ Σημαντικοί δυσμενείς παράγοντες είναι η ηλικία, υποκείμενες καρδιο-αγγειακές παθήσεις και οργανικές δυσλειτουργίες. Σε μια άλλη αμερικανική μελέτη, ο επιπολασμός της σοβαρής σήψης στα παιδιά αυξήθηκε σημαντικά από 6,2% σε 7,7% ενώ η θνητότητα μειώθηκε από 18,9% σε 12% ($p < 0.001$).¹⁶ (δείχνοντας ότι παραμένει ένα μεγάλο πρόβλημα και μια πρόκληση για τον ιατρικό κόσμο).

Διαφορετικοί βιοδείκτες έχουν μελετηθεί και προτάθηκαν σαν δείκτες της σοβαρότητας και θνητότητας στη σήψη. Ιδιαίτερα έχουν μελετηθεί βακτηριακοί παράγοντες όπως ενδοτοξίνες και βακτηριακά DNA, πρωτεΐνες οξείας φάσης (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, προκαλσιτονίνη, LBP-LPS-binding protein), παράγοντες πήξης (προϊόντα αποδόμησης ινώδους, αντιθρομβίνη III, D-διμερή), δείκτες κυτταρικής μεμβράνης (HLA-DR, CD-64, E-selectin), ορμόνες (κορτιζόλη, ACTH), διαλυτοί υποδοχείς (sCD-14, sTNFRI, sTNF-RII), και κυτταροκίνες (TNF, IL-6, IL-8, IL-10). Κανείς από τους μετρήσιμους αυτούς παράγοντες δεν συγκεντρώνει τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιοδείκτη υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας. Μόνο πρόσφατα η επιστημονική κοινότητα έστρεψε την προσοχή της στις πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (HSP), βασιζόμενη στο γεγονός ότι οι HSP προάγουν τις ιντερλευκίνες (ILs) και διεγείρουν τα ανοσολογικά κύτταρα κατά την διάρκεια της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS). Παράλληλα, το ενδιαφέρον της σύγχρονης έρευνας στρέφεται στη διερεύνηση της προοπτικής μιας πιθανής θεραπευτικής παρέμβασης μέσω διεγερτών ή αναστολέων των HSP ή ακόμη και μέσω παρασκευής αντίστοιχων εμβολίων.

1.2. Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS)

1.2.1. Τραύμα

Από το 1996 είναι γνωστό ότι ασθενείς με σοβαρό τραύμα εκδηλώνουν από τις πρώτες ώρες SIRS.¹⁷ Κατά τη διάρκεια ενός τραύματος, μια αλυσίδα συμβάντων ξεδιπλώνεται. Η πρώτη φάση αντιστοιχεί στην έναρξη της φλεγμονής. Η εξήγηση του SIRS επί απουσίας προφανούς μικροβιακής λοίμωξης επιχειρήθηκε από τον Matzinger, ο οποίος υιοθέτησε την υπόθεση ότι η απάντηση του ξενιστή στα DAMPs μπορεί να ενεργοποιήσει την εγγενή ανοσία μέσω των TLRs.¹⁸ Σύμφωνα με την «θεωρία κίνδυνου» του Matzinger, η ιστική βλάβη αποτελεί μια μείζονα πηγή in vivo ενδογενών σημάτων κινδύνου, τα οποία και διεγείρουν το εγγενές ανοσολογικό σύστημα.¹⁹



Εικόνα 4. Η ανοσολογική απάντηση σε σοβαρό τραύμα (Immunologic Response to Severe Trauma. Hwang et al. Journal of Translational Medicine.2011; 9:92)

Στην περίπτωση που το SIRS που εκδηλώνεται κατά την διάρκεια του τραύματος δεν αντιρροπείται από την ανάπτυξη του CARS, ακολουθεί ένας καταρράκτης των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που μπορούν να επιφέρουν MODS και θάνατο²⁰ (Εικόνα 4). Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να διαλευκάνουν τον μηχανισμό και τον ρόλο των σημάτων κινδύνου στη φλεγμονώδη απάντηση στο τραύμα, προσφέροντας αποτελεσματικότερες θεραπευτικές λύσεις στην πρόληψη της νοσηρότητας και θνητότητας που σχετίζονται με το τραύμα.

1.2.2. Κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Το τραύμα, και ιδιαίτερα η κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ), παραμένει μια από τις μείζονες αιτίες της νοσηρότητας και θνησιμότητας μεταξύ νεαρών ατόμων.²¹ Υπολογίζεται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η ΚΕΚ αφορά 475000 παιδιά 0-14 ετών κάθε χρόνο.²²⁻²³ Η εγκεφαλική προσβολή είναι το αποτέλεσμα της άμεσης μηχανικής δράσης (νέκρωση κυττάρων, αιμορραγία, ισχαιμία)²⁴ και σε δεύτερο χρόνο (από ώρες σε εβδομάδες) της χημικής προσβολής, που εμπλέκει βιοχημικές και μοριακές αλλαγές στους τοπικούς και απομακρυσμένους ιστούς.²⁵

Σε μεγάλο ποσοστό, οι επιπλοκές του σοβαρού τραύματος θεωρούνται αποτέλεσμα μιας υπερβολικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS). Από παθοφυσιολογική άποψη, το τραύμα εμπλέκει ενδογενή σήματα κινδύνου, όπως οι HMGB-1 και HSPs, που παράγονται από κατεστραμμένους ιστούς προκαλώντας ανοσολογική δυσλειτουργία.²⁶ Τα μείζονα σήματα κινδύνου («danger signals») που προάγουν την ανοσολογική απάντηση μετά το τραύμα είναι οι λεγόμενες «alarmins» όπως HMGB-1, IL-1α, και IL-33 με σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και διάδοση της φλεγμονώδους απάντησης μετά τη διάσπαση της κυτταρικής ακεραιότητας. Μετά το τραύμα, απελευθερώνονται διάφοροι κυτταρικοί μεσολαβητές με σημαντικό ρόλο στην συστηματική φλεγμονή, όπως παράγοντες συμπληρώματος, πήξης, πρωτεΐνες οξείας φάσης και νευρο-ενδοκρινικοί μεσολαβητές. Απ' αυτούς η S100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) καθώς και διάφορες κυτταροκίνες²⁷ έχουν ιδιαίτερα χρησιμοποιηθεί στην ΚΕΚ ως δείκτες έκτασης και πρόγνωσης της ιστικής βλάβης.^{28,29} Έτσι, έχει πρόσφατα δειχθεί ότι πολύ υψηλά επίπεδα της HSP72 στον ορό ενηλίκων ασθενών με σοβαρή ΚΕΚ συνδέονται με κακή πρόγνωση.³⁰

1.3. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

1.3.1. Διέγερση κυτταρικής ανοσίας

Το ανοσολογικό σύστημα έχει δυο σκέλη – το εγγενές και το επίκτητο (προσαρμοσμένο) τα οποία και εκφράζουν την απάντηση του ξενιστή σε παθογόνα ή τραυματική βλάβη. Αρχικά η σήψη είχε θεωρηθεί απλά μια υπερβολική συστηματική φλεγμονώδης απάντηση στους μικροβιακούς παράγοντες. Νεότερα δεδομένα όμως εστιάζουν περισσότερο στη «θεωρία κινδύνου». Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η ιστική βλάβη στη σήψη ακολουθείται από απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, η διαταραχή της ισορροπίας των οποίων οδηγεί σε «ανοσολογική» πάρεση.³¹ Η ανοσο-φλεγμονώδης δυσλειτουργία που αναπτύσσεται με τον τρόπο αυτό στη σοβαρή σήψη σχετίζεται με την: 1) αναγνώριση του παθογόνου, 2) μεταφορά του προ- και αντι-φλεγμονώδους κυτταρικού σήματος, 3) απελευθέρωση των προ-και αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών, 4) δυσλειτουργία των ανοσοκυττάρων αλλά και άλλων κυτταρικών πληθυσμών και 5) αλληλεπίδραση με άλλα βιολογικά συστήματα στη σήψη (πήξης, αυτόνομου νευρικού συστήματος). Η διέγερση των ανοσολογικών κυττάρων γίνεται δια μέσου PPRs, όπως οι TLRs, που αντιπροσωπεύουν το μοριακό κλειδί-σύνδεσμο μεταξύ της ιστικής προσβολής, λοίμωξης και φλεγμονής. Η οδός μετάδοσης του σήματος αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-kB, ο οποίος με τη σειρά του δραστηριοποιεί τα γονίδια των προ-φλεγμονωδών παραγόντων. Οποιαδήποτε δυσλειτουργική ενεργοποίηση του NF-kB είναι πιθανόν να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, ευνοώντας την απόπτωση δραστικών ανοσοκυττάρων με ανεπιθύμητα επακόλουθα. Η υπερβολική ενεργοποίηση του ανοσολογικού μηχανισμού, ιδιαιτέρως στην πρώτη φάση της σήψης, μπορεί να προκαλέσει ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη απάντηση με έμμεση ιστική βλάβη και οργανική ανεπάρκεια. Αντίθετα, μια υπερβολική καταστολή της, θα οδηγήσει σε ανοσοπαράλυση, με επακόλουθο την ανάπτυξη επικίνδυνων ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων.³² Έχει παλαιότερα εκφραστεί η άποψη ότι κύτταρα που έχουν υποστεί νέκρωση προκαλούν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση προκαλούν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών ή ανοσο-ανεργία.³³

1.3.2. Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες που παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση, είναι χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπίδια ή γλυκοπρωτεΐνες (οι περισσότερες <40kDa) οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία πολλών διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση. Παράγονται από διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης παθογόνων και μονοκυττάρων και διακρίνονται σε: προ (υπερ)-φλεγμονώδεις (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), αντι-φλεγμονώδεις (IL-4, IL-10), αντιφλεγμονώδεις μηχανισμοί (TNFR1, sTNFR2, IL-1ra, TREM-1).³⁴ Αμέσως μετά την απελευθέρωση, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκαλούν την ενεργοποίηση της εγγενούς ή προσαρμοσμένης ανοσολογικής απάντησης, συμβάν που οδηγεί στην περαιτέρω παραγωγή των ανοσορυθμιστικών και δραστικών κυτταροκινών.³⁵ Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως «καταρράκτης των κυτταροκινών».³⁶

Οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν και άλλες φλεγμονώδεις απαντήσεις, όπως τη μετανάστευση των ανοσολογικών κυττάρων στον τόπο της λοίμωξης, συμβάλλοντας σημαντικά στον περιορισμό της φλεγμονής και στην προφύλαξη της διασποράς της. Αντίθετα, η δυσλειτουργία της απελευθέρωσης των κυτταροκινών μπορεί να οδηγήσει στο σύνδρομο διαφυγής («leakage»), εκδηλούμενο κλινικά από υπόταση, αιμοσυμπύκνωση, μακρομοριακή εξαγγείωση και οίδημα.³⁷ Πρόσφατες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι η προ-φλεγμονώδης απάντηση κυτταροκινών εξουδετερώνεται από αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IL-10, TGF- β και IL-4, οι οποίες έργο έχουν να επαναφέρουν την ανοσολογική ισορροπία TNFR1, sTNFR2, IL-1ra, TREM-1.³⁸

1.3.3. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες

1.1.1.1 TNF- α (Παράγοντας νέκρωσης των όγκων)

Μεταξύ των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ο TNF- α είναι μια πρωτεΐνη (17 kDa) που απελευθερώνεται όχι μόνο από τα ενεργά ανοσολογικά κύτταρα (μακροφάγα) αλλά και από μη-ανοσολογικά κύτταρα (ινοβλάστες), σαν απάντηση σε λοιμογόνους ή φλεγμονώδεις παράγοντες.³⁹⁻⁴⁰ Ο TNF- α θεωρείται ένας πρώιμος ρυθμιστής της ανοσολογικής απάντησης

και ένας ισχυρός διεγέρτης της παραγωγής των φλεγμονωδών κυτταροκινών. Δρα συνεργικά με την ιντερλευκίνη-1(IL-1)⁴¹ και προκαλεί μια κατάσταση «shock-like» που χαρακτηρίζεται από αγγειακή διαπερατότητα, σοβαρό πνευμονικό οίδημα και αιμορραγία,⁴² οδηγώντας τη σήψη σε οργανική ανεπάρκεια.³¹ Στον εγκεφαλικό ιστό που έχει υποστεί βλάβη, τα μακροφάγα, τα αστροκύτταρα και τα μικρογλιακά κύτταρα παράγουν TNF-α σε τοπικό επίπεδο, προκαλώντας δια μέσω του TNFR1 απόπτωση των νευρώνων.⁴³ Αντίθετα, ο TNF-α μπορεί επίσης να διεγείρει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό νευρώνων και ολιγοδενδρογλιακών κυττάρων δια μέσω του TNFR2.⁴⁴

1.1.1.2 *Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)*

Η IL-6 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (21kDa) που παράγεται από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα σαν απάντηση στις LPS, IL-1 και TNF-α.⁴⁵ Αυξημένα επίπεδα της IL-6 στο πλάσμα βαρέως πασχόντων ασθενών έχουν συσχετιστεί με τη βαρύτητα της σήψης, την πολυοργανική ανεπάρκεια, τη σηπτική καταπληξία και τη θνητότητα.⁴⁶⁻⁴⁷

Η IL-6 ενεργοποιεί τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και διεγείρει την οξεία φλεγμονώδη απάντηση, εκφραζόμενη με πυρετό, λευκοκυττάρωση, και αύξηση της CRP, των συστατικών του συμπληρώματος, του ινωδογόνου και της φερριτίνης.⁴⁸ Υψηλά επίπεδα IL-6 σε ασθενείς με πρώιμη σοβαρή σήψη συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα του SIRS,⁴⁹ το score (βαθμό) APACHE που χαρακτηρίζει τη βαρύτητα της νόσου,⁵⁰ και τη θνητότητα,⁵¹ ιδιαίτερα σε επίπεδα IL-6>1000ng/ml.⁵²

Ο ρόλος της IL-6 στην ΚΕΚ είναι αμφίβλος, έχοντας προ- και αντι-φλεγμονώδη δράση. Αυξάνεται στην ΚΕΚ και φαίνεται ότι διεγείρει την έκκριση της βασοπρεσσίνης ενώ μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια του συνδρόμου της απρόσφορης έκκρισης της αντιδιουρητικής ορμόνης.⁵³

1.1.1.3 *Ιντερλευκίνη -8 (IL-8)*

Η IL-8 είναι μέλος της οικογένειας χυμοκινών και ασκεί κυρίως χημειοτακτική δράση στα ουδετερόφιλα. Μαζί με τις IL-1 και TNF-α εμπλέκεται στη προσκόλληση των

ουδετεροφίλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των μορίων προσκόλλησης ELAM-1 και ICAM-1. Συσχετίζεται με την καταπληξία, την οξεία πνευμονική βλάβη (ALI) και την οξεία αναπνευστική δυσχέρεια (ARDS),⁵⁴ καθώς διευκολύνει την εξωαγγειακή συσσώρευση τους μέσω της αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας (capillary leak). Οι Wong και Wheeler το 2010 αναφέρουν σε μελέτη τους πάνω στην IL-8 σε παιδιά με σηπτική καταπληξία ότι επίπεδα <220pg/ml (cut off value) το πρώτο 24ωρο στον ορό μπορούν να προβλέψουν την επιβίωση στη σηπτική καταπληξία σε ~95% των περιπτώσεων.⁵⁵

Η IL-8 θεωρείται μια σημαντική κυτταροκίνη στην ΚΕΚ. Παράγεται από ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αστροκύτταρα και την μικρογλία και η απελευθέρωση της σχετίζεται με τη δράση άλλων κυτταροκινών, την ισχαιμία, υποξία και την επαναιμάτωση. Αυξημένα επίπεδα της στο πλάσμα σχετίζονται με την θνητότητα στη βαριά μεμονωμένη ΚΕΚ.⁵⁶

1.3.4. Αντιφλεγμονώδης αντίδραση

Για να εξισορροπηθεί η δράση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IL-8 TNF-α) συγχρόνως απελευθερώνονται αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-4, IL-10, IL-13).⁵⁷

1.1.1.4 Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)

Η IL-10 γνωστή και ως ανθρώπινος ανασταλτικός παράγοντας σύνθεσης κυτταροκινών (CSIF) είναι μια αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία παράγεται από τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, Β-λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα.⁵⁸ Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση και ανοσορρύθμιση κατά τη διάρκεια συστηματικής λοίμωξης, προκαλώντας μείωση και τελικά διακοπή της φλεγμονώδους απάντησης.⁵⁹ Περιορίζει την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α, IL-6, IL-1) μέσω ενεργοποιημένων μακροφάγων,⁶⁰ ενώ αυξάνει την παραγωγή του ανταγωνιστή του υποδοχέα IL-1 (IL-1ra) από τα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα.⁶¹ Επίσης καταστέλλει την απελευθέρωση της ιντερφερόνης-γ από τα Th1 λεμφοκύτταρα.⁶² Σημαντική συσχέτιση έχει περιγραφεί μεταξύ των επιπέδων της IL-10 και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IL-6, IL-8, όπως και της CRP. Σε διάφορες κλινικές μελέτες τα επίπεδα της IL-10 στον ορό

συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της σηπτικής καταπληξίας, την ανάπτυξη πολύ-οργανικής ανεπάρκειας και τη θνητότητα.⁶³⁻⁶⁴

Στην ΚΕΚ, η IL-10 φαίνεται να ασκεί έναν προστατευτικό ρόλο. Η χορήγηση IL-10 στα πειραματόζωα έχει δείξει ότι καταστέλλει τη σύνθεση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , IL-1), μειώνει τη δραστηριοποίηση των νευρογλιακών κυττάρων και βελτιώνει την πρόγνωση.⁶⁵

1.4. Πρωτεΐνες οξείας φάσης

1.4.1. CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη)

Η CRP είναι μια πενταμερής πρωτεΐνη η οποία παράγεται κυρίως στο ήπαρ υπό την επίδραση της IL-6 και του TNF- α . Συμμετέχει στον φλεγμονώδη καταρράκτη, ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος και προάγει τη φαγοκυττάρωση.⁶⁶ Τα επίπεδα της αυξάνονται σε 4-6 ώρες μετά την προσβολή και διπλασιάζονται κάθε 8 ώρες φτάνοντας στη μέγιστη τιμή μετά από 36-50 ώρες. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται ως δείκτης φλεγμονής επί εδάφους μικροβιακής λοίμωξης και ιστικής βλάβης, αλλά μπορεί να αυξάνεται και σε άλλες καταστάσεις, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, τραύμα, μεγάλα χειρουργεία, εγκαύματα, ογκολογικά νοσήματα.⁶⁷ Η λοίμωξη με Gram (+) ή Gram (-) βακτηρίδια όπως και αυτή με μύκητες προκαλεί σημαντική αύξηση της CRP ακόμα και σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια.⁶⁸⁻⁶⁹ Οι τιμές της CRP αυξάνονται παράλληλα με τη σοβαρότητα της σήψης. Μέτριες τιμές (~70mg/L) έχουν καταγραφεί στο SIRS, υψηλές στη σήψη (98mg/L), και πολύ υψηλές στη σοβαρή σήψη και το σηπτικό σοκ (145mg/L και 173mg/L αντίστοιχα).⁷⁰ Παρόμοια συσχέτιση της CRP με τη βαρύτητα της φλεγμονής έχουν περιγραφεί και σε άλλες μελέτες, όπου τιμές 66mg/L, 108mg/L και 126mg/L καταγράφηκαν σε ασθενείς με SIRS, σήψη και σηπτικό σοκ αντίστοιχα.⁷¹ Όσον αφορά τη προγνωστική της αξία, οι ασθενείς που πέθαναν είχαν στην εισαγωγή τους μια τιμή CRP~ 70mg/L, σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή ασθενών που επιβίωσαν (18mg/L).⁷²

1.4.2. Προκαλσιτονίνη (PCT)

Η PCT είναι ένα προπεπτίδιο της καλσιτονίνης με 116 αμινοξέα και μοριακό βάρος 14,5 kDa. Αυξάνεται σε βακτηριακές και σε μυκητιασικές λοιμώξεις. Η αύξηση της ανιχνεύεται εντός 2 ωρών και φτάνει στο μέγιστο σε 6-12 ώρες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 24 ώρες.

Στη σήψη η PCT έχει υψηλή ευαισθησία (85%) και ειδικότητα (91%), σημαντικά υψηλότερη συγκρινόμενη με άλλους βιοδείκτες όπως οι IL-2, IL-6, IL-8 CRP, TNF.⁷³ Ασθενείς με τιμές $\leq 0,5\text{ng/ml}$ είναι απίθανο να έχουν σοβαρή σήψη ή σηπτικό σοκ, ενώ επίπεδα $>2\text{ng/ml}$ απαντώνται σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για σηψαιμία ή σηπτικό σοκ.⁷⁴ Επίπεδα PCT $>10\text{ng/ml}$ ανιχνεύονται σε ασθενείς με οργανική ανεπάρκεια σε όργανο απομακρυσμένο από την εστία της λοίμωξης.⁷⁵ Παιδιά με σηπτική καταπληξία που είχαν υψηλότερες τιμές προκαλσιτονίνης κατά την εισαγωγή τους σε ΜΕΘ παρουσίαζαν χειρότερη πρόγνωση.⁷⁶

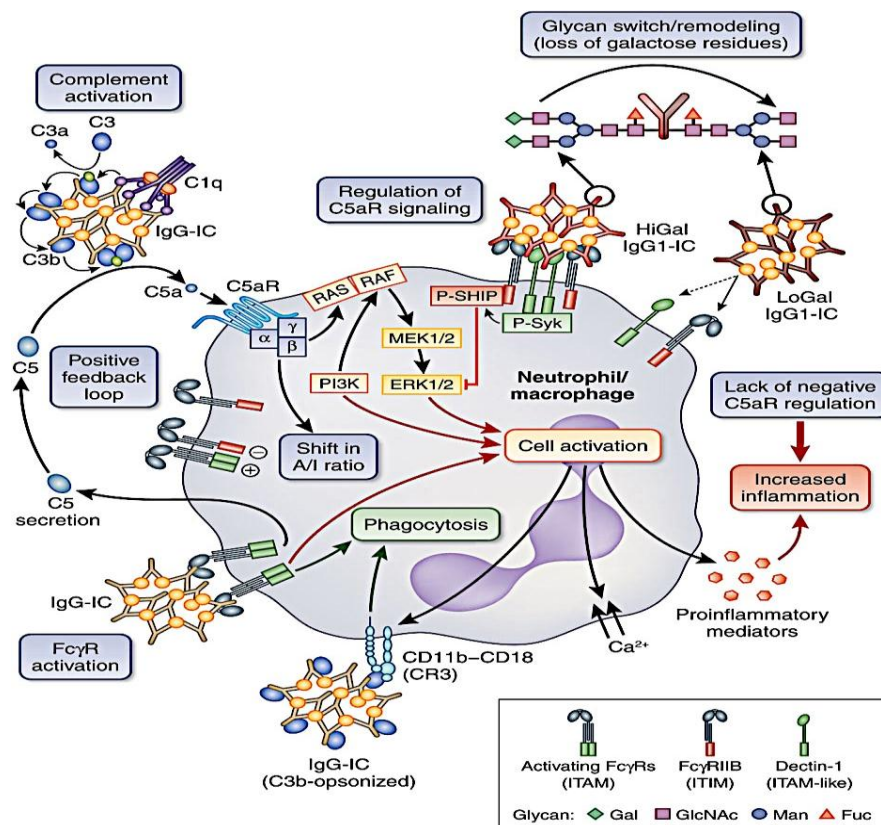
Εκτός από τις ενδοτοξίνες, η παραγωγή της PCT επάγεται και από προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που απελευθερώνονται σε τραυματισμό, σε μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις, σε σοβαρά εγκαύματα ή σε καρδιογενές σοκ, σε βαθμό που σχετίζεται με την βαρύτητα της ιστικής καταστροφής. Στις περιπτώσεις σοβαρών τραυματισμών, τα επίπεδα της PCT φθάνουν στο μέγιστο τις τρεις πρώτες ημέρες και στη συνέχεια υποχωρούν. Τα αρχικά αυξημένα επίπεδα της PCT σε πολύ-τραυματίες καταδεικνύουν τον κίνδυνο εμφάνισης σηπτικών επιπλοκών και πολυοργανικής ανεπάρκειας.⁷⁷

1.5. Αντιγόνα επιφανείας CD11b και CD64

1.5.1. CD64

Κατά τη διάρκεια της σήψης τα ουδετερόφιλα εμφανίζουν ενεργοποίηση και δυσλειτουργία. Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, η δυσλειτουργία οργάνων προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από τα ουδετερόφιλα, τα οποία είναι βασικά κύτταρα του ανοσοποιητικού.⁷⁸ Τείνουν να εκφράσουν δείκτες επιφανείας ενεργοποίησης (αυξημένα επίπεδα CD11b και CD64), αλλά ταυτόχρονα εμφανίζουν και σημαντική διαταραχή της φαγοκυτταρικής

ικανότητας μέσω των προ-φλεγμονωδών παραγόντων αποδόμησης του συμπλέγματος.⁷⁹ HCD64, γνωστή σαν FcγRI, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 71kDa μοριακό βάρος (Εικόνα 5). Η CD64 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις κυτταροτοξικότητας (antibody-dependent cytotoxicity)(ADCC), στη φαγοκυττάρωση και στην έκλυση των IL-1, IL-6 και TNF-α. Παράλληλα, η INF-γ αυξάνει την έκφρασή της CD64 στα ουδετερόφιλα.⁸⁰



Εικόνα5. Συνομιλία μεταξύ συμπλεγμάτων FcγRs και dectin-1 στην τροποποίηση φλεγμονής προκαλούμενης από ανοσολογικά συμπλέγματα (ICs). Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από ICs οδηγεί σε οψονοποίηση μέσω της C3b και ενεργοποίηση της C5a. Η ενεργοποίηση του C5aR στα ανοσολογικά κύτταρα προκαλεί μια μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων των ενεργοποιημένων έναντι των κατασταλαμένων FcγRs (the A/I ratio) υπέρ της ενεργοποίησης, με αυξημένη παραγωγή C5a (positive-feedback loop). Η σύγχρονη διέγερση του C5aR- και ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης μέσω του FcγR-διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση (άμεσα ή μέσω της υπερ-ρύθμισης των υποδοχέων των φαγοκυττάρων όπως CD11b/CD18) και προωθεί την φλεγμονή μέσω της απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών και κυτταρικής μετανάστευσης(Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. A sweet spot to control complement-induced inflammation. *Nature Medicine*.2012; 18:1340-1).

Η έκφραση της CD64 στα ουδετερόφιλα είναι πρώιμος δείκτης βακτηριακής λοίμωξης σε μετεγχειρητικούς ασθενείς.⁸¹ Σε κλινικές μελέτες σε ενήλικες και πρόσφατα και σε παιδιά⁸² η έκφραση CD64 στα ουδετερόφιλα αποδείχθηκε καλύτερος δείκτης σήψης σε σχέση με τη PCT⁸³⁻⁸⁴ ή CRP.⁸⁵ Τα αποτελέσματα μελετών σε ενήλικες,⁸⁶⁻⁸⁷ παιδιά ή νεογέννητα⁸⁸ είναι

συγκρίσιμα και δείχνουν ότι η έκφραση CD64 είναι αυξημένη σε ασθενείς με λοιμώδες SIRS σε σχέση με μη-μικροβιακό SIRS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης, η μετρούμενη έκφραση CD64 στην επιφάνεια πολυμορφοκυττάρων είναι πιθανό να αποτελέσει ένα μελλοντικό δείκτη λοίμωξης σε παιδιά και ενήλικες με ευαισθησία 79%(0,26-0,96) και ειδικότητα 91%(0,85-0,95).⁸⁹ Η έκφρασή της είναι υψηλότερη σε Gram (-) σε σχέση με τις Gram (+) λοιμώξεις.⁹⁰

1.5.2. CD11b

Όσον αφορά την CD11b, έχει περιγραφεί η αύξηση της έκφρασης της στα ουδετερόφιλα σε ενήλικες ασθενείς με σήψη και σηπτικό σοκ σε σχέση με ασθενείς με ιογενείς λοιμώξεις⁹¹ ή υγιείς εθελοντές.⁹² Δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για παιδιατρικούς ασθενείς. Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση των μορίων προσκόλλησης στα ουδετερόφιλα και στο ενδοθήλιο διευκολύνει τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων από το αίμα στον ιστό. Φαίνεται ότι τα CD11b/CD18 εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή της προσκόλλησης.⁹³

Η αυξημένη έκφραση των CD11b/CD18 στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων παρατηρείται το μέγιστο τις πρώτες 24 ώρες μετά το τραύμα και τα επίπεδα μπορούν να παραμείνουν αυξημένα τις επόμενες 2-3 εβδομάδες.⁹⁴

1.6. Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (HSP)

1.6.1. HSP σε καταστάσεις στρες

Η ανταπόκριση στο θερμικό σοκ είναι ένας πολύ καλά διατηρημένος κυτταρικός μηχανισμός που προστατεύει από τοξικούς και λοιμώδεις παράγοντες, τραυματισμούς και ποικίλες περιβαλλοντικές καταστάσεις στρες. Το 1962 ο F. Ritossa παρατήρησε για πρώτη φορά ότι η απάντηση στο θερμικό σοκ προκάλεσε την ταχύτερη διέγερση της έκφρασης μιας ομάδας πρωτεϊνών τις Πρωτεΐνες Θερμικής Καταπληξίας “Heat Shock Proteins” (1974-1975).⁹⁵ Η αρχική αυτή κυτταρική απάντηση στο στρες αντιπροσωπεύει τον καλύτερα μέχρι σήμερα διατηρημένο κυτταρο-προστατευτικό αμυντικό μηχανισμό, γεγονός που οδήγησε στο

να ονομαστούν οι πρωτεΐνες αυτές και “stress proteins”. Οι HSP υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά είδη,⁹⁶ βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα του σώματος και ανάλογα με τη θέση τους ενδο- ή εξωκυττάρια έχουν διαφορετικούς ρόλους.

Παραγωγή υψηλών επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί να προκληθεί από την έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως η μόλυνση, η φλεγμονή, η άσκηση, η έκθεση του κυττάρου σε τοξίνες (αιθανόλη, αρσενικό, ίχνη μετάλλων, και την υπεριώδη ακτινοβολία), η πείνα, η υποξία, η ανεπάρκεια αζώτου, ή η στέρση νερού. Με βάση το μοριακό τους βάρος, το μέγεθος, τη δομή και τη λειτουργία, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) ταξινομούνται σε τάξεις: HSP 100, HSP90, HSP70, HSP60, μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ.⁹⁷ Ιδιαίτερα, οι HSP90, HSP70 έχουν μελετηθεί εκτενώς. Σε φυσιολογικές καταστάσεις βρίσκονται ενδοκυττάρια και είναι συνδεδεμένες στον παράγοντα θερμικού σοκ (HSF) (heat shock factor).⁹⁸ Σε κατάσταση στρες (θερμική καταπληξία, ισχαιμία ή έκθεση σε τοξίνες), οι πρωτεΐνες καταστρέφονται και ο HSF χωρίζεται από τις HSPs. Ο απελευθερωμένος φωσφορυλιωμένος HSF σχηματίζει ενεργά τριμερή που προσδένονται σε μεταγραφικά στοιχεία στα HSE (heat shock elements) με αποτέλεσμα αύξησης παραγωγής των HSPs. Οι ελεύθερες HSPs στη συνέχεια συνδέονται στις προσβεβλημένες πρωτεΐνες και υπηρετούν την ανασυγκρότηση, ενσωμάτωση τους σε συμπλοκές δομές, την αναδίπλωση και μεταφορά τους σε ενδοκυττάρια σχηματισμούς, αποτρέποντας μια καταστροφική επίδρασή τους στο κυτταρόπλασμα.⁹⁹

1.7. HSP72

Έχει δειχθεί ότι οι HSP72 πρωτεΐνες που ανήκουν σε ομάδα DAMPs έχουν διπλή λειτουργία, ενεργώντας και σαν τσαπερόνες και σαν κυτταροκίνες («τσαπεροκίνες»). Αυτή η διπλή ιδιότητα υποστηρίζεται και από τη λεγόμενη «danger hypothesis» κατά την οποία τα κύτταρα που υποβάλλονται σε στρες απελευθερώνουν στο άμεσο εξωκυττάριο περιβάλλον HSPs, μεταφέροντας το σήμα κινδύνου στα γειτονικά κύτταρα. Η σύνθεση της HSP72 ενεργοποιείται στα μακροφάγα, μετά από έκθεση σε ενδοτοξίνη. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι HSPs, και ιδιαίτερα η 70, διεγείρουν το εγγενές ανοσολογικό σύστημα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12, GM-CSF) από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα και την ενεργοποίηση της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων δια μέσω των υποδοχέων TLR2 και 4.

Η HSP72 αποτελεί το κυριότερο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70kDa.¹⁰⁰ (Άλλες παλαιότερες ονομασίες είναι: HSP72i, HSP72-1, HSPA-(κωδικός αριθμησης SwissProt 3303). Η HSP72 είναι μια ATP-εξαρτώμενη τσαπερόνη, η έκφραση της οποίας επάγεται σημαντικά σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας.¹⁰¹ Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση της στα κύτταρα είναι χαμηλή και περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ σε συνθήκες θερμικού στρες εισέρχεται στον πυρήνα και συγκεκριμένα στους πυρηνισκούς και/ή σε άλλες ετεροχρωματινικές περιοχές.¹⁰² Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις Hsp διατάσσονται σε μια ανοικτή δομή χρωματίνης με υπερευαίσθητες θέσεις στο 5' άκρο. Αυτό εξηγεί την πλήρη επαγωγή των HSPs σε μερικά μόνο λεπτά.

1.7.1. Δομή της HSP72

Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας των HSP72 εξήχθη κυρίως από δεδομένα που ελήφθησαν από ένα συνδυασμό βιοχημικής, κρυσταλλογραφικής και μοριακής ανάλυσης μοντέλων.¹⁰³ Έτσι γνωρίζουμε σήμερα ότι η ανθρώπινη HSP72 είναι μια μονομερής πρωτεΐνη των 640 αμινοξέων¹⁰⁴ που αποτελείται από τρεις περιοχές :

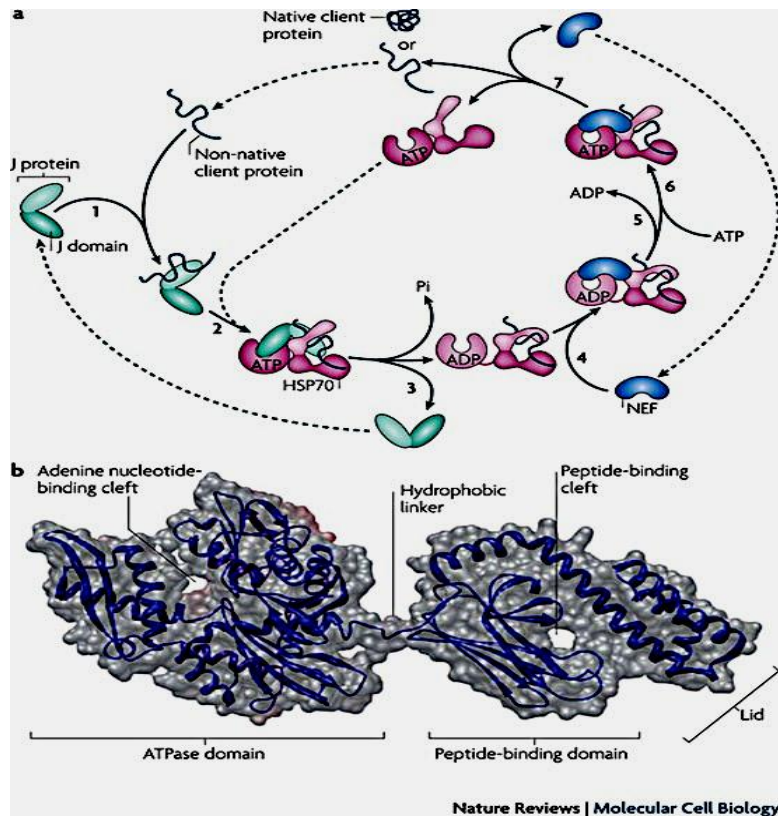
-**N-τελική περιοχή** με δράση ATPase¹⁰⁵ (Nucleotide-binding domain)(NBD). Η περιοχή αυτή συνδέεται με την ATP που υδρολύεται σε ADP. Έχει δυο λοβούς χωρισμένους με μια βαθιά σχισμή μεταξύ τους, στο κάτω μέρος της οποίας δεσμεύονται νουκλεοτίδια (ATP και ADP).

- **Περιοχή πρόσδεσης υποστρωμάτων** (SBD)(Substrate binding domain). Η διάταξη της SBD είναι ριζικά διαφορετική σε κλειστή και ανοικτή διάπλαση εξαρτώμενη από την ενεργό δράση της.¹⁰⁶

- **C-τελική περιοχή** πρόσδεσης πεπτιδίων (C-terminal domain) δρα ως «κάλυμμα» για την περιοχή δέσμευσης υποστρώματος. Το C-τερματικό τμήμα της HSP72 διεγείρει την παραγωγή TNF- α , IL-12, και χυμοκινών, επάγει την πόλωση των T-βοηθητικών κυττάρων τύπου 1, και διεγείρει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.

Η N- και C- τελική περιοχή σχετίζονται με την έκθεση σε αντιγόνο, μια σημαντική διεργασία με την οποία η HSP72 συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση, εμφανίζοντας παράλληλη δράση μοριακού συνοδού και κυτοκίνης.¹⁰⁷ Η περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων βρίσκεται πλησίον της περιοχής με δράση ATP-άσης και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις της HSP72 με

κακώς αναδιπλωμένα, μη αναδιπλωμένα ή μερικώς αναδιαταγμένα πολυπεπτιδικά υποστρώματα (Εικόνα 6).



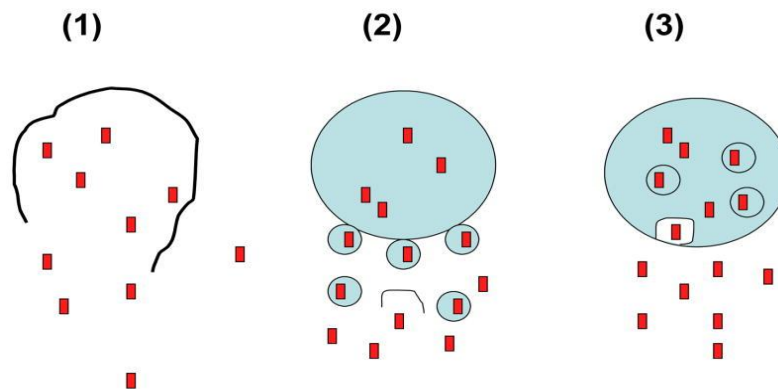
Εικόνα 6. Δομή και τρόπος λειτουργίας της HSHP72 (HSHP72 machinery) στην αναδίπλωση πρωτεϊνών-πελατών με τη βοήθεια co-chaperones (Kampinga HH, Craig EA. The HSHP72 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* .2010;11:579-92). a. Η HSHP72 δεν δουλεύει μόνη της αλλά μαζί με μια ομάδα συνοδών co-chaperones. Οι πιο σημαντικές co-chaperones είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών του J-domain (JDPs) και κάποιες οικογένειες των nucleotide exchange παραγόντων (NEF) (παραγόντων αλλαγής νουκλεοτιδίων). Οι πρωτεΐνες J συνδέονται με τις πρωτεΐνες πελάτες (1) και αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα HSHP72-ATP (2). Η πρωτεΐνη πελάτης αλληλεπιδρά παροδικά με την ανοιχτή περιοχή της HSHP72 που είναι ειδικευμένη στο δέσιμο των πεπτιδίων. Η ATP υδρόλυση προκαλεί αλλαγή της μορφολογίας της HSHP72 που κλείνει και σταθεροποιεί την σχέση με την πρωτεΐνη πελάτη και την J πρωτεΐνη δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα (3). Ένας παράγοντας αλλαγής νουκλεοτιδίων (NEF) προσδένεται στη HSHP72 (4), απελευθερώνει το ADP (5). Καθώς το ATP προσδένεται στην HSHP72 (6), η πρωτεΐνη πελάτης απελευθερώνεται λόγω της χαμηλής έλξης για το HSHP72-ATP (7). Το δέσιμο του ATP στη HSHP72 ευνοείται λόγω μεγαλύτερης συγκέντρωσης του ATP στο κύτταρο σε σχέση με το ADP. b | Η δομή της HSHP72.

1.7.2. Ο μηχανισμός της εξαγωγής της HSP72

Οι μηχανισμοί εξόδου της HSP72 από τα κύτταρα είναι ακόμα αμφιλεγόμενοι. Φαίνεται ότι υπάρχουν δυο διαφορετικές πηγές της εξωκυττάριας HSP72 (eHSP72): ενεργής, μέσω ενός μη-τυπικού εκκριτικού μηχανισμού, και παθητική, σαν αποτέλεσμα λύσης νεκρωμένων κυττάρων.¹⁰⁸

Η ενεργής απελευθέρωση της HSP72 μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων μηχανισμών: 1) Μέσω της λυσοσωμικής – ενδοσωμικής οδού (lysosome endosome pathway) στην οποία η HSP μεταφέρεται μέσα στα λυσοσώματα όπου προστατεύεται από τη φθορά και έπειτα μεταφέρεται εξωκυττάριας, δια μέσω μιας ενδοκυτταρικής διαδικασίας.¹⁰⁹ 2) Μέσω των κυστιδίων μετάφορας απέκκρισης των πρωτεϊνών του στρες (Εικόνα 7). Σύμφωνα με τους Gastpar και συνεργάτες, τα εξωκυττάρια αυτά κυστιδία που περιέχουν την HSP72 ενισχύουν την κυττάρο-τοξική ικανότητα των NK κυττάρων.¹¹⁰

PATHWAYS OF HSP70 RELEASE



Εικόνα 7. Οδοί (Μηχανισμοί) απελευθέρωσης της HSP72. Απεικονίζονται τρεις βασικές υποθέσεις για την απελευθέρωση πρωτεϊνών δια μέσω της «μη-κανονικής» έκκρισης. Αυτές περιλαμβάνουν: 1) λύση του κυττάρου, 2) απελευθέρωση σε κυστιδία με ένα μηχανισμό «διόγκωσης» που ακολουθείται μετέπειτα από λύση των κυστιδίων, και 3) έκκριση μέσω ενός ενδολυσόσωματος και απελευθέρωση όταν το ενδολυσόσωμα ενώνεται με την κυτταρική επιφάνεια. (Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK. Mechanisms For HSP72 Secretion: Crossing Membranes Without A Leader Methods. 2007;43 (3):168–75.)

1.7.3. Ενδοκυττάρια HSP72

Σε μοριακό επίπεδο, η θερμικά επαγόμενη HSP72 καθοδηγεί τη διαμόρφωση άλλων ενδοκυττάριας πρωτεϊνών σε όλη τη διάρκεια της λειτουργικότητάς τους, αποτρέποντας

κάθε πιθανή παραμόρφωσή τους. Ιδιαίτερα προστατεύει τις ενεργά-υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών από αλληλεπιδράσεις που είναι δυνατόν να οδηγήσουν στο σχηματισμό μη παραγωγικών πρωτεϊνών.¹¹¹ Με αυτή τη δράση, η HSP72 λειτουργεί ως μοριακός συνοδός (τσαπερόνη), **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.** η οποία:

- A) Εμπλέκεται στα μονοπάτια της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών.
- B) Καθοδηγεί τη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτεϊνών στα μικροσώματα.
- Γ) Βοηθά στη μεταφορά των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο.
- Δ) Ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ελέγχοντας τις αλλαγές στη διαμόρφωση τους.
- E) Προστατεύει τις πρωτεΐνες που υποβάλλονται σε στρες.

Σε επίπεδο κυττάρων η HSP72 μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής των φλεγμονωδών κυτταροκινών, προστατεύει τα κύτταρα από τα υψηλά επίπεδα των φλεγμονωδών κυτταροκινών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε βλάβη ή θάνατο των κυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Η παρουσία της ενδοκυττάριας HSP72 φαίνεται να προσδίδει ανθεκτικότητα στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από απόπτωση, ή ακόμη και από νέκρωση, κάτω από την επίδραση κασπάσο- εξαρτώμενων ή κασπάσο- ανεξάρτητων ερεθισμάτων, όπως ο TNF και το θερμικό ή οξειδωτικό στρες, εξασφαλίζοντας στο κύτταρο μια αντιφλεγμονώδη δράση.¹¹² Επιπλέον, η παρουσία της HSP72 προσδίδει θερμο-ανθεκτικότητα και παρέχει στα κύτταρα του μυοκαρδίου προστασία από ισχαιμικές επιδράσεις.¹¹³ Παράλληλα, η έκφραση της HSP72 στην επιφάνεια των κυττάρων που δέχονται το στρες διαμορφώνει την ανοσολογική απόκριση καθώς την κάνει αναγνωρίσιμη από τα φυσικά θανατηφόρα κύτταρα (NK) και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα.

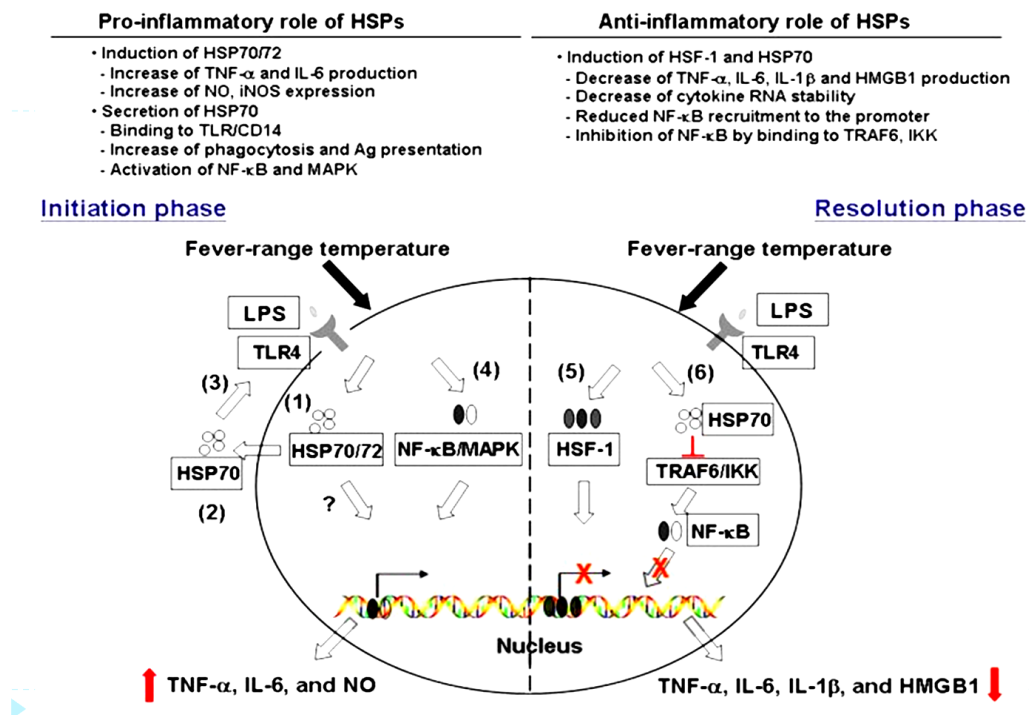
1.7.4. Εξωκυττάρια HSP72 (eHSP72)

Ανάλογα με την ενδο ή έξωκυτταρική τους προέλευση, οι HSPs ασκούν θετικές ή αρνητικές επιδράσεις στη ρύθμιση της λειτουργίας των μακροφάγων. Φαίνεται ότι οι

εξωκυττάρειες HSPs λειτουργούν ως «σήμα κινδύνου» που διεγείρει την ανοσολογική απάντηση, ενώ οι ενδοκυττάρειες HSPs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν «αρνητικός ρυθμιστής» για να ελεγχθεί η φλεγμονή.¹¹⁴ Πειραματικές μελέτες έχουν πρόσφατα αναδείξει ορισμένες από τις εξωκυττάρειες λειτουργίες της HSP72 όπως είναι οι ακόλουθες: παραγωγή και απελευθέρωση κυτταροκινών, ενεργοποίηση της μικρογλίας, επαγωγή της IL-6 και TNF- α , διέγερση της φαγοκυττάρωσης και της κάθαρσης του αμυλοϊδούς- β ,¹¹⁵ και απελευθέρωση των IL-1 β , IL-12, NO, και χυμοκινών από μονοκύτταρα/μακροφάγα.^{116,117, 118}

Φαίνεται ότι η eHSP72 διεγείρει *in vitro* την παραγωγή της iNO--συνθετάσης, NO, TNF- α , IL-1b και IL-6 από τα μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Μπορεί να οδηγήσει άμεσα στην ενεργοποίηση της c1q και του καταρράκτη του συμπληρώματος, διαδραματίζοντας ένα σημαντικό ανοσο-διαμορφωτικό ρόλο στη διάρκεια του στρες.

Οι ανοσοδιεγερτικές δράσεις της επιτυγχάνονται μέσω των CD14/TLR (TLR2 και TLR4) συμπλεγμάτων και οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF- κ B και MAPK μονοπατιού¹¹⁹ που παρουσιάζεται στην [Εικόνα 8](#).



Εικόνα8. Προ- και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις του θερμικού στρες και Πρωτεΐνες Θερμικής Καταπληξίας (Heat Shock Proteins). Αλλαγές θερμοκρασίας προκαλούν θετικές και αρνητικές δράσεις στην παραγωγή των κυτταροκινών στα μακροφάγα. Φαίνεται ότι αυτές οι αντίθετες δράσεις εξαρτώνται από το βαθμό ενεργοποίησης των μακροφάγων και από την κυτταρική θέση των HSP. Στην αρχική φάση της ενεργοποίησης των μακροφάγων, αλλαγές θερμοκρασίας αυξάνουν την επαγόμενη από LPS παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF- α , IL-6, και NO (1). Αυτή η θερμική αύξηση της παράγωγης των κυτταροκινών

συνοδεύεται από την επαγωγή HSP72/72 σε αυτά τα κύτταρα (2). Στη συνέχεια η HSP72 απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον(3) και δρα σαν κυτταροκίνη δια μέσω της οδού CD14/TLR (4). Τα παραπάνω οδηγούν στην ενεργοποίηση των μονοπατιών NF-κΒ και MAPK και στη συνέχεια μεταγραφή του γονιδίου της κυτταροκίνης. Από την άλλη πλευρά, αλλαγές θερμοκρασίας μπορεί να καταστέλλουν την LPS-παραγωγή TNF-α, IL-6 και IL-1β και την απελευθέρωση HMGB-1 (5). Η HSF-1 λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής της κυτταροκίνης (6). Η χορήγηση LPS και HSP προάγουν την έκφραση της HSP72 που στη συνέχεια συνδέεται στο TRAF6 ή IKK και καταστέλλει την ενεργοποίησή του και των κυτταροκινών (Chen-Ting Lee and Elizabeth A. Repasky. Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activate state? Front Immunol.June 2012;doi:10-3389).

1.7.5. Οι ανοσολογικές επιδράσεις της eHSP72

1. Διεγείρει την έκφραση του προ-φλεγμονώδους γονιδίου στα μακροφάγα κύτταρα και μονοκύτταρα δια μέσω των TLR-2 και TLR-4 υποδοχέων
2. Προκαλεί έμμεσα και άμεσα χημειοταξία των ουδετερόφιλων και των δενδριτικών κυττάρων
3. Παίζει σημαντικό ρόλο στην διέγερση των δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων, μονοκυττάρων και NK κυττάρων
4. Ενισχύει τη σύνθεση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ενισχύει την έκφραση του MHC τάξης II στην επιφάνεια και άλλων σημαντικών συν-διεγερτικών μορίων σε δενδριτικά κύτταρα
5. Διεγείρει άμεσα την φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων
6. Επάγει την δραστηριότητα των φυσικών NK-κυττάρων
7. Ασκεί σημαντικές επιδράσεις στην προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση.

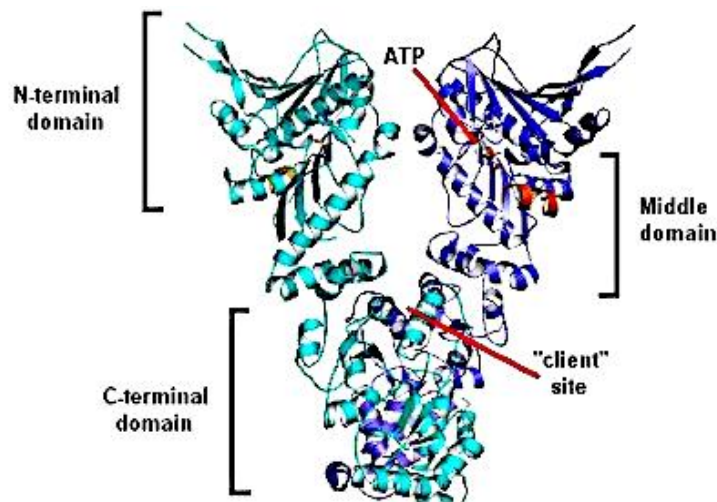
1.8. HSP90α

Η HSP90α είναι μία από τις πλέον άφθονες πρωτεΐνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 1% της συνολικής διαλυτής πρωτεΐνης, ακόμη και σε συνθήκες ηρεμίας/μη πίεσης.¹²⁰ Διακρίνονται δυο μείζονες ισόμορφες: Η HSP90α που επάγεται σε στρεσογόνες συνθήκες και HSP90β που είναι ιδιοσυστασιακή.

1.8.1. Η δομή της HSP90

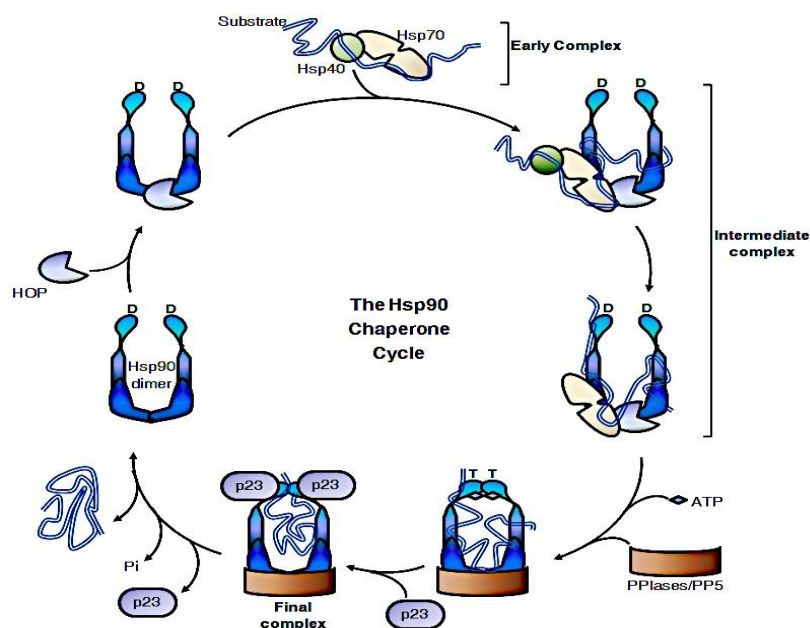
Η HSP90 είναι μία ευέλικτη διμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις διαφορετικές περιοχές (Εικόνα 9):

1. N-τελική περιοχή με δράση ATP-άσης (N-terminal domain, NTD)
2. Μια μεσαία περιοχή πρόσδεσης (M-domain, MD)
3. Μια C-τελική περιοχή διαμερισμού (C-terminal domain, CTD)



Εικόνα 9. Η δομή της HSP90 (Dollins ED. , Warren JJ, Immormino RM., Gewirth D T(2007) Structure of GRP94-Nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. Molec. Cell 28:41-56.)

Η αμινοτελική περιοχή (NTD) είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του ATP και τη σύνδεση του με την ενδιάμεση περιοχή (MD) μέσω μιας ισχυρά φορτισμένης περιοχής (charged linker). Η M-περιοχή εμπλέκεται στην υδρόλυση ATP και συμβάλλει στις θέσεις αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες πελάτες και ορισμένες συν-συνοδούς (co-chaperones). Η C-περιοχή (CTD) είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό του μορίου καθώς και για την πρόσδεση συνοδών μορίων (co-chaperons). Η HSP90 πραγματοποιεί ρυθμιζόμενους κύκλους πρόσδεσης και απελευθέρωσης ATP, μέχρι την τελική απελευθέρωση της πρωτεΐνης στη φυσική διαμόρφωση¹²¹ όπως φαίνεται στην [Εικόνα 10](#).



Εικόνα10. Ο κύκλος της HSP90. Στην «ανοιχτή» διαμόρφωση της πρωτεΐνης όπου έχει δεσμευτεί η ADP, η HSP90 κατά προτίμηση δεσμεύεται από το HOP, (HSP72/Hsp90 organizing protein) ένα βοηθητικό συνοδό μόριο το οποίο μεταφέρει μερικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στην HSP90 μέσω του σύμπλοκου HSP72/40/HIP. Όταν η HSP90 περάσει στο στάδιο δέσμευσης του ATP, απελευθερώνει τα βοηθητικά συνοδά μόρια και οδηγείται στην «κλειστή» διαμόρφωση της. Η πρόσδεση του p23 σταθεροποιεί την HSP90 στη δομή που απαιτείται για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης-πελάτη. Αφού απελευθερωθεί η πρωτεΐνη-πελάτης, η HSP90 παίρνει πάλι την αρχική της διαμόρφωση, και είναι διαθέσιμη για τον επόμενο κύκλο (Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the HSP90 molecular chaperone machinery. *Annu RevBiochem*, 75;271-294).

1.8.2. Η έκκριση της HSP90α

Δεν είναι πλήρως γνωστός ο μηχανισμός έκκρισης της HSP90α στον εξωκυττάριο χώρο. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν τη μεταφορά της στον εξωκυτταρικό χώρο αμέσως μετά τον κυτταρικό θάνατο.¹²² Έχει αποδειχθεί ότι μικρές παραβιάσεις της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης προωθούν την έκκριση της HSP90α, διαδικασία που φαίνεται να εμπλέκει έναν ρυθμιστικό μηχανισμό, όπως εξωσωμική απελευθέρωση.¹²³ Η έκκριση της HSP90α προκαλείται από μια ποικιλία ερεθισμάτων όπως βλάβη του DNA, οξειδωτικό στρες,¹²⁴ χημικοθεραπευτικοί παράγοντες,¹²⁵ αυξητικοί παράγοντες και μηχανισμοί σηματοδότησης,¹²⁶ θερμικό στρες (heat stress), και υποξία.¹²⁷

1.8.3. Οι λειτουργίες «chaperone» της HSP90α

1. Ρόλος στη μεταγωγή σήματος

Η HSP90α ως μηχανισμός τσαπερόνης «chaperone machinery» παίζει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή σήματος μέσω ενεργοποίησης κινασών-ρυθμιστών κυτταρικού κύκλου (τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης-κινάσης) και διαφόρων πρωτεϊνών όπως συνθετάσης νιτρικού οξειδίου και καλσινευρίνης.¹²⁸ Η HSP90α είναι επίσης μέλος του επιφανειακού συμπλέγματος της σηματοδότησης που είναι απαραίτητο για τη σωστή ανοσολογική απάντηση στην LPS.¹²⁹ Λειτουργεί ως συνοδός, όταν όπως και η HSP72, δεσμεύεται με μόρια LPS σηματοδότησης, με αποκορύφωμα την ενεργοποίηση του NF-κB και την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στα μακροφάγα. Η αναστολή της HSP90 έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης μέσα από τις μονάδες TLR σηματοδότησης.

2. «Πυκνωτής» της εξέλιξης (*Capacitor of evolution*)

Η HSP90 επιδρά ως βιοχημικός ρυθμιστής, συνδέεται σταθερά με τα μεταλλαγμένα υποστρώματα και ως εκ τούτου, δεν επιτρέπει τη φαινοτυπική έκφρασή τους.¹³⁰

3. Ενεργοποίηση των στεροειδών υποδοχών (*steroid hormone receptors-SHRs*)

Η HSP90 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των στεροειδών υποδοχών (*steroid hormone receptors-SHRs*) που παίζουν διάφορους ρόλους στην ανθρώπινη φυσιολογία (απάντηση στο στρες, απόπτωση, ρύθμιση της διαφοροποίησης, σεξουαλική ανάπτυξη και γενικώς ομοιόσταση).

4. Ρόλος της HSP90 στη διατήρηση των χρωμοσωμάτων

Μελέτες στη *Drosophila melanogaster* έχουν δείξει ότι η δυσλειτουργία της HSP90 προκαλεί γενετικές μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, καθώς και μεταβολές στην κατάσταση της χρωματίνης.¹³¹

5. Ρόλος της HSP90 στον καρκίνο

Μαζί με τους co-factors (συν-παράγοντες) της η HSP90 ρυθμίζει την απόπτωση των κυττάρων των όγκων. Συγκεκριμένα, καταστέλλει την απόπτωση τους δρώντας μέσω των μονοπατιών των AKT, TNF-υποδοχέα και NK-κB.

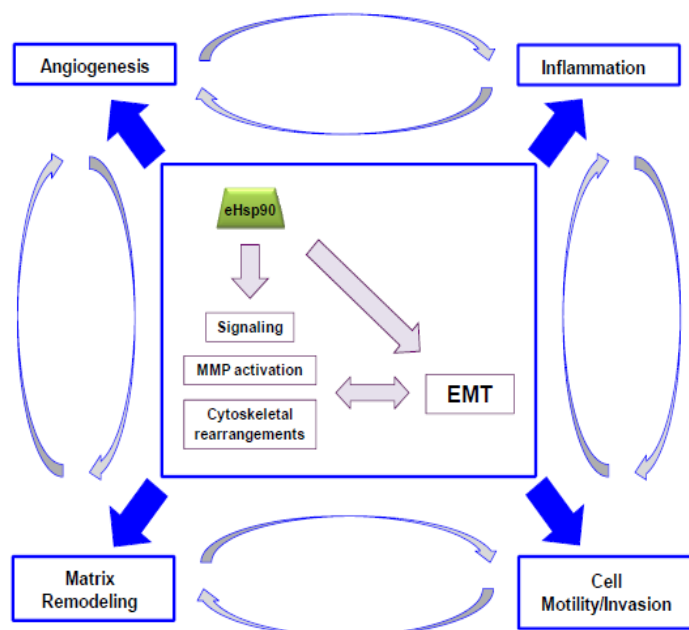
6. Προστασία πρωτεϊνών-πελατών

Η HSP90 σταθεροποιεί και προάγει την σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και επίσης μπορεί να διευκολύνει την αποικοδόμηση τους.¹³² Είναι υπεύθυνη για την τρισδιάστατη αναδίπλωση των πρωτεϊνών-πελατών όπως των kappa-B kinase, IL-1receptor-associated kinase και MAPK.¹²⁴

1.8.4. Λειτουργίες της εξωκυττάριας HSP90α

Πολύ λίγα είναι γνωστά για τις εξωκυττάριας (extracellular) λειτουργίες της HSP90α (eHSP90α). Φαίνεται ότι ο κύριος ρόλος της HSP90α είναι η διευκόλυνση της κυτταρικής κινητικότητας, συμβάλλοντας σημαντικά στην ιστική ίαση.¹²⁶ Σε υποξία, η HSP90α εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, προσδένοντας και σηματοδοτώντας δια μέσω της LDL-Receptor-Related Protein -1 την κυτταρική κινητικότητα, οδηγώντας τελικά στην επανόρθωση του προσβεβλημένου ιστού.¹³³ Μια άλλη λειτουργία είναι η αναδόμηση της θεμέλιας ουσίας των πρωτεϊνών (matrix proteins). Η έκκριση της HSP90α αυξάνεται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, προωθώντας τις αγγειοκινητικές τους δράσεις μέσω της επαγωγής της σύνθεσης των πρωτεϊνών θεμέλιας ουσίας. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μελετών σε ανθρώπους, πρόσφατες μελέτες σε σηπτικά ποντίκια έχουν αποδείξει ότι η ενεργοποίηση της οδού HSP90/Akt ενεργοποιεί την κασπάση-3 αυξάνοντας τα ποσοστά κυτταρικής απόπτωσης.¹⁴⁰ Παράλληλα, φαίνεται ότι η HSP90α αλληλεπιδρά με την annexin-II στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διαμορφώνει/ τροποποιεί τη δράση του πλασμινογόνου που εμπλέκεται στις θρομβωτικές επιλοκές/ εκδηλώσεις σε διαβητικούς.¹³⁴

Άλλες μελέτες έδειξαν ένα ρόλο της HSP90α στην ανάπτυξη της υπερ-αντιδραστικότητας των βρόγχων στο άσθμα δια μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος preallikrein-kininogen.¹³⁵ Η επιφανειακή eHSP90α μπορεί επίσης να συμμετέχει στη διασταυρούμενη παρουσίαση των πεπτιδικών αντιγόνων («cross-presentation»), διατηρώντας την ικανότητα να μετέχει στη ρύθμιση της εγγενούς και προσαρμοσμένης ανοσίας.¹³⁶ Καθώς η HSP90α αλληλεπιδρά με πολλούς υποδοχείς, εκπέμπει ένα δυνατό σήμα κινδύνου, παρέχοντας τη δυνατότητα στον οργανισμό μιας άμεσης προστατευτικής ανοσολογικής απάντησης έναντι της λοίμωξης και του κυτταρικού στρες.



Εικόνα 11. Εξωκυττάρειες λειτουργίες της HSP90α. Κάποιες από τις λειτουργίες –κλειδιά της eHSP90α φαίνονται στις γωνίες της εικόνας: αγγειογένεση, φλεγμονή(inflammation), αναδόμηση θεμέλιας ουσίας (matrix remodeling)και κυτταρική κινητικότητα/ εισβολή (and cell motility and invasion) (Hance MW, Krystal DN, Isaacs JS. The Double-Edged Sword: Conserved Functions of Extracellular Hsp90 in Wound Healing and Cancer. *Cancers*.2014;6:1065-97)

1.9. Σημασία των εξωκυττάρειων HSPs (eHSPs)

Οι HSP72 και HSP90α επάγονται σε απόκριση μίας ποικιλίας κυτταρικών προσβολών.¹³⁷ Ανταποκρινόμενες στο ενδοκυττάριο στρες, οι εξωκυττάρειες HSPs ενεργούν «σηματοδοτώντας» την παρουσία κινδύνου (danger hypothesis), ώστε να διεγείρουν τη μεταβίβαση του ανάλογου σήματος στο ανοσολογικό κυτταρικό σύστημα.¹³⁸ Οι eHSPs είτε βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια είτε στην κυκλοφορία, λειτουργούν ως alarmins-DAMPs ενεργοποιώντας την προφλεγμονώδη αντίδραση σαν απάντηση των κυττάρων στο στρες. Ταυτόχρονα, διεγείρουν και την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό οι eHSPs είναι σε θέση να διαμορφώνουν και τις δυο ανοσολογικές απαντήσεις, την εγγενή και την επίκτητη.

Η μειωμένη έκφραση μιας πιθανά προστατευτικής HSP, όπως είναι η HSP72 ή η HSP90α, θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανεπαρκή ανοσολογική απάντηση όσον αφορά την λεμφοκυτταρική T και B λειτουργία. Έτσι η δυνατότητα καταγραφής της επαγόμενης HSP72 στα περιφερικά λεμφοκύτταρα θα μπορούσε πιθανώς να συμβάλλει στην εκτίμηση

της ανοσολογικής απάντησης στη σοβαρή σήψη. Προχωρώντας ένα ακόμη βήμα, πειράματα *in vitro* κατέδειξαν ότι πειραματική αύξηση της έκφρασης της HSP72 προσφέρει προστασία έναντι ενός ευρέως φάσματος θανατηφόρων κυτταρικών βλαπτικών επιδράσεων και μοντέλων οργανικής βλάβης.¹³⁹

1.9.1. Ο ρόλος της HSP72 στη σήψη και το τραύμα

Οι HSPs είναι πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές καταστάσεις και προστατεύουν τα κύτταρα από πολλαπλούς στρεσογόνους παράγοντες.¹⁴⁰ Σύμφωνα με την «υπόθεση κινδύνου», η απελευθέρωση της HSP72 από σοβαρά κατεστραμμένα κύτταρα ή σε φλεγμονή χρησιμεύει ως σηματοδότης για επικείμενο κίνδυνο σε γειτονικά κύτταρα.¹⁴¹

Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι στη διάρκεια της ενδοτοξιναιμίας η ενδογενής HSP72 ασκεί κατασταλτική δράση στην απελευθέρωση των κυτταροκινών και ρυθμιστική δράση στο ινωδολυτικό σύστημα και πήξη.¹⁴²⁻¹⁴³ Φαίνεται μάλιστα ο τι οι ενδοκυττάριας HSPs εμπλέκονται στην προστασία του οργανισμού δρώντας άμεσα στην οδό του κυτταρικού θανάτου μέσω της καταστολής της υπερβολικής έκφρασης των γονιδίων φλεγμονής και απόπτωσης.¹⁴⁴ Απελευθερούμενες στον εξωκυττάριο χώρο, οι HSPs λειτουργούν ως DAMPs, ενεργοποιώντας την προφλεγμονώδη αντίδραση σαν απάντηση των κυττάρων που προσβάλλονται ή εκτίθενται σε στρες. Έτσι, η εξωκυττάρια έκλυση HSP72 ως «σήματος κινδύνου» οδηγεί σε ελεγχόμενη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των μονοπατιών LPS TLR4 / CD14 μιας εξαρτώμενης σηματοδότησης.¹⁴⁵

Πολλές μελέτες σε ζωικά μοντέλα σήψης έχουν δείξει έναν προστατευτικό ρόλο της HSP72 σε ποσοστό 95,8%, αλλά μόνο σε 16,7% σε μελέτες στους ανθρώπους.¹⁴⁶ Εξάλλου η αύξηση των επιπέδων των HSP72 στον ορό συσχετίστηκε θετικά με την επιβίωση μετά το τραύμα, την παρουσία λοίμωξης και τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο σε ενήλικες. Σύμφωνα με τον Hashiguchi και συνεργάτες, η έκφραση των HSP27, HSP60, HSP72 και HSP90a ήταν αυξημένη σε πολυμορφοπύρηνια σπητικών ασθενών έναντι υγιών εθελοντών, και συνδυαζόταν με αυξημένη οξειδωτική δράση και κατασταλμένη απόπτωση.¹⁶³ Πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της επαγόμενης HSP72 είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία έναντι της πνευμονικής βλάβης που σχετίζεται με σήψη. Σε ζωικό μοντέλο σήψης

δείχθηκε ότι η απουσία της HSP72 ενισχύει την οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια (ARDS) και ενεργοποιεί την φλεγμονώδη απάντηση οδηγώντας στην αύξηση της θνητότητας, υπονοώντας ένα δυνητικό θεραπευτικό ρόλο για την HSP72 στη σήψη.¹⁴⁷

Αντίθετα, σε άλλες μελέτες, η αύξηση της HSP72 συνδυάστηκε με κακή έκβαση σε ασθενείς με σοβαρή ηπατική νόσο,¹⁴⁸ στεφανιαία νόσο,¹⁴⁹ προεκλαμψία, αποφρακτικές κρίσεις στη δρεπανοκυτταρική νόσο,¹⁵⁰ διαβητική κετοξέωση,¹⁵¹ και σηπτική καταπληξία.¹⁵² Έχει βρεθεί επίσης ότι τα επίπεδα των HSP72 ήταν σημαντικά αυξημένα σε παιδιά με σηπτική καταπληξία σε σχέση με παιδιά χωρίς σήψη και ότι υπάρχει συσχέτιση με την κακή έκβαση.^{152,172} Άλλες μελέτες, όπως αυτή του Gelain, έχουν επίσης δείξει ότι όσο πιο έντονη είναι η οξειδωτική βλάβη τόσο πιο ψηλά είναι τα επίπεδα της HSP72 στον ορό των ασθενών με σήψη και ότι αυτά σχετίζεται με τη θνητότητα.¹⁵³

Ανεξήγητη παραμένει η σημασία της συσχέτισης αυξημένων επιπέδων HSP72 και θνητότητας στη σηπτική καταπληξία. Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν μεγαλύτερη απελευθέρωση των HSP72 από τα νεκρωμένα κύτταρα όταν το στρες κατά την διάρκεια της σηπτικής καταπληξίας είναι εντονότερο. Στην περίπτωση όμως αυτή, αναμένεται ότι μεγαλύτερη θα είναι και η απάντηση από τις HSP72 που, αντιδρώντας ως «τσαπεροκίνες», μπορούν να ενεργοποιούν μια ισχυρή συστηματική φλεγμονώδη απάντηση. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η HSP72 εκδηλώνει μια προστατευτική δράση σε χαμηλότερα επίπεδα σαν φυσιολογική απάντηση σε λοίμωξη ή στρες, αλλά προκαλεί μια δυσανάλογη ανοσολογική απάντηση όταν ένα κρίσιμο επίπεδο κινδύνου ξεπερνιέται, με αποτέλεσμα πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια.

Στο τραύμα το ανοσολογικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νέκρωση των νευρώνων μέσω της ενεργοποίησης μικρογλιακών κυττάρων, επιστράτευσης λευκοκυττάρων και έκκρισης κυτταροκινών. Η συμμετοχή της HSP72 στην ανοσολογική απάντηση μετά την εγκεφαλική κάκωση έχει ως ρόλο την αντιρρόπηση μιας υπερβολικής φλεγμονώδους κατάστασης.¹⁵⁴ Πειραματικές μελέτες in vivo και in vitro έχουν αποδείξει ότι η παραγωγή της HSP72 ασκεί προστατευτική δράση στην τραυματική βλάβη, ισχαιμία, και αιμορραγία.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵ Μελέτες σε ενήλικες με εγκεφαλική ισχαιμία ή τραυματική βλάβη, έχουν επίσης αναδείξει την νευρο-προστατευτική δράση της HSP72.¹⁵⁶ Οι Pittet και συνεργάτες έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα της HSP72 που ανιχνεύεται στον ορό των ασθενών με σοβαρό τραύμα συσχετίζονται με καλύτερη έκβαση.¹⁵⁷ Εντούτοις, μελέτες σε παιδιά με ΚΕΚ

έδειξαν συσχέτιση υψηλών επιπέδων της HSP72 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την κακή έκβαση.¹⁵⁸

Ο τρόπος με τον οποίο η HSP72 μπορεί να προάγει ή να καταστείλει την φλεγμονώδη αντίδραση συμμετέχοντας στη βελτίωση της νευρολογικής βλάβης φαίνεται να σχετίζεται με τις ιδιότητες της ως DAMP που προσδένεται και διεγείρει τη μικρογλία, κύτταρο που παίζει σημαντικό ρόλο στην εγγενή ανοσολογική απάντηση.¹⁵⁹ Μια ακόμη ενδιαφέρουσα πτυχή της αντίδρασης της HSP72 στο τραύμα είναι ότι η αυξημένη έκφραση της φαίνεται να παίζει ρόλο όχι μόνο στην προστασία και επιβίωση των κυττάρων αλλά και την ανάρρωση μετά από εγκεφαλικές προσβολές,¹⁶⁰ επηρεάζοντας την οδό της ανοσολογικής απάντησης,⁹⁸ περιορίζοντας τους ρυθμούς κυτταρικού θανάτου και απόπτωσης.¹⁶¹ Ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος αλλά κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της HSP72 αυξάνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 επηρεάζοντας έτσι τη διαδρομή στο μονοπάτι διαδικασία των κασπασών.¹⁴²

1.9.2. Ο ρόλος της HSP90α στη σήψη και το τραύμα

Η HSP90α δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί στη σοβαρή σήψη και στο τραύμα, παρόλο που θεωρείται πολύ σημαντική για τη λειτουργία διάφορων κυτταρικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η HSP90α αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής και την οδό του μεταγραφικού σήματος, όπως οι υποδοχείς στεροειδών, κινάσες, και μεταγραφικοί παράγοντες.¹⁶² Σε ενήλικες με σήψη, η αύξηση της έκφρασης της επαγόμενης HSP90α φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των ουδετερόφιλων.¹⁶³ Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η καταστολή της HSP90 στη σήψη μειώνει σημαντικά τη διαφυγή τριχοειδών (leakage) του εντέρου και εξασθενεί την εντερική προσβολή,¹⁶⁴ αποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο της HSP90 στη δυσλειτουργία του εντερικού ενδοθηλίου.¹⁶⁵ Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση του ανασυνδυασμένου αντισώματος έναντι της HSP90 μαζί με λιποσωμική αμφοτερικίνη B προκάλεσε σημαντική βελτίωση της έκβασης των ασθενών με διεισδυτική καντιντίαση.¹⁶⁶ Σε αντίθεση με τα σηπτικά ποντίκια, τα ποντίκια που πήραν καταστολείς της HSP90 πριν την ενδοτοξίνη παρουσίασαν παρατεταμένη επιβίωση, μείωση ή κατάργηση της αύξησης των συστηματικών και πνευμονικών φλεγμονωδών παραμέτρων, εξασθένιση της τριχοειδούς διαφυγής (leakage), και αποκατάσταση της πνευμονικής λειτουργίας.¹⁶⁷

1.10. ΥΠΟΘΕΣΗ

Η παρούσα έρευνα εξετάζει την υπόθεση ότι:

- 1) τα επίπεδα των HSP72 και HSP90α στον ορό ασθενών με σοβαρή σήψη είναι πιθανό να επηρεάζονται σημαντικά σε σύγκριση με εκείνα υγιών παιδιών και ασθενών με απλή σήψη ή τραύμα.
- 2) τα επίπεδα των HSP72 και HSP90α θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά της έντασης του στρες και να σχετίζονται με τον βαθμό βαρύτητας της νόσου, με μεσολαβητές φλεγμονώδους αντίδρασης και με την πολυοργανική ανεπάρκεια (MOFS) ή τη θνητότητα
- 3) η οξεία μεταβολική αντίδραση είναι πιθανόν να διαφέρει στο μη-λοιμώδες SIRS σε σύγκριση με εκείνο της σοβαρής σήψης όσον αφορά την οξεία επίδραση του στρες επί των επιπέδων των λιπο-πρωτεϊνών και των επιπέδων γλυκόζης και τριγλυκεριδίων, καθώς δεν ακολουθεί τη δραματική αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσης που παρατηρείται στη σήψη.
- 4) η έκφραση της CD64 στα πολυμορφοπύρρηνα ασθενών με οξεία φλεγμονώδη αντίδραση, εφόσον επίσης αυξάνεται πρώιμα, θα πρέπει να σχετίζεται με το χαρακτηριστικό μεταβολικό πρότυπο της σοβαρής σήψης όπως αυτό εκδηλώνεται στην οξεία φάση της νόσου
- 5) οι HSP72, HSP90α, βάσει των ανωτέρω προϋποθέσεων, αναμένεται να συσχετίζονται θετικά με δείκτες οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης όπως οι nCD64 και ILs και αρνητικά με δείκτες μεταβολικού προφίλ όπως οι LDL και HDL

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η σύγκριση των επιπέδων εξωκυττάριας HSP72 και HSP90α στον ορό παιδιών της ΜΕΘ με σοβαρή σήψη με τα αντίστοιχα επίπεδα ορού υγιών παιδιών και ασθενών με απλή σήψη ή τραύμα. Παράλληλα συσχετίζονται τα επίπεδα των HSP72 και HSP90α με τα επίπεδα των κυτταροκινών, TNF-α και ιντερλευκινών IL-6, IL-8 και IL-10 στην οξεία φάση του στρες. Τέλος συσχετίζονται τα επίπεδα των HSP α) με την έκφραση των κυτταρικών υποδοχέων CD11b και CD64 σε μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα παιδιών με σοβαρή σήψη (συμπεριλαμβάνεται η σηπτική καταπληξία), σήψη, τραύμα και ομάδα ελέγχου (υγιή παιδιά), β) με τους βιοδείκτες PCT, CRP γ) με τους μεταβολικούς δείκτες γλυκόζη, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, LDL και HDL, δ) με τη βαρύτητα της νόσου (Pediatric Risk of Mortality II score, TISS και PELOAD), ε) τη θνητότητα και στ) άλλους δείκτες έκβασης (διάρκεια νοσηλείας, νοσοκομειακές λοιμώξεις).

Η σημασία των μετρήσεων και συσχετίσεων αυτών έγκειται στο ότι τα αποτελέσματά τους είναι δυνατόν να συνεισφέρουν στη διαλεύκανση του ρόλου των τσαπεροκινών στα βαριά άρρωστα παιδιά και να οδηγήσουν στην αποτελεσματική διερεύνηση και αποδοχή ή απόρριψη της ανωτέρω διατυπωθείσης υπόθεσης. Η περαιτέρω έρευνα θα αξιολογήσει τις προοπτικές διαγνωστικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων στο επίπεδο των HSP72 και HSP90α.

2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Βιοηθική και δεοντολογία της έρευνας

Αυτή η προοπτική μελέτη παρατήρησης διεξήχθη στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στην Παιδιατρική Μονάδα Εντατικής Θεραπείας μεταξύ Ιανουαρίου 2009 και Σεπτεμβρίου 2014. Η μελέτη εγκρίθηκε (στις 25/2/2008, Αριθμ.Πρωτ.141) από την επιτροπή βιοηθικής και έρευνας του Πανεπιστημίου της Κρήτης και την επιστημονική επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Γραπτή συναίνεση πάρθηκε από τους γονείς πριν από την ένταξη στη μελέτη αυτή. Όλα τα δεδομένα ήταν ανώνυμα.

2.2.2. Ασθενείς

Μελετήθηκαν ασθενείς (αγόρια και κορίτσια) με α) SIRS που οφειλόταν σε τραύμα χωρίς λοίμωξη, β) με σήψη (Σ) και γ) με βαριά σήψη ή σηπτικό σοκ (ΣΣ), οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Οι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη εντός 24 ωρών από την εισαγωγή τους στην μονάδα. Μια άλλη ομάδα από υγιή παιδιά (Υ) αντίστοιχης ηλικίας αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Ήταν φυσιολογικά παιδιά που εξετάστηκαν για εμβολιασμό ή τακτική παρακολούθηση στα εξωτερικά παιδιατρικά ιατρεία ή παιδιά προγραμματισμένα να υποβληθούν σε επιλεκτικές χειρουργικές επεμβάσεις (βουβωνοκήλη, κρυψορχία). Ο πληθυσμός μελέτης επομένως, σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό της μελέτης, χωρίστηκε σε 4 ομάδες:

Στην **ομάδα Α (Υγιή παιδιά – Μάρτυρες)** περιλαμβάνονται υγιή παιδιά αγόρια (n=16) και κορίτσια (n=9) ηλικίας 1 μηνός-18 ετών (n=25).

Στην **ομάδα Β (SIRS/ΚΕΚ)** περιλαμβάνονται παιδιά (n=23) αγόρια (n=15) και κορίτσια (n=8), ηλικίας 1 μηνός-18 ετών που νοσηλεύτηκαν στην ΜΕΘ Παίδων λόγω τραύματος (μη σηπτικό SIRS, όπως ορίζεται σύμφωνα με τα κριτήρια της Διεθνούς Παιδιατρικής Ομοφωνίας) (Παράρτημα Α).

Στην **ομάδα Γ (Σήψη)** περιλαμβάνονται παιδιά (n=20), αγόρια (n=12) και κορίτσια (n=8), ηλικίας 1 μηνός-18 ετών που εισήχθησαν στην ΜΕΘ Παιδών λόγω σήψης. Η σήψη ορίζεται, σύμφωνα με την Διεθνή Παιδιατρική Ομοφωνία Σήψης, ως SIRS με παρουσία ή ως αποτέλεσμα μιας ύποπτης ή αποδεδειγμένης λοίμωξης (ΛΟΙΜΩΞΗ: Ύποπτη ή αποδεδειγμένη (με θετική καλλιέργεια, χρώσεις ιστού ή PCR) λοίμωξη, προκαλούμενη από οποιοδήποτε παθογόνο ή κλινικό σύνδρομο που συνδέεται με υψηλή πιθανότητα λοίμωξης. Η παρουσία λοίμωξης τεκμηριώνεται από τα θετικά ευρήματα στην κλινική εξέταση, τον απεικονιστικό έλεγχο ή τις εργαστηριακές εξετάσεις.

Στην **ομάδα Δ (Σοβαρή Σήψη)** περιλαμβάνονται παιδιά (n=22), αγόρια (n=13) και κορίτσια (n=9), ηλικίας 1 μηνός-18 ετών που εισήχθησαν στην ΜΕΘ Παιδών λόγω σοβαρής σήψης. Στην σοβαρή σήψη συμπεριλαμβάνεται και η σηπτική καταπληξία.

Η κατανομή σε ομάδες ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη συνεχίστηκε έως ότου τουλάχιστον 20 παιδιά να έχουν συμπεριληφθεί σε κάθε ομάδα. Δεκαπέντε παιδιά από την ομάδα σοβαρής σήψης συμπλήρωναν κριτήρια σηπτικού σοκ. Όλοι οι ασθενείς με σηπτικό σοκ και σοβαρή σήψη είχαν SIRS, λοίμωξη και πάνω από 2 δυσλειτουργίες οργάνων, απαρτίζοντας την ομοιογενή ομάδα ΣΣ(Παρά το γεγονός ότι μόνο 3 από την ομάδα με σοβαρή σήψη εισήχθησαν στη ΜΕΘ με σηπτικό σοκ, όλοι οι ασθενείς με σοβαρή σήψη είχαν εκτός από σήψη (Σ) περισσότερες από 2 δυσλειτουργίες οργανικών συστημάτων, απαρτίζοντας την ομοιογενή ομάδα ΣΣ). Ασθενείς με μη σηπτικό SIRS είχαν σοβαρή κρανιοεγκεφαλική κάκωση και σχεδόν όλοι είχαν πρόσθετες ελεγχόμενες δευτερεύουσες κακώσεις (θλάσεις πνευμόνων, κατάγματα, ρήξεις ήπατος ή σπλήνας).

Οι ασθενείς υποστηρίχθηκαν αρχικά με φορτίσεις (εφόσον απαιτήθηκε) και συντήρηση υγρών με φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%) και στη συνέχεια τέθηκαν σε τυποποιημένα διαλύματα γλυκόζης με ηλεκτρολύτες. Μετά από 12 ώρες από την εισαγωγή και την ολοκλήρωση της αιμοληψίας έγινε έναρξη εντερικής διατροφής ενώ κανένας από τους ασθενείς δεν έλαβε παρεντερική διατροφή. Το Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM),¹⁶⁸ το Therapeutic Intervention Scoring System (TISS) τροποποιημένο για παιδιά,¹⁶⁹ και το Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score (PELOD)¹⁷⁰ χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες εκτίμησης της σοβαρότητας της νόσου κατά την ημέρα της αιμοληψίας. Χρησιμοποιήθηκε η ταξινόμηση της σήψης, σοβαρής σήψης, σηπτικού σοκ, και SIRS εξαιτίας τραυματικής βλάβης του εγκεφάλου σύμφωνα με τους ορισμούς της International Pediatric Sepsis Consensus Conference¹⁷¹ (Παράρτημα Α). Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και

δείκτες έκβασης όπως είναι η θνητότητα, η διάρκεια νοσηλείας (LOS) και η διάρκεια του μηχανικού αερισμού (LOMV), επίσης καταγράφηκαν. Με βάση τα κριτήρια Wilkinson, ορίστηκε η πολυοργανική ανεπάρκεια (MOFS, παρουσία τουλάχιστον 2 συστημικών οργάνων ανεπαρκειών).¹⁷² Κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης, αποκλείστηκαν πενήντα δύο ασθενείς με κακοήθειες, μεταβολικές ασθένειες ή ενδοκρινοπάθειες (διαβήτης, υπερχοληστερολαιμία) ή ανοσοκαταστολή.

Καλλιέργειες εισόδου αίματος, ούρων, βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), και επιχρίσματα εν τω βάθην ελήφθησαν σε όλους τους ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, αν και οι περισσότεροι από τους ασθενείς αυτούς ήταν ήδη σε αντιβιοτικά πριν από την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Όλοι οι ασθενείς SIRS είχαν σοβαρή τραυματική εγκεφαλική βλάβη (Κλίμακα Γλασκώβης (GCS) <9) και ήταν σε συνεχή παρακολούθηση της ενδοκράνιας πίεσης.

2.2.3. Αναλύσεις δειγμάτων

Οι αιμοληψίες των παιδιών που μελετήθηκαν, ελήφθησαν τις πρώτες 24 ώρες από την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ Παιδών. Στον ορό αίματος μετρήθηκαν: οι εξωκυττάριας HSP72 και HSP90α, ο TNF-α, οι κυτοκίνες IL-6, -8, και -10, προκαλσιτονίνη (PCT), CRP, γλυκόζη αίματος, ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, LDL- και HDL-χοληστερόλη. Στην αιμοληψία της πρώτης ημέρας, σε δείγμα με EDTA, μετρήθηκε η κυτταρική έκφραση των CD11b, CD64 και ο αριθμός των λευκοκυττάρων. Τα δείγματα για HSP, και κυτοκίνες φυλάχθηκαν στους -80° C μέχρι την ολοκλήρωση της συλλογής και ανάλυση τους. Οι αναλύσεις των δειγμάτων στα εργαστήρια έγιναν χωρίς να είναι γνωστή η κατανομή των ασθενών ή άλλα κλινικά δεδομένα (τυφλή μελέτη).

1.1.1.5 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Τα επίπεδα πρωτεΐνης HSP72 και HSP90α στον ορό αίματος προσδιορίστηκαν με την 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. Οι ευαισθησίες των ανιχνεύσεων ήταν 90 pg/mL για την Hsp72 και 50 pg/mL για την Hsp90α.

1.1.1.6 Χημειοφωταύγεια

Οι TNF-α, IL-6, IL-8, και IL-10 μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ χημειοφωταύγειας (IMMULITE 100 Siemens Medical Solutions Diagnostics Limited, Surrey, UK). Οι ευαισθησίες των προσδιορισμών ήταν <2 pg/ml για την IL-6, <1 pg/ml για την IL-10, 2 pg/ml για την IL-8, 4 pg/mL για TNF-α, αντίστοιχως. Όλα τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία εις διπλούν, με τη μέση τιμή να χρησιμοποιείται αν ο συντελεστής διακύμανσης ήταν <20%.

1.1.1.7 Κυτταρομετρία ροής

Δείγματα ολικού αίματος μεταφέρονταν αμέσως στο εργαστήριο για ανάλυση των CD11b και CD64 με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα 100 μL αίματος επώαστηκαν με CD11b (κλώνος 10: Bear1) συζευγμένο με Fluoroisothiocyanate (FITC) και CD64 (κλώνος

22) συζευγμένο με Phycoerythrin (PE) - επί 20 λεπτά, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. FITC και PE-mouse IgG χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control) (αντισώματα από IMMUNOTECH- Beckman Coulter, Μασσαλία, Γαλλία). Ακολούθησε έκπλυση με PBS + 2% FCS + 0.05% Sodium Azide. Μετά τη λύση των ερυθρών και μονιμοποίηση (IMMUNOPREP- BECKMAN COULTER, Mervue, Galway, Ireland) η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των αντιγόνων έγινε σε κυτταρομετρητή ροής Epics-Coulter. Αρχικά τα κύτταρα διαχωρίστηκαν σε ιστόγραμμα (gated) σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (κοκκίωση κ μέγεθος — πλάγια -εμπρόσθια σκέδαση/ side- forward scatter αντίστοιχα) και στη συνέχεια ανάλογα με την έκφραση των συνδεδεμένων με τη φθορίζουσα ουσία. Ανακτήθηκαν και αναλύθηκαν περίπου 30000 κύτταρα σε κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε χωριστά για καθένα από τα: λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό (%) κυττάρων με θετική έκφραση για τα αντίστοιχα αντιγόνα.

1.1.1.8 Πρωτεΐνες οξείας φάσης και μεταβολικοί δείκτες

Προσδιορισμοί CRP πραγματοποιήθηκαν στο immunonephelometer της Dade Behring BN II (Dade Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ). Τα επίπεδα της CRP < 0.8 mg/dL θεωρούνται φυσιολογικές. Η PCT μετρήθηκε με ανοσοφωτομετρική δοκιμασία (Immunoluminometric: Lumitest-PCT, Brams-Diagnostica, Berlin, Germany). Επίπεδα PCT > 0.5 ng/mL θεωρήθηκαν μη φυσιολογικά (τιμές αναφοράς εργαστηρίου). Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης, TG, TC, HDL ή LDL μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φωτομετρικό αναλυτή (Bayer Advia 1650 Chemistry Analyzer). Οι αιματολογικοί δείκτες πλάσματος μετρήθηκαν με συνήθεις εργαστηριακές μεθόδους. Όλοι οι μεταβολικοί δείκτες και πρωτεΐνες οξείας φάσης επαναλήφθηκαν την ημέρα 2 και 3 μετά την εισαγωγή στις ομάδες Σ, ΣΣ και SIRS (n = 220, συμπεριλαμβανομένης της ημέρας 1 για την ομάδα Υ).

2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Το τεστ Kolmogorov-Smirnoff κατέδειξε μη-κανονική κατανομή των δεδομένων. Τα αριθμητικά δεδομένα ως εκ τούτου, παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή και εύρος τιμών. Οι

συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν με τη χρήση της δοκιμασίας Kruskal-Wallis. Οι μεταβλητές που έδειξαν διαφορές μεταξύ των 4 ομάδων συγκρίθηκαν ανά ζεύγη με το Mann-Whitney test. Για τη σύγκριση των μετρήσεων που σχετίζονταν με δείγματα σειράς 3 ημερών χρησιμοποιήθηκε η αμφίδρομη ανάλυση Friedman για μη-παραμετρικές διακυμάνσεις κατά τάξεις. Η συσχέτιση μεταξύ συνεχών μεταβλητών αναλύθηκε με το Spearman test. Οι κατηγορικές μεταβλητές συγκρίθηκαν με το χ^2 τεστ. Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η επίδραση βιολογικών και κλινικών δεικτών στη θνητότητα. Ένα διπλής όψης επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$ χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου της IBMSPSS Statistics (version 22.0; Chicago, IL).

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το φύλο των ασθενών των ομάδων που μελετήθηκαν. Οι σηπτικοί, αλλά όχι οι σοβαρά σηπτικοί, ασθενείς ήταν νεότεροι σε σύγκριση με τους υγιείς και την ομάδα τραύματος. Μόνο 2 ασθενείς στην ομάδα SIRS έχασαν τη ζωή τους, και οι δύο είχαν υποστεί πολλαπλά τραύματα από τροχαία ατυχήματα (ασθενείς με την υψηλότερη PRISM και TISS) και επίσης 2 ασθενείς με σηπτικό σοκ (ασθενείς με ανεπάρκεια οργάνων πολλαπλών συστημάτων) πέθαναν. Οι ασθενείς με σοβαρή σήψη είχαν υψηλότερα σκορ βαρύτητας της νόσου, ανεπάρκειες οργάνων, και μακρύτερη παραμονή στη ΜΕΘ ή σε διάρκεια μηχανικού αερισμού σε σύγκριση με τις ομάδες απλής σήψης και τραύματος (Πίνακας 1).

Στις δύο σηπτικές ομάδες, τα στελέχη των παθογόνων που απομονώθηκαν ήταν τα εξής: Καλλιέργειες αίματος: *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, (n=1 κάθε μία), *Neisseria meningitidis* και είδη *Candida species* (n = 2 η κάθε μία) and *Staphylococcus haemolyticus* (n=4); BAL: *Pseudomonas aeruginosa* (n = 5), *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria*, *Mycoplasma pneumoniae* (n=1 κάθε μία); Ούρων: *Pseudomonas aeruginosa* (n = 2), *Escherichia coli* (n=1); Κεντρικού νευρικού συστήματος: *Neisseria meningitidis* (n = 1). Ασθενείς με αρνητικές καλλιέργειες είχαν ήδη λάβει αντιβιοτικά πριν την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Σε ασθενείς με ΚΕΚ δεν απομονώθηκαν παθογόνοι μικροοργανισμοί από το αίμα ή σε δείγματα από άλλες θέσεις.

2.3.1. Ο ρόλος των HSP72 και HSP90α στη σήψη και τραύμα

Οι ασθενείς σε αμφοτέρως τις σηπτικές ομάδες είχαν αυξημένα επίπεδα HSP90α, HSP72, IL-6, IL-8 και IL-10 σε σύγκριση με την ομάδα υγιών(Υ). Στην ομάδα σοβαρής σήψης(ΣΣ) ήταν αυξημένα τα επίπεδα HSP72, IL6 και TNF-α σε σύγκριση με την ΚΕΚ (Πίνακας 2). Οι

Πίνακας 1. Βασικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ομάδων μελέτης

	Υγιείς Μάρτυρες	Τραύμα (SIRS)	Σήψη	Σοβαρή Σήψη	p value*
Πληθυσμός (n)	25	23	20	22	
Ανδρικό φύλλο, n (%)	14 (66%)	13 (72%)	10 (62%)	9 (60%)	0.8
Ηλικία [χρόνια]	9 (2-15.5) ^e	8.5 (2-18) ^d	4.25 (1-18) ^{d,e}	6 (1-18)	0.029
Θνητότητα (n)	0	2	0	2	0.5
MOSF (n)	0	9	0	22	0.0001
PRISM II	NA	11 (6-29)	11 (2-20)	15 (6-26)	0.12
PELOD	NA	3 (1-21) ^b	2 (1-13) ^c	13 (5-32) ^{b,c}	0.0001
TISS	NA	38.5 (25-57)	36.5 (12-47) ^c	42 (32-59) ^c	0.14
LOS [ημέρες]	NA	6.5 (3-18) ^b	10.5 (2-98)	16 (3-235) ^b	0.0001
LOMV [ημέρες]	NA	4.5 (1-14) ^b	6 (1-95)	11 (1-235) ^b	0.0001

Τα δεδομένα δίδονται ως διάμεση τιμή (εύρος) ή n (%) των ασθενών; MOSF, Multiple Organ System Failure; PRISM, Pediatric Risk of Mortality; TISS, the Therapeutic Intervention Scoring System; PELOD, Paediatric Logistic Organ Dysfunction; LOS, Length Of Stay; LOMV, Length Of Mechanical Ventilation *Kruskal-Wallis Test p values; ^{a-f} Mann-Whitney U Test p<0.05: ^aΣΣ έναντι Υ, ^bΣΣ έναντι SIRS, ^cΣΣ έναντι Σ, ^dΣ έναντι SIRS, ^eΣ έναντι SIRS, ^fSIRS έναντι Υγιών

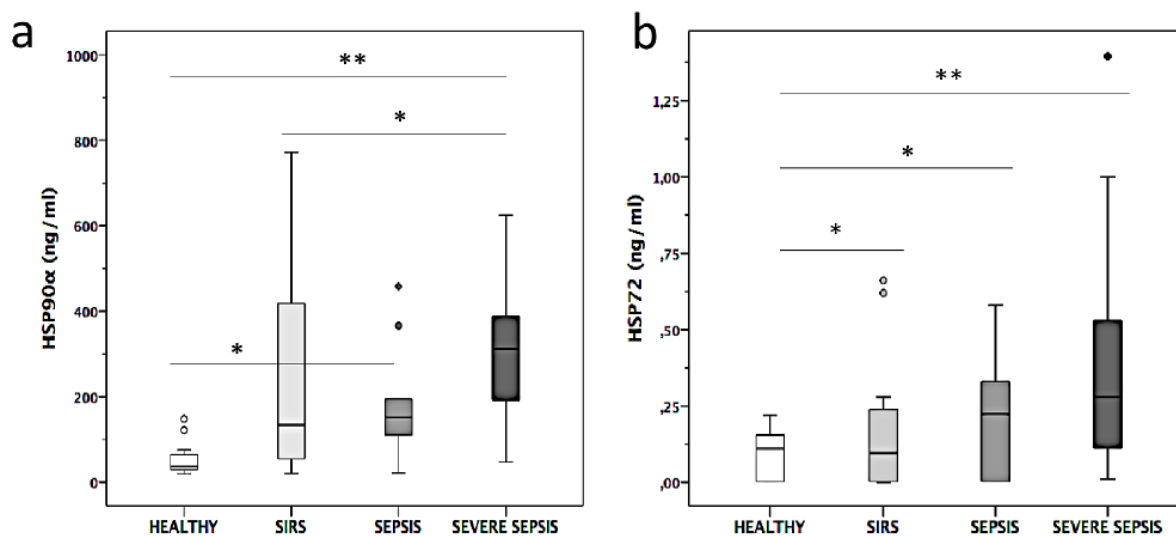
παιδιατρικοί ασθενείς με ΚΕΚ (SIRS) παρουσίασαν αυξημένη HSP90α, IL-6 και IL-8 σε σύγκριση με την ομάδα υγιών παιδιών.

Πίνακας 2. Επίπεδα εξοκυττάρων HSP και ιντερλευκινών την ημέρα της εισαγωγής στη ΜΕΘ στις 4 ομάδες

	Υγιείς Μάρτυρες	Τραύμα (SIRS)	Σήψη	Σοβαρή Σήψη	p value*
Διάμεσες τιμές (εύρος)					
HSP72 (ng/ml)	0.11 (0.01-0.22) ^{a,e}	0.1 (0.03-0.66) ^b	0.25 (0.07-0.58) ^e	0.19 (0.09-1.39) ^{a,b}	0.047
HSP90α (ng/ml)	35.5 (18-148) ^{a,e,f}	133 (19-773) ^f	156 (21-520) ^e	298 (47-1716) ^a	0.0001
IL-8 (ng/ml)	6.4 (4-32) ^{a,e,f}	25 (7.4-95.8) ^f	22 (7-861) ^e	84 (6-7100) ^a	0.02
IL-10 (ng/ml)	4.6 (4-32) ^{a,e}	11 (7-177)	17 (7-1100) ^e	38 (4-876) ^a	0.07
TNF-α (pg/ml)	13 (9-65)	12 (9-15) ^b	15 (7-66)	22 (11-95) ^b	0.043
IL-6 (pg/ml)	1 (1-11) ^{a,e,f}	20 (2-77) ^{b,f}	15 (3.5-1100) ^e	104 (22-1100) ^{a,b}	0.001

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή (εύρος) ή n (%) των ασθενών. *Kruskal-Wallis Test p values; ^{a-f} Mann-Whitney U Test p<0.05: ^a ΣΣ έναντι Υγείων, ^b ΣΣ έναντι SIRS, ^c ΣΣ έναντι Σ, ^d Σ έναντι SIRS, ^e Σ έναντι SIRS, ^f SIRS έναντι Υγείων

Οι ασθενείς των ομάδων Σ, ΣΣ και SIRS είχαν αυξημένη HSP90α σε σχέση με ομάδα Υγείων (Εικόνα 12a). Οι ομάδες της σήψης, ιδιαίτερα ΣΣ, είχαν επίσης αυξημένη HSP72 σε σχέση με υγιείς και/ή SIRS (Εικόνα 12b).



Εικόνα 12. (a) Οι ασθενείς με σοβαρή σήψη (SS), σήψη (S) ή SIRS είχαν αυξημένες εξωκυττάριας HSP90α σε σχέση με τους υγιείς (H). (b) Οι ασθενείς με SS ή S είχαν αυξημένες εξωκυττάριας HSP72 σε σχέση με τις ομάδες H και/ή SIRS. Κάθε πλαίσιο-κουτί απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (T-μπαρ και οριζόντιες γραμμές) υποδεικνύουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι κύκλοι (outliers) και οι ρόμβοι (extremes) υποδεικνύουν τιμές εκτός των ορίων ακραίων τιμών. *p< 0.05; **p< 0.01; †p< 0.001 (Mann-Whitney tests). SIRS, systemic inflammatory response syndrome; HSP, heat shock protein.

Παράλληλα με την αύξηση της HSP90α παρατηρήθηκαν: αύξηση των επιπέδων HSP72, IL-6, IL-8 και IL-10 στις ομάδες της σήψης σε σχέση με την Υ. Αυξημένες τιμές HSP72, IL-6 και TNF-α στη ΣΣ σε σχέση με το SIRS. Αυξημένες IL-6 και IL-8 στην ομάδα SIRS σε σχέση με την Υ (Πίνακας 2). Η HSP90α, παράλληλα με την HSP72, αυξήθηκαν στην ομάδα

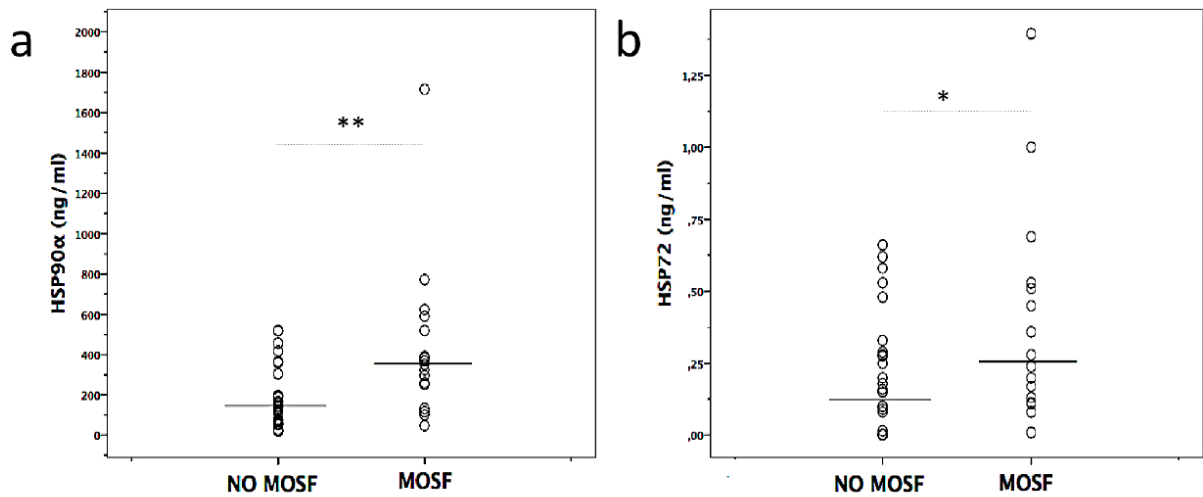
MOSF συγχρόνως με μια: α) σημαντική αύξηση των φλεγμονωδών δεικτών nCD64, IL-6, CRP, και PCT.β) Σημαντική μείωση των μεταβολικών δεικτών (nutritional indices) χοληστερόλη, HDL, και LDL, αλλά όχι και της γλυκόζης (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Επίπεδα τωνHSPs φλεγμονωδών βιοδεικτών και μεταβολικών δεικτών στο οξύ στρες (τις πρώτες 24ώρες) σε παιδιά σε μηχανικό αερισμό με σήψη ή SIRS ταξινομημένα ανάλογα με την παρουσία πολυοργανικής ανεπάρκειας (MOSF)

	Non-MOSF	MOSF	<i>p value*</i>
Number	34	31	
HSP90α (ng/ml)	141 (19-520)	340 (47-1716)	0.003
HSP72 (ng/ml)	0.13 (0.00-0.66)	0.26 (0.01-1.39)	0.018
ICD64 (%)	0.3 (0-3.8)	0.5 (0.1-2.9)	0.33
mCD64 (%)	87 (0-97)	91 (42-99)	0.25
nCD64 (%)	25.7 (0.5-99)	95 (3-100)	0.02
CRP (mg/dl)	4.2 (0.3-25)	13 (0.3-41)	0.003
PCT (ng/ml)	0.6 (0.3-12)	11 (0.3-12)	0.001
WBC (K/μl)	12 (2-40)	11 (1.5-47)	0.33
IL-8 (ng/ml)	21 (7-861)	66 (6-7100)	0.99
IL-10 (ng/ml)	9 (4-1100)	38 (4-876)	0.08
TNF-α (pg/ml)	12 (7-66)	17 (10-95)	0.12
IL-6 (pg/ml)	17 (2-1100)	91 (22-1100)	0.006
Glu (mg/dl)	116 (31-332)	126 (77-265)	0.2
TGL (mg/dl)	89 (27-326)	104 (34-591)	0.5
TC (mg/dl)	126 (55-277)	100 (45-150)	0.03
HDL (mg/dl)	40 (9-62)	24 (9-62)	0.04
LDL (mg/dl)	68 (15-209)	40 (13-86)	0.08

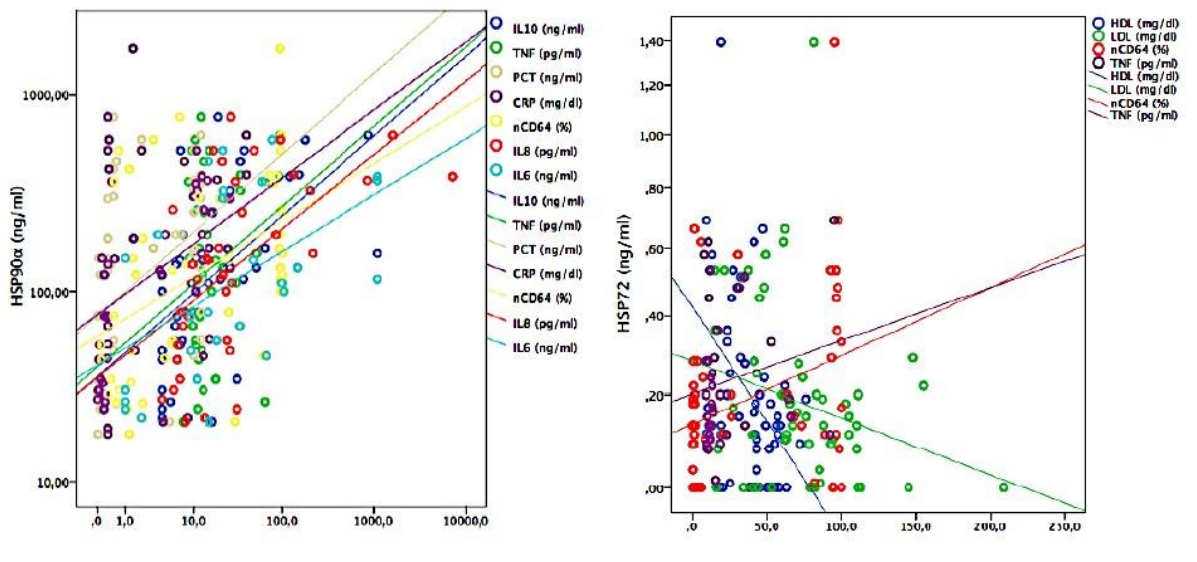
Τα δεδομένα δίδονται ως διάμεση τιμή (εύρος) ή n (%) των ασθενών; MOSF, Multiple Organ System Failure; SIRS, σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης; HSP, heat shock proteins; ICD64, lymphocyte CD64; mCD64, monocyte CD64; nCD64, neutrophil CD64; CRP, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη; PCT, προκαλσιτονίνη; WBC, White Blood Cells; IL, interleukin; TNF- α, Glu, glucose; TGL, Triglycerides; TC, Total Cholesterol; LDL, Low-Density-Lipoproteins; HDL, High-Density-Lipoproteins. Data given as median (range) * Mann-Whitney U

Η HSP90α όπως και ηHSP72 παρουσία σαν δραματική αύξηση στην ομάδα ασθενών με MOFS (Εικόνα 13α,β).



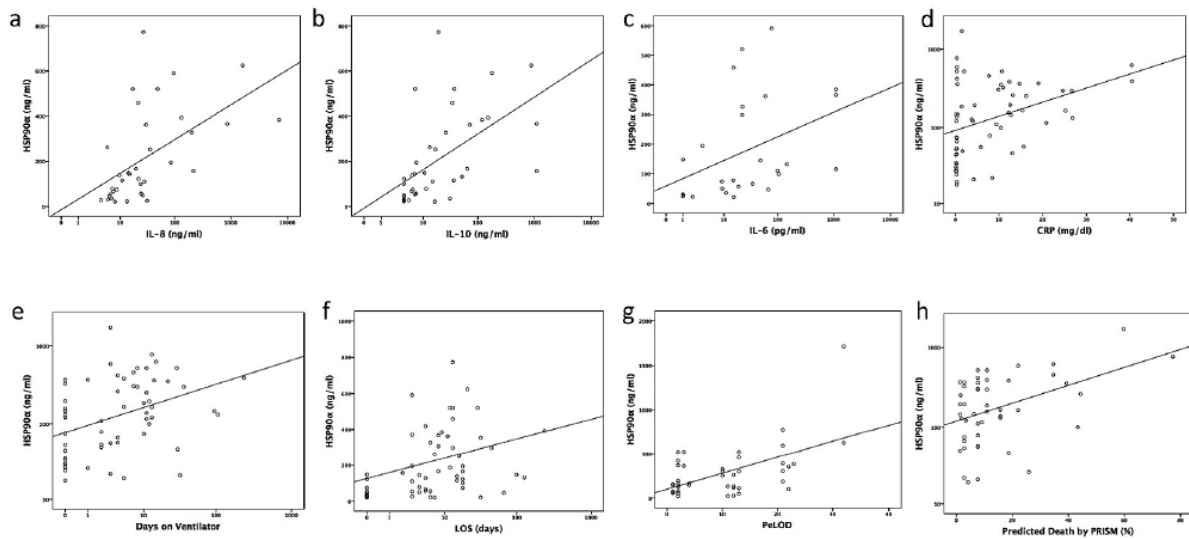
Εικόνα 13. Οι ασθενείς με MOSF είχαν αυξημένα (α) εξωκυτάρια HSP90α και (β) εξωκυτάρια HSP72 σε σχέση με τους non-MOSF ασθενείς. Οι οριζόντιες γραμμές υποδεικνύουν τις διάμεσες τιμές. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney tests). MOSF, multiple organ system failure; HSP, heat shock protein

Τα επίπεδα της HSP72 παρουσίασαν τάσεις αρνητικής συσχέτισης με τους μεταβολικούς δείκτες και θετικής με την TNF-α και nCD64 (Εικόνα 14).



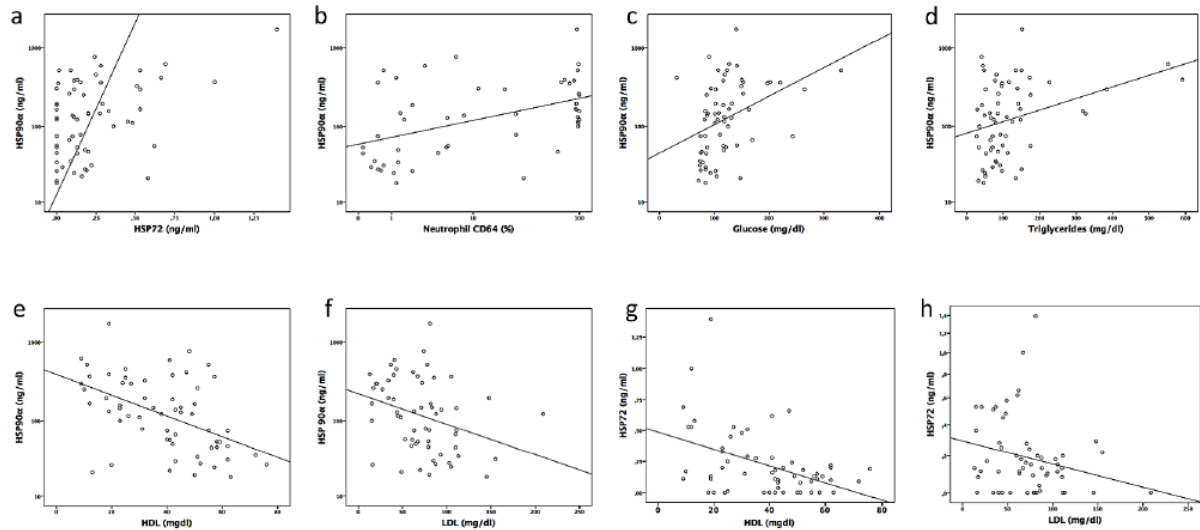
Εικόνα 14. Διαγράμματα σημείων (Scatterplots) συσχετίσεων συγκεντρώσεων ορού των α) HSP72 με συστήματα υπολογισμού βαρύτητας της νόσου, πρωτεΐνες οξείας φάσης, ιντερλευκίνες, nCD64 και δείκτες μεταβολισμού. β) HSP90α με συστήματα υπολογισμού βαρύτητας της νόσου, πρωτεΐνες οξείας φάσης, ιντερλευκίνες, nCD64 και δείκτες μεταβολισμού.

Μόνο η συσχέτιση με την HDL, εντούτοις, έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.001$). Η HSP90 σχετίστηκε θετικά προς τις IL-6, IL-8, IL-10 και CRP (Εικόνα 15a-d). Η HSP90α παρουσίασε συσχέτιση με τη προβλεπόμενη πιθανότητα θανάτου κατά PRISM-predicted death, και με τα συστήματα οργανικής δυσλειτουργίας PELOD, θεραπευτικών παρεμβάσεων TISS και διάρκεια νοσηλείας LOS (Εικόνα 15e-h).



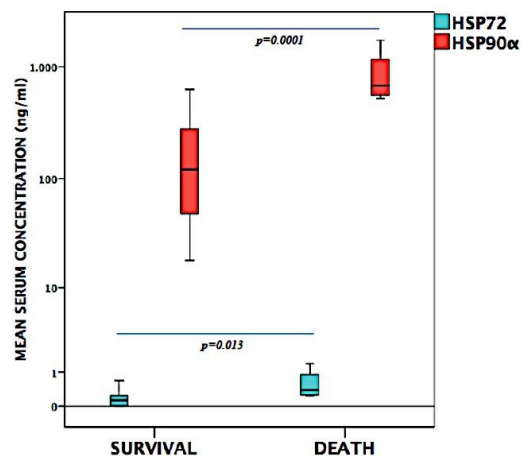
Εικόνα 15. Θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης της HSP90α με τα επίπεδα στον ορό των: (a-d) IL-8 ($r_s = 0.63$, $p < 0.0001$), IL-10 ($r_s = 0.70$, $p < 0.0001$), IL-6 ($r_s = 0.51$, $p < 0.01$), και CRP ($r_s = 0.49$, $p < 0.0001$), και τις (e-h) ημέρες σε μηχανικό αερισμό ($r_s = 0.49$, $p < 0.001$), διάρκεια νοσηλείας (LOS) ($r_s = 0.60$, $p < 0.001$), οργανική δυσλειτουργία (PELOD) ($r_s = 0.72$, $p < 0.0001$), και κατά PRISM προβλεπόμενη πιθανότητα θανάτου ($r_s = 0.44$, $p < 0.02$) (Spearman rank correlation tests). HSP, heat shock protein; IL interleukin; CRP, C-Reacting Protein; PELOD, Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score; LOS, length of stay; PRISM, Pediatric Risk of Mortality Score.

Παρά μια μεγάλη σκέδαση των τιμών, η HSP90α παρουσίασε θετική συσχέτιση με τις HSP72 και nCD64 καθώς και με τα σχετιζόμενα με στρες μεταβολικά μόρια γλυκόζης και τριγλυκεριδίων (Εικόνα 16a-d). Αντίθετα, οι HSP90α και HSP72 συσχετίστηκαν αρνητικά με τις δύο λιποπρωτεΐνες (Εικόνα 16e-h).



Εικόνα 16. Θετική συσχέτιση των συγκεντρώσεων της HSP90α στον ορό με τις: (a- d) HSP72 ($r_s=0.56$, $p<0.01$), nCD64 ($r_s=0.47$, $p<0.001$), γλυκόζη ($r_s=0.49$, $p<0.001$), και τριγλυκερίδια ($r_s=0.42$, $p<0.02$). (e-h) Αρνητική συσχέτιση της HSP90α με τις HDL ($r_s=-0.48$, $p<0.001$) και LDL ($r_s=-0.43$, $p<0.01$) καθώς και της HSP72 στον ορό με τις HDL ($r_s=-0.40$, $p<0.001$) και LDL ($r_s=-0.39$, $p<0.05$) (Spearman rank correlation tests).

Παρά την μικρή θνητότητα, όχι μόνο η HSP90α ($p<0.0001$) αλλά και η HSP72 ($p<0.015$) ήταν αυξημένες μεταξύ των μη επιζώντων (Εικόνα 17).

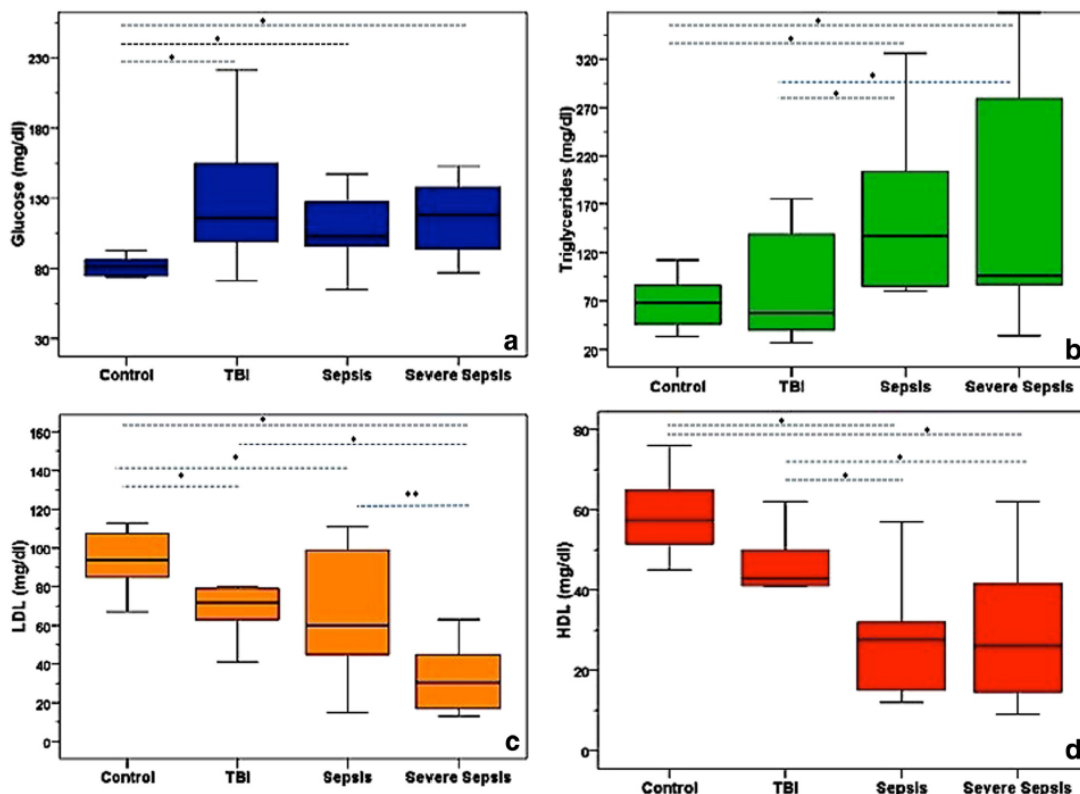


Εικόνα 17. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα συγκεντρώσεων της HSP90α και HSP72 στον ορό ασθενών που απεβίωσαν σε σύγκριση με τους επιβιώσαντες.

2.3.2. CD11βκαι CD64 και μεταβολικά πρότυπα

Τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων. Αν και τα επίπεδα της γλυκόζης δεν διέφεραν μεταξύ των σηπτικών ομάδων και των ομάδων τραύματος, οι ασθενείς της καθεμιάς από τις 3 ομάδες παιδιών ΜΕΘ σε κρίσιμη κατάσταση είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα γλυκόζης σε σύγκριση με υγιή παιδιά. Τα αρχικά (πρώτης ημέρας) επίπεδα της CRP, PCT, TG και ο λόγος TC/HDL ήταν σημαντικά αυξημένα στις 2 ομάδες σήψης σε σύγκριση με τις ομάδες τραύματος και υγιών παιδιών (Πίνακας 3).

Σημαντικά χαμηλότερα ήταν τα επίπεδα της TC, LDL και HDL στις σηπτικές ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ακόμη και την ΚΕΚ (μέτρια μειωμένα επίπεδα). Ωστόσο, μόνο η LDL διέφερε μεταξύ των δύο σηπτικών ομάδων ($p < 0.02$) (Εικόνα 18).

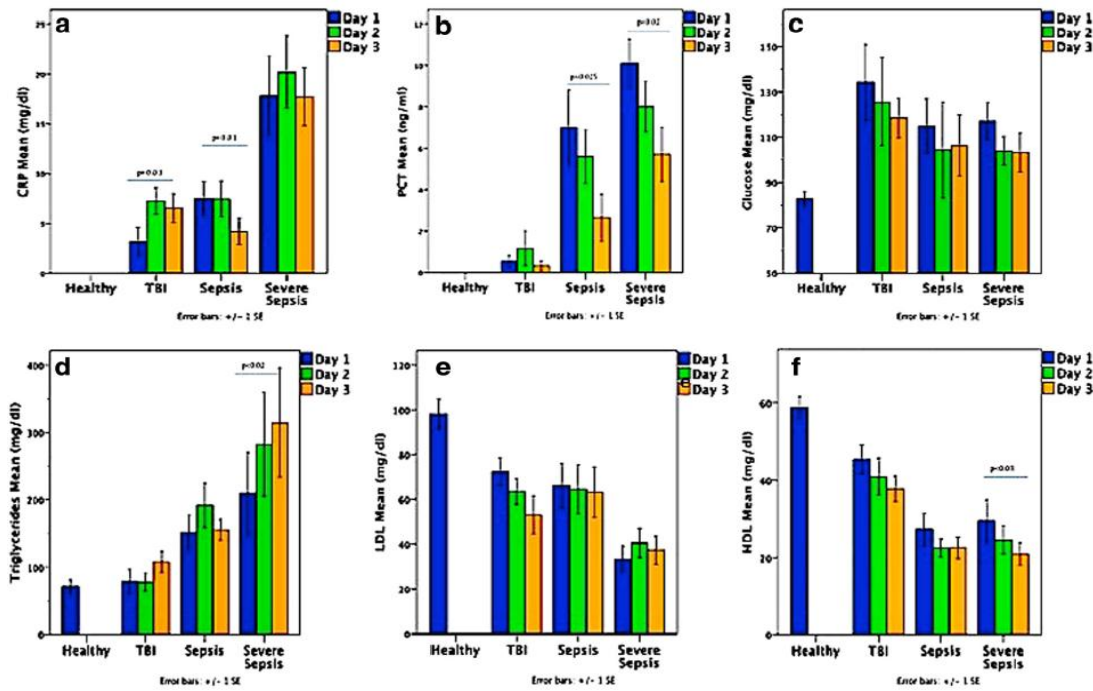


Εικόνα 18. Τα μεταβολικά πρότυπα πρώιμης φάσης ήταν χαρακτηριστικά της παθολογικής διεργασίας διαφέροντας σημαντικά μεταξύ της σοβαρής σήψης και ΚΕΚ. Διαγράμματα Box plots **α)** γλυκόζης (GL), **β)** τριγλυκεριδίων (TG), **γ)** χαμηλής πυκνότητας-λιποπρωτεϊνών (LDL), και **δ)** υψηλής πυκνότητας-λιποπρωτεϊνών (HDL) σε υγιή παιδιά και σε ασθενείς με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης

(SIRS) μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ), σήψη (Σ), ή σοβαρή σήψη (ΣΣ). Τα μεταβολικά πρότυπα διέφεραν μεταξύ των τεσσάρων ομάδων: τα επίπεδα TG αυξήθηκαν σημαντικά ενώ οι TC, LDL, και HDL μειώθηκαν σημαντικά στις σηπτικές σε σύγκριση με τις Υ και / ή ΚΕΚ ομάδες ($p < 0.01$). * Η GL δεν διέφερε μεταξύ ΚΕΚ και σηπτικών ομάδων, ενώ μόνο η LDL διέφερε μεταξύ Σ και ΣΣ ($p < 0,02$). ** Κάθε πλαίσιο-κουτί απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (Τ-μπαρ και οριζόντιες γραμμές) υποδεικνύουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι ακραίες τιμές (εκτός των ορίων) θεωρούνται ακραίες και υποδεικνύονται στο γράφημα με κύκλους ή αστερίσκους.

Οι διαδοχικές μετρήσεις γλυκόζης, TC, και LDL δεν διέφεραν μεταξύ των ημερών 1, 2 ή 3 σε οποιαδήποτε από τις ομάδες των παιδιών ΜΕΘ (Εικόνα 19). Μεταξύ των σηπτικών ασθενών τις 3 πρώτες ημέρες τα επίπεδα PCT μειώθηκαν σημαντικά ($p < 0.02$), ακολουθούμενα από παράλληλη μείωση της HDL ($p < 0.03$) και αύξηση των TG ($p < 0.02$), ιδιαίτερα στην ομάδα σοβαρής σήψης. Μεταβολές της CRP στις ομάδες ΚΕΚ και σήψης δεν αντικατοπτρίζονταν από αντίστοιχες μεταβολές σε οποιονδήποτε από τους μεταβολικούς δείκτες. Όλες τις 3 πρώτες ημέρες νοσηλείας, οι PCT και CRP διέφεραν μεταξύ των παιδιών με ΚΕΚ και σοβαρή σήψη ($p < 0.005$), αλλά μόνο η PCT διέφερε μεταξύ των Σ και ΣΣ τις ημέρες 2 και 3 ($p < 0.001$). Και τις 3 ημέρες οι HDL και TG διέφεραν μεταξύ των Σ ή ΣΣ και ΚΕΚ ($p < 0.04$). Η LDL την ημέρα 2 ήταν χαμηλότερη στην ομάδα ΣΣ σε σύγκριση με την ΚΕΚ ($p < 0.03$) (Εικόνα 19).

Δεν καταγράφηκε διαφορά στην έκφραση των CD11b τόσο των ουδετερόφιλων όσο και μονοκυττάρων μεταξύ των 4 ομάδων που μελετήθηκαν. Η έκφραση των CD11b των λεμφοκυττάρων έδειξε μια τάση για χαμηλότερες τιμές στη σοβαρή σήψη σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες (Πίνακας 4). Η έκφραση των CD64 των μονοκυττάρων δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων στην οξεία φάση (1^η ημέρα). Στα λεμφοκύτταρα, η έκφραση των CD64 ήταν εξαιρετικά χαμηλή, όπως αναμενόταν. Αν και η αρχική έκφραση των ουδετερόφιλων CD64 δεν διέφερε μεταξύ των δύο σηπτικών ομάδων, ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με ΣΣ ή Σ σε σύγκριση με ασθενείς με SIRS (τραύμα) ή υγιείς (Πίνακας 4).



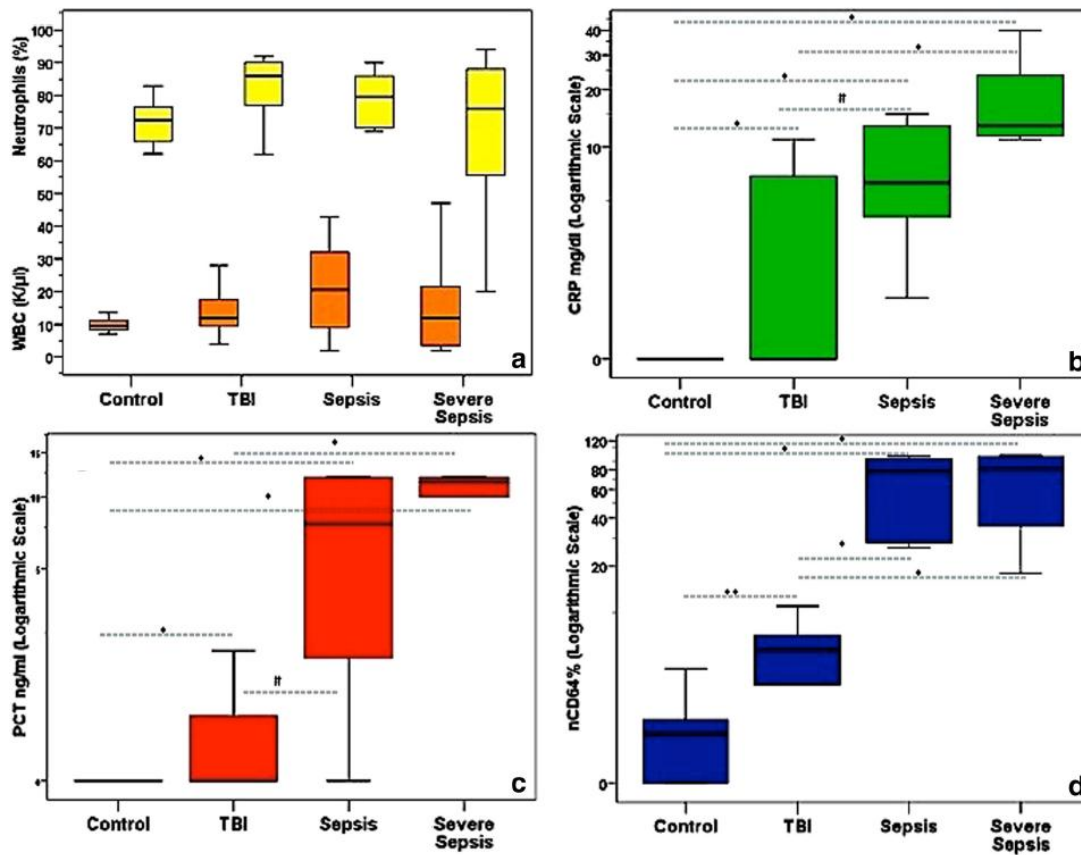
Εικόνα 19. Οι πρώιμες σημαντικές διακυμάνσεις των λιπιδίων συνεχίστηκαν για 3 ημέρες και στο σηπτικό και το τραυματικό μεταβολικό πρότυπο. Στο ραβδόγραμμα απεικονίζεται η διαχρονική διακύμανση τις 3 πρώτες ημέρες διανομής για την **α)** C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), **β)** προκαλσιτονίνη (PCT), **γ)** γλυκόζη (GL), **δ)** τα τριγλυκερίδια (TG), **ε)** χαμηλής (LDL) και **στ)** υψηλής πυκνότητας- λιποπρωτεΐνες (HDL) σε υγιή παιδιά και σε ασθενείς με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (TBI), σήψη (Σ), ή σοβαρή σήψη (ΣΣ). Η 3-ημερών παρακολούθηση έδειξε μια σημαντική διαχρονική μείωση της PCT σε σηπτικούς ασθενείς που ακολουθείται από παράλληλες μειώσεις της HDL και αυξήσεις των TG στην ομάδα ΣΣ. Οι μεταβολές της CRP στις ομάδες ΚΕΚ και Σ δεν αντικατοπτρίζονται από παρόμοιες αλλαγές σε οποιονδήποτε από τους μεταβολικούς δείκτες (διαφορές οι οποίες απεικονίζονται από οριζόντιες γραμμές). Τα παθολογικά μεταβολικά πρότυπα ήταν διακριτά στις ομάδες σήψης και ΚΕΚ σε σύγκριση με τους μάρτυρες και επιπλέον οι πρώιμες (πρώτες 6 ώρες) διαφορές των HDL και TG μεταξύ των Σ ή ΣΣ και ΚΕΚ παρέμειναν σημαντικές σε όλη τη διάρκεια των πρώτων 3 ημερών ($p < 0,04$). Η LDL την ημέρα 2 ήταν χαμηλότερη στη ΣΣ σε σύγκριση με την ΚΕΚ ($p < 0,03$). Όλες οι τιμές PCT και CRP των 3 ημερών διέφεραν μεταξύ των ΚΕΚ και ΣΣ ($p < 0,005$). Η PCT, αλλά όχι η CRP, διέφερε μεταξύ των ομάδων ΚΕΚ και Σ την 2^η ημέρα. Αντιθέτως, μόνο η PCT διέφερε μεταξύ Σ και ΣΣ τις ημέρες 2 και 3 ($p < 0,001$).

Πίνακας 4. Η έκφραση των CD11b και CD64 (%) σε πολυμορφοπύρηνα, μονοκύτταρα, και λεμφοκύτταρα στις 3 ομάδες παιδιών με SIRS (τραύμα, σήψη, σοβαρή σήψη) σε σύγκριση με υγιή παιδιά

	Υγιή-Μάρτυρες	Τραύμα (SIRS)	Σήψη	Σοβαρή Σήψη	p value
Διάμεσες τιμές (εύρος)					
Ουδετερόφιλα					
<i>CD11b</i> (%)	99.6 (98-100)	98.9 (93-100)	99 (92.6-99.9)	99.6 (96.3-100)	0.29
<i>CD64</i> (%)	0.9 (0.1-4.3) ^{b,c,d}	5.5 (0.5-11.3) ^{c,e,f}	78.8 (25.7-97.3) ^{b,e}	81.2 (17.5-99.9) ^{d,f}	0.0001 ^a
Μονοκύτταρα					
<i>CD11b</i> (%)	96 (86-99)	96.4 (53.9-99)	95 (52-99.3)	87.4 (24-98.7)	0.11
<i>CD64</i> (%)	87.4 (78-94)	87.9 (43.9-97)	90.9 (42-99)	87.3 (18.3-95.5)	0.52
Λεμφοκύτταρα					
<i>CD11b</i> (%)	22.9 (7.7-36.5)	18.3 (4-39.5)	16.8 (7.3-42)	9.3 (0.9-44.2)	0.043 ^a
<i>CD64</i> (%)	0.1 (0-2.6) ^{b,c}	0.6 (0.7-3.8) ^c	0.82 (0.3-1.5) ^b	0.25 (0.1-2.9)	0.01 ^a

Στα ουδετερόφιλα κύτταρα, οι διαφορές έκφρασης των *CD64* δεν επηρεάζονταν από τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ή μεταβολές του πληθυσμού ουδετερόφιλων μεταξύ των ομάδων. Αντίθετα η έκφραση των *CD64* στα ουδετερόφιλα ακολουθούσε μια παράλληλη αυξητική απόκριση στο στρες παρόμοια με εκείνη των πρωτεϊνών οξείας φάσης (Εικόνα 20).

Η έκφραση των ουδετερόφιλων *CD64* σχετιζονταν θετικά με τα επίπεδα στον ορό των CRP ($r_s = 0.82$, $p < 0.0001$), PCT ($r_s = 0.89$, $p < 0.0001$), γλυκόζης ($r_s = 0.42$, $p < 0.01$), και TG ($r_s = 0.46$, $p < 0.008$) και αρνητικά με την TC ($r_s = -0.60$, $p < 0.0001$), LDL ($r_s = -0.62$, $p < 0.0001$), και HDL ($r_s = -0.70$, $p < 0.0001$). Η *CD64* έκφραση δεν σχετιζόταν με οποιοδήποτε από τα συστήματα βαθμολόγησης της σοβαρότητας νόσου, το GCS, αιματολογικούς δείκτες, τη LOS ή LOMV. Δεν αναδείχθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των ουδετερόφιλων *CD11b* και οποιοδήποτε από τα συστήματα βαρύτητας της νόσου, τις πρωτεΐνες της οξείας φάσης ή διάφορους μεταβολικούς ή αιματολογικούς δείκτες.



Εικόνα 20. Η απάντηση στο οξύ στρες της CD64 έκφρασης των ουδετερόφιλων δεν εξαρτάται από τη διέγερση των λευκών αιμοσφαιρίων ή την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Διαγράμματα πλαισίου-απολήξεων (Box plots) **α)** λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και των ουδετερόφιλων, **β)** C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), **γ)** προκαλσιτονίνης (PCT), και **δ)** έκφρασης του υποδοχέα Fc γάμμα επί ουδετερόφιλων (nCD64) σε υγιή παιδιά και σε ασθενείς με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (TBI), σήψη (Σ), ή σοβαρή σήψη (ΣΣ). Οι CRP και PCT διέφεραν μεταξύ των σηπτικών ομάδων και των C ($p < 0.001$)* και / ή TBI ομάδων ($p < 0,03$).# Σε αντίθεση με τα WBC και ουδετερόφιλα, τα οποία δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων, nCD64 διέφερε μεταξύ των σηπτικών και υγιών –μαρτύρων (Control) ή TBI ομάδων ($p < 0.001$)* και μεταξύ των TBI και C ομάδων ($p < 0,02$).** Κάθε πλαίσιο-κουτί απεικονίζει το 1ο τεταρτημόριο (25ο εκατοστημόριο), την διάμεσο (έντονη μαύρη γραμμή) και το 3ο τεταρτημόριο (75ο εκατοστημόριο). Οι απολήξεις (T-μπαρ και οριζόντιες γραμμές) υποδεικνύουν τα όρια των ακραίων τιμών (ελάχιστες και μέγιστες τιμές των υπολογιζόμενων τιμών). Οι τιμές εκτός των φραγμάτων των απολήξεων θεωρούνται ακραίες και υποδεικνύονται στο γράφημα με κύκλους ή αστερίσκους.

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.4.1. Κινητικότητα των HSPs στη σήψη και τραύμα

Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας δείχνουν ότι τα εξωκυττάρια επίπεδα των HSP72 και HSP90a είναι σημαντικά υψηλότερα σε παιδιά με σοβαρή σήψη, και σε μικρότερο βαθμό σε παιδιά με SIRS, σε σύγκριση με υγιή παιδιά. Οι εξωκυττάρια αυτές HSPs είναι πολύ υψηλότερες σε παιδιά με πολυοργανική ανεπάρκεια, ένα εύρημα σχετιζόμενο με αυξημένα επίπεδα IL6 και TNF-α. Τέλος στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι και οι δύο HSPs σχετιζόταν αντίστροφα με ένα μεταβολικό πρότυπο στρες (χαμηλές LDL, HDL), αποκαλύπτοντας έναν πιθανό ρόλο των HSPs στην πρόωμη οξεία μεταβολική διαταραχή στη σοβαρή σήψη.

2.4.2. Η εξωκυττάρια HSP72 στη σήψη και τραύμα

Μια σημαντική αύξηση των επιπέδων HSP72 στον ορό έχει προηγουμένα αναφερθεί σε παιδιά με σηπτικό σοκ¹⁵² με οξεία πνευμονική βλάβη¹⁷³ ή μετά από καρδιοπνευμονική παράκαμψη.¹⁷⁴ Τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης ενηλίκων με σήψη ανέφερε ότι η αύξηση στον ορό των επιπέδων HSP72 συνδέεται με τη θνητότητα.¹⁵³

Αυξημένα επίπεδα της εξωκυττάριας HSP72 σε παιδιά με σηπτικό σοκ έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με την θνητότητα.¹⁵² Στην παρούσα μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα της HSP72 στον ορό δείχθηκε να σχετίζονται με τα προβλεπόμενα ποσοστά θανάτου σε παιδιά με ΣΣ ή με SIRS. Σύμφωνα με την « υπόθεση κινδύνου», η απελευθέρωση της HSP72 από σοβαρά κατεστραμμένα κύτταρα ή σε φλεγμονή χρησιμεύει ως σηματοδότης για επικείμενο κίνδυνο σε γειτονικά κύτταρα.¹⁷⁵ Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ επάγονται σε απόκριση σε μία ποικιλία κυτταρικών προσβολών, και αποτελούν έναν αξιόπιστο δείκτη κινδύνου (σήμανσης) στρες των κυττάρων.¹⁷⁶ Έτσι, η εξωκυττάρια έκλυση HSP72 ως «σήματος κινδύνου» οδηγεί στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των μονοπατιών LPS TLR4 / CD14 μιας εξαρτώμενης σηματοδότησης.¹⁷⁷ Επαληθεύοντας το ρόλο της ως «σηματοδότης», η κυκλοφορούσα HSP72 έχει επίσης συσχετιστεί με την οργανική δυσλειτουργία ή επιπλοκές στεφανιαίας νόσου, ηπατικής νόσου, αγγειο-αποφρακτικές κρίσεις της δρεπανοκυτταρικής

νόσου, και την εκλαμψία. Επεκτείνοντας ακόμη περισσότερο τις κλινικές αυτές συσχετίσεις, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι η εξωκυττάρια HSP72 εκλύεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε βαριά άρρωστα σηπτικά παιδιά ή παιδιά με τραύμα και MOSF.

2.4.3. Η εξωκυττάρια HSP90α στη σήψη και τραύμα

Δεν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τα εξωκυττάρια επίπεδα HSP90α σε παιδιά ή νεογνά με σηπτικό σοκ. Μόλις πρόσφατα άλλωστε έχειδειχτεί ότι τα επίπεδα της eHSP90α είναι αυξημένα σε ενήλικες με SS και SIRS και ότι σχετίζονται με τα επίπεδα HSP72, IL-6, IL-10 και κορτιζόλης.¹⁷⁸ Στην παρούσα έρευνα επεκτείναμε την παρατήρηση αυτή, αποκαλύπτοντας αυξημένα επίπεδα HSP90α σε βαριά άρρωστα παιδιά, ιδιαίτερα σε αυτά με σοβαρή σήψη. Επί πλέον διαπιστώσαμε μια ισχυρή συσχέτιση της HSP90α με τις nCD64, IL-6, IL-8, IL-10, LOS, LOMV, τη βαρύτητα της νόσου, και την προβλεπόμενη βάση αυτής, πιθανότητα θανάτου. Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει ότι τα εξωκυττάρια επίπεδα HSP90α είναι σημαντικά υψηλότερα σε παιδιά με σοβαρή σήψη σε σύγκριση με τα παιδιά με τραύμα που σχετίζεται με SIRS και υγιή παιδιά.

Το πιο σημαντικό ίσως εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι τα υψηλότερα επίπεδα εξωκυττάριας HSP90α σχετίζονται ανεξάρτητα από άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες με MOSF. Πρόσφατα άλλωστε έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της HSP90α στο πλάσμα θα μπορούσαν να αποτελούν ισχυρό προγνωστικό δείκτη κακής έκβασης σε ενήλικες με σήψη.¹⁷⁹ Τα δεδομένα μας αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με MOSF ή χωρίς MOSF υιοθετώντας την άποψη ότι η HSP90α μπορεί να παίζει κεντρικό κλινικό ρόλο στην ανάπτυξη MOSF σε ασθενείς με σήψη και/ή SIRS. Μια τέτοια υπόθεση ενισχύεται από προηγούμενες παρατηρήσεις ότι η MOSF στη σήψη μπορεί να οφείλεται σε μια πρόιμη υπερ-φλεγμονώδη απάντηση (“cytokine storm”) ή σε μια πρόιμη ενεργοποίηση της εγγενούς ανοσίας και καταστολής της επίκτητης ανοσίας.¹⁸⁰

Συγκριτικά με την HSP72, η HSP90α φαίνεται να παρουσιάζει πολύ πιο δραματική αύξηση μεταξύ των ασθενών με οργανική ανεπάρκεια, αύξηση που σχετίζεται καλύτερα με ένα υπερβολικό πρόιμο φλεγμονώδες-μεταβολικό στρες. Έτσι, σε ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης, μόνο η HSP90α (μεταξύ άλλων βιολογικών δεικτών - όπως οι HSP72, ιντερλευκίνες, πρωτεΐνες οξείας φάσης και η σοβαρότητα νόσου - των οποίων η σχετική επίδραση ελέγχθηκε και υπολογίσθηκε) συσχετίστηκε ανεξάρτητα με τη θνητότητα.

Προφανώς η σημασία του ευρήματος αυτού θα πρέπει να διερευνηθεί από εκτενέστερες μελέτες που θα επιβεβαιώσουν τη διαφορά και θα ερμηνεύσουν τη σημασία του.

Αν και το μεγαλύτερο επίπεδο στρες που σχετίζεται με σοβαρή σήψη και / ή σηπτικό σοκ μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη απελευθέρωση της HSP90α, εξακολουθεί να παραμένει το ερώτημα γιατί μια παρόμοια αύξηση δεν παρατηρείται στην οξεία φάση στρες στο τραύμα ή τη σήψη. Η εξωκυττάρια HSP90α, λειτουργώντας ως «chaperokine», θα μπορούσε να εκλυθεί υπερβολικά για να ενισχύσει μια ήδη ενεργή συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Η συσχέτιση της HSP90α με τη βαρύτητα της νόσου, τη nCD64 και τις ιντερλευκίνες δίνει μια τέτοια εξήγηση εκθετικής αύξησης με την ένταση της φλεγμονής και του μεταβολικού στρες. Εναλλακτικά, τα δεδομένα της μελέτης αυτής δεν μπορούν να αποκλείσουν και μια μαζική έξοδο της HSP90α από πληθυσμούς νεκρωτικών κυττάρων.

Συγκριτικά με την ομάδα υγιών παιδιών, και οι παιδιατρικοί ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ παρουσίασαν αυξημένη HSP90α, μαζί με τις IL-6 και IL-8. Η παρούσα μελέτη έδειξε μια πρόωμη αύξηση της HSP90α κατά τη διάρκεια ενός σοβαρού, οξέος στρες και συσχέτιση της όχι μόνο με την προστατευτική nCD64, IL-10, αλλά και με τις φλεγμονώδεις IL-6 και IL-8. PCT, CRP και PELOAD, γεγονός που θα μπορούσε να κάνει την HSP90α να είναι όχι μόνο ένας παράγοντας αναδιαμόρφωσης των προσβεβλημένων ιστών αλλά επίσης ένας που επάγει την απόπτωση στη σοβαρή σήψη. Η θεωρία αυτή είναι σύμφωνη με μελέτες στις οποίες η χορήγηση των αναστολέων της HSP90α βελτίωσε την επιβίωση, μείωσε την φλεγμονή, την καταπληξία και την οργανική δυσλειτουργία.¹⁶⁵ Καθώς η στόχευση της HSP90α προστάτευσε το έντερο από τη φλεγμονή και την αυξημένη διαπερατότητα κατά την διάρκεια της σήψης, φάνηκε ότι μια τέτοια παρέμβαση θα μπορούσε να διανοίξει ένα νέο δρόμο θεραπευτικής προσέγγισης στην προσπάθεια αντιμετώπισης της εντερικής βλάβης σε πολυμικροβιακή σήψη.¹⁶⁴

2.4.4. Η σημασία της έκφρασης των CD64 στη σοβαρή σήψη

Σε ένα παράλληλο μέρος της μελέτης αυτής για πρώτη φορά σχετίστηκε η έκφραση των CD64 ταυτόχρονα σε 3 διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς και συγκριτικά σε 3 διαφορετικές ομάδες παιδιατρικών ασθενών ΜΕΘ και σε υγιείς. Η έκφραση των CD64 στα πολυμορφοπύρηνια (nCD64), αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα, δείχθηκε να είναι

υψηλότερη σε ασθενείς με σοβαρή σήψη σε σύγκριση με ασθενείς με ΚΕΚ ή υγιή παιδιά. Αντίθετα, η έκφραση των CD11b σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα δεν είναι διαγνωστική, αν και η έκφραση τους σε λεμφοκύτταρα είναι πιθανόν να καταστέλλεται παρουσία σοβαρής σήψης.

Τα ενδιαφέροντα αυτά αποτελέσματα είναι εν μέρει συγκρίσιμα με εκείνα προηγούμενων μελετών σε ενήλικες,¹⁸¹ παιδιά,⁸² ή νεογνά,¹⁸² οι οποίες έχουν δείξει ότι η έκφραση nCD64 ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με λοιμώδες SIRS σε σύγκριση με μη-λοιμώδες SIRS.¹⁸³ Είναι η πρώτη φορά, όμως, που η έκφραση CD64 μετρήθηκε ταυτόχρονα και στις 3 κυτταρικές σειρές σε δυο διαφορετικές ομάδες σήψης (απλή, σοβαρή) και συγκρίθηκε ταυτόχρονα σε παιδιά με ΚΕΚ και υγιή παιδιά. Επίσης είναι η πρώτη φορά που η έκφραση nCD64 σχετίστηκε με μεταβολικές διαταραχές οξείας φάσης. Δεν διαπιστώθηκε οποιαδήποτε σχέση μεταξύ της CD64 και CD11b στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν. Σε προηγούμενες μελέτες, επίσης δεν βρέθηκαν διαφορές στην έκφραση CD11b σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα ανάμεσα σε ενήλικες υγιείς εθελοντές, ασθενείς με σήψη, σοβαρή σήψη και σηπτικό σοκ.¹⁸⁴

2.4.5. Οι διαταραχές μεταβολισμού στη σήψη και το τραύμα

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, αυτή είναι η πρώτη φορά που οι CD11b εντεγκρίνες και οι CD64 υποδοχείς υψηλής συγγένειας που εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα σχετίζονται με μεταβολικές διεργασίες σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση των nCD64 στη σήψη σχετίζεται με μια χαρακτηριστική μεταβολική ανταπόκριση του οργανισμού στην οξεία φάση που διακρίνεται εκείνης ασθενών με σοβαρή ΚΕΚ. Ο συνδυασμός αυξημένων επιπέδων γλυκόζης – τριγλυκεριδίων με τα χαμηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης - LDL - HDL χαρακτηρίζει το μεταβολικό πρότυπο της σήψης και ιδιαίτερα σοβαρής σήψης. Αντίθετα η ανταπόκριση στο στρες ασθενών με ΚΕΚ χαρακτηρίζεται από μέτρια αύξηση μόνο της γλυκόζης σε συνδυασμό με ήπια μείωση των TC - LDL – HDL. Οι διαταραχές αυτές παρατηρούνται τις πρώτες ώρες του στρες αναπτύσσοντας ένα πρώιμο παθολογικό μεταβολικό προφίλ SIRS σε σύγκριση με το φυσιολογικό μεταβολικό προφίλ υγιών ατόμων. Για πρώτη φορά επίσης δείξαμε ότι οι πρώιμες μεταβολικές διαταραχές στο στρες διαφέρουν στις διαφορετικές ομάδες SIRS (λοιμώδες ή μη λοιμώδες). Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της

μελέτης ήταν ότι οι χαρακτηριστικές μεταβολικές διαταραχές επιμένουν κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου, αναδεικνύοντας παρόμοιες σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων τις 3 πρώτες ημέρες για τα TG και HDL και τις πρώτες 2 ημέρες για την LDL. Επιπλέον, η PCT, αλλά όχι η CRP, μειώνεται σταθερά στην ομάδα ΣΣ και ακολουθείται από παράλληλη μείωση της HDL και αύξηση των TG.

Σε κλινική μελέτη σε ενήλικες, η χαμηλή HDL επίσης συνδυάστηκε με την παρουσία βακτηριακής λοίμωξης ενώ η χαμηλή ολική χοληστερόλη(TC) ήταν προγνωστική κακής έκβασης σε ασθενείς με λοιμώξεις της κατώτερης αναπνευστικής οδού.¹⁸⁵ Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τα ευρήματα μιας πρόσφατης μελέτης σε ενήλικες, όπου τα επίπεδα TC, LDL, και HDL ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σηπτικούς σε σχέση με υγιείς, ιδιαίτερα επηρεαζόμενα από τη βαρύτητα της νόσου.¹⁸⁶ Παρά το γεγονός όμως ότι η ταχεία πτώση περιγράφεται κυρίως στην HDL, υποδηλώνοντας μια πιθανή δέσμευση των σωματιδίων λιποπρωτεΐνης,¹⁸⁷ εμείς βρήκαμε μία ταχεία (εντός 6 ωρών) μείωση στα επίπεδα και των δύο κλασμάτων, HDL και LDL, και επίσης στην TC που συνδυαζόταν με πιθανή πρόιμη αύξηση της αντίστασης της γλυκόζης στην ινσουλίνη. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα TG σχετίζονταν με την αυξημένη έκφραση των nCD64. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι ο λόγος TC/HDL, που αποτελεί ένα ισχυρό μέτρο κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, αυξάνεται σταθερά στο πλαίσιο του οξέος στρες σε παιδιά με σοβαρή σήψη ή ΚΕΚ.¹⁸⁸

Η ισχυρή θετική σχέση μεταξύ nCD64 και TG ή γλυκόζης και μια αρνητική με την TC, HDL, LDL υποδεικνύει μια πιθανή άμεση δράση της φλεγμονώδους διεργασίας στον μεταβολισμό. Είναι πιθανό ότι τα τριγλυκερίδια ανταποκρίνονται γρήγορα στη σήψη, σε μια προσπάθεια προστασίας από την ενδοτοξίνη, αφού η πρόσδεση λιποπρωτεΐνης-λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σχετίζεται με εξασθενημένη απάντηση σε αυτό το τοξικό μακρομόριο.¹⁸⁹ Ωστόσο, η κλινική σημασία των ευρημάτων αυτών θα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω σε καλά σχεδιασμένες προοπτικές πολυκεντρικές μελέτες.

2.4.6. Συσχετίσεις HSP72 και HSP90α με άλλους βιο-δείκτες στρες και μεταβολισμού

Οι συσχετίσεις των HSPs με βιο-δείκτες στρες όπως οι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις ινερλευκίνες, nCD64, πρωτεΐνες οξείας φάσης στρες και δείκτες βαρύτητας νόσου, κατέδειξαν τάσεις σημαντικής θετικής αλληλεπίδρασης. Αρνητική εντούτοις δείχθηκε η αλληλεπίδραση των HSPs με τους δείκτες μεταβολισμού, ιδιαίτερα των λιποπρωτεϊνών. Ιδιαίτερα, τα επίπεδα της HSP72 παρουσίασαν τάσεις αρνητικής συσχέτισης με τους μεταβολικούς δείκτες, που έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα για την HDL, και θετικής με την TNF-α και nCD64. Η HSP90 σχετίστηκε θετικά προς τις nCD64, IL-8, IL-10, CRP, PRISM, PELOD, TISS και LOS και αρνητικά με τις HDL και LDL. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να υποδεικνύουν απλά αναλογικά υψηλότερο επίπεδο του φυσιολογικού στρες που σχετίζεται με τη ΣΣ σε σύγκρισή με το SIRS. Έτσι, η eHSP90α, ενεργώντας ως “chaperokine” θα μπορούσε να ενισχύσει μια ήδη ενεργή συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση στη σοβαρή σήψη .

Το εύρημα μας ότι η HSP90α συσχετίζεται αντίστροφα με ένα πρώιμο σηπτικό μεταβολικό πρότυπο, υποδεικνύει ότι η HSP90α μπορεί να επάγει μια ισχυρή οξεία nCD-interleukin φλεγμονώδη απάντηση με αποτέλεσμα μια ανισόρροπη (διαταραγμένη) μεταβολική κατάσταση. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ότι το μεταβολικό προφίλ έναρξης της σήψης χαρακτηρίζεται από μια οξεία αύξηση (nCD64, γλυκόζη, τριγλυκερίδια)-μείωση (ολική χοληστερόλη, HDL, LDL) των βιοδεικτών σε αντίθεση με το μη-λοιμώδους SIRS, στο οποίο η αύξηση της γλυκόζης συνδυάζεται με μια μη-σημαντική μείωση της χοληστερόλης-λιποπρωτεΐνης.¹⁹⁰ Ωστόσο, ένας πολύ-δείκτης (multimarker) με βάση μοντέλα κινδύνου για παιδιατρικό σηπτικό σοκ, συμπεριλαμβανομένων των HSP72, HSP90α και μεταβολικών μικρομορίων προερχόμενων από ερευνητικά δεδομένα της γονιδιωματικής (genomics), πρωτεομικής (proteomics), λιπιδιομικής (lipidomics), και μεταβολομικής (metabolomics), θα μπορούσε να αποτελέσει το μέλλον στην παροχή αποτελεσματικότερων βιοδεικτών. Εκείνης της σημαντικότητας, που θα επέτρεπε μια επιτυχέστερη μελέτη της παθοφυσιολογίας και ακριβέστερης θεραπευτικής προσέγγισης των επικίνδυνων μονοπατιών της σοβαρής σήψης.¹⁹¹

2.5. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας περιορίζονται από το μικρό μέγεθος του δείγματος, η συλλογή των περιστατικών αυτών που απετέλεσαν 3

χωριστούς ευκρινείς ομοιογενείς παιδικούς πληθυσμούς ασθενών ΜΕΘ ήταν εξαιρετικά επίπονη και εν τέλει σημαντική. Λόγω των αυστηρών κριτηρίων αποκλεισμού για να εξασφαλίσουμε την ομοιογένεια των ομάδων και λόγω της σπανιότητας των μη-ανοσοκατασταλαμένων ασθενών με σήψη, οι ομάδες της μελέτης μας έχουν ένα σχετικό μικρό αριθμό, μεγαλύτερο πάντως σε σχέση με άλλες παρόμοιες μελέτες.¹⁵³ Παρόμοιες ερευνητικές προσπάθειες δεν έχουν επιχειρηθεί σε τέτοια έκταση και οι ελάχιστες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί αναφέρονται είτε σε ετερογενή γενικότερα δείγματα πληθυσμού ΜΕΘ είτε σε 1 ομάδα συγκρινόμενη με ομάδα κοντρόλ. Παρόλα αυτά και οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούν παρόμοια αριθμητικά δείγματα πληθυσμού προκειμένου να φθάσουν σε συμπεράσματα μιας αξιόπιστης ανάλυσης (power analysis). Μια πρόδρομη power analysis των αποτελεσμάτων ανέδειξε μια αποδεκτή ισχύ για ανάδειξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων όσον αφορά τις HSP και CD64. [Αναμενόμενο μέγεθος επίδρασης μέγεθος του δείγματος για μια μελέτη πολλαπλής παλινδρόμησης (f^2): 0.17 (Κατά συνθήκη, τα μεγέθη επίδρασης των 0.02, 0.15 και 0.35 θεωρούνται μικρά, μεσαία και μεγάλα, αντίστοιχα). Επιθυμητό επίπεδο στατιστικής ισχύος: 0.80 (Κατά σύμβαση, μεγαλύτερη από ή ίση με 0.80). Ελάχιστος αριθμός παραμέτρων πολλαπλής παλινδρόμησης χωρίς να συμπεριλαμβάνει τη συνεχή παλινδρόμηση: 3. Επίπεδο άλφα: 0,05(Κατά σύμβαση, μικρότερη από ή ίση με 0,05 με την αξίωση στατιστικής σημαντικότητας)]. Το ελάχιστο υπολογισμένο δείγμα μελέτης είναι 68, το τελικό δείγμα μελέτης 90. Οι πολύ σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων της μελέτης αυτής προσδίδουν σε αυτή μια δυναμική περαιτέρω έρευνας καθώς μπορεί να συμβάλει στο σχεδιασμό ενός οργανωμένου επόμενου σταδίου για εστιασμένη μελέτη σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών. Εντούτοις, σε μια τέτοια μεταγραφική έρευνα μικρής έκτασης, δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί η ακριβής λειτουργική σημασία των κυκλοφορούντων HSP72 και HSP90α κατά τη διάρκεια της νόσου.

Επί μέρους αναλύσεις των συγκεντρώσεων των εξωκυττάρων HSP72 και HSP90α υπό την επίδραση διαφόρων ειδικών θεραπευτικών παρεμβάσεων δεν διεξήχθησαν, λόγω του μεγέθους των ασθενών στις ομάδες. Στη μελέτη σαν πρώτη επιλογή ινοτρόπων, αγγειοδραστικών παραγόντων χρησιμοποιήσαμε την αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη. Με αυτό τον τρόπο δεν είχαμε ασθενείς υπό αγωγή με ντοπουταμίνη που πρόσφατα αποδείχτηκε ότι προάγει τη σύνδεση του DNA με τον παράγοντα HSF1, και κατ' ακολουθία την mRNA-έκφραση της HSP90α.¹⁹² Επίσης, κατά την διάρκεια της μελέτης, κανένας ασθενής δεν λάμβανε θειοπεντάλη που επάγει μια ειδική και διαφορετική heat-shock απάντηση,

μεσολαβώντας έτσι κύτταρο-προστατευτικά μέσω της έκφρασης της HSP72 σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα.¹⁹³

Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης είναι ότι δεν είχαμε την ευκαιρία μετρήσεων των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων των HSP πέραν της πρώτης ημέρας νοσηλείας. Ο ακριβής ρόλος των HSP72 / HSP90α στην παθοφυσιολογία της σοβαρής σήψης και του βαρέως τραύματος, η προειδοποιητική / προστατευτική δράση τους στη χειραγώγηση της φλεγμονής, καθώς και οι πιθανές επιπτώσεις τους στην ανάπτυξη των οξέων μεταβολικών διαταραχών πρέπει ασφαλώς να διερευνηθούν εκτενέστερα και σε βάθος, ώστε να παράσχουν νέα στοιχεία πιθανών ανοσο-διατροφικών και φαρμακευτικών στόχων παρέμβασης για την αντιμετώπιση της σοβαρής σήψης και του SIRS.

2.6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επιβεβαιώνοντας την «υπόθεση κινδύνου», οι εξωκυττάρια HSP72 και HSP90α είναι αυξημένες σε επίπεδα «συναγερμού» σε παιδιά σε κρίσιμη κατάσταση, ειδικά με σοβαρή σήψη. Στην παρούσα μελέτη αναφέρουμε για πρώτη φορά ότι η εξωκυττάρια HSP90α είναι σημαντικά αυξημένα σε αρρώστους με SIRS, ιδιαίτερα σε παιδιατρικούς ασθενείς με σοβαρή σήψη. Για πρώτη φορά επίσης δείξαμε ότι η εξωκυττάρια «τσαπερόνη» HSP90α συσχετίζεται με την MOFS, το φλεγμονώδες στρες, τις σοβαρότητα της νόσου, οργανική δυσλειτουργία, LOS, και LOMV και την προβλεπόμενη θνητότητα. Οι HSPs σχετίζονται θετικά στην οξεία φάση του στρες με βιοδείκτες στρες όπως οι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις ινερλευκίνες, η nCD64, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης στρες και οι δείκτες βαρύτητας νόσου. Αρνητική εντούτοις δείχθηκε η αλληλεπίδραση των HSPs με τους δείκτες μεταβολισμού, ιδιαίτερα τις λιποπρωτεΐνες.

Το μεταβολικό πρότυπο της οξείας φάσης ενός μη λοιμώδους-SIRS, όπως σε τραυματική βλάβη του εγκεφάλου, είναι διαφορετικό από εκείνο της σοβαρής σήψης, του οποίου η απόκριση σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης. Η πρόωρη συνδυασμένη μεταβολική διαταραχή (πρότυπο) του στρες στη σοβαρή σήψη χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό υψηλών (nCD64, γλυκόζη, TG) - χαμηλών (TC, HDL, LDL) σε αντίθεση με το τραύμα (SIRS) στο οποίο, με εξαίρεση μια αυξημένη γλυκόζη, η μείωση της λιποπρωτεΐνης είναι μέτρια και οι μεταβολές των nCD64 ή TG παρουσιάζουν ήπια αυξητική

τάση ή δεν είναι εμφανείς. Είναι σημαντικό, ότι οι πρώιμες αυτές μεταβολικές διαταραχές επιμένουν κατά τη διάρκεια των 3 πρώτων ημερών της οξείας φάσης της σήψης ή τραύματος. Η πρώιμα αυξημένη έκφραση CD64 των ουδετερόφιλων, αλλά όχι των λεμφοκυττάρων ή μονοκυττάρων, διαφοροποιεί τα παιδιά με σήψη από εκείνα με τραύμα και συνδέεται όχι μόνο με τις αντιδράσεις των CRP και PCT, αλλά ακόμη πιο σημαντικά με τα εξωκυττάρια «σήματα κινδύνου» των HSP72 και HSP90α.

2.7. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΟΡΙΖΟΝΤΕΣ – ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής αναδεικνύουν νέα δεδομένα για τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζουν οι HSP72 και 90, η nCD64 και ενδεχομένως χαρακτηριστικά πρώιμα μεταβολικά πρότυπα στη διαδικασία της ανοσοαπάντησης στη σοβαρή σήψη και το σύνδρομο φλεγμονώδους αντίδρασης στο βαρέως πάσχον ή τραυματισμένο παιδί. Οι HSP72 και 90 θα μπορούσαν να αναδειχθούν ενδεχομένως ευαίσθητοι ή ειδικοί προγνωστικοί δείκτες της σοβαρής σήψης ή σηπτικού shock στα βαριά άρρωστα παιδιά, διακρίνοντας την από άλλες καταστάσεις φλεγμονώδους αντίδρασης όπως η απλή σήψη ή το τραύμα. Επίσης η HSP90α μπορεί να είναι ένας καλός δείκτης της σοβαρότητας τραύματος και συγχρόνως κακής πρόγνωσης. Οι HSP72 και 90α που φαίνεται ότι διαδραματίζουν ρόλο στην ισορροπία ανάμεσα στην προ-φλεγμονώδη και αντι-φλεγμονώδη διαδικασία, θα μπορούσαν να συσχετίζονται με την πρώιμη διέγερση της nCD64 και οξείες διαταραχές του μεταβολισμού (μεταβολικά πρότυπα στρες), την ανάπτυξη SIRS, και τη βαρύτητα της νόσου, ανοίγοντας την πύλη για μελλοντικές εστιασμένες μελέτες μοριακής γενετικής (pathways) και πιθανών ανοσο-παρεμβάσεων.

2.8. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ / ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η λεγόμενη «υπόθεση κινδύνου» (“danger hypothesis”), σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα σε καταστάσεις ισχυρού στρες διεγείρουν την έκφραση και αύξηση των «τσαπεροκινών» στο εξωκυττάριο τους περιβάλλον, μεταφέροντας ένα σήμα κινδύνου στα γειτονικά κύτταρα, μπορεί να έχει σημαντική πρακτική εφαρμογή στη διάκριση ασθενών με σοβαρή σήψη στο

μέλλον. Επίσης, θα μπορούσε να εκτιμήσει τον αυξημένο κίνδυνο ασθενών με φλεγμονώδη αντίδραση σε ανοσο-απάντηση στο στρες, προσδιορίζοντας τα επίπεδα των HSP72 και HSP90α στον ορό των ασθενών, σε συνδυασμό με την άμεση απόκριση της έκφρασης των nCD64 και την πρόιμη διαμόρφωση χαρακτηριστικών μεταβολικών προτύπων. Διανοίγεται ένας νέος δρόμος, κατά συνέπεια, πιθανών ανοσο-παρεμβάσεων με διεγέρτες της HSP72 ή αναστολείς της HSP90α και με εστιασμένη μεταβολική παρέμβαση (φάρμακο-διατροφή) στη θεραπεία ασθενών ΜΕΘ με σοβαρή σήψη ή τραύμα.

2.9. Παράρτημα Α.

Κριτήρια που διεθνώς χρησιμοποιούνται για τους ορισμούς του SIRS, σήψης, βαριάς σήψης και σηπτικής καταπληξίας

SIRS	Παρουσία ≥ 2 από τα ακόλουθα κριτήρια, ένα από αυτά πρέπει να είναι παθολογική θερμοκρασία ή αριθμός λευκοκυττάρων:
	*κεντρική θερμοκρασία $>38,5^{\circ} \text{C}$ ή $<36^{\circ} \text{C}$
	*ταχυκαρδία ή βραδυκαρδία
	*ταχύπνοια ή μηχανικός αερισμός
	*αυξημένος ή μειωμένος αριθμός λευκοκυττάρων για την ηλικία ή $>10\%$ άωρες μορφές
Λοίμωξη	Υποπτη/αποδεδειγμένη λοίμωξη προκαλούμενη από οποιοδήποτε παθογόνο/κλινικό σύνδρομο που συνδέεται με υψηλή πιθανότητα λοίμωξης
Σήψη	SIRS επί παρουσίας ή ως αποτέλεσμα ύποπτης ή αποδεδειγμένης λοίμωξης
Βαριά σήψη	Σήψη συν ένα από τα ακόλουθα: Καρδιαγγειακή δυσλειτουργία ή ARDS ή τουλάχιστον 2 οργανικές δυσλειτουργίες
Σηπτικό σοκ	Σήψη και καρδιαγγειακή δυσλειτουργία

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
DAMP	Danger-associated molecular pattern molecules
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor
ELAM-1	Endothelial-leucocytes adhesion molecule-1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
CD	Cluster of Differentiation
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
LOS	Length of stay
LOMV	Length of mechanical ventilation
PRISM	Pediatric Risk of Mortality
TISS	Therapeutic Intervention Scoring System
PELOAD	Pediatric Logistic Organ Dysfunction
PRR	Pattern-recognition receptors
TLR	Toll-like receptor
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern molecules
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B

IκB	Inhibitor of kappa B
PLA2	Phospholipase A2
MIF	Migration inhibitory factor
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
NEF	Nucleotide exchange factor
JDPs	J-domain proteins
SBD	Substrat Binding Domain
FITC	Fluoroisothiocyanate
PE	Phycoerythrin
NK-kB	Nuclear Factor-kB
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
HMGB-1	High mobility group box 1 protein
NK	Natural killer cell
TLR4-MD	Toll like receptor4-driven signal
ADCC	Antibody-dependent cytotoxicity
AKT	Serine/treonine kinase
hTERT	Human telomere-specific reverse transcriptase
Sti/Hop -1	Stress-inducible protein 1
TPR 2	Three tetratricopeptide repeat 2
TNFR1 receptor	Tumor necrotic factor type 1
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor
MBP	Myelin basic protein
GFAP	Glial fibrillary acid protein

NSE	Neuron-specific enolase
BDPs	Break down products
S 100B	Calcium-binding protein B
BDNF	Brain-derived neurothrophic factor
NLR	NOD-like receptor

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΟ

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

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹Flom G, Weekes J, Johnson JL. Novel interaction of the Hsp 90 chaperone machine with Ss12, an essential DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2005;47(6):368-80.
- ²Riedmann NC, Guo RF, Wang PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112(4):460-7. Review.
- ³ Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Re*. 2003;16:379-414. Review.
- ⁴Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(3):858-73.
- ⁵ Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Critical Care Medicine*. 2013;41(2):580-637.
- ⁶Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Review.
- ⁷Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular Medicine*. 2008; 14(7-8):476-84.
- ⁸ Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
- ⁹Lakhani SA and Bogue CW. Toll-like receptor signaling in sepsis. *Current Opinion in Pediatrics* 2003;15(5):278-82.
- ¹⁰O'Neill LA. A critical role for citrate metabolism in LPS signaling. *Biochemical Journal* 2011;438(3): e5-6. doi: 10.1042/BJ20111386.
- ¹¹Liu S, Salyapongse AN, Geller DA, Vodovotz Y, Billiar TR. Hepatocyte toll-like receptor 2 expression in vivo and in vitro: role of cytokines in induction of rat TLR2 gene expression by lipopolysaccharide. *Shock*. 2000;14(3):361-5.
- ¹²Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*. 1999; 27(7):1230-5.
- ¹³ Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Critical Care Medicine* 2007;35(10):2408-16.
- ¹⁴Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
- ¹⁵Watson RS, Carcillo JA. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(3Suppl):83-5. Review.
- ¹⁶Ruth A, McCracken C, Fortenberry J, Hall M, Simon H, Hebbard K. Pediatric Severe Sepsis: Current Trends and Outcomes from the Pediatric Health Information Systems Database. *Pediatr Crit Care Med* 2014;15(9): 828-38.
- ¹⁷Bone RC. Sir Isaac Newton. Sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24(7):1125-8.
- ¹⁸Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296,(5566): 301-5.
- ¹⁹Matzinger P. An innate sense of danger. *Ann N.Y. Acad Sci* 2002;961:341-2. Review.
- ²⁰Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptors responses. *J Leukoc Biol* 2004, 75(3):400-7.
- ²¹Khan F, Baguley IJ, Cameron ID. Rehabilitation after traumatic brain injury. *Med J* 2003;178(6): 290-5.

- ²²Langlois JA, Rutland-Brown W, Thomas KE. The incidence of traumatic brain injury among children in the United States: differences by race. *J Head Trauma Rehabil* 2005;20(3):229-38.
- ²³Bondanelli M, Ambrosio MR, Zatelli MC, De ML, gliUberti EC. Hypopituitarism after traumatic brain injury. *Eur J Endocrinol* 2005;152(5): 679-91.Review.
- ²⁴Kingman TA, Mendelow AD, Graham DI, Teasdale GM. Experimental intracerebral mass: time-related effects on local cerebral blood flow. *J Neurosurg* 1987;67(2):732-8.
- ²⁵Siesjö BK, Siesjö P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996;13(3): 247-68.
- ²⁶Flohé SB, Flohé S, Schade FU. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immunity* 2008;14(6):333-44.
- ²⁷Dash PK, Zhao J, Hergenroeder G, Moore AN. Biomarkers for the diagnosis, prognosis and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010;7(1):100-14.
- ²⁸Palfreyman JW, Thomas DG, Ratcliffe JG. Radioimmunoassay of human myelin basic protein in tissue extract , cerebrospinal fluid and serum and its clinical application to patients with head injury. *CinChimActa* 1978; 82(3)259-70.
- ²⁹Kövesdi E, Lückl J, Bukovics P, Farkas O, Pál J, Czeiter E, Szellár D, Dóczy T, Komoly S, Büki A. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *ActaNeurochir (Wien)*. 2010;152(1):1-17
- ³⁰Da Rocha AB, Zanoni C, de Freitas GR, André C, Himelfarb S, Schneider RF, Grivicich I, Borges L, Schwartzmann G, Kaufmann M, Regner A. Serum HSHP72 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J Neurotrauma* 2005;22(9):966-77.
- ³¹ Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420(6917):885-91.
- ³² Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, Davis CG, McDunn JE, Hotchkiss RS. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol*. 2008;83(4):1009-18.
- ³³Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390(6658):350-1.
- ³⁴Kellum JA, Kong L, Fink MP, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: Results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Arch Intern Med 2007;167(15):1655-63.
- ³⁵Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carle J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg?. *Circulatory Shock* 1992;38(2):145-52.
- ³⁶Blackwell TS and Christman JW . Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthesia* 1996; 77(1):110-7.
- ³⁷Rivers E, Nguyen B, Havstad S et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine* 2001;345(19):1368-77.
- ³⁸Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Coimbra R. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *Journal of Trauma* .1996; 40(5):702-9.
- ³⁹Parameswaran N, Patil N . Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2010; 20(2):87-103.
- ⁴⁰Feldmann M, Brennan FM, Elliot M, Katsikis P, Maini RN . TNF α as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Circulatory Shock*. 1994;43(4):179-84.
- ⁴¹Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in pathogenesis of septic shock . *Chest*. 1997;112(6): 321-9.
- ⁴²Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* .1988;81(4): 1162-72.
- ⁴³Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2005;8(2):101-5.
- ⁴⁴Fontain V, Mohamed-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*. 2002;22:216-31.

- ⁴⁵Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiology roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*.1998;128(2): 127-37.
- ⁴⁶Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Critical Care Medicine* 1996;24(3): 392-7.
- ⁴⁷Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin-6, interleukin-1, and fatal outcome. *Journal of Experimental Medicine* 1989;169(1):333-8.
- ⁴⁸Kushner I, Rzewnicki DL. The acute phase response: general aspects. *Bailliere's Clinical Rheumatology*.1994; 8(3):513-30.
- ⁴⁹Woiciechowsky C, Schönig B, Cobanov J, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD. Early IL-6 concentrations correlate with severity of brain injury and pneumonia in brain-injured patients. *J Trauma*.2002;52(2):339-45.
- ⁵⁰Kinasewitz GT, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. *Crit Care*.2004;8(2):R82
- ⁵¹Dougnac A, Riquelme A, Calvo M, et al. Study of cytokines kinetics in severe sepsis and its relationship with mortality and score of organic dysfunction. *Rev Med Chil* 2001; 129(4):347-58.
- ⁵²Van Griensven M. Trauma und Infection. II Internationales Symposium: Sepsis, SIRS, Immunantwort. Diagnostik und Therapeutische Ansätze. 2002:24.
- ⁵³Finfer SR, Cohen J. Severe traumatic brain injury, *Resuscitation*.2001;48(1):77-90.
- ⁵⁴Roman-Marchant O, Orellana-Jimenez CE, De Backer D, Melot C, Vincent JL: Septic shock of early or late onset: does it matter? *Chest*.2004;126(1):173-8.
- ⁵⁵Wong HR, Cvijanovich N, Wheeler DS, Bigham MT, Monaco M, Odoms K, Macias WL, Williams MD. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*.2008;178(3):276-82.
- ⁵⁶Crespo AR, Da Rocha AB, Jotz GP, Schneider RF, Grivicich I, Pinheiro K, Zanoni C, Regner A. Increased serum sFas and TNF alpha following isolated severe head injury in males. *Brain Inj* 2007;21(4):441-7.
- ⁵⁷Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarquez-Lopez A, et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*.2001;15(4):232-6.
- ⁵⁸Lafiti SQ, O'Riordan MA, Levine AD. "Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock". *Infection and Immunity*.2002;70(8):4441-6.
- ⁵⁹Tryzmel J, Miskolci V, Castro-Alcaraz S, Vancurova I, Davidson D. Interleukin-10 inhibits proinflammatory chemokine release by neutrophils of the newborn without suppression of nuclear factor- κ B. *Pediatr Res*.2003;54(3):382-6.
- ⁶⁰Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992; 12(4):239-47.
- ⁶¹Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effect of interleukin -10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res*.1994;13(1):47-54.
- ⁶²Hempel L, Köhrholz D, Nussbaum P, Bönig H, Burdach S, Zintl F. High interleukin -10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*.1997;20(5):365-8.
- ⁶³Sobieski MA, Graham JD, Pappas PS, Tatoes AJ, Slaughter MS. Reducing the effects of the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: can single dose steroids blunt systemic inflammatory response syndrome? *ASAIO J* 2008;54(2):203-6.
- ⁶⁴Whitlock RP, Young E, Noora J, Farrokhyar F, Blackall M, Teoh KH. Pulse low dose steroids attenuate post-cardiopulmonary bypass SIRS; SIRS. *I J Surg Res*.2006;132(2):188-94.
- ⁶⁵Knoblauch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*.1998;153(1):143-51.
- ⁶⁶Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*.1999;42(1-3):23-30.

- ⁶⁷Barati M, Alinejad F, Bahar MA, et al. Comparison of WBC, ESR, CRP and PCT serum levels in septic and non-septic burn cases. *Burns*.2008;34(6):770-4.
- ⁶⁸Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J*.1997;16(8):735-46.
- ⁶⁹Young B, Gleeson M, Gripps AW. C-reactive protein : a critical review. *Pathology*.1991;23(2):118-24.
- ⁷⁰Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le Tulzo Y, Lavare S, Feuillu A, Thomas R. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU? *Intensive Care Med*.2000;26(9):1232-8.
- ⁷¹Ugarte H, Silva E, Mercan D, De Mendoca A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27(3):498-504.
- ⁷²Cox ML, Rudd AG, Gallimore R, Hodgkinson HM, Pepys MB. Real-time measurement of serum C-reactive protein in the management of infection in elderly. *Age Ageing*.1986;15(5):257-66.
- ⁷³Socha LA, Gowardman J, Silva D, Correcha M, PetroskyN.Elevation in interleukin 13 levels in patients diagnosed with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med*.2006;32(2):244-50.
- ⁷⁴Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, Ritz R. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*.2000;28(4):977-83.
- ⁷⁵Meisner G, Tschaikowsky K, Palmaers T, Schmidt J. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care Med*.1999;3(1):45-50.
- ⁷⁶Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. *Crit Care Med*.2000;28(7):2591-4.
- ⁷⁷Wanner GA, Keel M, Steckholzer U, Beier W, Stocker R, Ertel W. Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure and mortality in injured patients. *Crit Care Med*.2000;28(4):950-7.
- ⁷⁸Brown K, Brain S, Pearson J, Edgeworth J, Lewis S, Treacher D. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*.2006; 368(9530):157-69.
- ⁷⁹Conway Morris A, Kefala K, Wilkinson TS, Dhaliwal K, Farrell L, Walsh T, Mackenzie SJ, Reid H, Davidson DJ, Haslett C, Rossi AG, Sallenave JM, Simpson AJ. C5a mediates peripheral blood neutrophil dysfunction in critically ill patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.2009;180(1):19-28.
- ⁸⁰Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and Monocyte CD64 and CD163 Expression in Critically Ill Neonates and Children with Sepsis: Comparison of Fluorescence Intensities and Calculated Indexes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:202646. doi: 10.1155/2008/202646.
- ⁸¹Fjaertoft G, Håkansson LD, Pauksens K, Sisask G, Venge P. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection : a study on kinetics and impact of major surgery. *Scand J Infect Dis*.2007;39(6-7):525-35.
- ⁸²Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavenik-Arnold M, Kopitar AN, Gmeiner-Stopar T, Dergane M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med*.2009;35(11):1950-8
- ⁸³Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, Papasteriades C, Armaganidis A, Roussos C, Orfanos SE, Douzinas EE. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8:sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*.2006;36(5-6):283-90.
- ⁸⁴Cardelli P, Ferraironi M, Amodeo R, Tabacco F, De Blasi RA, Nicoletti M, Sessa R, Petrucca A, Costante A, Cipriani P. Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(1):43-9.
- ⁸⁵Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med*.2006;130(5):654-61.

- ⁸⁶Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *ClinExpImmunol* 2001;125(2): 258-65.
- ⁸⁷Herra CM, Keane CT, Whelan A. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *J Med Microbiol.*1996;44(2):135-40.
- ⁸⁸Fjaertoft G, Håkansson LD, Ewald U, Foucard T, Venge P. Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fcγ-receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res.*1999;45(6):871-6.
- ⁸⁹Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, Garcí-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.*2010;60(5):313-9.
- ⁹⁰Gros A, Roussel M, Sauvadet E, Gacouin A, Marqué S, Chimot L, Lavoué S, Camus C, Fest T, Le Tulzo Y. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2012;38(3):445-52.
- ⁹¹Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I, Kotilainen P, Rajamäki A, Nikoskelainen J, Lilius EM. Quantitative analysis of complement receptors, CRI (CD35) and (CD11b), on neutrophils improves distinction between bacterial and viral infections in febrile patients: comparison with standard clinical laboratory data. *J Immunol Methods.*2006;315(1-2):191-200.
- ⁹²Turunen R, Andersson S, Nupponen I, Kautiainen H, Sjitonen S, Repo H. Increased CD11b-density on circulating phagocytes as an early sign of late-onset sepsis in extremely low-birth-weight infants. *PediatrRes.*2005 ;57(2):270-5.
- ⁹³Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.*2006;12(6):682-7.
- ⁹⁴White-Owen C, Alexander JW, Babcock CF: Reduced expression of neutrophil CD11b and CD18 after severe traumatic injury. *J Surg Res.*1992;52(1):22-6.
- ⁹⁵Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.*1962;18:571-3.
- ⁹⁶Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones*1996;1(2):97-8.
- ⁹⁷Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia.*1992; 48(7):629-34.
- ⁹⁸Kelly S, Yenari MA. Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr Med Res Opin* 2002;18:s 55-60.
- ⁹⁹Guzhova I and Margulis B. HSHP72 Chaperone as a Survival Factor in Cell pathology. *Int Rev Cytol* 2006; 254:101-49.
- ¹⁰⁰Tavaria M, Gabriele T, Kola, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human HSHP72 family. *Cell Stress Chaperones.*1996 ;1(1):23-8.
- ¹⁰¹Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
- ¹⁰²Multhoff G, Hightower LE. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (HSHP72) on the cell surface by HSHP72-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones.*2011;16(3): 251-5.
- ¹⁰³Gunther E, Walter L. Genetic aspects of HSHP72 multigene family in vertebrates. *Experientia* 1994;50: 987-1001.
- ¹⁰⁴Srisam M, Osipiuk J, Freeman BC, Morimoto R I, Joachimiak A. Humans HSHP72 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATP-ase domain. *Structure* 1997; 5(3):403-14.
- ¹⁰⁵Feige U, Polla BS. Hsp 70-a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*1994;50(11-12):979-86.
- ¹⁰⁶Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat -shock cognate protein. *Nature*,1990;346(6285): 623-8.
- ¹⁰⁷Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *ExercImmunol Rev.*2005;11:34-5.

- ¹⁰⁸Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH.HSP72 release from peripheral blood mononuclear cells. *BiochemBiophys Res Commun*.2004;324(2):511-7.
- ¹⁰⁹Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involvinglysosomal endosomes. *J Immunol*.2006 ;177(11):7849-57.
- ¹¹⁰Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G.Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005;65(12): 5238-47.
- ¹¹¹Kampinga HH, Craig EA.The HSP72 chaperone machinery : J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*2010;11(8):579-92.
- ¹¹² Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louver R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van WuytswinkelO.The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J*.2008;6(6):609-18.
- ¹¹³Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. Aggregation of hsc 70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur J Biochem*.1999;259(1-2):505-12.
- ¹¹⁴Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*.2007;81(1):15–27.
- ¹¹⁵Evans CG, Wisen S,Gestwicki JE. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid β -(1-42) aggregation in vitro, *Journal of Biological Chemistry*.2006; 281(44):33182-91.
- ¹¹⁶Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R, van der Zee R .Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptative immunity. *Eur J Immunol*.2000; 30(2):594-603.
- ¹¹⁷Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK.Heat shock proteins gp96 and HSP72 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol*.2002;168(6):2997-3003.
- ¹¹⁸ Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrmann M, Diaz JC, Steinem C, Multhoff G, Arispe N, Maio A. HSP72 translocates into the plasma membrane after stress and its released into the extracellular environment in a membrane –associated form that activates macrophages. *J Immunol* .2008;180(6):4299-307.
- ¹¹⁹Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP72 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*.2002;277(17):15107-12.
- ¹²⁰ Buchner J.Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*.1999;24(4):136-41.
- ¹²¹Obermann WMJ, SondermannH,RussoAA,Pavletich NP,Hartl FU. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 1998; 143:901-910.
- ¹²²Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivasta PK. Necrotic but not apoptotic cell death release heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kb pathway. *Int Immunol*.2000;12(11):1539-46.
- McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular HSP90 α via exosomes increases cancer cell motility: A role for plasminogen activation. *BMC Cancer* .2010;10:294.doi:10.1186/1471-2407-10-294.
- ¹²⁴ Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, Berk BC. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*.2000; 275(1):189-96.
- ¹²⁵Lv LH, Wan YL, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li GL, Lin HM, Shang CZ, Chen YJ, Min J. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem*.2012; 287(19):15874-85.
- ¹²⁶ Song X, Luo Y. The regulatory mechanism of HSP90 α secretion from endothelial cells and its role in angiogenesis during wound healing. *BiochemBiophys Res Commun*.2010;398(1):111-7.
- ¹²⁷Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, Graner M, Frederick B, Agarwal R, Deep G. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *MolCarcinog*.2013,doi:10.1002/mc.22124.

- ¹²⁸ Echeverria PC and Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *BiochemBiophys Acta*.2010;1803(6):641-9.
- ¹²⁹ Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition:CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-4.
- ¹³⁰ Cowen LE and Lindquist S.Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi.*Science*. 2005;309(5744):2185-9.
- ¹³¹ Pearl LH, ProdromouC. Structure and in vivo function of Hsp90. *CurrOpinStruct Biol*.2000;10(1):46-51.
- ¹³² Young JC, Barral JM,Ulrich Hartl F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends. Biochem. Sci*.2003;28(10):541-7.
- ¹³³ Li X, Luo R, Jiang R, Meng X, Wu X, Zhang S, Hua W.: The role of the Hsp90/Akt pathway in myocardial calpain-induced caspase-3 activation and apoptosis during sepsis. *BMC CardiovascDisord*. 2013;13:8.
- ¹³⁴ Lei H, Romeo G, Kazlauskas A. Heat shock protein 90a –dependent translocation of annexinII to surface of endothelial cells modulates plasminogen activity in the diabetic rat aorta. *Circ Res*. 2004;94(7):902-9.
- ¹³⁵ Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *ProcNatlAcadSci USA*. 2002;99:896-900.
- ¹³⁶ Murshid T, Gong J, Calderwood SK. Heat shock protein 90 mediates efficient antigen cross presentation through the scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *J Immunol*.2010;185(5):2903-17.
- ¹³⁷ Oberbeck R, Deckert H, Bangen J, Kobbe P, Schmitz D. Dehydroepiandrosterone: a modulator of cellular immunity and heat shock protein 70 production during polymicrobial sepsis. *Intensive Care Med*.2007;33(12):2207-13.
- ¹³⁸ Anderson CC, Matzinger P. Danger: the view from the bottom of the cliff. *SeminImmunol*. 2000;12(3):231-8; discussion 257-344.
- ¹³⁹ Kiang JG. Inducible heat shock protein 70kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Research*.2004; 14(6): 450-9.
- ¹⁴⁰ Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J ExpBiol* 2004;207(Pt18):3213-20.
- ¹⁴¹ Lang A, Benke F, Eitner D, Engel S, Ehrlich M, Breloer E, Hamilton-Williams S, Specht A, HoeraufJ, Floege A, von Bonin, Kurts C. Heat shock protein 60 is released in immune-mediated glomerulonephritis and aggravates disease: in vivo evidence for an immunologic danger signal. *J Am SocNephrol*.2005 ;16(2):383–91.
- ¹⁴² Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, Hoover David L: Overexpression of HSP-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine*.2001;16(6):210-9.
- ¹⁴³ Suganuma T, Irie K,Fujii E, Yoshioka T, MurakiT.Effect of heat stress on lipopolysaccharide-induced vascular permeability change in mice. *J PharmacolExp Ther*.2002;303(2):656-63.
- ¹⁴⁴ Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG.Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y AcadSci*.2005;1053:74-83.
- ¹⁴⁵ Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol*.2006; 177(10):7184-92.
- ¹⁴⁶ Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki D-M, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies- a hypothetical:comparative:study. *Bio Med Res Int*. 2014;2014:101023.
- ¹⁴⁷ Singleton KD and WischmeyerPE.Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock* .2006;25(3):295-9.
- ¹⁴⁸ Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, YoshidomeH, et al.Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection.*Am J Surg*. 2004;187(6):777-84.
- ¹⁴⁹ Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ishaemia and the inflammatory response: Release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*. 2005;91(3):299-304.

- ¹⁵⁰Adewoye AH, Klings ES, Farber HW, et al. Sick cell vasoocclusive crisis induces the release of circulating serum heat shock protein-70. *Am J Hematol*.2005;78(3):240-2.
- ¹⁵¹Oglesbee MJ, Herdman AV, Passmore GG, Hoffman WH. Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible70-kDa heat shock protein. *ClinBiochem*.2005;38(10):900-4.
- ¹⁵²Wheeler DS, Fisher LE, Catravas JD, Jacobs BR,CarilloJA,Wong HR. Extracellular HSP72 levels in children with septic shock.*PediatrCrit Care Med* .2005;6(3):308-11.
- ¹⁵³Gelain DP, de BittencourtPasquali MA, Comin MC, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC et al.Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock* .2011;35(5):466-70.
- ¹⁵⁴Guzhova I, Kislyakova K, MoskaliovaO,Fridlanskaya I, Tyell M, Cheetham M, MargulisB.In vitro studies show that HSP72 can be released by glia and that exogenous HSP72 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res*.2001; 914(1-2):66-73.
- ¹⁵⁵Manaenko A, Fathali N, Chen H, Suzuki H, Wiliams S, Zhang JH, Tang J. Heat Shock protein 70 upregulation by geldanamycin reduces brain injury in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Neurochemistry International*.2010;57(7):844-50.
- ¹⁵⁶Turturici G, Sconzo G, Geraci F. HSP72 and its molecular role in nervous system disease.*Biochem Res Int*. 2011;2011:618127.
- ¹⁵⁷Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival.*J Trauma*.2002;52(4):611-7.
- ¹⁵⁸Lai Y, Kochanek PM, Adelson PD, Janesko K, Ruppel RA, Clark RS.Induction of the stress response after inflicted and non-inflicted traumatic brain injury in infants and children. *J Neurotrauma* 2004;21(3):229-37.
- ¹⁵⁹Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):429-39.
- ¹⁶⁰Radjev S, Hara K, KokuboY,Mestrl R, Dillmann W, Weinstein PR, Sharp FR .Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol*.2000;47(6):782-91.
- ¹⁶¹GiffardRG.Yenari MA. Many mechanisms for HSP72 protection from cerebral ischemia. *J NeurosurgAnesthesiol*.2004;16(1):53-61.
- ¹⁶²Sato S, Fujita N, TsuruoT.Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.*ProcNatlAcadSci USA*.2000;97(20):10832-7
- ¹⁶³Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Nakamori Y, NoborioM, et al. Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis.*J Trauma*.2001; 51(6): 1104-9.
- ¹⁶⁴Zhao Y, Huang ZJ, Rahman M, Luo Q, Thorlacius H. Radicicol, an Hsp90 inhibitor, inhibits intestinal inflammation and leakage in abdominal sepsis *J Surg Res*. 2013;182(2):312-8.
- ¹⁶⁵Chatterjee A, Dimitropoulou C, Drakopanayiotakis F, Antonova G, Snead C, Cannon J, Venema RC, Catravas JD. Heat shock protein 90 inhibitors prolong survival, attenuate inflammation, and reduce lung injury in murine sepsis. *Am JRespirCrit Care Med*. 2007;176(7):667-75.
- ¹⁶⁶Sutherland A, Ellis D. Treatment of a critically ill child with disseminated *Candida glabrata* with a recombinant human antibody specific for fungal heat shock protein 90 and liposomal amphotericin B, caspofungin, and voriconazole. *PediatrCrit Care Med*. 2008;9:e23-e5.
- ¹⁶⁷Joshi AD, Barabuti N, Birmas C, Dimitropoulou C, Thangjam G, Cherian-Shaw M, Dennison J, Catravas JD. Histone deacetylase inhibitors prevent pulmonary endothelial hyper-permeability and acute lung injury, by regulating heat shock protein 90 function.*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Oct 23;ajplung.00180.2015.
- ¹⁶⁸Pollack MM, Patel KM, RuttimannUE .PRISM III: an updated Pediatric Risk of Mortality score. *Crit Care Med* .1996; 24(5): 743-52.
- ¹⁶⁹Keene AR, Cullen DJ.Therapeutic Intervention Scoring System: update. *Crit Care Med* .1983;11(1):1-3.
- ¹⁷⁰Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Proulx F, Grandbastien B, Cotting J, Gottesman R, Joffe A, Pfenninger J, Hubert P, Lacroix J, Leclerc F. Validation of the pediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. *Lancet*.2003; 362(9379):192-7.
- ¹⁷¹Goldstein B, Giroir B, Randolph A: International pediatric consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *PediatrCrit Care Med* .2005; 6(1):2-8.

- ¹⁷² Wilkinson JD, Pollack MM, Glass NL, Kanter RK, Katz RW, Steinhart CM: Mortality associated with multiple organ system failure and sepsis in pediatric intensive care unit. *J Pediatr.*1987;111:324-8.
- ¹⁷³Wheeler DS, Wong HR.Heat shock response and acute lung injury. *Free RadicBiol Med* 2007; 42(1):1-14.
- ¹⁷⁴Dybdahl B, Wahba A, Haaverstad R, Kirkeby-Garstad I, KierulfP,Espevik T, Sundan A. On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting: more heat-shock protein 70 is released after on pump surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(6):985–92.
- ¹⁷⁵ Lang A, Benke F, Eitner D, Engel S, Ehrlich M, Breloer E, Hamilton-Williams S, Specht A, HoeraufJ, Floege A, von Bonin, Kurts C. Heat shock protein 60 is released in immune-mediated glomerulonephritis and aggravates disease: in vivo evidence for an immunologic danger signal. *J Am SocNephrol.*2005;16(2):383–91.
- ¹⁷⁶Oberbeck R, Deckert H, Bangen J, Kobbe P, Schmitz D. Dehydroepiandrosterone: a modulator of cellular immunity and heat shock protein 70 production during polymicrobial sepsis. *Intensive Care Med.*2007;33(12):2207-13.
- ¹⁷⁷Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol.*2006; 177(10):7184-92.
- ¹⁷⁸Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, Goukos D, Psarra K, Botoula E, Tsagarakis S, Magira E, Routsis C, Nanas S, Briassoulis G: Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90a in severe sepsis and SIRS. *Bio Med Res Int.*2014, 2014:803561.
- ¹⁷⁹ Zhang R, Wan XJ, Zhang X, Kang QX, Bian JJ, Yu GF 2, Wang JF, Zhu KM: Plasma HSPA12B is a potential predictor for poor outcome in severe sepsis *PLOS ONE.*2014;9(6):e101215.
- ¹⁸⁰Hotchins RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression : from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:862-74.
- ¹⁸¹Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *ClinExpImmunol.* 2001;125(2):258-65.
- ¹⁸²Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz R, Rinder HM, BhandariV. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis.*Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(7):777-81.
- ¹⁸³Genel F, Atlihan F, Gulez N, Kazanci E, Vergin C, Terek DT, YurdunOC.Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World J Pediatr.* 2012;8(1):72-5.
- ¹⁸⁴Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* 2006; 25(4):351-7.
- ¹⁸⁵Gruber M, Christ-Crain M, Stolz D, Keller U, Müller C, Bingisser R, Tamm M, Mueller B, SchuetzP.Prognostic impact of plasma lipids in patients with lower respiratory tract infections - an observational study. *Swiss Med Wkly.*2009; 139(11-12):166-72.
- ¹⁸⁶Kumaraswamy SB, Linder A, Akesson P, DahlbäckB. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care.* 2012;16(2):R60. [Epub ahead of print]
- ¹⁸⁷van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP.Lipoproteinmetabolism in patientswith severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(5):1359-66.
- ¹⁸⁸Kosuge M, Kimura K, Ishikawa T, Shimizu T, Sugano T, Sumita S, Hibi K, Takamura T, Toda N, Kanna M, Tsukahara K, Okuda J, Tahara Y, Nozawa N, FurukawaE,Umemura S. Different clinicalandcoronaryangiographicfindingsaccordingtoratios of total cholesterol to high-densitylipoprotein cholesterol during the acute phase of myocardialinfarction. *J Cardiol* 2004 Jun; 43(6):251-8.
- ¹⁸⁹Harris HW, Johnson JA, WigmoreSJ.Endogenous lipoproteins impact the response to endotoxin in humans. *Crit Care Med* 2002; 30(1):23-31.
- ¹⁹⁰Fitrolaki DM, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G.CD64 –Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury inchildren. *BMC Pediatr.*2013; 13:31.
- ¹⁹¹ Mickiewicz B, Vogel HJ, Wong HR, Winston BW. Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J RespirCrit Care Med.*2013 May 1;187(9):967–76.
- ¹⁹²Roesslein M, Froehlich C, Jans F, Piegeler T, Goebel U, Loop T. Dobutamine mediates cytoprotection by induction of heat shock protein 70 in vitro. *Life Sci* 2014;98:88-95.

¹⁹³Roesslein M, Schibilsky D, Muller L, et al. Thiopental protects human T lymphocytes from apoptosis in vitro via the expression of heat shock protein 70. J PharmacolExpTher 2008;325:217-25.