

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Δ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΜΠΟΥΜΠΑΣ



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ IL-17 ΣΤΗΝ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ
ΣΗΠΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Π. ΜΑΡΑΒΙΤΣΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΟΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΕΒΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΒΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 05/03/2009

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος και πρωτοκόλλου διδακτορικής διατριβής:
19/08/2009

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης έκθεσης προόδου: 03/09/2010

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης έκθεσης προόδου: 12/10/2014

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης έκθεσης προόδου: 10/12/2008

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 10/12/2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Αναπλ. Καθηγητής Ε. Ι. Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης, Επιβλέπον Μέλος ΔΕΠ

Καθηγήτρια Κ. Κανελλακοπούλου

Καθηγητής Δ. Βλαχάκος

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Π. Σφηκάκης

Στον γιό μου, Φίλιππο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό	6
Αντί προλόγου	9
Γενικό Μέρος	
1.Εισαγωγή	12
2. Νεφρική βλάβη στη σήψη	14
2.1 Διαταραχές στη μακροκυκλοφορία του νεφρού	15
2.2. Διαταραχές στη μικροκυκλοφορία του νεφρού	16
2.2. Αύξηση φλεγμονωδών παραγόντων και οξειδωτικού stress	18
2.3. Ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης	21
3. Ιντερλευκίνη-17	22
3.1. Δομή της IL-17	24
3.2. Γονιδιακή έκφραση	24
3.3. Θεραπευτικοί Στόχοι	25
3.4. IL-17 και Νεφρός	26
Ειδικό Μέρος	
Ασθενείς και Μέθοδοι	31
Αποτελέσματα	38
Συζήτηση	63
Ελληνική περίληψη	67
Αγγλική περίληψη	68
Βιβλιογραφία	69

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Μαραβίτσα Παναγιώτα
Ημερομηνία γέννησης: 13 Δεκεμβρίου 1982
Διεύθυνση: Ηφαίστου 24B , Βάρη
Τηλέφωνο: +30 694 2993301
Ηλεκτρονική διεύθυνση: *myrpenny13@hotmail.com*

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Ιούνιος 2016 : απόκτηση τίτλου ειδικότητας Νεφρολογίας
- 2012- 2016 : ειδικότητα Νεφρολογίας «*Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών*»
- 2009-2011: ειδικότητα Παθολογίας (διετής εκπαίδευση) στο Γενικό νοσοκομείο Άργους
- 2009-2016: εκπόνηση και ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους διδακτορικής διατριβής με θέμα « *Ο ρόλος της IL-17 στη νεφρική ανεπάρκεια στα πλαίσια του σηπτικού συνδρόμου*».
- 2006:Πτυχίο Ιατρικής, *Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Λίαν Καλώς)*
- 2000: Απόφοιτη Ενιαίου Λυκείου Περιστερίου (Βαθμός : 19,7/20). Εισαγωγή με πανελλαδικές εξετάσεις στην Ιατρική Σχολή Αθηνών.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Μάρτιος 2012 – Μάρτιος 2016: Ειδικευόμενη Νεφρολογίας στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική (Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης, Υπεύθυνος Νεφρολογικού τμήματος: Καθηγητής Δ. Βλαχάκος)
- Σεπτέμβριος 2009- Ιούνιος 2011: Ειδικευόμενη Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Άργους

- Αύγουστος 2008 - Σεπτέμβριος 2009: Επιστημονικός Συνεργάτης, Δ' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ (Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ε. Γιαμαρέλλου)
- Απρίλιος 2007 - Αύγουστος 2008: Υπηρεσία Υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Βλαχόπουλου, (Μεσσηνία)
- Φεβρουάριος 2007 - Απρίλιος 2007: Τρίμηνη εκπαιδευτική εργασία στο Γενικό Νοσοκομείο Καλαμάτας

Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά μετά κρίση

1. Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, **Maravitsa P**, Adamis S, Alexiou Z, Andrianopoulos G, Antonopoulou A, Athanassia S, Baziaka F, Charalambous A, Christodoulou S, Dimopoulou I, Floros I, Giannitsioti E, Gkanas P, Ioakeimidou A, Kanellakopoulou K, Karabela N, Karagianni V, Katsarolis I, Kontopithari G, Kopterides P, Koutelidakis I, Koutoukas P, Kranidioti H, Lignos M, Louis K, Lymberopoulou K, Mainas E, Marioli A, Massouras C, Mavrou I, Mpalla M, Michalia M, Mylona H, Mytas V, Papanikolaou I, Papanikolaou K, Patrani M, Perdios I, Plachouras D, Pistiki A, Protopapas K, Rigaki K, Sakka V, Sartzi M, Skouras V, Souli M, Spyridaki A, Strouvalis I, Tsaganos T, Zografos G, Mandragos K, Klouva-Molyvdas P, Maggina N, Giamarellos-Bourboulis EJ. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. Critical Care 2010, 14: R96
2. Giamarellos-Bourboulis EJ, Spyridaki A, Savva A, Georgitsi M, Tsaganos T, Mouktaroudi M, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Papaziogas V, Baziaka F, Sereti K, Christopoulos P, Marioli A, Kanni T, **Maravitsa P**, Pantelidou I, Leventogiannis K, Tsiaoussis P, Lymberopoulou K, Koutelidakis I. Intravenous paracetamol as antipyretic and analgesic medication: the significance of drug metabolism. Journal of Pharmacological Sciences 2014, 124: 144-152
3. Maravitsa P, Adamopoulou M, Pistiki A, Netea MG, Louis K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Systemic over-release of interleukin-17 in acute kidney injury

after septic shock: clinical and experimental evidence. Immunology Letters
2016, 178: 68-76

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ: Cambridge Proficiency in English (grade B)

ΓΑΛΛΙΚΑ : Delf (A1,A4)

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η σήψη, στις σοβαρότερες εκφάνσεις της δηλαδή την σοβαρή σήψη και την σηπτική καταπληξία, αποτελεί παγκοσμίως την συχνότερη αιτία νοσηλείας στη ΜΕΘ, ενώ είναι μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου. Η ευαισθητοποίηση όλων των γιατρών για ταχεία αντιμετώπιση του συνδρόμου ως επείγουσα κατάσταση, η επιθετική αντιμετώπιση από τις πρώτες ώρες και η αναζήτηση κλίνης στη ΜΕΘ για τις σοβαρότερες μορφές της σήψης οδηγεί σε βελτίωση της τελικής έκβασης και μείωση της θνητότητας. Σε αυτήν την κλιμάκωση των μέτρων συντέλεσε η σύνταξη κατευθυντήριων γραμμών αντιμετώπισης της σύνθετης αυτής νοσηρής κατάστασης. Από τις πρωταρχικές εκδηλώσεις της σηπτικής καταπληξίας αποτελεί η εγκατάσταση οξείας νεφρικής βλάβης κυρίως λόγω της υποάρδευσης του νεφρού.

Στο κέντρο των ανθρώπινων μηχανισμών άμυνας βρίσκεται το σύστημα της εγγενούς ανοσίας. Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που παράγονται από τα κύτταρα της εγγενούς και επίκτητης ανοσίας ως διαμεσολαβητές φλεγμονής αλλά και ως ρυθμιστές τόσο της ανοσιακής όσο και της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα πολύ υψηλά επίπεδα κυτταροκινών δεν βοηθούν πάντα στην κινητοποίηση της άμυνας του οργανισμού. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τον ρόλο της IL-17 ως διαμεσολάβητη φλεγμονής στο επίπεδο του νεφρού σε συνθήκες σηπτικής καταπληξίας, με την προοπτική να αποτελέσει μελλοντικά θεραπευτικό στόχο για την πρόληψη της ONB.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας των Λοιμώξεων της Δ' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη, καθοδήγηση και συνεχή στήριξη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ε. Γιαμαρέλλου-Μπουρμπούλη, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω που μου έδωσε την ευκαιρία να περιπλανηθώ στα άβυσσους και γοητευτικά μονοπάτια της ιατρικής έρευνας μέσα από μια προσπάθεια αρκετών ετών, η οποία συνέβαλλε αφενός να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στην ανοσολογία αλλά κυρίως να γνωρίσω και άλλες διαστάσεις της ιατρικής έρευνας. Η συνεχής συνεργασία μαζί του ήταν μια ανεξάντλητη πηγή γνώσης και έμπνευσης και τον ευχαριστώ θερμά.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω :

Τον Καθηγητή Δ. Βλαχάκο για την ουσιαστική καθοδήγηση του καθόλη τη διάρκεια της ειδικότητας μου στον τομέα της νεφρολογίας , ο οποίος ως φωτεινός δάσκαλος, μου μεταλαμπάδευσε γνώση, μου δίδαξε ήθος και εργατικότητα και πλέον αποτελεί σημείο αναφοράς σε κάθε διαγνωστικό ή θεραπευτικό προβληματισμό μου. Τον ευχαριστώ για την συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση του.

Την Καθηγήτρια Κ. Κανελλακοπούλου που μου μετέδωσε, από τα φοιτητικά μου χρόνια, την ιδιαίτερη αγάπη της για την λοιμωξιολογία

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου Δ. Δρογγίτη, Μ. Γεωργίτη, Κ. Πιστική, Μ. Δρογγίτη, Κ. Λούη, Η. Παντελίδου για την βοήθεια τους στην εκτέλεση των πειραμάτων και τη συλλογή των δειγμάτων καθώς και τον συνάδελφο Σ. Γρηγοριάδη για την έμπρακτη υποστήριξη του στη συγγραφή αυτού του πονήματος.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS) περιγράφηκε αρχικά απο το American College of Chest Physician and Society of Critical Care Medicine το 1991. Τα κριτήρια για το SIRS περιλαμβάνουν: α) μεταβολές στην θερμοκρασία του σώματος, β) μεταβολές στην καρδιακή συχνότητα, γ) ταχύπνοια και δ) μεταβολή στον αριθμό των λευκοκυττάρων. Για να τεθεί η διάγνωση του SIRS απαιτούνται δύο ή περισσότερα κριτήρια απο τα παραπάνω. Η σήψη αποτελεί υποκατηγορία του SIRS και χαρακτηρίζεται ως η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση στην παρουσία μιας επιβεβαιωμένης ή υποπτευθείσας λοίμωξης [1].

Κλινικά οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν πυρετό, ρίγος, επηρεασμένο επίπεδο συνείδησης, αιμοδυναμική αστάθεια έως και πολυοργανική ανεπάρκεια. Μικροσκοπικά παρατηρείται αύξηση στην τοπική και συστηματική κυκλοφορία φλεγμωνωδών διαμεσολαβητών, ενεργοποίησης βλαστοκυττάρων, διαταραχές στην μικροκυκλοφορία, παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και υποξαιμία [2]. Η σοβαρή σήψη αφορά ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια της σήψης και συνυπάρχει ανεπάρκεια κάποιου οργάνου ενώ η σηπτική καταπληξία αποτελεί υποκατηγορία της σοβαρής σήψης και χαρακτηρίζεται και απο υπόταση [1].

Αρκετοί εργαστηριακοί δείκτες συσχετίστηκαν με την επιβεβαίωση της διάγνωσης της σήψης. Σε αυτούς περιλαμβάνεται η προκαλσιτονίνη, η CRP (C-Reactive protein), ο TNFa (tumor necrosis factor a), κάποιες ιντερλευκίνες και η πρωτεΐνη C [3]. Η προκαλσιτονίνη έχει την μεγαλύτερη χρησιμότητα στο να αναγνωρίζει το λοιμογόνο αίτιο του SIRS. Παράλληλα γίνεται σημαντική έρευνα ώστε να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα της προκαλσιτονίνης για να ταξινομηθεί η βαρύτητα της σήψης [4].

Η σήψη προκαλείται ως ανοσιακή απάντηση σε μία λοίμωξη. Η λοίμωξη αυτή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων προκαλείται απο βακτήρια καθώς και απο μύκητες, ιούς ή παράσιτα. Οι πιο συνηθισμένες αιτίες πρωτοπαθούς λοίμωξης αφορούν στο αναπνευστικό σύστημα, στο ουροποιητικό σύστημα, στο εγκέφαλο, στο δέρμα και στο γαστρεντερικό σύστημα. Παράγοντες κινδύνου

είναι: α) η πολύ μικρή ή η πολύ μεγάλη ηλικία, β) εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα από διάφορες καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο πολυτραυματίας και το εκτεταμένο έγκαυμα [5].

Βασική είναι η επιθετική αντιμετώπιση στα πρώτα στάδια της σηπτικής καταπληξίας με χορήγηση κρυσταλλοειδών υγρών ενδοφλεβίως με στόχο μέση αρτηριακή πίεση 65mmHg και κεντρική φλεβική πίεση 8-12 mmHg (12-15mm Hg για όσους λαμβάνουν μηχανικό αερισμό). Σύμφωνα με τα δεδομένα από πρόσφατες πολυκεντρικές τυχαιοποιημένες μελέτες και με τις συστάσεις του 2012 της παγκόσμιας εταιρείας για την αντιμετώπιση της σήψης (Surviving Sepsis Campaign) τα κολλοειδή διαλύματα και ειδικότερα τα υδροξυαιθυλάμυλα μεγάλου μοριακού βάρους και οι δεξτράνες θα πρέπει να αποφεύγονται. Εάν η χορήγηση υγρών δεν είναι αρκετή στο να διατηρείται η αρτηριακή πίεση τότε μπορεί να χρησιμοποιηθούν αγγειοσυσπαστικά για τη διόρθωση της συστηματικής αγγειοδιαστολής που προκύπτει από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την απελευθέρωση NO. Παρά της ανησυχίας για την επαγόμενη από την νοραδρεναλίνη αγγειοσυστολή, με πιθανή επιδείνωση της νεφρικής άρδευσης και λειτουργίας, φαίνεται ότι ισχύει ακριβώς το αντίθετο και η νοραδρεναλίνη αναδεικνύεται ως αγγειοσυσπαστικό φάρμακο εκλογής.

Όταν η νεφρική δυσλειτουργία είναι πολύ σοβαρή και απειλεί τη ζωή του ασθενούς έχει ένδειξη η εξωνεφρική κάθαρση. Αν και οι δυο βασικοί τρόποι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, η συνεχής και η διαλείπουσα, είναι ισοδύναμες από άποψης έκβασης, η συνεχής θεραπεία είναι προτιμότερη σε βαριά πάσχοντες ασθενείς γιατί επιτυγχάνει καλύτερη ρύθμιση της αιμοδυναμικής τους κατάστασης. Προτείνεται το ισοζύγιο των υγρών ως βασικός καθοριστικός παραγοντας της διακοπής της θεραπείας υποκατάστασης, αφού φαίνεται ότι ένα αρνητικό ισοζύγιο πρέπει να είναι στόχος ειδικά μετά την επίτευξη της αιμοδυναμικής σταθερότητας. Μάλιστα σε αναδρομική μελέτη βρέθηκε ότι το αρνητικό ισοζύγιο κατά τη διάρκεια της θεραπείας σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο θανάτου στις 90 ημέρες, περισσότερες ημέρες εκτός εξωνεφρικής κάθαρσης, εκτός ΜΕΘ και εκτός νοσοκομείου [6].

Η σήψη ευθύνεται για εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως κάθε χρόνο και είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου σε νοσηλευόμενους ασθενείς [5,7].

Τα περιστατικά της σήψης παγκοσμίως εκτιμώνται στα 18.000.000 ετησίως [8] και στις Η.Π.Α , η σήψη προσβάλλει περίπου τρεις στους χίλιους ανθρώπους κάθε χρόνο. Έχει καταγραφεί ποσοστό σήψης στο 1-2% των νοσηλειών καθώς και ποσοστό 25% εξ αυτών που απαιτήθηκε εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας.

Αποτελεί την δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου σε μονάδα εντατικής θεραπείας και κατέχει μια απο τις δέκα πρώτες θέσεις στα αίτια θανάτου γενικότερα [9].

2. ΝΕΦΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΣΤΗ ΣΗΨΗ

Η σήψη αποτελεί τη συχνότερη αιτία οξείας νεφρικής βλάβης στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Η επίπτωση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ΟΝΑ) στη σήψη αναφέρεται από 5% ως 51%. Μάλιστα η επίπτωση της ΟΝΑ αυξάνεται αναλογικά με τη βαρύτητα της σήψης και ανέρχεται σε ποσοστό 19% των ασθενών με σήψη, 23% των ασθενών με σοβαρή σήψη και 51% αυτών με σηπτική καταπληξία. Η θνητότητα της σηπτικής ΟΝΑ παραμένει ιδιαίτερα υψηλή, κυμαινόμενη μεταξύ 50-70%, κυρίως λόγω της δυσχέρειας που υπάρχει στη διάγνωση της διαταραχής, αλλά και στην ατελή κατανόηση της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου. Τα τελευταία χρόνια ο όρος οξεία νεφρική ανεπάρκεια έχει αντικατασταθεί από την έκφραση «οξεία νεφρική βλάβη», που ανταποκρίνεται καλύτερα στην πραγματικότητα, αφού η επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας έχει πολλαπλές εκφάνσεις και βαρύτητες που κυμαίνονται από την ήπια βλάβη ως την τελικού σταδίου ανεπάρκεια που απαιτεί εξωνεφρική κάθαρση.

Η παθοφυσιολογία της είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και όχι ιδιαίτερα κατανοητή. Μέχρι πρόσφατα η υποάρδευση των νεφρών λόγω χαμηλής παροχής θεωρούνταν ο κυριότερος παράγοντας της οξείας νεφρικής βλάβης στην σήψη. Οι μηχανισμοί που περιλαμβάνονται στα νέα δεδομένα είναι :

1) η διαταραχή στην μακρο- και μικρο-κυκλοφορία του νεφρού

- 2) η ραγδαία αύξηση φλεγμονωδών παραγόντων και οξειδωτικού stress
- 3) η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης

2.1. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗ ΜΑΚΡΟ-ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ

Οι μεταβολές της νεφρικής σπειραματικής διήθησης στην παθογένεια της οξείας νεφρικής βλάβης αποτελεί αντικείμενο συνεχούς διαμάχης. Στην σήψη η διαμεσολάβηση των κυτταροκινών προκαλεί την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου με αποτέλεσμα την πτώση των συστηματικών αγγειακών αντιστάσεων και συνεπώς την αρτηριακή αγγειοδιαστολή [10,11]. Αυτό έχει ως συνέπεια την αιμοδυναμική κατάρριψη του οργανισμού και την επηρεασμένη αιμάτωση των οργάνων.

Η πτώση των αγγειακών συστηματικών αντιστάσεων μειώνει το καρδιακό προφορτίο και προκαλεί την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης και την απελευθέρωση της βάζοπρεσσίνης. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν σε νεφρική αγγειοσύσπαση, ισχαιμικές βλάβες και οξεία νεφρική ανεπάρκεια [11]. Η απελευθέρωση της νορεπινεφρίνης ως απάντηση της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος προκαλεί αγγειοσύσπαση στο προσαγωγό αρτηρίδιο με συνέπεια την μείωση της σπειραματικής διήθησης [11].

Θεωρητικά εάν η σηπτική οξεία νεφρική βλάβη χαρακτηρίζεται απο νεφρική υποαρδύση τότε η αποκατάσταση της αιμοδυναμικής αστάθειας θα ήταν ικανή να αποτρέψει την οξεία νεφρική βλάβη. Πράγματι, αυτή η υπόθεση υποστηρίχθηκε απο αρκετές μελέτες. Σε μία εξ αυτών βρέθηκε οτι μια τιμή μέσης αρτηριακής πίεσης μικρότερης των 75 mmHg στο πρώτο 24ωρο παραμονής σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας αποτελεί *ισχυρό προγνωστικό παράγοντα* για ανάγκη υποστήριξης με αιμοκάθαρση σε σηπτικούς ασθενείς [12]. Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε η συσχέτιση της μέσης αρτηριακής πίεσης και της νεφρικής λειτουργίας στην πρώιμη φάση της σηπτικής καταπληξίας, διαπιστώθηκε δηλαδή οτι η διατήρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης σε τιμές απο 72 έως 82 mmHg είναι αναγκαία ώστε να αποφευχθεί η οξεία νεφρική βλάβη

στην σήψη [13]. Πιο πρόσφατη προοπτική, πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης που περιλάμβανε πάνω από 300 ασθενείς διαπιστώθηκε ότι υποτασικά επεισόδια, που ορίστηκαν ως μέση αρτηριακή πίεση κάτω από 72 mmHg, σχετίζονταν με περαιτέρω εξέλιξη της οξείας νεφρικής βλάβης σε βαρέως πάσχοντες σηπτικούς ασθενείς [14]. Στην πρώιμη φάση της σηπτικής καταπληξίας το μονοξείδιο του άνθρακα αυξάνεται και το ίδιο συμβαίνει με τον ρυθμό ροής του αίματος. Ωστόσο η αγγειοσυστολή που προκαλείται στο απαγωγό αρτηρίδιο δημιουργεί μια κατάσταση χαμηλής πίεσης μέσα στα σπειραματικά τριχοειδή. Συνεπώς παρα τον αυξημένο ρυθμό ροής αίματος η πίεση στα σπειραματικά τριχοειδή μπορεί να είναι πολύ χαμηλή και να οδηγήσει σε πτώση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης [15].

2.2. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟ-ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ

Η νεφρική ροή αίματος αποτελεί το 25% της καρδιακής παροχής, υπερβαίνοντας τα 1000mL/min σε ηρεμία. Οι νεφροί δέχονται μια εξαιρετικά μεγάλη ποσότητα αίματος και έχουν χαμηλές τάσεις οξυγόνου. Αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη μικροαγγείωση του νεφρού, η οποία διαφέρει στο φλοιό από ότι στο μυελό. Η αιμάτωση της μυελώδους μοίρας είναι πολύ μικρή – αντιστοιχεί μόνο στο 1-2% της ολικής αιμάτωσης του νεφρού- σε σύγκριση με την αιμάτωση της φλοιώδους μοίρας. Αρχικά, το αίμα απάγεται από το σπείραμα μέσω των απαγωγών αρτηριδίων, τα οποία σχηματίζουν το περισκληναριακό τριχοειδικό δίκτυο, στο φλοιό. Στη συνέχεια, το σύστημα των περισκληναριακών τριχοειδών εξειδικεύεται στα ευθέα αγγεία, τα οποία αιματώνουν την εσωτερική και εξωτερική μοίρα του μυελού. Τα εν λόγω αγγεία κατέρχονται μέσα στον μυελό και επιστρέφουν στο φλοιό, παράλληλα με τις αγκύλες του Henle , διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη συμπίκνωση των ούρων πριν αποδώσουν το αίμα προς το φλεβικό σύστημα. Επιπλέον, αρτηριοφλεβικές τριχοειδικές αναστομώσεις, μεταξύ ανιόντων και κατιόντων ευθέων αγγείων εξασφαλίζουν μεγαλύτερη παροχή οξυγόνου στο μυελό. Η βασική λειτουργία της νεφρικής μικροκυκλοφορίας –ενός δικτύου αγγείων με διάμετρο <150μm αποτελούμενο από αρτηρίδια, τριχοειδή και φλεβίδια- είναι η εξασφάλιση επαρκούς ποσότητας οξυγόνου για την κάλυψη των

ενεργειακών αναγκών κάθε κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 80% της νεφρικής κατανάλωσης οξυγόνου χρησιμοποιείται για τη λειτουργία της Na-K-ATP ασης στο εγγύς σωληνάριο, μέσω της οποίας επαναρροφούνται περίπου τα 2/3 του NaCl που εισάγονται στο σωληναριακό αυλό με τη σπειραματική διήθηση [15].

Η σήψη προκαλεί σημαντικές αλλαγές στον ρυθμό μικροκυκλοφορίας του νεφρού. Αυτές οι αλλαγές χαρακτηρίζονται από ετερογένεια με κάποια από τα τριχοειδή να υπόκεινται σε υποάδρευση ενώ κάποια άλλα να έχουν φυσιολογική αιμάτωση ακόμη και υπεραιμία [16]. Αυτές οι διαταραχές στην μικροκυκλοφορία δημιουργούν μια περιοχή υποάρδευσης και υποξίας που επάγουν την φλεγμονή και την αποδιοργάνωση των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων [15-19]. Η προκαλούμενη από την σήψη διαταραχή στην μικροκυκλοφορία δημιουργεί περιοχές βραδείας περισωληναριακής ροής που πιθανότατα ενισχύουν τα φλεγμονώδη σήματα [20].

Η σήψη αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ενεργοποίησης και δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, κυτταροκίνες, χυμοκίνες, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα, μεταβολές στην οξυγόνωση και την αιματική ροή μπορούν να ενεργοποιήσουν το ενδοθήλιο, με συνέπεια δομικές και κυρίως λειτουργικές μεταβολές. Έτσι, ενώ φυσιολογικά το ενδοθήλιο έχει αντιπηκτικές ιδιότητες (παραγωγή NO, προστακυκλίνες) το δυσλειτουργούν ενδοθήλιο στη σήψη εκδηλώνει προπηκτικές ιδιότητες που περιλαμβάνουν αυξημένη προσκόλληση αιμοπεταλίων, απελευθέρωση ιστικού παράγοντα, έκθεση υπενδοθηλιακών συστατικών που ενεργοποιούν μηχανισμούς πήξης και μειωμένη σύνθεση θρομβομοντουλίνης. Έχει βρεθεί επίσης, ότι το LPS και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν την έκφραση προσκολλητικών μορίων στην επιφάνεια τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων (σελεκτίνες, ιντεγκρίνες), ευνοώντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών με αγγειοκινητική δράση.

Ένας πιθανός μηχανισμός είναι ότι τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα απαιτούν περισσότερο χρόνο για να περάσουν διαμέσου περιοχών βραδείας

ροής, που με την σειρά του ευθύνεται για τον παρατεταμένο χρόνο έκθεσης του ενδοθηλίου στις κυτταροκίνες καθώς και σε άλλα μικροβιακά προϊόντα που αναγνωρίζονται από το σύστημα φυσικής ανοσίας, γνωστά και ως παθογονοεξαρτώμενοι μοριακοί τύποι (Pathogen-Associated Molecular Patterns -PAMPs) ή και μοριακά πρότυπα που παράγονται σε βλάβες ιστών ή κατά την κυτταρική απόπτωση (Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) τα οποία προκαλούν επιπλέον φλεγμονώδεις απαντήσεις.

Ανεξάρτητα από τον μηχανισμό πρόκλησης της νεφρικής βλάβης, κοινός μηχανισμός νεφρικής δυσλειτουργίας στην ενδοτοξιναιμία είναι η απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και LPS. Αν και ο κύριος στόχος του LPS είναι το ενδοθήλιο, φαίνεται ότι μπορεί να έχει και άμεση τοξική δράση στο σωληνάριο κατά τη σήψη. Στον μηχανισμό απόπτωσης των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων ενέχονται τα μιτοχόνδρια καθώς και η ρήξη της ισοροπίας μεταξύ αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της ομάδας Bcl-2.

Τα επιζώντα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα μετά το πέρας της οξείας φάσης, ανακτούν την προγονική τους ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα με τη βοήθεια ειδικών παραγόντων ανάπτυξης, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor, HGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) και η λιποκαλίνη σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετεροφίλων (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) [19]

2.3. ΑΥΞΗΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS

Βασική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η άμυνα του ξενιστή έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, η οποία μεσολαβείται από την πρώιμη δράση της μη ειδικής ή φυσικής ανοσίας και την όψιμη δράση της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας.

Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού κατά τη διάρκεια της λοίμωξης και συνεπώς διαδραματίζει καίριο ρόλο στην έγκαιρη αναγνώριση των εισβολέων και την επακόλουθη ενεργοποίηση των

προφλεγμονωδών αποκρίσεων. Η επίκτητη ανοσία είναι υπεύθυνη για την εξάλειψη των παθογόνων στην όψιμη φάση της λοίμωξης και την παραγωγή ανοσολογικής μνήμης. Ενώ η επίκτητη ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από ειδικότητα που εξασφαλίζεται από την αναδιάταξη των γονιδίων των αντιγονοειδικών υποδοχέων των λεμφοκυττάρων, η φυσική ανοσολογική απόκριση μεσολαβείται από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα και κύτταρα-φονείς (NK).

Η πυροδότηση ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής μηνυμάτων οδηγεί σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων, την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών και την κινητοποίηση της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης. Οι υποδοχείς της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν δομές που είναι κοινές σε αρκετες ομάδες μικροοργανισμών και αντιπροσωπεύουν μοριακά πρότυπα ή προϊόντα μεταβολισμού των μικροβίων. Οι δομές αυτές δεν παρουσιάζουν μεταβλητότητα με την πάροδο του χρόνου, θεωρούνται απαραίτητες για την επιβίωση και τη λοιμογόνο δράση των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ δεν υπάρχουν στον ξενιστή και είναι γνωστές ως «μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών» (PAMPs).

Η ανίχνευση των παθογόνων εισβολέων πραγματοποιείται μέσω της αναγνώρισης των PAMPs από υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (pattern-recognition receptors, PRRs), εκ των οποίων η οικογένεια των Toll-like υποδοχέων (TLRs) έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι PRRs αναγνωρίζουν και ενδογενή ιστικά σήματα κινδύνου (DAMPs), όπως DNA, ATP, υαλουρονικό οξύ, οξειδωμένη LDL και πρωτείνες θερμικού σοκ που προέρχονται από ιστικά κύτταρα που βρίσκονται σε συνθήκες στρες ή έχουν υποστεί τραυματισμό. Μετά την αναγνώριση των PAMPs, οι PRRs ενεργοποιούν ενδοκυττάρια οδούς μεταγωγής μηνυμάτων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και σύνθεση κυτταροκινών (TNF- α , IL-1 και IL-12), χημειοκινών και ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης.

Οι Toll-like υποδοχείς είναι PRRs και ανήκουν στην οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I. Διαθέτουν μια εξωκυτταρική περιοχή που

φέρει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη. Ακόμη, φέρουν ένα βραχύ διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική περιοχή, γνωστή ως 'Toll/IL-1 receptor' (TIR). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί δέκα διαφορετικοί Toll-like υποδοχείς. Οι TLRs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε οικογένειες ανάλογα με τα είδη των PAMPs που αναγνωρίζουν. Οι TLR1,2,4 και 6 αναγνωρίζουν λιπίδια, ενώ οι TLR3,7,8 και 9 νουκλεικά οξέα. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια αναγνωρίζονται από τον TLR4 μέσω του λιπιδίου A του LPS, ενώ τα λιποτεichoικά οξέα, οι λιποπρωτεΐνες και η πεπτιδογλυκάνη των gram-θετικών βακτηρίων ανιχνεύονται από τον TLR2.

Όλοι οι TLRs που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα επιστρατεύουν την πρωτεΐνη προσαρμογέα MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), η οποία αλληλεπιδρά με την TIR περιοχή του TLR. Ακολουθεί η επιστράτευση και ενεργοποίηση μιας οικογένειας κινάσων σερίνης –θρεονίνης, που είναι γνωστές ως IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases). Η IRAK4 είναι η πρώτη που ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την IRAK1. Αυτές οι κινάσες ενεργοποιούν τον TRAF6 (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6), ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με δύο ένζυμα, τα UEV1A και UBC13, και συμβάλλει στην ενεργοποίηση κινάσων, όπως οι IKKs (inhibitor of NF-κB kinases). Ο NF-κB μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-12. Όταν τα παραπάνω μόρια, που συνιστούν το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι, ενεργοποιηθούν, προάγουν τη σύνθεση των ιντερφερονών β και α [15,16,21,22].

Επίσης, οι TLRs αναγνωρίζουν τα μόρια όπως τα DUMPs από τους ίσχαιμους νεφρικούς ιστούς [23], με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση λευκοκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και άλλων προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών, ελεύθερων ριζών (ROS) και αιμοπεταλίων, με κατάληξη την ιστική καταστροφή και υποξία [24,25].

2.4. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗ ΠΗΞΗΣ

Η φλεγμονώδης αντίδραση και η πήξη συνδέονται στενά. Η ενεργοποίηση του συστήματος πήξης παρατηρείται συχνά στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς μετά από σήψη, τραύμα, εγκαυμα. Οι διαταραχές στην ισορροπία των προπηκτικών και ινωδολυτικών παραγόντων οδηγούν στην κατάσταση η οποία κλινικά εμφανίζεται ως διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Στην παθογένεια της διαταραχής, θεμελιώδης είναι η επαφή του αίματος με τον ιστικό παράγοντα (TP) στα σημεία βλάβης του ενδοθηλίου, με επακόλουθο την ενεργοποίηση της πήξης και την παραγωγή θρομβίνης.

Η απελευθέρωση στη συστηματική κυκλοφορία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών προκαλεί την ενεργοποίηση της πήξης. Οι παράγοντες φλεγμονής, όπως TNF- α , IL-1, IL-6 και IL-8, προάγουν την έκφραση του ιστικού παράγοντα. Επιπλέον, ο μεσολαβητής της φλεγμονής TNF- α per se ενεργοποιεί τη σύνθεση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) που είναι ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός παράγοντας της ινωδολύσης. Φαίνεται ότι η ινωδολύση σε καταστάσεις SIRS (συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης), αν και είναι ενεργοποιημένη, δεν επαρκεί για να αντισταθμίσει το σχηματισμό του ινώδους. Η σχετική αυτή ανεπάρκεια του ινωδολυτικού συστήματος δημιουργεί μια κατάσταση υπερπηκτικότητας η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των μικροθρόμβων στο αγγειακό δίκτυο. Η βακτηριαιμία και η ενδοτοξιναιμία οδηγούν στην αύξηση της ινωδολυτικής δραστηριότητας λόγω της απελευθέρωσης των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Η προϊνωδολυτική αυτή αντίδραση όμως, ακολουθείται σχεδόν αμέσως από την καταστολή του ινωδολυτικού συστήματος από τα αυξανόμενα επίπεδα του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1. Η μείωση των επιπέδων αναστολέων πήξης προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση διάφορων διεργασιών, όπως: α) η υπερκατανάλωση τους λόγω αυξημένης παραγωγής της θρομβίνης, β) η αποδόμηση τους από τις ελαστάσες του πλάσματος, οι οποίες απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και γ) η ανεπαρκής σύνθεσή τους.

Θεωρείται ότι ο σχηματισμός θρόμβου είναι ευεργετικός για την άμυνα του ξενιστή καθώς σε αυτόν παγιδεύονται βακτήρια και τα DUMPs οπότε εμποδίζεται η διασπορά της λοίμωξης και μειώνονται οι κυκλοφορούντες διαμεσολαβητές της φλεγμονής [26].

Η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη διαγιγνώσκεται όταν υπάρχει συνδυασμός των ακόλουθων κλινικών καταστάσεων και παθοφυσιολογικών διαταραχών:

- Απελευθέρωση κυτοκινών, πρωτεασών και ορμονών από τα κύτταρα του ξενιστή που οδηγεί σε εκτεταμένη βλάβη του ενδοθηλίου της μικροκυκλοφορίας
- Αγγειοδιαστολή, απώλεια των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του ενδοθηλίου, διαταραχές διαπερατότητας και εξόδο υγρών στο διάμεσο χώρο
- Σχηματισμό μικροθρόμβων που οδηγεί σε ισχαιμία και δυσλειτουργία οργάνων
- Υπερκατανάλωση των παραγόντων πήξης και των αιμοπεταλίων που οδηγεί σε αιμορραγική διάθεση.

3. INTERΛΕΥΚΙΝΗ (IL)-17

Τα T βοηθητικά κύτταρα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες στην ειδική απάντηση του οργανισμού απέναντι στο αντιγόνο [27]. Μια υποκατηγορία των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων γνωστή έως Th1 έχει βρεθεί ότι εκκρίνει ιντερφερόνη γ (IFN-γ) που είναι σημαντικός διαμεσολαβητής της ανοσιακής απάντησης έναντι ενδοκυττάρων παθογόνων. Παρομοίως μια δεύτερη υποκατηγορία τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν την IL4, IL5 και IL13 οι οποίες είναι γνωστό ότι, προάγουν την προστασία του οργανισμού έναντι παρασιτικών λοιμώξεων. Η ετερογένεια στην ανοσοποιητική απάντηση σχετίζεται με την παρουσία μίας υποκατηγορίας των CD4 T-κυττάρων που ανακαλύφθηκε πρόσφατα γνωστή ως T17 βοηθητικά κύτταρα (Th17) [28].

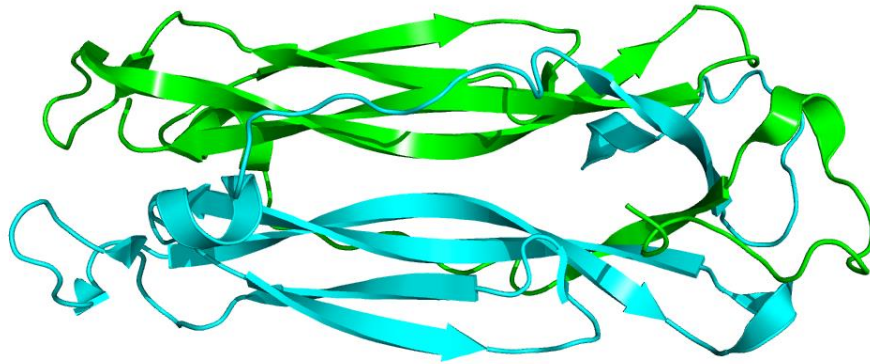
Τα πρώιμα CD4 κύτταρα διαφοροποιούνται σε διάφορες σειρές ανάλογα με την κυτταροκίνη που παράγεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένης της υποκατηγορίας των Th 17 κυττάρων που εκκρίνουν μια μοναδική σειρά κυτταροκινών (IL-17A-F, IL-22, IL21, GM-CSF, IL26) [29].

Τα Th 17 κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξένηστη έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκήτων [30-32], ενώ μπορούν να επάγουν ιστική φλεγμονώδη αντίδραση και αυτοάνοσες παθήσεις συμπεριλαμβανομένων της ψωρίασης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδος, του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου και της πολλαπλής σκλήρυνσης [33]. Σημειώνεται επίσης ότι τα Th17 συμμετέχουν σε διαφορετικά μονοπάτια ανάπτυξης ή αναστολής της διαδικασίας καρκινογένεσης [34-36]. Η IL-17 αποτελεί μια οικογένεια προφλεγμονώδων κυτταροκίνων με 6 γνωστά μέλη (IL-17A, B, C, D, E, F) [37]. Εκτός από τα CD4 και CD8, αυτόλογα κύτταρα όπως τα γδΤ κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα NK κύτταρα, τα iNKT κύτταρα, μαστοκύτταρα και LTi-like κύτταρα παράγουν IL-17 κάτω από φλεγμονώδεις συνθήκες. Επιπρόσθετα, μη αιμοποιητικά κύτταρα όπως τα μεσεγχυματικά και επιθηλιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι παράγουν IL-17 [38]. Η IL-17 ασκεί την δράση της μέσω ενός συμπλόκου υποδοχέων εκ των οποίων ο πρώτος που αναγνωρίστηκε ήταν ο IL-17R [39]. Η οικογένεια των IL17R υποδοχέων αποτελείται από άλλα 4 μέλη: IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL17RE [40].

Η αναγνώριση της συμμετοχής της IL-17RA ως ενδιάμεσου διαμεσολαβητή στην ενεργοποίηση της IL-17RB και της IL-17E, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την IL-17C, οδήγησε στην θεωρία ότι η IL-17RA κατέχει κεντρικό ρόλο στην αλληλουχία σημάτων της οικογένειας των IL-17 και πιθανή απενεργοποίηση της θα οδηγούσε σε αντιφλεγμονώδη αντίδραση σχετιζόμενη με τον παθογενετικό ρόλο της IL17 στις αυτοάνοσες παθήσεις. Μειονέκτημα φυσικά μιάς τέτοιας πιθανής παρέμβασης στον υποδοχέα IL-17RA θα ήταν το ενδεχόμενο βακτηριακής ή μυκητιασικής επιλοίμωξης όπου η IL-17 κατέχει προστατευτικό ρόλο [41,42]. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει τον σημαντικό ρόλο της IL-17 στα αιμοποιητικά κύτταρα ειδικά στα ουδετερόφιλα, B κύτταρα και T κυττάρια [43].

3.1 ΔΟΜΗ IL-17

Η IL-17 είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς και κάθε μονομερές αποτελείται από 155 αμινοξέα. Το μοριακό της βάρος είναι 35 kDa [44]. Κάθε υπομονάδα από το ομοδιμερές είναι 15-20 kDa. Η δομή της IL-17 αποτελείται από ένα πεπτιδιο-σήμα 23 αμινοξέων ακολουθούμενο από μία αλυσίδα 123 αμινοξέων που είναι χαρακτηριστική για την οικογένεια της IL-17 και δεν φέρει καμία ομοιότητα στην δομή της με τις υπόλοιπες γνωστές ιντερλευκίνες ή άλλες γνωστές πρωτεΐνες [45].



Εικ.1 : Κρυσταλλογραφία διμερούς ανθρώπινης ιντερλευκινής 17F.

3.2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Το γονίδιο για την ανθρώπινη IL-17 αποτελείται από 1874 ζεύγη βάσεων και απομονώθηκε από τα CD4 T κύτταρα [46]. Η έκφραση της IL-17A και F φαίνεται να περιορίζεται σε έναν μικρό αριθμό ενεργοποιημένων T κυττάρων που ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Η IL -17B εκφράζεται σε διάφορους περιφερικούς ιστούς καθώς και ιστούς άμυνας. Η IL-17C αυξάνεται ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες φλεγμονής ενώ σε περιόδους ηρεμίας διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Η IL-17D εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο νευρικό

και μυϊκό σύστημα ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα παράγεται σε αυτούς τους ιστούς καθώς και σε περιφερικούς ιστούς η IL-17E.

Μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των νόμων που διέπουν την παραγωγή της IL-17. Αρχικά, οι Aggarwal et al, έδειξαν ότι η παραγωγή της IL-17 εξαρτάται από την IL-23 [47]. Αργότερα μια ομάδα από την Κορέα ανακάλυψε πως σήματα διαμεσολαβήτων όπως τα STAT3 και NF-kB είναι απαραίτητα για την IL-23 και συνεπώς για την παραγωγή της IL-17 [48]. Σε συνέχεια αυτής της μελέτης, οι Chen et al, ανέδειξαν άλλα μόρια με εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της IL-17 όπως το SOCS3 [43]. Απουσία του εν λόγω μορίου (SOCS3) οδηγεί σε φωσφορυλίωση του STAT3 το οποίο επάγει σήματα αύξησης της γονιδιακής έκφρασης της IL-17A και IL-17F [49, 50].

Πολλαπλές ομάδες μελέτης κατόρθωσαν την *in vivo* και *in vitro* παραγωγή της IL-17 χωρίς την ανάγκη παρουσίας της IL-23 με την βοήθεια κυτοκινών γνωστές ως TGF-β και IL-6 [51-53]. Ωστόσο, η παραγωγή IL-17 διαμέσω της IL-23 έχει δείξει ότι ασκεί προσατατευτικό ρόλο καθώς και σήμα πολλαπλασιασμού για την παραγωγή T-κυττάρων. Πρόσφατα, οι Ivanov et al. βρήκαν ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς στον θύμο αδένα όπως ο ROR-γ οι οποίοι κατευθύνουν την διαφοροποίηση της IL-17 για να παράγει T-κύτταρα.

3.3. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Εξαιτίας της αναμφισβήτητης συμμετοχής της IL-17 στην ρύθμιση της αυτοάνοσης απάντησης έχει ερευνηθεί πιθανή συμμετοχή της σε θεραπευτικές προσεγγίσεις για τις αυτοάνοσες νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου [54-56]. Τον Ιανουάριο του 2015 ο FDA ενέκρινε την χρήση της secukinumab, ενός μονοκλωνικού αντισώματος που αναστέλλει την IL-17 για την αντιμετώπιση των ψωριασικών πλακών [51]. Μελέτες φάσεως II και III έδειξαν επίσης την αποτελεσματικότητα δυο άλλων αναστολέων IL-17 για τη θεραπεία της ψωρίασης: ixekizumab και brodalumab (μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των υποδοχέων της IL-17A). Ως μονοκλωνικό ανοσοτροποποιητικό αντίσωμα, το secukinumab, χαρακτηρίζεται από μακρό χρόνο ημίσειας ζωής, αργή απορρόφηση από τους υποδόριους

ιστούς και χαμηλή κάθαρση. Δεν φαίνεται να επηρεάζει την ηπατική και τη νεφρική λειτουργία και σε πολλαπλά κλινικά πειράματα αναδείχθηκε η υπεροχή του secukinumab έναντι άλλων βιολογικών παραγόντων που κυκλοφορούν στην αγορά, όπως ο αναστολέας του TNF (etanercept). Επιπρόσθετα, απέδειξε την χρήση της στην θεραπεία της ψωριασικής αρθρίτιδος [57]. Βάσει μελετών σε πειραματόζωα στα πλαίσια επείγοντων συμβαμάτων έχει προταθεί ως στόχος η αναστολή της IL-17 ως αντιφλεγμονώδης θεραπεία στην βελτίωση της ανάκαμψης μετά από ισχαιμικό επεισόδιο [58]. Επίσης έχει αναφερθεί θετική επίδραση στην πολλαπλή σκλήρυνση [59] αλλά και στην διαδικασία αναστολής της εξέλιξης του καρκίνου του δέρματος [60].

Σημαντική επίσης, βάσει πρόσφατων μελετών σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, είναι η συμμετοχή της IL-17 στην αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων με αλλεργικό υπόβαθρο. Έχει προταθεί η εξωγενής χορήγηση της IL-17 που φαίνεται να ενισχύει την ανοσιακή απάντηση έναντι του στρεπτόκοκκου της πνευμονίας και οδηγεί σε υποχώρηση των αλλεργικών μεταλοιμωδών φαινομένων [61].

3.4 IL-17 ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΣ

Μελέτες που έγιναν σε πειραματικά ζωικά μοντέλα (διαβητικά ποντίκια) έδειξαν ότι ανασταλτικά φάρμακα όπως η mychofenolate mofetil (MMF), ένας ισχυρός, εκλεκτικός, μη συναγωνιστικός και αναστρέψιμος αναστολέας της αφυδρογονάσης της μονοφωσφορικής ινωσίνης και αναστολέας της de novo σύνθεσης του νουκλεοτιδίου της γουανοσίνης, καταστέλλουν την ενδονεφρική παραγωγή της IL-17A και βελτιώνουν σημαντικά την πρωτεϊνουρία και την σωληναριοδιάμεση ίνωση (ανεξάρτητα από του γλυκαιμικό δείκτη). Συνεπώς από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι Th-17 διαδραματίζουν έναν ανεξάρτητο ρόλο στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας και η IL-17 αποτελεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση ανοσολογικής αρχής [62].

Σε πειραματική αυτοάνοση σπειραματονεφρίτιδα (Goodpasture) σε ποντίκια μελετήθηκε η αντίδραση του οργανισμού στο αντιγόνο α3IV-NC1. Συγκεκριμένα

ανθρώπινο αντιγόνο α3IV-NC1 μεταφέρθηκε με έγχυση στα ποντίκια τα οποία εν συνεχεία ανέπτυξαν νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα – σπειραματονεφρίτιδα μηνοειδών σχηματισμών. Περαιτέρω ιστολογική ανάλυση των νεφρών ανέδειξε παρουσία CD4 κυττάρων που ως απάντηση στο αντιγόνο α3IV-NC1 ήταν η παραγωγή IFN-γ και IL-17A που αποδεικνύει την ειδική απάντηση των TH1 και TH17 κυττάρων [63].

Μια αποτελεσματική φλεγμονώδης απάντηση είναι ουσιώδης όχι μόνο για την λύση της λοίμωξης αλλά και για την επούλωση του τραύματος που μπορεί να προκαλέσει. Η διαδικασία της επούλωσης του τραύματος περιλαμβάνει την απελευθέρωση χυμοκινών, κυτταροκινών καθώς και μετανάστευση ποκίλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Μία εμμένουσα φλεγμονώδης αντίδραση αν δεν επιλυθεί αποκτά χαρακτήρες χρονιότητας με αποτέλεσμα την ίνωση [64].

Η περιτοναϊκή κάθαρση είναι μια εναλλακτική μορφή αιμοκάθαρσης που χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο απο ασθενείς που πάσχουν απο χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Κατα την διάρκεια αυτής χρησιμοποιείται το περιτόναιο ως ημιδιαπερατή μεμβράνη ανάμεσα στο διάλυμα και στα στοιχεία που αφαιρούνται απο το αίμα (ηλεκτρολύτες, ουρία, γλυκόζη και άλλα μικρά μόρια). Στην θεραπεία περιλαμβάνεται εγχύση ενός υπερωσμωτικού διαλύματος στην περιτοναϊκή κοιλότητα διαμέσου ενός μόνιμου περιτοναϊκού καθετήρα. Ωστόσο η μηχανική βλάβη που προκαλείται απο την τοποθέτηση του καθετήρα και η έκθεση των κυττάρων του περιτοναίου στα προϊόντα αποδόμησης της γλυκόζης (Glucose Degradation Products) δημιουργούν φλεγμονή με απώτερο αποτέλεσμα την περιτοναϊκή ίνωση [65,66]. Αλλωστε αυξημένες συγκεντρώσεις των IL-6, TNF-α, VEGF(αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), CRP στο πλάσμα ασθενών που μελετήθηκαν δείχνουν ότι η περιτοναϊκή κάθαρση οδηγεί σε αυξημένη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

Σε αυτή συμμετέχουν εκτός απο τις κλασσικές υποκατηγορίες Th1 και Th2, και τα Th 17 και T ρυθμιστικά (Treg) κύτταρα τα οποία εκκρίνουν μεγάλες

ποσότητες προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22) αλλά και περιορίζουν την φλεγμονώδη απάντηση αντιστοιχα [68].

Σε *in vitro* μελέτες έχει αποδειχθεί πως η IL-17A συμμετέχει στην πνευμονική ίνωση, στην χρόνια ηπατική ίνωση και στην αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα [68-70]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει επίσης την συμμετοχή της IL-17A σε αυτοάνοσες σπειραματονεφρίτιδες καθώς και στην νεφρίτιδα του λύκου και θεωρείται ότι τα νεφρικά κύτταρα μπορούν να παράγουν αυτή την κυτταροκίνη δίνοντας έκταση στην ήδη υπάρχουσα βλάβη. Απο αυτό θα μπορούσε να προκύψει ότι το μπλοκάρισμα της IL-17A θα μείωνε την φλεγμονή στο νεφρό. Μάλιστα προτείνονται οι ακόλουθες θεραπευτικές στρατηγικές για την βλάβη στο περιτόναιο εξαιτίας της περιτοναϊκής κάθαρσης σε ζωικά μοντέλα:

- Αναστολείς του mTOR: Αναστολή της mammalian target of rapamycin κινάσης θα μπορούσε να μειώσει την παραγωγή της IL-17 [71]. Οι αναστολείς δρουν σε ένα συστατικό ενδοκυττάρων μονοπατιών που σχετίζονται με την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς και την απόκριση αυτών στο υποξικό στρες. Συνδέονται με μια ένδοκυττάρια πρωτεΐνη την FKBP-12, και με αυτόν τον τρόπο δημιουργούν σύμπλεγμα που αναστέλλει το mTOR. Η εν λόγω αναστολή μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την αγγειογένεση και τον κυτταρικό κύκλο.
- Cox-2 αναστολείς: Μετά απο 5 εβδομάδες θεραπεία στο group της σελεκοξίμπης φάνηκε παρόμοια ινωτική βλάβη στο περιτόναιο με το control group, ενώ το group που δεν έλαβε θεραπεία και εκτέθηκε σε περιτοναϊκή κάθαρση ανέπτυξε σημαντικού βαθμού ίνωση [72].
- Ενεργοποίηση υποδοχέων Vit D: Σε μοντέλα με ποντίκια βρέθηκε ότι αυτά που λάμβαναν θεραπεία με παρακαλσιτόλη, η λέπτυνση της περιτοναϊκής μεμβράνης ήταν ελαττωμένη σε σύγκριση με το group που δεν λάμβανε θεραπεία [73].

Απο τα ανωτέρω προκύπτει συσχέτιση της IL-17 με φλεγμονώδεις καταστάσεις των νεφρών. Απομένει και απαιτείται περαιτέρω έρευνα προς αυτή την

κατεύθυνση ώστε να αποδειχθεί η σαφής σχέση της IL-17 με τους νεφρούς και ο διαγνωστικός ή θεραπευτικός ρόλος που αυτή μπορεί να διαδραματίσει.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κλινική μελέτη

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε κατά τα χρονικά διαστήματα Ιανουάριος 2011 έως Μάρτιος 2014 και Μάρτιος 2016 έως Ιούλιος 2016 σε ασθενείς που εισήχθησαν Δ΄ Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΤΤΙΚΟΝ. Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του νοσοκομείου. Οι ασθενείς εισάγονταν στη μελέτη ύστερα από έγγραφη συγκατάθεση που παρείχαν οι ίδιοι ή οι συγγενείς πρώτου βαθμού στις περιπτώσεις ασθενών που δεν ήταν σε θέση να δώσουν συγκατάθεση.

Τα κριτήρια εισαγωγής ήταν: α) ηλικία μεγαλύτερη ή ίση των 18 ετών β) λοίμωξη κοινότητας - οι λοιμώξεις που συμπεριλήφθησαν ήταν οι εξής: οξεία πυελονεφρίτιδα (UTI), πνευμονία της κοινότητας (CAP), ενδοκοιλιακές λοιμώξεις (IAI) και βακτηριαιμίες (BSI)- γ) παρουσία σηπτικής καταπληξίας που ορίζεται ως μικροβιακή λοίμωξη συνοδευόμενη από σημαντική πτώση της συστολικής αρτηριακής πίεσης κάτω από 90mmHg, παρά την ενδοφλέβια χορήγηση υγρών και απαιτεί την χρήση αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων δ) παρουσία τουλάχιστον δύο σημείων του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) ή παρουσία σηπτικής καταπληξίας συνοδευόμενης από οξεία νεφρική βλάβη σε ασθενείς χωρίς προϋπάρχουσα γνωστή νεφρική ανεπάρκεια ή σηπτικής καταπληξίας που αναπτύχθηκε σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια χωρίς την εμφάνιση σημείων οξείας νεφρικής βλάβης και ε) αιμοληψία στις πρώτες 12 ώρες από την εγκατάσταση της σηπτικής καταπληξίας.

Μία αναδρομική αξιολόγηση του πληθυσμού που είχε ενταχθεί στην μελέτη έδειξε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν βαθμολογία SOFA (sequential organ failure assessment) ίση ή μικρότερη από 2 ώστε να μπορούν να ταξινομηθούν ως σηπτικοί σύμφωνα με την νέα κατάταξη της σήψης [74].

Οι UTI, CAP, IAI, BSI και SIRS ορίστηκαν όπως αναφέρεται αλλού [75, 76]. Ως Οξεία Νεφρική Βλάβη (ONB) ορίστηκε η απέκκριση ούρων μικρότερη από 0,5 ml/Kg/h για δύο συνεχόμενες ώρες [76, 77]. Η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια ορίστηκε ως κάθαρση κρεατινίνης κάτω από 30ml/min τα τελευταία

δύο έτη. Η κάθαρση της κρεατινίνης υπολογίστηκε απο τον τύπο Cockcroft-Gault [78].

Κριτήρια αποκλεισμού ήταν: α) ηλικία μικρότερη των 18 ετών, β) άρνηση έγγραφης συγκατάθεσης, γ) λοίμωξη απο τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, δ) ουδετεροπενία οριζόμενη ως απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων μικρότερος απο $1000/\text{mm}^3$, και ε) χρόνια λήψη κορτικοστεροειδών οριζόμενη ως ημερήσια πρόσληψη πάνω απο $0,4\text{mg}/\text{Kg}$ ισοδύναμου πρεδνιζόνης για περισσότερο απο 15 ημέρες. Τα τρία τελευταία κριτήρια αποκλεισμού τέθηκαν διότι η παρουσία τους θα μπορούσε να επηρεάσει την παραγωγή κυτταροκινών.

Έικοσι ml ηπαρινισμένου αίματος ήταν το δείγμα που λαμβάνονταν κατά την φλεβοκέντηση του αντιβραχίου υπό άσηπτες συνθήκες και το οποίο επεξεργάζονταν εντός μίας ώρας. Μία ολοκληρωμένη σειρά διαγνωστικών εξετάσεων λάμβανε χώρα περιλαμβάνοντας καλλιέργειες αίματος, ποσοτικές καλλιέργειες βρογχικών εκκρίσεων, ακτινογραφία θώρακος και εφόσον κρινόταν απαραίτητο, αξονική τομογραφία θώρακος και κοιλίας. Μία αντίστοιχη ποσότητα αίματος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πολυμορφοπύρηνων περιφερικού αίματος (PBMCs) σε δείγμα απο 15 υγιείς εθελοντές βάσει των κριτηρίων ηλικίας και φύλου.

Το ηπαρινισμένο φλεβικό αίμα επιστρώθηκε ύπερθεν φικόλης (Ficoll Hyraque) και τοποθετήθηκε για φυγοκέντρηση για είκοσι λεπτα στα $1400g$. Τα διαχωρισμένα πολυμορφοπύρηννα περιφερικού αίματος πλύθηκαν τρεις φορές με παγωμένο αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS ,pH 7,2) (Biochrom) και ο αριθμός τους υπολογίστηκε σε πλάκα Neubauer. Η βιωσιμότητα τους ήταν πάνω απο 99% όπως εκτιμήθηκε μετά από χρώση τους με μπλέ-τρυπτάνης (trypan blue) κατα την οποία αποκλείστηκαν τα νεκρά κύτταρα. Έπειτα ανασυστάθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 και εμπλουτίστηκαν με 2 mM L-γλουταμίνης, 20% βόειου εμβρυικού ορού (Biochrom), 100 U/ml πενικιλίνης G και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ γενταμυκίνης και διανεμήθηκαν σε πλάκα χωρητικότητας 96 βυθισμάτων με τελικό όγκο 200ml και πυκνότητας 2×10^6 κύτταρα/ml. Τα πολυμορφοπύρηννα περιφερικού αίματος επώαστηκαν για πέντε ημέρες εις

διπλούν σε κλίβανο με τις εξής συνθήκες: 37°C και 5% CO₂ και με τους ακόλουθους αγωνιστές: 5μg/ml PHA (lymphocyte agonist phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*), 5x10⁵ μονάδες (CFU)/ml θερμικώς εξασθενημένες αποικίες *Candida albicans* και 5x10⁵ μονάδες (CFU)/ml θερμικώς εξασθενημένες αποικίες ευαίσθητου στην μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus*. Οι παραπάνω μικροοργανισμοί είχαν απομονωθεί κλινικά από την συστηματική κυκλοφορία του αίματος ασθενών με σοβαρή σήψη. Η διέγερση κυτταροκινών για 5 ημέρες με PHA χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ανάγνωσης των ενεργοποιημένων μη-εκλεκτικών λεμφοκυττάρων από θερμικώς εξασθενημένα στελέχη *C.albicans* για την ενεργοποίηση των T17 βοηθητικών κυττάρων και από θερμικώς εξασθενημένα στελέχη *S.aureus* για την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων [79,80].

Προκειμένου να επικεντρωθούμε στην απελευθέρωση της IL-17 από τα Th17, μελετήθηκαν κεκαθαρμένα CD4 λεμφοκύτταρα. Για αυτόν τον σκοπό, τα PBMCs ενός υποσύνολου ασθενών σημάνθηκαν με αντι-CD4 σφαιρίδια (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Γερμανία) και τα CD4 λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν με θετικό μαγνητικό διαχωρισμό με τη χρήση ενός MiniMacs μαγνήτη (Miltenyi) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο αριθμός των απομονωμένων κυττάρων υπολογίστηκε με τη χρήση πλάκας Neubauer, μετά αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων με χρώση μπλέ τρυπτάνης και επωάστηκαν σε τελική πυκνότητα 5x10⁶/ml για πέντε ημέρες στους 37°C και 5%CO₂ σε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 2mM γλουταμίνης, 10% βόειου εμβρυϊκού ορού, παρουσία 100U/ml πενικιλίνης G και 0,1mg/ml στρεπτομυκίνης σε απουσία/παρουσία θερμοεξασθενημένων στελεχών *C.albicans* συγκέντρωσης 5x10⁵ cfu/ml.

Μετά από πέντε ημέρες επώασης σε συνθήκες 37°C και 5%CO₂, οι πλάκες που περιείχαν PBMCs ή κεκαθαρμένα CD4 λεμφοκύτταρα τέθηκαν για φυγοκέντρηση. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -70°C ώστε να προσδιοριστούν σε αυτά οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης όγκων -αλφα (TNF-α), της ιντερλευκίνης -10 (IL-10), της ιντερλευκίνης-17 (IL-17), της ιντερλευκίνης-22 (IL-22) και της ιντερφερόνης -γ (IFNγ). Όλες οι κυτταροκίνες μέτρηθηκαν εις διπλούν με τη χρήση ανοσοενζυμικής μέθοδου (R&D

Minneapolis, ΗΠΑ). Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης ήταν: 20pg/ml για τον TNFα και την IL-10, 40pg/ml για την IL-17A, 20pg/ml για την IL-22, 16pg/ml για την INFγ.

Τέλος, για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίπτωση των T-βοηθητικών κυττάρων ως πηγή της ιντερλευκίνης-17, πλυμένα μονοπύρηννα περιφερικού αίματος ενός υποσυνόλου ασθενών επώασθηκαν για τέσσερις ώρες σε πλάκα 24 βυθισμάτων σε πυκνότητα 5×10^6 /ml στους 37°C και 5% CO₂ σε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 2mM γλουταμίνης, 10% βόειου εμβρυϊκού ορού, παρουσία 100U/ml πενικιλίνης G και 0,1mg/ml στρεπτομυκίνης σε απουσία/παρουσία θερμοεξασθενημένων στελεχών *C.albicans* συγκέντρωσης 5×10^5 cfu/ml. Τριάντα λεπτά μετά την έναρξη της επώασης, προστέθηκε στα βυθίσματα 1μl αναστολέα πρωτεΐνης-μεταφορέα που περιείχε brefeldin (GolgiPlug, BD Bioscience, San Jose, California). Στο τέλος της επώασης, συλλέχθηκαν τα μη προσκολλημένα λεμφοκύτταρα και σημάνθηκαν για δεκαπέντε λεπτά σε σκοτάδι με αντι-CD4 φθοριόχρωμα φλουορεσκεΐνης ισοθειοκυανίου (FITCH, εκπομπής 525 nm, Immunotech, κλώνος 13B8.2, Μασσαλία, Γαλλία), με αντι-CD3 φθοριόχρωμα Φυκοερυθρίνης-Texas Red-x (ECD, εκπομπής 480 nm, κλώνος UCHT1, Immunotech) και με αντι-CD196 φθορόχρωμα Peridinin-Phycocyanin (PerCP-Cy5.5, εκπομπής 695 nm, κλώνος 11 A9, BD Bioscience). Τα κύτταρα που σχηματίστηκαν, ανασυστάθηκαν με αντιδραστήρια διαπερατότητας λευκοκυττάρων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (IntraPrep, Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενδοκυττάρια χρώση με αντι-IL-17 φθορόχρωμα φυκοερυθρίνης και τα κύτταρα αναλύθηκαν μέσω κυτταρόμετρου ροής (CYTOMICS FC-500, Beckman Coulter) με σκέδαση FS/SS. 100.000 γεγονότα αναλύθηκαν και τα κύτταρα που εμφάνιζαν θετική χρώση για CD3(+)/CD4(+)/CD169(+)/cytIL-17(+) αναγνωρίστηκαν ως T-17 βοηθητικά λεμφοκύτταρα που απελευθερώνουν IL-17. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση ένταση φθορισμού (MFI) ανα κύτταρο.

Με βάση την υπόθεση ότι η απελευθέρωση της IL-17 από τα κυκλοφορούντα PBMCs, ως δείκτης ενεργοποίησης των T-17 βοηθητικών κυττάρων, θα ήταν μεγαλύτερη τουλάχιστον στο 70% των ασθενών με σηπτική

καταπληξία και οξεία νεφρική βλάβη συγκριτικά με την ομάδα υγιών εθελοντών, υπολογίσθηκε ότι θα ήταν αναγκαίο να ενταχθούν 13 ασθενείς από την κάθε ομάδα μελέτης ώστε να επιτευχθεί ισχύς 80% σε ποσοστό 10% σημαντικότητας.

Μελέτες σε πειραματόζωα

Συνολικά μελετήθηκαν 49 αρσενικοί ομόαιμοι μύες βάρους 20-25γρ και ηλικίας 7-9 εβδομάδων (Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur). Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο Πειραματικό Εργαστήριο του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Μετά τον εγκλιματισμό τους, οι μύες φυλάσσονταν σε κλωβούς με συνεχή ρυθμό εναλλαγής αέρα (70 αλλαγές την ώρα) ώστε να εξασφαλισθούν στείρες συνθήκες. Είχαν πρόσβαση σε τροφή (τύπος 4f 18) και νερό *ad libitum*. Οι μύες φυλάσσονταν σε απομονωμένο δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας στους 24°C και κύκλους εναλλαγής ημέρας/νύχτας 8π.μ-8μ.μ. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ» και της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Νομαρχίας Αθηνών, Ελλάδας.

Επαγωγή οξείας νεφρικής βλάβης επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός μοντέλου πολυοργανικής ανεπάρκειας που έχει περιγραφεί στο παρελθόν από την ομάδα μας [81]. Η οξεία νεφρική βλάβη αποτελεί ένα χαρακτηριστικό αυτού του μοντέλου. Εν συντομία, οι μύες τέθηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες ύστερα απο ήπια αναισθησία με αιθέρα:

- Ομάδα-μάρτυρες (n=12), όπου χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά PBS την ημέρα 0 και στείρο παραφινέλαιο την ημέρα 6.
- Ομάδα LPS (n=12), όπου χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά λιποπολυσακχαρίτης (LPS 10mg/Kg , στέλεχος *Escherichia coli* O55:B55) (Sigma Co, St. Louis, ΗΠΑ) σε διάλυμα PBS την ημέρα 0 και στείρο παραφινέλαιο την ημέρα 6.
- Ομάδα MODS1 (n=13), όπου χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά LPS την ημέρα 0 και 0,6g/kg ΣΒ *zymozan* διαλυμένο σε στείρο παραφινέλαιο την ημέρα 6.

- Ομάδα MODS2 (n=13) , όπου χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά LPS την ημέρα 0 και 1,2g/kg ΣΒ zymozan διαλυμένο σε στείρο παραφινέλαιο την ημέρα 6.

Τέσσερις μύες απο την κάθε ομάδα θυσιάζονταν στις 24 ώρες ύστερα από πρόκληση με παραφινέλαιο ή zymozan, ενώ οι εναπομείναντες μύες κάθε ομάδας θυσιάζονταν στις 48 ώρες ύστερα από πρόκληση επίσης με παραφινέλαιο ή zymozan. Οι θυσίες των ζώων τελούνταν ύστερα από εισπνοή διεθλαιθέρα και ακολούθως ενίονταν κεταμίνη.

Για τη θυσία των ζώων πραγματοποιήθηκε τομή στην κοιλιακή χώρα κατα τη μέση γραμμή υπό άσηπτες συνθήκες. Η λήψη αίματος πραγματοποιήθηκε μετά από παρακέντηση της κάτω κοίλης φλέβας υπό άσηπτες συνθήκες. Ακολούθως, το αίμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα φιαλίδια και τοποθετήθηκε για φυγοκέντρηση ώστε να υπολογιστεί η τιμή της κρεατινίνης ορού. Μετά την είσοδο στην περιτοναϊκή κοιλότητα και την μετατόπιση των εντερικών ελίκων προς τα αριστερά, εξαιρέθηκαν τμήματα από τον δεξιό νεφρό, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά αποστειρωμένα δοχεία. Αφού ζυγίζονταν υπό άσηπτες συνθήκες, τα τμήματα του νεφρού που είχαν αφαιρεθεί ομογενοποιούνταν με τη χρήση 1ml ζυμού Mueller-Hinton (Oxoid Ltd, London, UK) και τοποθετούνταν για φυγοκέντρηση. Οι συγκεντρώσεις της IL-10, της IL-17, της IL-22 και της INF γ μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του νεφρικού ομογενοποιήματος με τη χρήση ανοσοενζυμικής μεθόδου (R&D Inc, Minneapolis, USA). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης για όλες τις κυτταροκίνες ήταν 8pg/ml. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως pg ανά gr ιστού.

Οι νεφροί που προέρχονταν από μύες που θυσιάστηκαν στις 48 ώρες στάλθηκαν επίσης για ποσοτικές καλλιέργειες. Μέτα την επεξεργασία, ποσότητα υποπολαπλάσια του 0,1ml από τα υπερκείμενα των νεφροκυττάρων αραιώθηκε κατα σειρά για τέσσερις συνεχείς φορές σε αναλογία 1: 10 σε NaCl 0.9%, ενώ 0,1 ml από κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε MacConkey άγαρ (Becton Dickinson, Cockeysville Md). Οι πλάκες επωάστηκαν για 24 ώρες στους 35⁰C. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν ανιχνεύθηκαν με τα συστήματα API20E και API20NE (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Γαλλία) και ο αριθμός των αποικιών

μετρήθηκε και πολλαπλασιάστηκε με τον κατάλληλο παράγοντα διάλυσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε τιμές δεκαδικών λογαρίθμων σε cfu ανα gr ιστού.

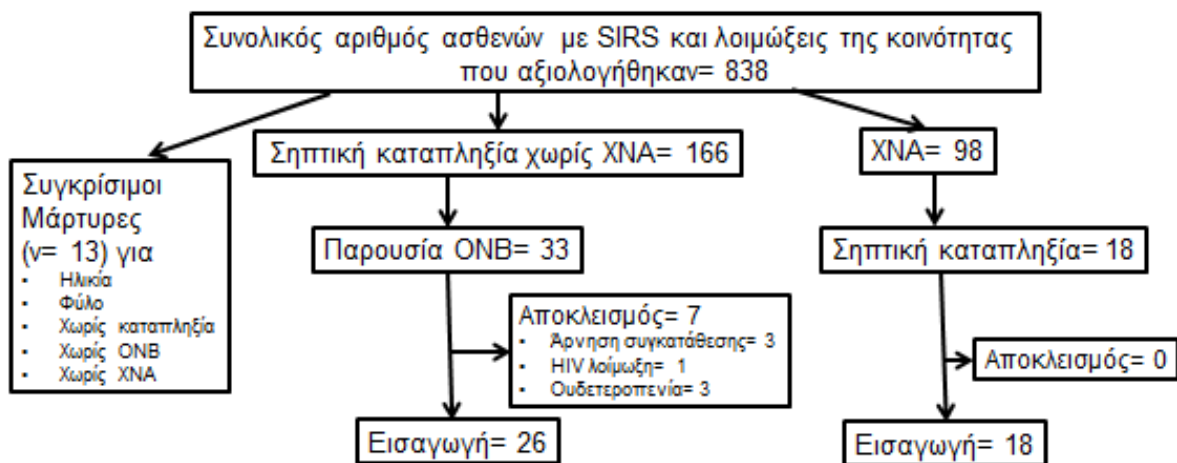
Στατιστική ανάλυση

Τα βασικά δημογραφικά στοιχεία των ασθενών εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm την τυπική απόκλιση (SD) και η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με οξεία νεφρική βλάβη και των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια έγιναν με τη χρήση του ακριβούς Fisher test για τις ποιοτικές μεταβλητές και καθώς και τη χρήση ANOVA και Bonferroni *post-hoc* ανάλυση για τις ποσοτικές μεταβλητές. Οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm το τυπικό σφάλμα (SE) ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν με τη χρήση του Mann-Whitney U test. Για τα πειράματα στα ζωικά μοντέλα οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων γίνονταν κατά τη διάρκεια της θυσίας αλλά και στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ των δυο χρονικών σημείων των θυσιών. Συσχετίσεις μεταξύ της ιστικής ανάπτυξης μικροβίων και της ιστικής παραγωγής κυτταροκινών έγιναν σύμφωνα με την κατάταξη Spearman. Οποιαδήποτε τιμή του p μικρότερη του 0.05, μετά από προσαρμογή πολλαπλών συγκρίσεων, θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή διερεύνησε αν η ανάπτυξη της οξείας νεφρικής βλάβης στα πλαίσια της σηπτικής καταπληξίας διαμεσολαβείται από την IL-17. Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση δύο σταδίων. Κατά το πρώτο στάδιο, μελετήθηκε η απελευθέρωση της IL-17 από τα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα ασθενών με σηπτική καταπληξία και οξεία νεφρική βλάβη. Κατά το δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η κατανάλωση της IL-17 στον νεφρό σε πειραματικό μοντέλο πολυοργανικής ανεπάρκειας και οξείας νεφρικής βλάβης.

Το σχεδιάγραμμα της ένταξης των ασθενών στο πρώτο κλινικό στάδιο απεικονίζεται στο Σχήμα 1 καθώς και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων ασθενών περιγράφονται στον Πίνακα 1. Μέρος του σχεδιασμού της αρχικής μελέτης ήταν επίσης να ενταχθούν ασθενείς με σηπτική καταπληξία χωρίς οξεία νεφρική βλάβη και ασθενείς με σοβαρή σήψη με οξεία νεφρική βλάβη αλλά χωρίς σηπτική καταπληξία. Ωστόσο καμία από αυτές τις κατηγορίες ασθενών δεν ήταν εφικτό να βρεθεί κατά την διάρκεια της περιόδου μελέτης, με αποτέλεσμα η ένταξη των ασθενών να περιοριστεί βάσει των χαρακτηριστικών που παρουσιάστηκαν στις ομάδες μελέτης.



Σχήμα 1 Σχεδιάγραμμα εισαγωγής ασθενών στη μελέτη

HIV: ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, SIRS: σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, ΟΝΒ: οξεία νεφρική βλάβη, ΧΝΑ: χρόνια νεφρική ανεπάρκεια,

Πίνακας 1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών

	Υγιείς (n= 15)	Σήψη (n= 13)	ONB μετά σηπτική καταπληξία (n= 26)	Σηπτική καταπληξία και XNA (n= 18)	p*
Άρρεν/θήλυ	7/8	7/6	14/12	11/7	1.00
Ηλικία (μέση ± SD)	69.6 ± 10.2	72.6 ± 10.2	76.5 ± 9.0	74.9 ± 9.6	0.521
Είδος λοίμωξης (n)		UTI= 4 BSI= 9	UTI= 13 CAP= 2 BSI= 7 IAI= 4	UTI= 5 CAP= 2 IAI= 2 BSI= 9	0.051
Λευκά αιμοσφαίρια (/mm ³ , μέση ± SD)		12967.5 ± 5037.9	17216.4 ± 6641.1***	16386.7 ± 4894.9	0.123
Κρεατινίνη (mg/dl, μέση ± SD)		1.55 ± 0.56	3.94 ± 1.40**	4.61 ± 1.97**	<0.0001
Ρυθμός σπειραματικής σινήθησης (ml/min, μέση ± SD)		48.9 ± 20.4	18.4 ± 7.5**	17.1 ± 7.9**	0.763
SOFA (μέση ± SD)		2.70 ± 0.48	3.90 ± 1.81	4.00 ± 2.00	0.142
APACHE II (μέση ± SD)		11.8 ± 5.3	23.1 ± 4.5**	22.9 ± 7.1**	<0.0001
Απομονωθείς μικροοργανισμός (n)		<i>Escherichia coli</i> = 4 <i>Staphylococcus aureus</i> = 3	<i>Escherichia coli</i> = 5 <i>Staphylococcus aureus</i> = 5	<i>Escherichia coli</i> = 3 <i>Staphylococcus aureus</i> = 3	0.445

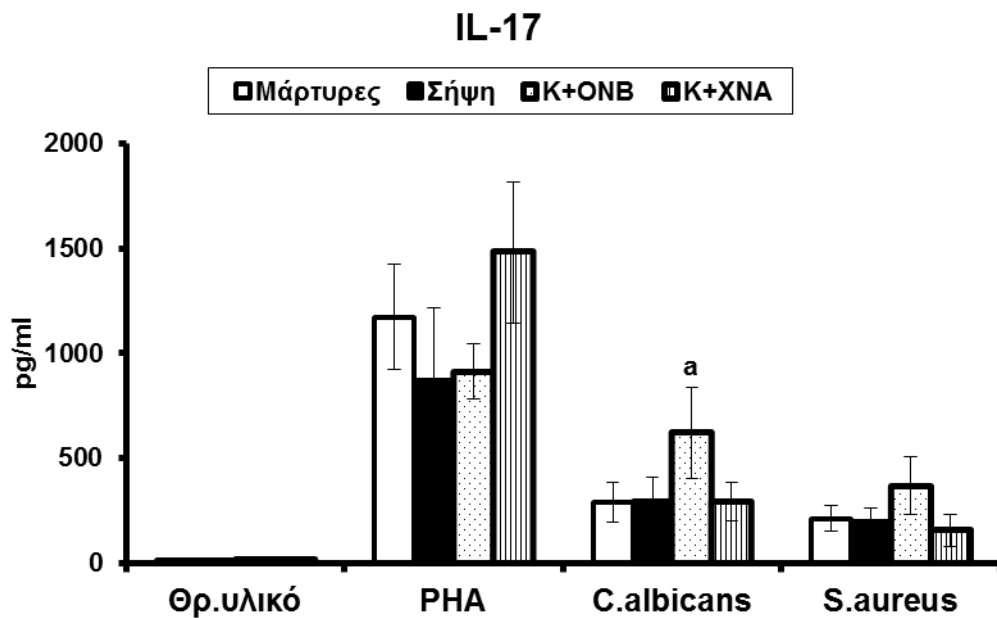
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> = 5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> = 10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> = 6	
	<i>Candida parapsilosis</i> = 1	<i>Acinetobacter baumannii</i> = 1	<i>Enterobacter cloacae</i> = 1	
		<i>Enterobacter cloacae</i> =1	<i>Candida parapsilosis</i> = 1	
		<i>Serratia marsecens</i> = 1		
Άλλα νοσήματα (v)	ΣΔ2= 4 ΚΑ= 3 ΧΑΠ=1	ΣΔ2= 8 ΚΑ= 6 ΧΑΠ=2	ΣΔ2= 7 ΚΑ= 6	0.719
Θνητότητα (n, %)	0 (0)	9 (34.6)	5 (27.7)	0.087

**μεταξύ των ομάδων με ANOVA για τις ποσοτικές μεταβλητές, με τη δοκιμασία χ^2 για τις ποιοτικές μεταβλητές

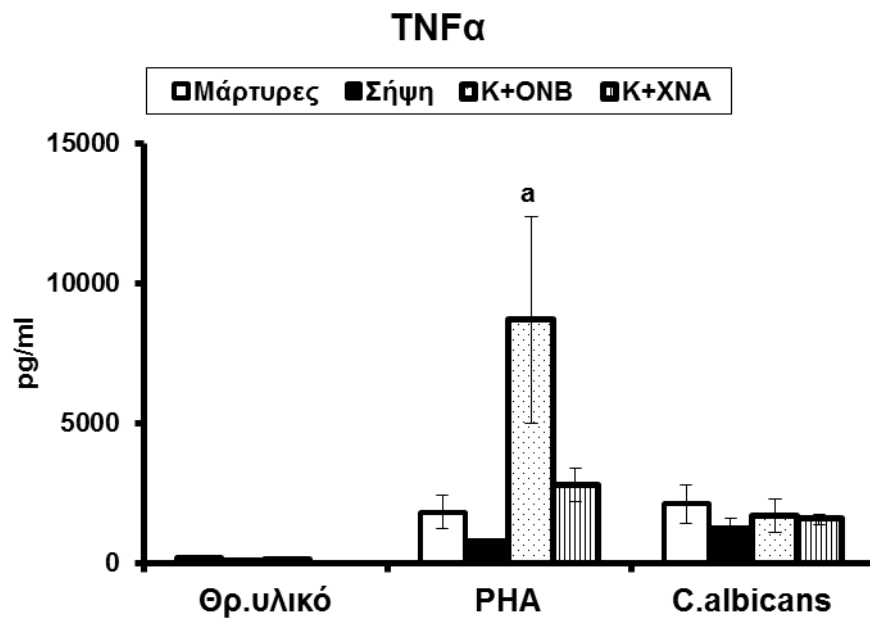
Τιμές του κριτηρίου p μετά *post-hoc* διορθώσεις κατά Bonferroni: **<0.0001 vs σήψη; ***0.044 vs σήψη

Συντομεύσεις APACHE: acute physiology and chronic health evaluation, BSI: πρωτοπαθής βακτηριαιμία, CAP: πνευμονία της κοινότητας, IAI: ενδοκοιλιακή λοίμωξη, ΚΑ: καρδιακή ανεπάρκεια, ONB: οξεία νεφρική βλάβη, SOFA: sequential organ failure assessment; ΣΔ2: σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, UTI: οξεία πυελονεφρίτιδα, ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ΧΝΑ: χρόνια νεφρική ανεπάρκεια,

Τα αρχικά πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν PBMCs έδειξαν ότι η απελευθέρωση της IL-17, με χρήση θερμικά εξασθενημένων στελεχών *C.albicans* ως ερέθισμα των T17 βοηθητικών κυττάρων, ήταν μεγαλύτερη ανάμεσα στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και οξεία νεφρική βλάβη σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές, τους ασθενείς με ανεπίπλεκτη σήψη και με τους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ (Σχήμα 2). Όσον αφορά την παραγωγή των υπόλοιπων κυτταροκινών, άνοδος της αντιφλεγμονώδους IL-10 προερχόμενης από τα T βοηθητικά κύτταρα παρουσιάστηκε και στις δύο ομάδες ασθενών με σηπτική καταπληξία και ΟΝΒ και στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ. Δεν σημειώθηκε κάποια μεταβολή από την ενεργοποίηση των Th1 κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η απελευθέρωση του TNFα από τα PBMCs ασθενών με σηπτική καταπληξία και ΟΝΑ ήταν αυξημένη χρησιμοποιώντας τον μη εκλεκτικό αγωνιστή των λεμφοκυττάρων PHA ενώ η απελευθέρωση της INFγ ήταν περιορισμένη και στις τρεις κατηγορίες ασθενών. Τα παραπάνω ευρήματα μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι η απελευθέρωση της IL-17 οδηγεί σε ΟΝΒ επιδεινώνοντας την σηπτική καταπληξία (Σχήματα 3-7).

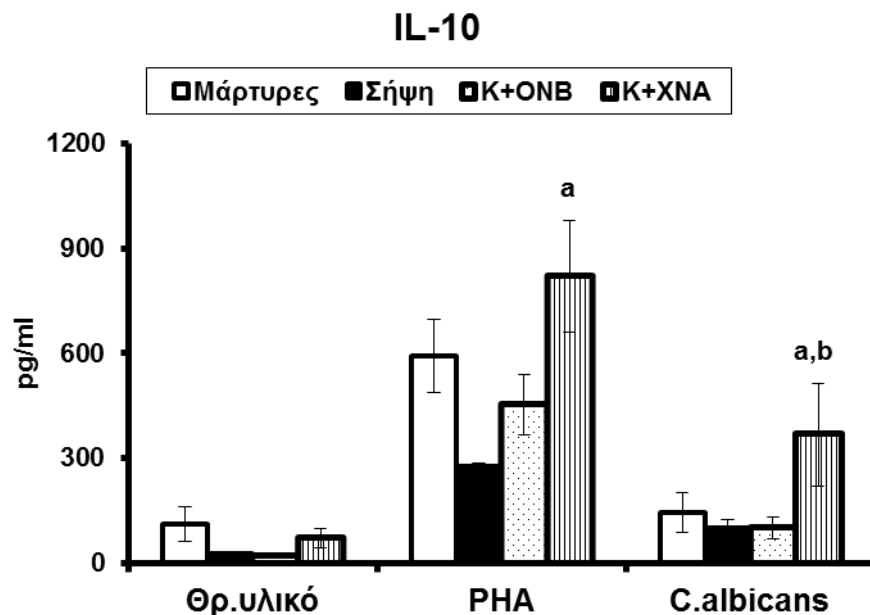


Σχήμα 3 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 19 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 15 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-17 μετά διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA), θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά-εξασθενημένο *Staphylococcus aureus*. Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^ap<0.05 vs υγιών και σήψης

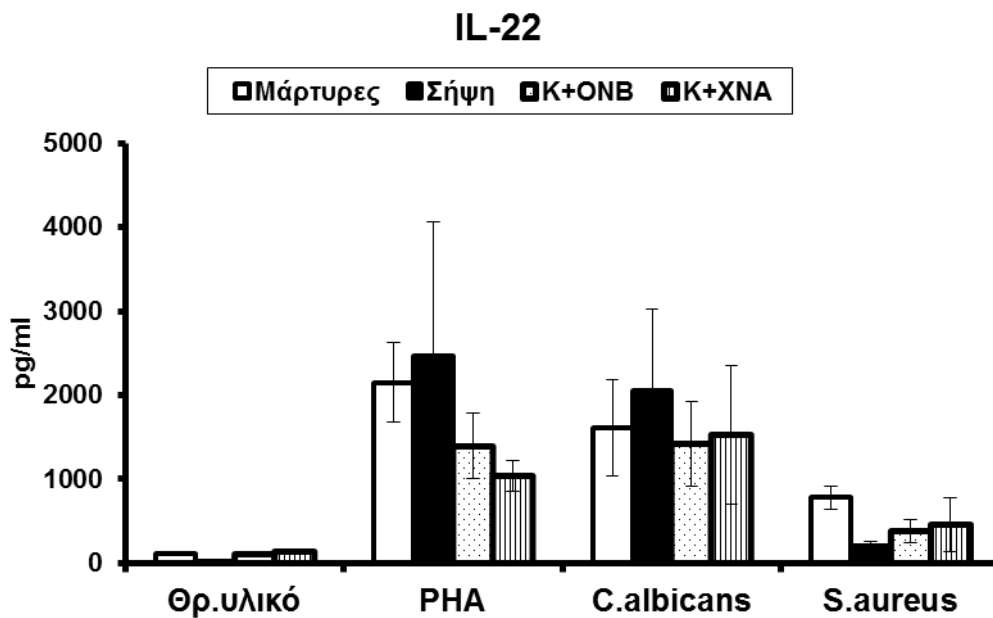


Σχήμα 4 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 19 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 15 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση του παράγοντα νεκρώσεως των όγκων-άλφα (TNF α) μετά διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) και θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*

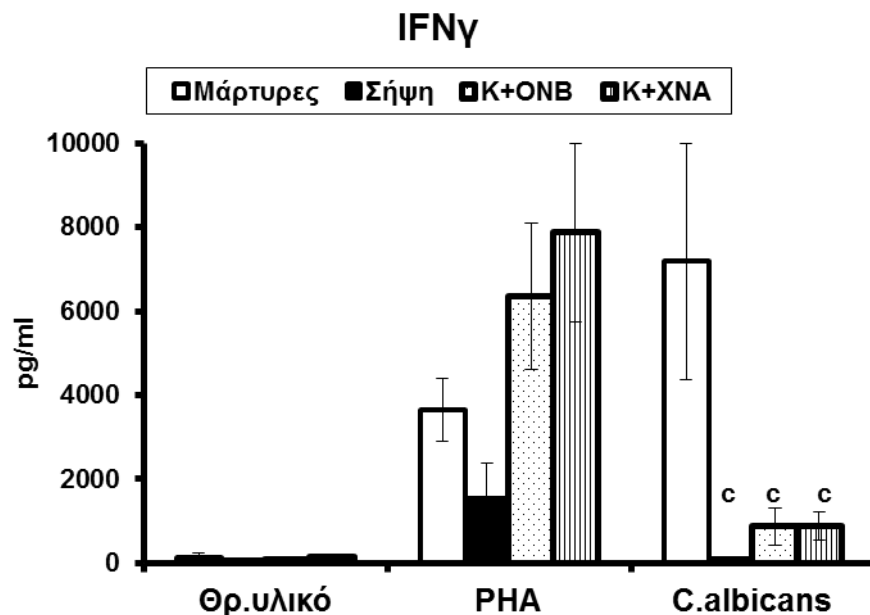
Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^ap<0.05 vs υγιών και σήψης



Σχήμα 5 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 19 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 15 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-10 μετά διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) και θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*. Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^ap<0.05 vs υγιών και σήψης, ^bp<0.05 vs K+ONB



Σχήμα 6 Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 υγείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 19 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 15 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-22 μετά διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA), θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά-εξασθενημένο *Staphylococcus aureus*.

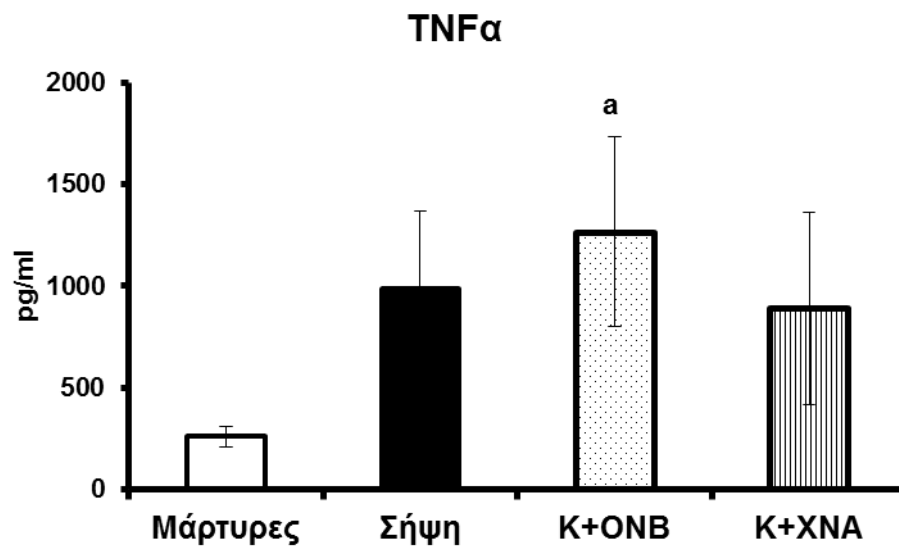


Σχήμα 7 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 19 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 15 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερφερόνης-γάμμα (IFN γ) μετά διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) και θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*.

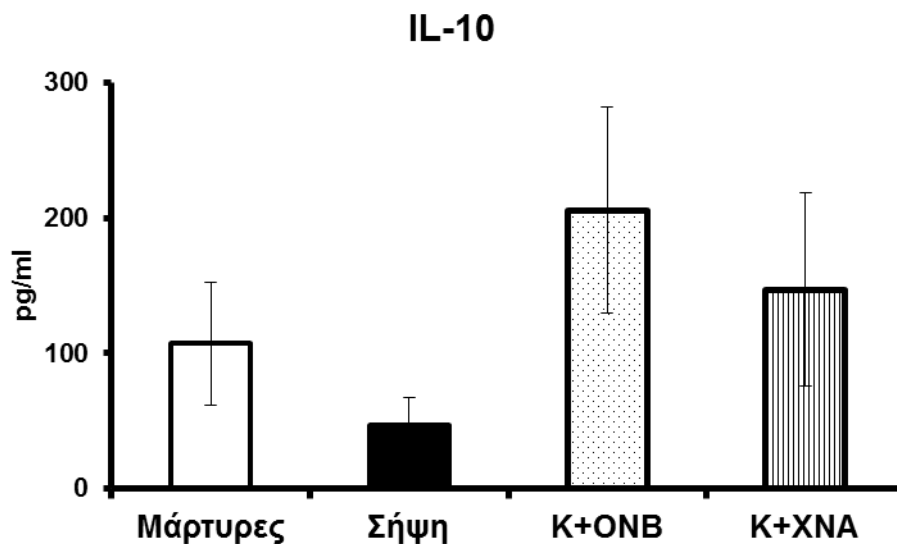
Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: $^{\circ}p < 0.05$ vs υγείων

Στην προσπάθεια να εντοπιστεί το υποσύνολο των λεμφοκυττάρων που μεσολαβεί για την αυξημένη απελευθέρωση της IL-17, απομονώθηκαν CD4 λεμφοκύτταρα στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα Th17 και διεγέρθηκαν για την παραγωγή κυτταροκινών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μόνη διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ONB και στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και XNA ήταν ότι τα επίπεδα της IL-17 αποδείχθηκαν μεγαλύτερα στα συμβάματα της ONB. Παρά το γεγονός ότι η απελευθέρωση του TNF α ήταν

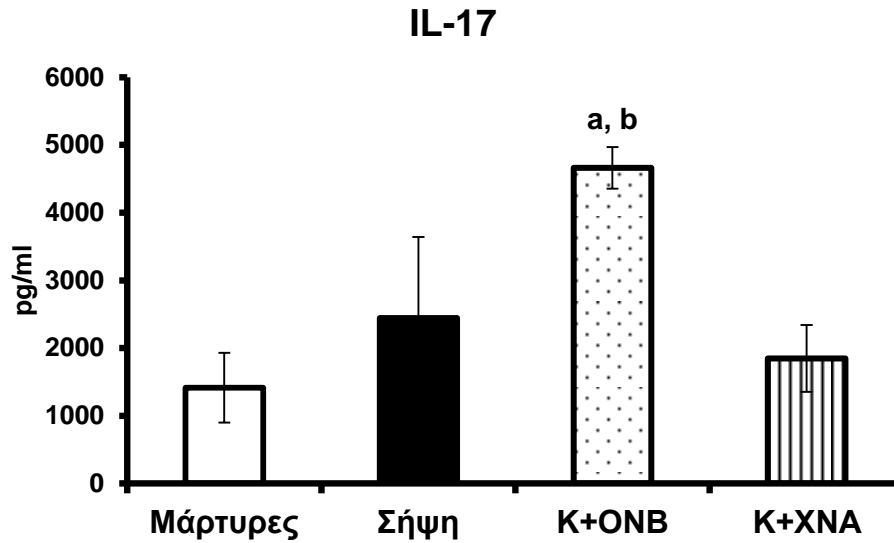
επίσης αυξημένη δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ. Τέλος, η απελευθέρωση της IL-22 ήταν μικρότερη στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ΟΝΑ σε σύγκριση με την ομάδα της απλής σήψης (Σχήματα 8-12).



Σχήμα 8 CD4-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 9 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (Κ+ΟΝΒ) και 6 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Κ+ΧΝΑ). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση του παράγοντα νεκρώσεως των όγκων-άλφα (TNFα) μετά διέγερση με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*. Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^ap<0.05 vs υγιών εθελοντών και σήψης

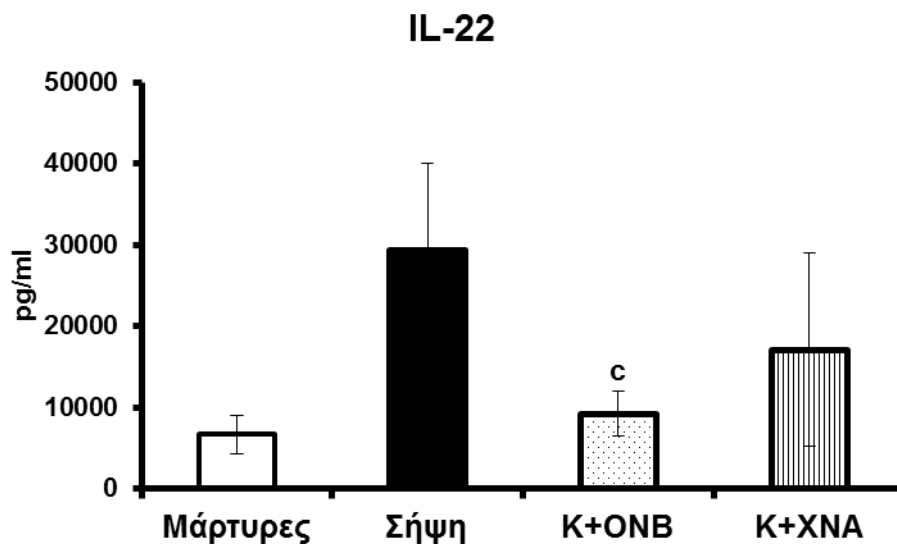


Σχήμα 9 CD4-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 9 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (Κ+ΟΝΒ) και 6 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Κ+ΧΝΑ). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-10 μετά διέγερση με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*

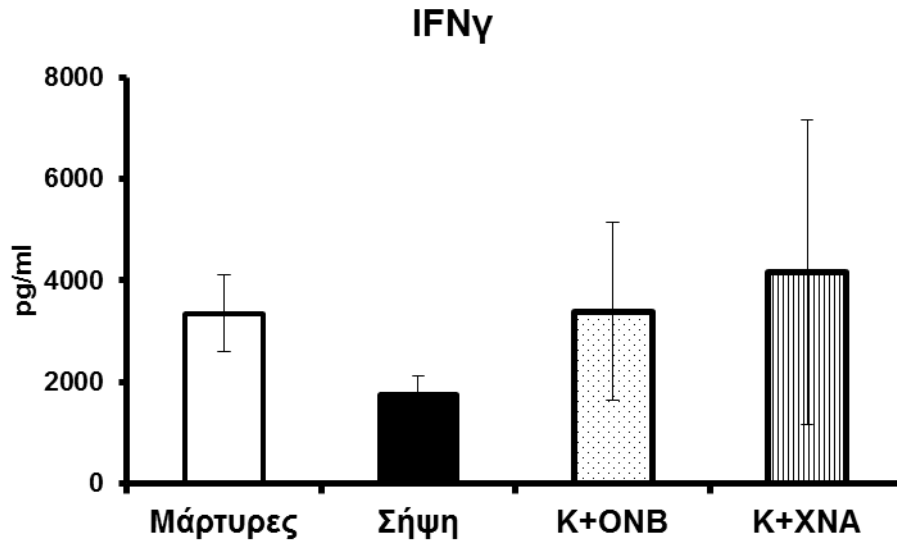


Σχήμα 10 CD4-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 9 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 6 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-17 μετά διέγερση με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*

Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^ap<0.05 vs υγιών εθελοντών και σήψης, ^bp<0.05 vs K+XNA

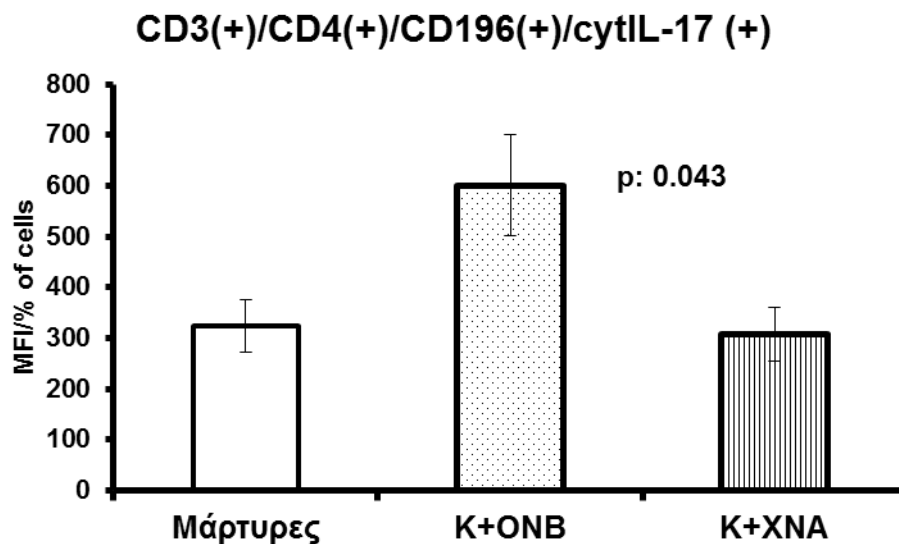


Σχήμα 11 CD4-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 9 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (Κ+ΟΝΒ) και 6 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Κ+ΧΝΑ). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-22 μετά διέγερση με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*
 Δίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές: ^cp<0.05 vs sepsis



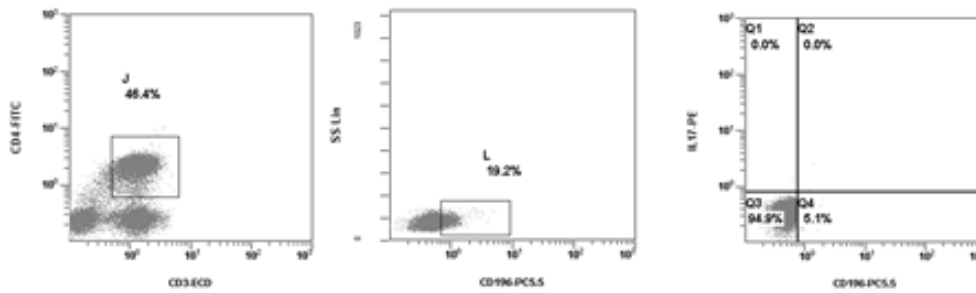
Σχήμα 12 CD4-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, 13 ασθενείς με σήψη και μέτρια μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας, 9 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 6 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+XNA). Το σχήμα δείχνει την απελευθέρωση της ιντερφερόνης- γ (IFN γ) μετά διέγερση με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*

Τα ευρήματα αυτά που προέκυψαν από την διέγερση των CD4 λεμφοκυττάρων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα Th17 για παράγωγή κυτταροκινών, ενίσχυσαν την υπόθεση ότι η απελευθέρωση της IL-17 από τα Th17 οδηγεί στην ανάπτυξη ONB μετά από σηπτική καταπληξία. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής επιβεβαίωσε την αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της IL-17 από τα Th17 στην σηπτική καταπληξία και την ONB συγκριτικά με τους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και XNA (Σχήματα 13, 14).

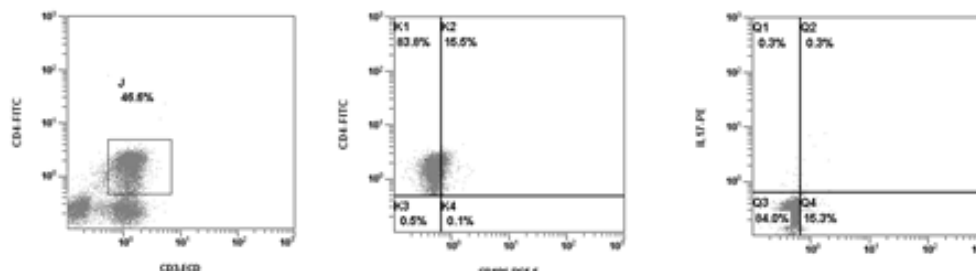


Σχήμα 13 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 3 υγιείς εθελοντές, 4 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (Κ+ΟΝΒ) και 3 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Κ+ΧΝΑ) και επωάσθησαν επί 4 ώρες με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*. Έγινε χρώση με τα αντιγόνα επιφανείας CD3, CD4 και CD196 και ενδοκυττάρια χρώση για την ιντερλευκίνη-17 (IL-17). Τα κύτταρα που είναι θετικά για CD3, CD4 και CD196 θεωρήθηκαν Th17 cells. Δίνεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) ανά Th17 κύτταρο. Η τιμή του κριτηρίου p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων Κ+ΟΝΒ και Κ+ΧΝΑ

A) Ασθενής με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ



B) Ασθενής με σηπτική καταπληξία και ONB



Σχήμα 14 Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 3 υγιείς εθελοντές, 4 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (K+ONB) και 3 ασθενείς με σηπτική καταπληξία και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (K+ΧΝΑ) και επωάσθησαν επί 4 ώρες με θερμικά εξασθενημένη *Candida albicans*.

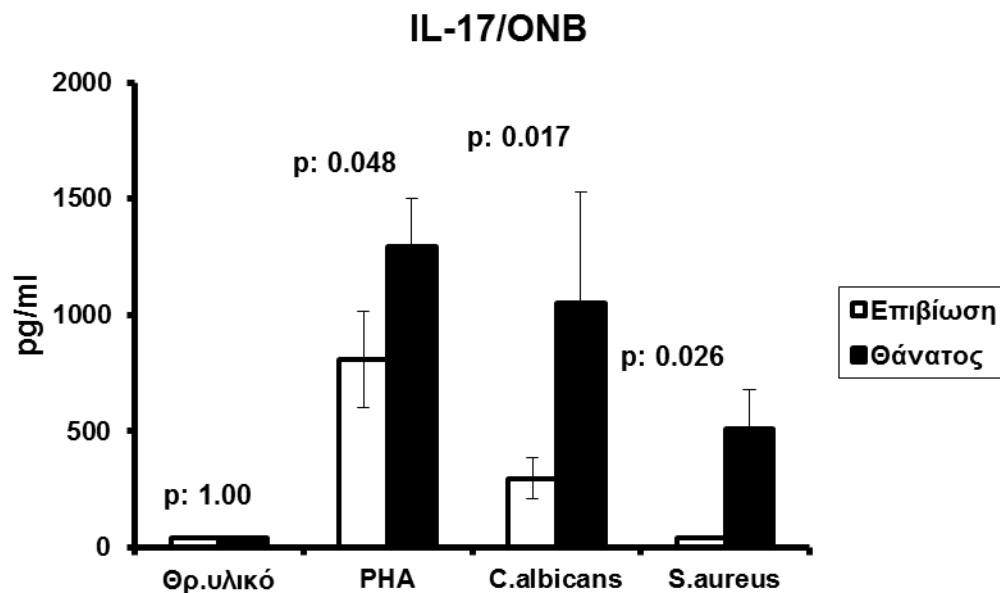
Έγινε χρώση με τα αντιγόνα επιφανείας CD3, CD4 και CD196 και ενδοκυττάρια χρώση για την ιντερλευκίνη-17 (IL-17). Τα κύτταρα που είναι θετικά για CD3, CD4 και CD196 θεωρήθηκαν Th17 cells.

A) Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής από έναν ασθενή με σηπτική καταπληξία και ONB

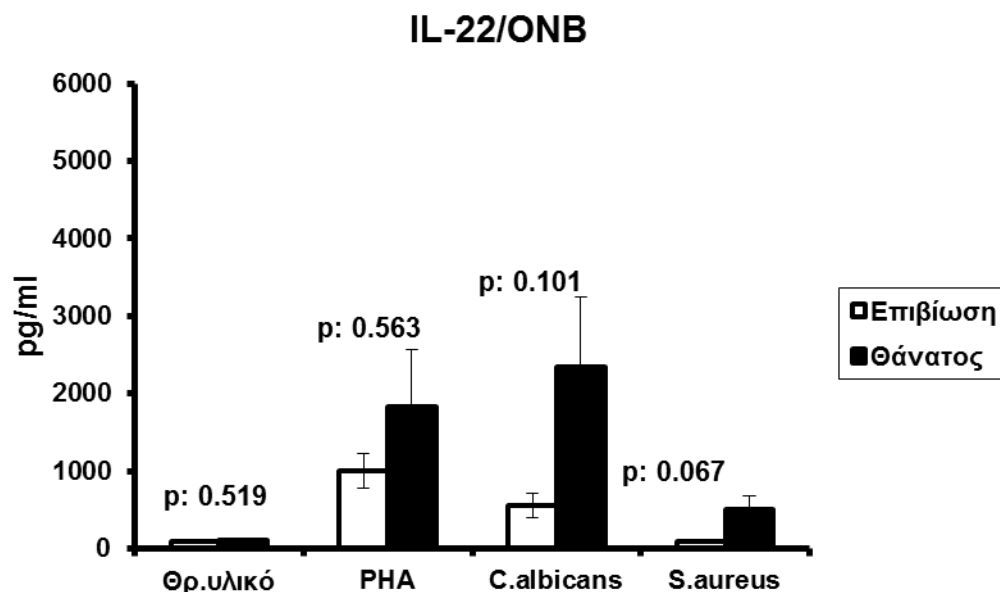
A) Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής από έναν ασθενή με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ

Τα διαγράμματα αντιστοιχούν από αριστερά προς τα δεξιά στην έκφραση CD3/CD4, στην έκφραση του CD196 επί των CD3(+)/CD4(+) κυττάρων και στην κυτταροπλασματική έκφραση του IL-17 επί των CD3(+)/CD4(+)/CD196(+) κυττάρων.

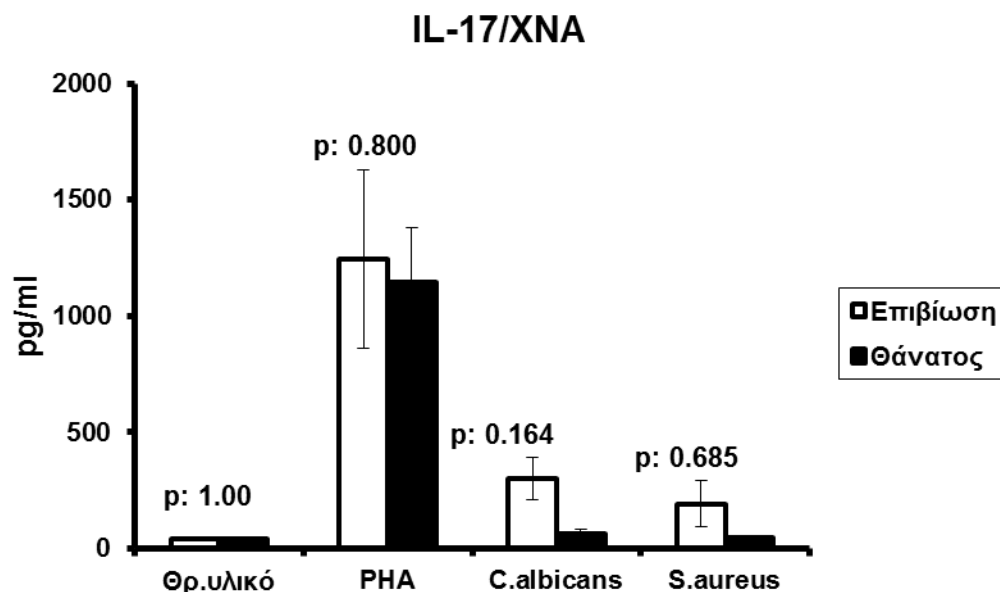
Η σημασία της απελευθέρωσης της IL-17 ως μεσολαβητή της ανάπτυξης της ONB στα πλαίσια της σηπτικής καταπληξίας αναδείχθηκε περαιτέρω από την σύγκριση ανάμεσα στους επιζώντες και μη επιζώντες. Σε αυτή την κατηγορία ασθενών, η απελευθέρωση της IL-17, αλλά όχι και της IL-22, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους μη επιζώντες απ'οτι στους επιζώντες. Αντιθέτως δεν διαπιστώθηκαν διαφορές ανάμεσα στους επιζώντες και μη επιζώντες από σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ (Σχήματα 15-18).



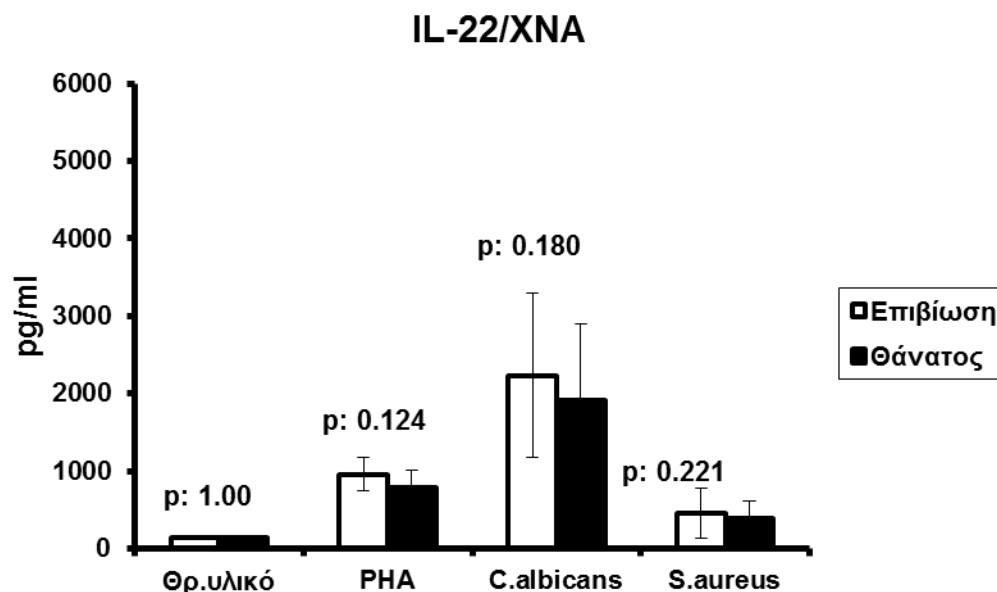
Σχήμα 15 Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 22 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (ONB) από τους οποίους 13 επιβίωσαν και 9 πέθαναν. Δίνεται η απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-17 μετά διέγερση με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA), θερμικά-εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά εξασθενημένο heat-killed *Staphylococcus aureus*. Οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p-values αντιστοιχούν στις συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν και των ασθενών που πέθαναν.



Σχήμα 16 Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 22 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη μετά σηπτική καταπληξία (ONB) από τους οποίους 13 επιβίωσαν και 9 πέθαναν. Δίνεται η απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-22 μετά διέγερση με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA), θερμικά-εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά εξασθενημένο heat-killed *Staphylococcus aureus*. Οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p-values αντιστοιχούν στις συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν και των ασθενών που πέθαναν.



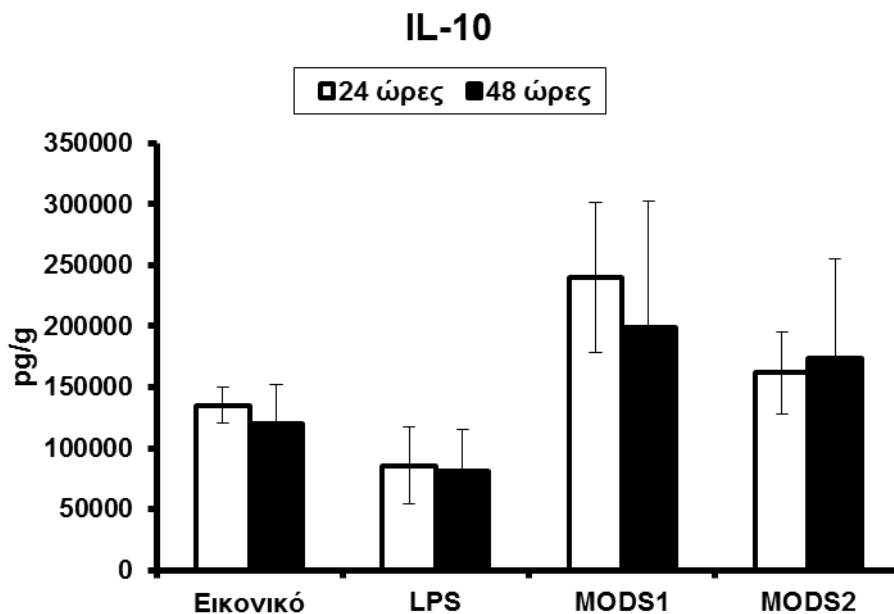
Σχήμα 17 Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) από τους οποίους 11 επιβίωσαν και 4 πέθαναν. Δίνεται η απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-17 μετά διέγερση με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA), θερμικά-εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά εξασθενημένο heat-killed *Staphylococcus aureus*. Οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p-values αντιστοιχούν στις συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν και των ασθενών που πέθαναν.



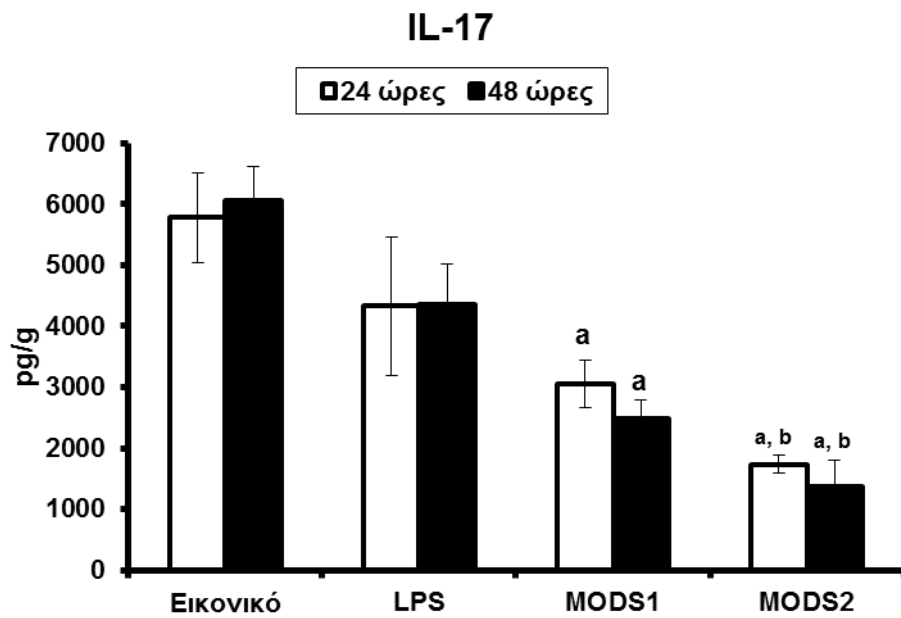
Σχήμα 18 Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 15 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) από τους οποίους 11 επιβίωσαν και 4 πέθαναν. Δίνεται η απελευθέρωση της ιντερλευκίνης (IL)-22 μετά διέγερση με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA), θερμικά-εξασθενημένη *Candida albicans* και θερμικά εξασθενημένο heat-killed *Staphylococcus aureus*. Οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p-values αντιστοιχούν στις συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν και των ασθενών που πέθαναν.

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης διερευνήσαμε την σημασία της κατανάλωσης της IL 17 στο νεφρό χρησιμοποιώντας ένα ζωικό πρότυπο πολυοργανικής ανεπάρκειας επιπλακεία με ONB, μέσω της μέτρησης των κυτταροκινών στα υπερκείμενα των νεφροκυττάρων. Σε αυτό το πρότυπο ο βαθμός νεφρικής δυσλειτουργίας αυξάνονταν με την παράλληλη αύξηση της ποσότητας του zymozan. Σε 48 ώρες της θυσίας, η μέση τιμή της κρεατινίνης ορού στην ομάδα LPS ήταν 0,6 mg/dl, στην ομάδα MODS1 0,9 mg/dl και στην ομάδα MODS2 1,7 mg/dl. Εν τέλει, αυτό το μοντέλο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανάλογο

ανθρώπινης μελέτης σε συνθήκες σηπτικής καταπληξίας και ONB με αρχόμενη πολυοργανική ανεπάρκεια. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν (Σχήματα 19-22) ότι οι συγκεντρώσεις της IL-10 και της IFN γ δεν διέφεραν σε καμία ομάδα θεραπείας. Ωστόσο, η IL-17 μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες MODS συγκρινόμενη με την ομάδα LPS και την ομάδα μαρτύρων. Η μείωση της IL-17 γίνονταν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Παρά το γεγονός ότι η IL-22 ήταν σημαντικά μειωμένη στις ομάδες MODS σε σύγκριση με την ομάδα LPS δεν παρατηρήθηκε παρόμοια τάση ελάττωσης των επιπέδων της με την πάροδο του χρόνου. Κατά συνέπεια αυτή η σταδιακή πτώση των επιπέδων της IL-17 μπορεί να εξηγηθεί ως κατανάλωση της στο επίπεδο του νεφρού.

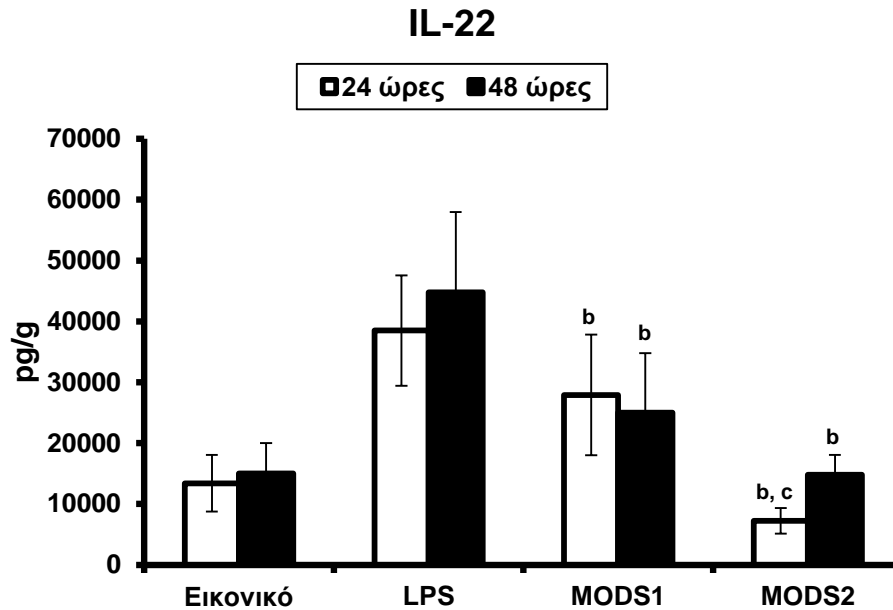


Σχήμα 19 Οι συγκεντρώσεις της ιντερλευκίνης (IL)-10 μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του ομογενοποιηήματος των νεφρών κατά την ευθανασία 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή πουλοοργανικής ανεπάρκειας (MODS) μέσω της σταδιακής έγχυσης βακτηριακής ενδοτοξίνης (LPS) και 0.6 g/kg zymozan (MODS1) ή LPS και 1.2 g/kg zymozan (MODS2).



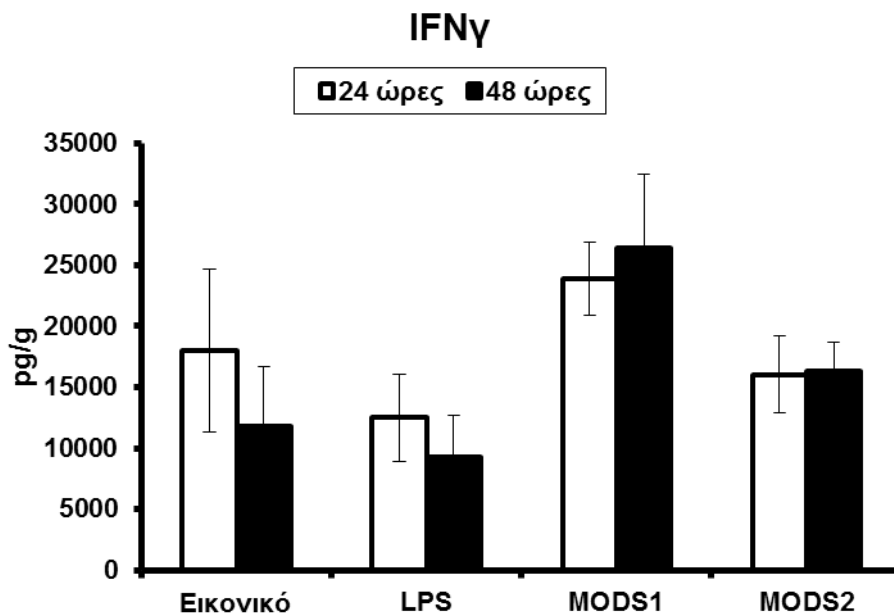
Σχήμα 20 Οι συγκεντρώσεις της ιντερλευκίνης (IL)-17 μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του ομογενοποιημένου των νεφρών κατά την ευθανασία 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή πουλοργανικής ανεπάρκειας (MODS) μέσω της σταδιακής έγχυσης βακτηριακής ενδοτοξίνης (LPS) και 0.6 g /kg zymozan (MODS1) ή LPS και 1.2 g/kg zymozan (MODS2).

Στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις: ^ap<0.05 vs εικονικό στα αντίστοιχα σημεία ευθανασίας, ^bp<0.05 vs στα αντίστοιχα σημεία ευθανασίας



Σχήμα 21 Οι συγκεντρώσεις της ιντερλευκίνης (IL)-22 μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του ομογενοποιημένου των νεφρών κατά την ευθανασία 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή πουλοργανικής ανεπάρκειας (MODS) μέσω της σταδιακής έγχυσης βακτηριακής ενδοτοξίνης (LPS) και 0.6 g /kg zymozan (MODS1) ή LPS και 1.2 g/kg zymozan (MODS2).

Στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις: ^bp<0.05 vs στα αντίστοιχα σημεία ευθανασίας, ^cp<0.05 vs MODS1 στα αντίστοιχα σημεία ευθανασίας

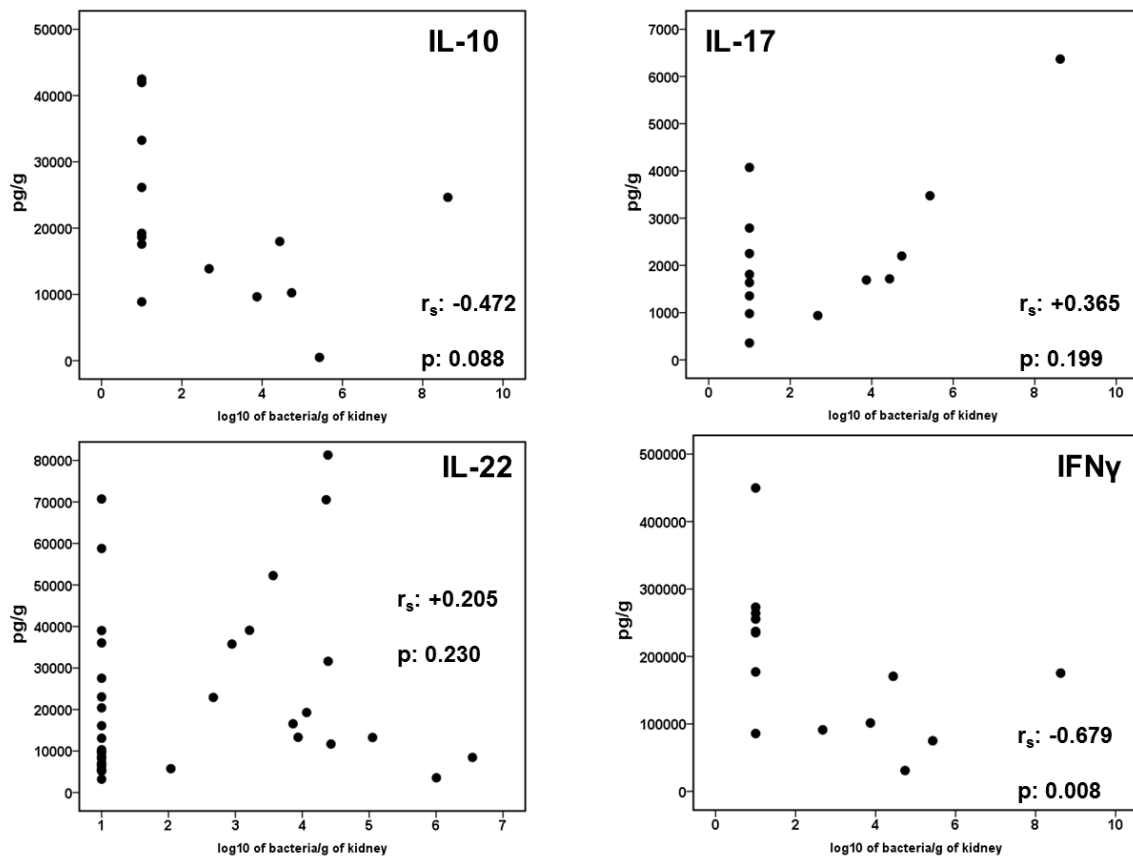


Σχήμα 22 Οι συγκεντρώσεις της ιντερφερόνης- γ (IFN γ) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του ομογενοποιημένου των νεφρών κατά την ευθανασία 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή πουλοργανικής ανεπάρκειας (MODS) μέσω της σταδιακής έγχυσης βακτηριακής ενδοτοξίνης (LPS) και 0.6 g /kg zymozan (MODS1) ή LPS και 1.2 g/kg zymozan (MODS2).

Στο μοντέλο μελέτης MODS πραγματοποιήθηκε βακτηριακή μετακίνηση των εντεροβακτηρίων [81]. Δεδομένου ότι τα βακτήρια μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών, η παρουσία τους μπορεί να προκαλέσει σύγχυση στην ερμηνεία των ευρημάτων. Για να αποφευχθεί η σύγχυση αυτή συσχέτισαμε τις συγκεντρώσεις των κυτταροκινών με το βακτηριακό φορτίο του νεφρού. Καμία θετική συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στο βακτηριακό φορτίο του νεφρού και στην IL-17 και IL-22 που μετρήθηκαν στα υπερκείμενα του νεφροκυττάρου (Σχήμα 23) ενώ σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ βακτηριακού φορτίου και της IL-10 καθώς επίσης οριακής σημασίας βρέθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στο βακτηριακό φορτίο και στην IFN γ . Αυτές οι διαφορές δείχνουν ότι οι μεταβολές στην IL-17 και στην IL-22 στα πειραματικά μοντέλα ONB και

πολυοργανικής ανεπάρκειας ως απάντησης ανοσοποίησης ήταν ανεξάρτητες απο το επίπεδο βακτηριακού φορτίου.

Η ενσωμάτωση των δεδομένων που προήλθαν απο την κλινική μελέτη και απο τα ζωικά πειράματα έδειξαν οτι τα Th17 ενεργοποιούνται για την απελευθέρωση της IL-17 κατα την ανάπτυξη της ONB μετά απο σηπτική καταπληξία. Έπειτα, η IL-17 καταναλώνεται σταδιακά στο νεφρικό παρέγχυμα.



Σχήμα 23 Συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης (IL)-10, IL-17, IL-22 και ιντερφερόνης- γ (IFN γ) στα υπερκείμενα τνω νεφρών και του βακτηριακού φορτίου του νεφρού. Για κάθε συσχέτιση δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman και η τιμή του στατιστικού κριτηρίου p.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μια συμπληρωματική προσέγγιση συνδυάζοντας ένα κλινικό στάδιο και ένα πειραματικό στάδιο σε ποντικούς ώστε να αποδειχτεί ο σημαντικός ρόλος των T-17 βοηθητικών λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της ανάπτυξης της οξείας νεφρικής βλάβης κατά τη σηπτική καταπληξία. Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα Th17 κύτταρα των ασθενών με σηπτική καταπληξία είναι υπερ-ενεργοποιημένα, όπως αυτό αποδείχτηκε από την ex-novo αυξημένη απελευθέρωση της IL-17. Αυτό έλαβε χώρα όταν τα PBMCs και τα απομονωμένα CD4 χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μελέτης και όταν τα στελέχη της *C.albicans* χρησιμοποιήθηκαν ως διεγέρτης. Δεδομένου ότι α) η απελευθέρωση της IL-17 μπορεί να προέλθει είτε από τα γδΤ κύτταρα είτε από τα Th17 κύτταρα, β) αυξημένη απελευθέρωση IL-17 παρατηρήθηκε στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν CD4 λεμφοκύτταρα και όχι στα γδΤ κύτταρα γ) η IL-17 που μετρήθηκε μετά από πέντε ημέρες επώασης θεωρήθηκε ως αναγνώριση της ενεργοποίησης των Th17 κυττάρων [82] και δ) ενδοκυττάρια παραγωγή της IL-17 βρέθηκε να πραγματοποιείται από τα CD3(+)/CD4(+)/CD196(+) κύτταρα, μπορεί να υποθεθεί με ασφάλεια ότι τα T-17 βοηθητικά λεμφοκύτταρα είναι η πηγή της IL-17 στην ONB.

Πρέπει επίσης, να ληφθεί υπόψιν ότι η υπερέκκριση της IL-17 αναμέσα στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία και ONB με δυσμενή έκβαση φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από το ερέθισμα που χρησιμοποιήθηκε για την απελευθέρωση κυτταροκινών. Η χρήση διαφορετικών ερεθισμάτων δεν έδειξε τίποτα παραπάνω από την ικανότητα απελευθέρωσης ιντερλευκίνης-17 σε μια εγκατεστημένη πολυοργανική ανεπάρκεια όπου τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος βρίσκονταν εκτεθειμένα σε μια τεράστια ποικιλία από σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά μοτίβα. Τα παραπάνω δεν αφορούν την περίπτωση ασθενών με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η οξεία νεφρική βλάβη που συνοδεύει την σηπτική καταπληξία είναι ένας παράγοντας κινδύνου για δυσμενή έκβαση [83]. Η ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους μη επιζώντες σε σχέση με τους επιζώντες ασθενείς με ONB και σηπτική καταπληξία.

Δεδομένου ότι αυτό δεν αφορά τις περιπτώσεις ασθενών με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ και ενώ οι τιμές κρεατινίνης ορού και κάθαρσης κρεατινίνης ήταν παρόμοιες συγκρινόμενες μεταξύ των ασθενών που μελετήθηκαν με ONB και ΧΝΑ αντίστοιχα, μπορεί να υποτεθεί ότι η ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων σχετίζεται με την οξεία εμφάνιση της φλεγμονώδους διαδικασίας που συνδέεται με την ONB.

Η δική μας πειραματική προσέγγιση βασίζεται σε ένα εξανθρωπισμένο μοντέλο πολυοργανικής ανεπάρκειας στο οποίο λαμβάνει χώρα βακτηριακή μετατόπιση από τις εντερικές έλικες [81]. Σε αυτό το μοντέλο μετρήθηκαν δυο επιπλέον κυτταροκίνες: η IFN γ ως δείκτης ενεργοποίησης των Th1 κυττάρων και η IL-10 ως δείκτης ενεργοποίησης των Th2 κυττάρων [84]. Εφόσον οι ιντερλευκίνες 17 και 22 είναι οι μοναδικές που μεταβάλλονται είναι δελεαστικό να υποθέσει κανείς ότι η απάντηση των Th17 είναι πιο σημαντική για την παθογένεια από την αντίστοιχη απόκριση των Th1 και Th2 κυττάρων. Η σταδιακή μείωση των επιπέδων της IL-17 στα υπερκείμενα των νεφρικών ομογενοποιημάτων συγκριτικά με τις άλλες ομάδες μπορεί να ερμηνευθεί ως ένα έμμεσο σημείο ενεργοποίησης των Th17 κυττάρων διαμέσου σύνδεσης με κυτταρικούς υποδοχείς, καθώς η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε μετρά μόνο την ελεύθερη και όχι την συνδεδεμένη με το κύτταρο IL-17.

Ο ρόλος της ενεργοποίησης των Th 17 δεν έχει διερευνηθεί ποτε στο παρελθόν όσον αφορά την ανάπτυξη της ONB μετά από βακτηριακή λοίμωξη. Πρόσφατα στοιχεία καταδεικνύουν έναν ρόλο στην ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων για την ανάπτυξη της ONB μετά από δυο λοιμώξεις μη βακτηριακής προέλευσης : την ελονοσία από το *Plasmodium falciparum* [85] και τον δάγκειο πυρετό [86]. Ένα μεγάλο φάσμα βιοδεικτών μετρήθηκε στον ορό 53 ασθενών με σοβαρή ελονοσία χωρίς κώμα και συγκρίθηκαν με 9 ασθενείς με ελονοσία χωρίς MODS, 42 ασθενείς με ελονοσία και κώμα και 41 ασθενείς με κώμα και MODS. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συγκρίθηκαν επιπλέον με 21 υγιείς εθελοντές, 10 ασθενείς με σοβαρή σήψη και 37 ασθενείς με πυρετό χωρίς άλλες επιπλοκές. Χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση βιοανάλυσης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσας IL-17 ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με MODS,

αλλά αυτή η αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η αύξηση της IL-17 έγινε στατιστικά σημαντική μόνο μετά από ξεχωριστή ανάλυση των ασθενών με ONB [85]. Η ανοσοϊστοχημεία των νεφρικών βιοψιών των ασθενών που απεβίωσαν από δάγκειο πυρετό συγκρίθηκε με βιοψίες ασθενών που απεβίωσαν από μη λοιμώδη αίτια. Βαριές εναποθέσεις της IL-17 βρέθηκαν στο σπείραμα [86]. Αυτή η διαπίστωση ταιριάζει με τα δικά μας ευρήματα από τα υπερκείμενα των νεφροκυττάρων των ποντικών με MODS. Η IL-17 συνδεόμενη με κυτταρικούς υποδοχείς καταναλώθηκε στο διάμεσο χώρο ερμηνεύοντας την μείωση της συγκέντρωσης της που διαπιστώθηκε. Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η IL-22 δεν μετρήθηκε σε καμία από τις παραπάνω μελέτες με ελονοσία και δάγκειο πυρετό. Συνεπώς, το πεδίο ενεργοποίησης των Th17 κυττάρων όπως περιγράφεται σε αυτή τη μελέτη είναι πιο πλήρες.

Παρόμοια ευρήματα σχετικά με τη σημασία της παραγωγής της IL-17 παρουσιάστηκαν σε μια σειρά από πειραματικές μελέτες για την ONB. Σε ένα πειραματικό πρότυπο ONB και σωληναριακής βλάβης που προκλήθηκε από την έγχυση σισπλατίνης, η γονιδιακή έκφραση της IL-17a αυξήθηκε άμεσα μετά τις 24 ώρες από την έγχυση του φαρμάκου. Όταν μελετήθηκαν knocked-out μύες για την IL-17, ο βαθμός της σωληναριακής βλάβης και της διήθησης του διαμέσου χώρου από ουδετερόφιλα ήταν χαμηλότερος. Η ενεργοποίηση της IL-17 γίνεται μέσω ενός ενδοκυττάρου υποδοχέα ROR γ t και οι μύες που είναι ομοζυγώτες για την έλλειψη του υποδοχέα ROR γ t είναι λιγότερο ευαίσθητοι στη νεφροτοξική δράση της σισπλατίνης [87]. Σε πειραματικό μοντέλο μηννοειδούς σπειραματονεφρίτιδας προκαλούμενη από έγχυση με αντιορό που στόχευε στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού, οι μύες που ήταν ομοζυγώτες για έλλειψη της IL-17 υπέστησαν πιο ήπια νεφρική βλάβη. Η χημειοτακτική δράση της IL-17 στα ουδετερόφιλα πραγματοποιείται μέσω των χημειοκινών CXCL5 και οι μύες με ελλιπή έκφραση του CXCL5 γονιδίου δεν ανέπτυξαν νεφρική βλάβη [88].

Η ONB αποτελεί μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της σήψης και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου θνητότητας [83]. Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι σε αυτούς τους ασθενείς λαμβάνει χώρα συστηματική ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν υπό το

πρίσμα προσφάτως αναπτυσσόμενων μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν στην IL-17 για ρευματικές και δερματικές παθήσεις [89] και μπορεί να ανοίξουν νέους ορίζοντες για την έγκαιρη πρόληψη της ONB στη σηπτική καταπληξία.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της ενεργοποίησης των T- 17 βοηθητικών κυττάρων (Th17) στην οξεία νεφρική βλάβη (ONB) κατά τη σηπτική καταπληξία, χρησιμοποιήθηκε μια μελέτη δυο σταδίων. Αρχικά, απομονώθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) και CD4 λεμφοκύτταρα, εντός εικοσιτεσσάρων ωρών από την εγκατάσταση της σηπτικής καταπληξίας, από 26 ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη (ONB) και 18 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια χωρίς ONB και τέθηκαν προς διέγερση για την απελευθέρωση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNFa), της ιντερλευκίνης-10, της ιντερλευκίνης-17, της ιντερλευκίνης-22 και της ιντερφερόνης-γ (IFNγ). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά 15 υγιών εθελοντών και 13 ασθενών με ανεπίπλεκτη σήψη. Εν συνεχεία, μελετήθηκε ένα ζωικό πρότυπο ποντικών με πολυοργανική ανεπάρκεια (MODS) και βακτηριακή μετατόπιση από το ΓΕΣ και υπολογίστηκε η συγκέντρωση των IL-10, IL-17, IL-22 και IFNγ στο νεφρικό ομογενοποίημα. Η IL-17 ήταν η μοναδική κυτταροκίνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα PBMCs και τα CD4 λεμφοκύτταρα των ασθενών με σηπτική καταπληξία και ONB από τις συγκρινόμενες. Όταν τα PBMCs των ασθενών με σηπτική καταπληξία και ONB διεγέρθηκαν ex-vivo, η ενδοκυττάρια χρώση για IL-17 ήταν εντονότερη στα CD3(+)/CD4(+)/CD196(+) κύτταρα συγκριτικά με των ασθενών με σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ. Η IL-17 απελευθερώθηκε σε μεγάλες ποσότητες από τα μονοπύρρηνα των μη-επιβιώσαντων ασθενών με αιτία την σηπτική καταπληξία και ONB, χωρίς να συμβεί το ίδιο όμως και στους μη επιβιώσαντες με αιτία την σηπτική καταπληξία και ΧΝΑ. Στο ζωικό πρότυπο της πολυοργανικής ανεπάρκειας, παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση των επιπέδων της IL-17 από το νεφρικό ομογενοποίημα, χωρίς αυτή να συνοδεύεται και από αντίστοιχη μείωση των IL-10, IL-22 και IFNγ, που αποδώθηκε σε αυξημένη κατανάλωση της. Από αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να προταθεί ότι η ONB στα πλαίσια της σηπτικής καταπληξίας μεσολαβείται από την απελευθέρωση της IL-17 από τα Th17 κύτταρα και στη συνέχεια η IL-17 καταναλώνεται σταδιακά στο νεφρό.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

In order to investigate the role of T-helper 17 (Th17) cell activation in acute kidney injury (AKI) after septic shock, a two-stage approach was used. Firstly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and CD4-lymphocytes were isolated the first 24 hours after septic shock from 26 patients with AKI and 18 patients with chronic renal disease (CRD) without AKI and stimulated for the release of tumour necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin (IL)-10, IL-17, IL-22 and interferon-gamma (IFN γ). Results were compared with 15 healthy volunteers and 13 patients with uncomplicated sepsis. Secondly, a murine model of multiple organ dysfunction (MODS) complicated with AKI and bacterial gut translocation was studied, and IL-10, IL-17, IL-22 and IFN γ were measured in kidney homogenates. IL-17 was the only cytokine produced at greater quantities from PBMCs and CD4-lymphocytes of patients with septic shock and AKI than comparators. When PBMCs of patients with septic shock and AKI were ex-vivo stimulated, intracellular staining for IL-17 was greater in CD3(+)/CD4(+)/CD196(+) cells compared to patients with septic shock and CRD. IL-17 was released at greater amounts from PBMCs of non-survivors by septic shock and AKI but not of septic shock and CRD. In the murine model of MODS, a gradual decrease of IL-17, but not of IL-10, IL-22 and IFN γ , of kidney homogenates was found indicating over-consumption. These results suggest that AKI after septic shock is driven through IL-17 release by Th17 cells; this is gradually consumed in the kidney.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-55
2. Wan L, Bagshaw SM, Langerberg C, Soutome T, May C, Belommo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: What do we really know? *Crit Care Med* 2008; 36: S198-203
3. Marik PE. Definition of sepsis: not quite time to dump SIRS? *Crit Care Med* 2002; 30:706-8
4. Zahorec R. Definition for septic syndrome should be re-evaluated. *Intensive Care Med* 2000; 26:1870
5. Deutschman, CS. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity* 2014; 40: 463-75
6. Dellinger P, Levy M, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41: 580-637.
7. Dellinger RP, Levy MM, Carlet J, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2008; 34:17-60
8. Lyle, NH; Pena, OM; Boyd, JH; Hancock, RE. Barriers to the effective treatment of sepsis: antimicrobial agents, sepsis definitions and host directive therapies. *Ann NY Acad Sci* 2014; 1323: 101-14.
9. Martin GS, Manino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
10. Esson ML, Schrier RW. Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. *Ann Intern Med* 2002; 137: 744-52.
11. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004; 351: 159-69.
12. Dunser MW, Takala J, Ulmer H, et al. Arterial blood pressure during early sepsis and outcome. *Intensive Care Med* 2009; 35: 1225-33.

13. Poukkanen M, Wilkman E, Vaara ST, et al. Hemodynamic variables and progression of acute kidney injury in critically ill patients with severe sepsis: data from the prospective observational FINNAKI study. *Crit Care* 2013; 17: R295
14. Prowle JR, Bellomo R. Sepsis-associated acute kidney injury: macrohemodynamic and microhemodynamic alterations in renal circulation. *Semin Nephrol* 2015; 35: 64-74.
15. Leong CI, Anderson Wp, Evans RG. Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1726-33.
16. Janssens S, Beyaert R, Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 637-46.
17. Almac E, SiegemundM, Demirci C, Ince C. Microcirculatory recruitment manoeuvres correct tissue CO2 abnormalities in sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2006; 72: 507-19.
18. Dyson A, Bezemer R, Legrand M, Balestra G, Singer M, Ince C. Microvascular and interstitial oxygen tension in the renal cortex and medulla studied in a 4-h rat model of LPS-induced endotoxemia. *Shock* 2011; 36: 83-9.
19. Gomez H, Ince C, De Backer D, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock* 2014; 41: 3-11.
20. Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, Gokden N, Mayeux PR. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2012; 81: 370-8.
21. Areahoug T. Gordon S Pattern recognition receptors and their role in innate immunity : focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiot* 2008; 15: 45-60.
22. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21: 317-37.

23. Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care* 2014; 20: 588-95.
24. Beg A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; 23: 509-12.
25. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002; 168: 1286-93.
26. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 34-45.
27. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffaman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
28. Kitching AR, Holdsworth SR. The emergency of TH17 cells as effector of renal injury. *J Amer Soc Nephrol* 2011; 22: 235-8.
29. Ivanof II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-33.
30. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, et al. CD4+T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170: 1958-63.
31. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defence against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 2005; 202: 761-9.
32. Huang W, Fiidel PL, Schwartzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic *Candida albicans* in mice. *J Infect Dis* 2004; 190: 624-31.
33. Noack N, Miossec P. Th 17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases, *Autoimmune Rev* 2014; 13: 668-76.
34. Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50: 980-9.

35. Zou W, Restifo NP. T(H) 17 cells in tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 248-56.
36. Gnerlich JI, Mitchem JB, Weir JS, et al. Induction of Th 17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 2010; 185: 311-21.
37. Onishi RM, Gaffen SI. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129: 311-21.
38. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation, *Nat Rev Drug Discovery* 2012; 11: 763-776.
39. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al., Herpes virus Saimiri encodes a new cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3: 811-21.
40. Gaffen SI. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 556-67.
41. Rickett CA, Siegel LA, Yoon BR, et al. Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. *J Immunol* 2008; 181: 4299-310.
42. Bordon Y. Cytokines: IL-17C joins the family firm. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 805.
43. Ge D, You Z. Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissue, *Int Arch Med* 2008; 1: 19.
44. Kolls J, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-76.
45. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leuk Biol* 2002; 71: 1-8.
46. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995; 155: 5483-6.
47. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278: 1910-4.
48. Cho ML, Kang JW, Moon UM, et al. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal

- model IL-1 receptor antagonist-deficient mice". *J Immunol* 2006; 176: 5652-61.
49. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8137-42.
 50. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-89.
 51. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-4.
 52. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal development pathway for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-8.
 53. Carbonell F, Heimpel H, Kubanek B, Fliender TM. Growth and cytogenetic characteristics of bone marrow colonies from patients with 5q-syndrome. *Blood* 1985; 66: 363-5.
 54. Cleve H, Kirk RL, Gajdusek DC, Guiart J. On the distribution of the Gc variant Gc Aborigine in Melanesian population; determination of Gc-types in sera from Tongariki Island, New Hebrides. *Acta Genet Statistica Medica* 1965; 17: 511-7.
 55. Seppala M, Ronnberg L, Karonen SL, Kaupila A. Micronized oral progesterone increases the circulation level of endometrial secretory PP14/beta-lactoglobulin homologue. *Hum Reprod* 2006; 2: 453-5.
 56. FDA approves new psoriasis drug Cosentyx. U.S. Food and Drug Administration. 2015-01-21. Retrieved 2015-03-12.
 57. First in the world regulatory approval of Novartis' Cosentyx™ in Japan for both psoriasis and psoriatic arthritis. *Novartis AG*. 2014-12-26.
 58. Swardfager W, Winer DA, Hermann N, Winer S, Lanctot KL. Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37: 436-47.

59. Ortiz ML, Kumar V, Martner A, et al. Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 2015; 212: 351-67.
60. Paul O, Bland EF, Massell BF. T.Duckett Jones and his association with Paul Dudley White". *Clin Cardiol* 1990; 13: 3838-9.
61. Guo S, Wu X, Jones CX, et al. Allergic airway inflammation disrupts interleukin 17 mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Int Immunopharmacol* 2015; 31:32-8.
62. Kim SM, Lee SH, Lee A, et al. Targeting T helper 17 by mycophenolate mofetil attenuate diabetic nephropathy progression. *Transl Res* 2015; 166: 375-83.
63. Hunemorder S, Treder J, Ahrens S, et al. TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Pathol* 2015; 237: 62-71.
64. Williams LD, Craig KJ, Topley N, et al, Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470-479.
65. Chaimovitz C. Peritoneal dialysis. *Kidney Intern* 1994; 45: 1226-40.
66. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis," *Kidney intern* 1999; 55: 341-56.
67. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010; 140: 845-58.
68. Mi S, Li Z, Yang HZ, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta I-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2011; 187: 3003-14.
69. Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4+T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 81-91.
70. Liu Y, Zhu H, Su Z, et al. IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signalling pathway. *Intern immunol* 2012; 24: 605-12.

71. Aguilera A, Aroeira LS, Ramirez-Huesca M, et al. Effects of rapamycin on the epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells. *Intern J Artificial Organs* 2005; 28: 164-9.
72. Gonzalez-Mateo GT, Fernandez-Millara V, Bllon T, et al. Paricalcitol reduces peritoneal fibrosis in mice through the activation of regulatory T cells and reduction in IL-17 production. *PLoS ONE* 2014; 9: e108477.
73. Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J, et al. Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alternations of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 582-92.
74. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-10.
75. Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, G et al, Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Crit Care* 2010; 14: R96.
76. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-6.
77. Macedo E, Malhotra R, Claire-Del Granado R, Fedullo P, Mehta RL. Defining urine output criterion for acute kidney injury in critically ill patients, *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 509-15.
78. Scrutinio D, Passantino A, Santoro D, Cacciapaglia E, Farinola G. Prognostic value of formulas estimating excretory renal function in the ederyly with systolic heart failure. *Age Ageing* 2009; 38: 296-301.
79. van de Veerdonk FL, Mouktaroudi M, Ramakers BP, et al Deficient Candida-specific T-helper 17 response during sepsis. *J Infect Dis* 2012; 206: 1798-802.
80. Giamarellos-Bourboulis EJ, van de Veerdonk FL, Mouktaroudi M, et al. Inhibition of caspase-1 activation in Gram-negative sepsis and experimental andotoxemia. *Crit Care* 2011; 15: R27.

81. Louis K, Netea MG, Carrer DP, et al. Bacterial translocation in an experimental model of multiple organ dysfunctions. *J Surg Res* 2013; 183: 686-94.
82. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17 producing cells: the sentinels of the immune system, *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-89.
83. Sood MM, Shafer LA, Ho J, et al., Early reversible acute kidney injury is associated with improved survival in septic shock, *Crit Care Med* 2014; 29: 711-7.
84. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* 2008; 29: 315-21.
85. Herbert F, Tchitchek N, Bansal D, et al. Evidence of IL-17, IP-10n and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Transl Med* 2015; 13: 369.
86. Pagliari C, Quaresma JAS, Kanashiro-Galo L, et al. Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL-17. *J Clin Virol* 2016; 75: 16-20.
87. Chan AJ, Alikhan MA, Odobasic D, et al. Innate IL-17A-producing leukocytes promote acute kidney injury through inflammasome and toll-like receptor activation. *Am J Pathol* 2014; 184: 1411-8.
88. Disteldorf EM, Krebs CF, Paust HJ, Jet al. CXCL5 drives neutrophil recruitment in T_H17 mediated GN. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 55-66.
89. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation, *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: e763-76.