

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

## **Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΘΕΜΑ: Φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια σχετιζόμενη με την κρίσιμη νόσο.**

**ΣΤΑΜΟΓΙΑΝΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημοπούλου Ιωάννα, Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας (Επιβλέπουσα), Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο 'Ο Ευαγγελισμός', Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.**

**Φιλίππου Αναστάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, ΕΚΠΑ.**

**Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Διευθυντής Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας, ΕΚΠΑ.**

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας Δημοπούλου Ιωάννα, η οποία με τίμησε αποδεχόμενη την επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την επιστημονική της καθοδήγηση.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Φιλίππου Αναστάσιο για τις πολύτιμες συμβουλές του και τον Καθηγητή Κουτσιλιέρη Μιχαήλ για τα εποικοδομητικά σχόλιά του.

6 Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,  
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ  
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ  
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ  
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ  
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ  
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ  
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ  
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ  
ΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,  
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ  
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΛΟΙΠΗΣ ΑΓΡΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ  
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ  
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ  
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ  
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ  
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ  
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ■ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ  
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ  
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ  
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ■ ΑΓΜΩΣ Δ  
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ  
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ■ ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ  
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ  
ΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ■ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ  
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ  
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ  
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ  
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ  
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. ■ Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,  
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β  
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ  
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΜΑΙ ΤΑ ΤΟ  
ΙΑΥΤΑ. ■ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ  
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ  
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π  
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ' ΠΑΡΑΒΑΙ  
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Βασικές ανατομικές υπομνήσεις.....	9
1.2 Εμβρυολογική προέλευση – Ιστολογία.....	10
2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	11
2.1 Στοιχεία από την Βιοχημεία.....	11
2.2 Ιστοειδική σύνθεση στεροειδών ορμονών από τον φλοιό των επινεφριδίων.....	13
3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ.....	14
3.1 Ανδρογόνα και Αλατοκορτικοειδή.....	14
3.2 Γλυκοκορτικοειδή.....	15
4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ.....	17
5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ.....	20
5.1 Μεταφορά της κορτιζόλης στο αίμα.....	20
5.2 Μεταβολισμός της κορτιζόλης.....	20
6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΧΟΥΣ.....	21
6.1 Γενωμικές και μη γενωμικές δράσεις των κορτικοειδών....	21
6.2 Ιστοειδική δράση κορτιζόλης.....	24

7. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΦΛΟΙΟΥ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ.....	24
7.1 Πρωτοπαθής, Δευτεροπαθής και Τριτοπαθής ανεπάρκεια φλοιού επινεφριδίων.....	24
7.2 Φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια σχετιζόμενη με κρίσιμη νόσο (Critical illness related corticoid insufficiency – CIRCI).....	27
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	35
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	35
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	36
3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Ο φλοιός των επινεφριδίων αποτελεί το τελικό τμήμα του άξονα υποθαλάμου – υπόφυση – επινεφρίδια η ενεργοποίηση του οποίου είναι από τα σημαντικότερα συστατικά της απάντησης του οργανισμού στο στρες. Η λειτουργική ακεραιότητα του άξονα αυτού είναι προϋπόθεση διατήρησης της ομοιόστασης και επιβίωσης. Η σχετιζόμενη με την κρίσιμη νόσο φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια (CIRCI) αναφέρεται στην κατάσταση εκείνη κατά την οποία η ενεργοποίηση του άξονα δεν επαρκεί για τις ανάγκες του οργανισμού και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Η απορρύθμιση του άξονα, οι διαταραχές του μεταβολισμού της κορτιζόλης και η αντίσταση στα κορτικοειδή ευθύνονται για την ανάπτυξή της. Η αντίσταση στα κορτικοειδή οφείλεται σε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα (GR), επηρεασμένη σύνδεσή του με την κορτιζόλη ή ανεπαρκή δράση του συμπλόκου GR-κορτιζόλης. Τελευταία έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για την ισομορφή του υποδοχέα GR-β η οποία προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα και του ενδεχόμενου ρόλου της στην αντίσταση των ιστών στα κορτικοειδή.

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:** Να διαπιστωθεί η ποσοτική έκφραση των GR-α και GR-β κατά την διάρκεια εξέλιξης της κρίσιμης νόσου.

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:** Διενεργήθηκε προοπτική μελέτη παρατήρησης σε 32 νοσηλευόμενους σε Πανεπιστημιακή ΜΕΘ ασθενείς με κρίσιμη νόσο που δεν έλαβαν κορτικοειδή. Οι αιμοληψίες για τον προσδιορισμό της έκφρασης των υποδοχέων έγιναν σε τέσσερα χρονικά σημεία: εντός 48 ωρών από την εισαγωγή και κατόπιν δις εβδομαδιαίως για συνολικό διάστημα δύο εβδομάδων.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Κατά την διάρκεια της κρίσιμης νόσου τα επίπεδα έκφρασης και των δύο ισομορφών του GR μειώθηκαν σημαντικά. Ωστόσο η μείωση έγινε σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Ο GR-α μειώθηκε κατά 4 φορές 4 ημέρες μετά την εισαγωγή ( $p < 0,0001$ ) και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα 2 εβδομάδες μετά την εισαγωγή ( $p < 0,001$ ). Ο GR-β αντίθετα παρέμεινε σταθερός 4 ημέρες μετά την εισαγωγή αλλά 1 εβδομάδα μετά μειώθηκε κατά 3 φορές ( $p < 0,01$ ) και παρέμεινε μειωμένος 2 εβδομάδες από την εισαγωγή ( $p < 0,001$ ).

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ:** Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η έκφραση των GR-α και GR-β ήταν εξαιρετικά μεταβαλλόμενη τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και για τους ίδιους ασθενείς σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Η γενική τάση όμως ήταν η

μείωση και των δύο, αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό, και μάλιστα ο GR-β παρέμεινε σταθερός για τις πρώτες 4 ημέρες πριν μειωθεί. Η μεταβλητότητα της έκφρασης των υποδοχέων μπορεί να ευθύνεται για την διαφορετική ανταπόκριση στα κορτικοειδή.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Adrenal cortex is part of the hypothalamus – pituitary – adrenal (HPA) axis, activation of which is one of the most important components of body's response to various stress stimuli. It's functional integrity is essential for homeostasis and survival. Critical illness related corticosteroid insufficiency refers to inadequate activation of HPA axis to match severity of patient's critical illness and is associated with poor prognosis. HPA axis dysregulation, impaired cortisol metabolism and tissue resistance to corticosteroids are responsible for development of CIRCI. Tissue resistance can be due to reduced GR expression, impaired ligand affinity or altered interactions with DNA regions and various transcription factors. Lately, research has focused on the main splicing variant of GR, the GR- $\beta$ , and the role it might play in resistance development.

**STUDY DESIGN:** A prospective observational study conducted in a university affiliated multidisciplinary intensive care unit. 32 critically ill adults not receiving corticosteroid included. Blood samples for GR measurement were collected within 48 hours after admission and twice weekly thereafter for up to two weeks.

**RESULTS:** During critical illness the mRNA levels of both GR isoforms significantly reduced. This however occurred in different time points. GR- $\alpha$  reduced 4-fold four days after admission ( $p < 0.0001$ ) and remained low during the 2 week period ( $p < 0.001$ ). GR- $\beta$  on the other hand remained stable four days after admission but reduced thereafter. More specifically it reduced 3-fold one week after admission ( $p < 0.01$ ) and remained low two weeks after admission ( $p < 0.001$ ).

**DISCUSSION:** According our study GR- $\alpha$  and GR- $\beta$  mRNA expression during critical illness is highly variable among different patients and within same patients at different time points. Both GR- $\alpha$  and GR- $\beta$  finally reduced during critical illness, result which was statistically significant. In addition, GR- $\beta$  remained stable four days after admission before decreasing. The highly variable GR expression could at least partially explain the differential responsiveness to corticosteroid administration.

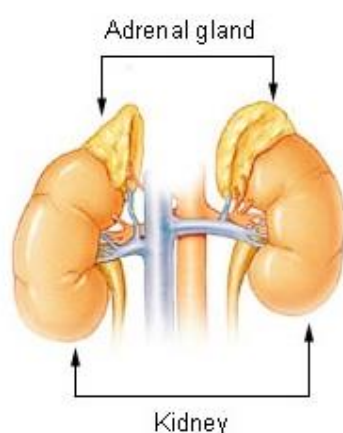


## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Εισαγωγή

#### 1.1 Βασικές ανατομικές υπομνήσεις.

Τα επινεφρίδια (Εικ. 1) είναι δύο μικρά ενδοκρινή όργανα που βρίσκονται οπισθοπεριτοναϊκά, επικαθήμενα στον άνω πόλο του σύστοιχου νεφρού και ζυγίζει το καθένα κατά προσέγγιση 4 – 6 gr.



Εικ. 1

Είναι κιτρινωπού χρώματος, περιβάλλονται από την περινεφρική περιτονία και διαχωρίζονται από τον σύστοιχο νεφρό με το περινεφρικό λίπος.

Αιματούνται από την άνω επινεφριδιακή αρτηρία η οποία είναι κλάδος της κάτω φρενικής, την μέση επινεφριδιακή αρτηρία η οποία είναι απευθείας κλάδος της κοιλιακής αορτής και την κάτω επινεφριδιακή αρτηρία η οποία εκφύεται από την σύστοιχη νεφρική αρτηρία. Οι αρτηρίες αυτές σχηματίζουν ένα υποκάψιο πλέγμα το οποίο συνθέτει ένα δίκτυο κολποειδών αγγείων που αρδεύει προς τα κάτω όλη την φλοιώδη μοίρα και επικοινωνεί με το αγγειακό πλέγμα του μυελού που προέρχεται επίσης από το υποκάψιο πλέγμα μέσω αρτηριδίων που διατρέχουν κάθετα την φλοιώδη μοίρα και δημιουργούν το μυελικό αγγειακό δίκτυο κολποειδών. Το αίμα απάγεται με τις επινεφριδιακές φλέβες που εκβάλλουν η μεν δεξιά απευθείας στην κάτω κοίλη, η δε αριστερή στην αριστερή νεφρική φλέβα.

Η νεύρωσή τους εξασφαλίζεται από το κοιλιακό και το νεφρικό πλέγμα με την πλειονότητα των ιών να είναι προγαγγλιακές συμπαθητικές ίνες

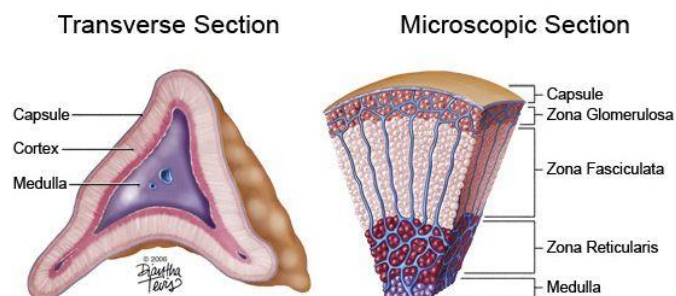
κατευθυνόμενες στην μυελώδη μοίρα. Το κάθε επινεφρίδιο περιβάλλεται από ινώδη χιτώνα κάτω από τον οποίο βρίσκεται η φλοιώδης μοίρα του οργάνου και εσωτερικά αυτής η μυελώδης μοίρα χωρίς να διαχωρίζονται μεταξύ τους με συνδετικό ιστό.

## 1.2 Εμβρυολογική προέλευση – Ιστολογία.

Εμβρυολογικά οι δύο αυτές μοίρες έχουν διαφορετική καταγωγή κάτι που αντανακλάται και στην διαφορετική τους λειτουργία. Η φλοιώδης μοίρα κατάγεται από το σπλαγχνικό κοίλωμα του μεσοδέρματος ενώ η μυελώδης μοίρα από την καταβολή για τα συμπαθητικά γάγγλια του εξωδέρματος, γεγονός που εξηγεί την λειτουργία της ως συμπαθητικό γάγγλιο – μεταγαγγλιακή οδός.

Ιστολογικά η φλοιώδης μοίρα αποτελείται από ένα λεπτό δίκτυο συνδετικού ιστού εντός του οποίου διατάσσονται κατά ζώνες αδενικά επιθηλιακά κύτταρα με διαφορετική εκκριτική λειτουργία (Εικ. 2).

Figure 2: Adrenal Gland Cross Sections



Εικ.2

Οι ζώνες αυτές από έξω προς τα έσω είναι η σπειροειδής (zona glomerulosa) που συνθέτει και εκκρίνει αλατοκορτικοειδή με κύριο εκπρόσωπο την αλδοστερόνη, η στηλιδωτή (zona fasciculata) που συνθετεί και εκκρίνει τα γλυκοκορτικοειδή με κύριο εκπρόσωπο την κορτιζόλη και η δικτυωτή (zona reticularis) που συνθέτει και εκκρίνει ανδρογόνα και οιστρογόνα με πρόδρομα μόρια τις δεϋδροεπιανδροστερόνη και ανδροστενεδιόνη. Η στηλιδωτή ζώνη είναι παχύτερη, ακολουθεί η δικτυωτή με την σπειροειδή να είναι η λεπτότερη. Ο μυελός, όπως είδαμε, ευρίσκεται στο κέντρο του επινεφριδίου, είναι εξαιρετικά αγγειοβριθής και

αποτελείται από μεγάλα χωμιόφιλα κύτταρα διατασσόμενα σε δίκτυο ή κατά τόπους συμπαγείς αθροίσεις, περιβαλλόμενα από πλούσιο δίκτυο τριχοειδών που εκκρίνουν τις κατεχολαμίνες αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη καθώς και δευτερευόντως και άλλα πεπτίδια όπως εγκεφαλίνες.

## 2. Βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών

### 2.1 Στοιχεία από την Βιοχημεία.

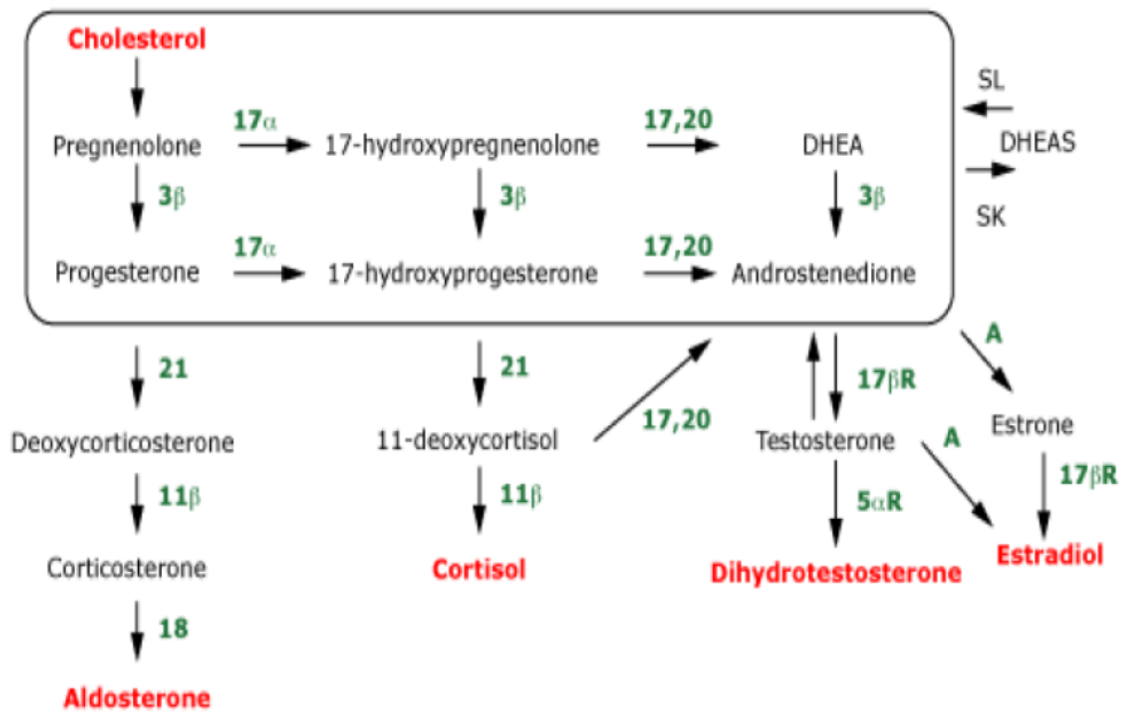
Πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης όλων των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη. Αυτή προσλαμβάνεται από τα κύτταρα του επινεφριδιακού φλοιού ως LDL κατόπιν σύνδεσης με τον υποδοχέα τους (LDLR) και με τον μηχανισμό της ενδοκύτωσης. Ενδοκυττάρια μεταφορά γίνεται και μέσω του υποδοχέα SCARB1 (scavenger receptor B1). Νεώτερα δεδομένα καταδεικνύουν πως και η μεταφερόμενη ως HDL χοληστερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα επινεφρίδια για στεροειδογένεση. Εναλλακτικά η χοληστερόλη μπορεί να συντεθεί *de novo* από Acetyl-CoA με την δράση της 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCoAR). Η χοληστερόλη παραμένει αποθηκευμένη στα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων, εντός κυστιδίων (lipid droplets) και εστεροποιημένη. Περίπου το 80% της χρησιμοποιούμενης χοληστερόλης προέρχεται από τις λιποπρωτεΐνες και το υπόλοιπο 20% από *de novo* σύνθεση[2].

Το αρχικό στάδιο είναι η απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα ελεύθερης χοληστερόλης με υδρόλυση των εστέρων. Καθοριστικό ωστόσο της ταχύτητας στάδιο είναι η μεταφορά της ελεύθερης ενδοκυττάριας χοληστερόλης από το κυττόπλασμα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου για την οποία είναι απαραίτητη η 30kd πρωτεΐνη μεταφορέας StAR (steroidogenic acute regulatory protein). Η StAR επάγεται από την ACTH μέσω αύξησης του ενδοκυττάριου cAMP [3]. Ακολουθεί η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο της ομάδας του κυτοχρώματος P450, το P450<sub>sc</sub> (side chain cleavage).

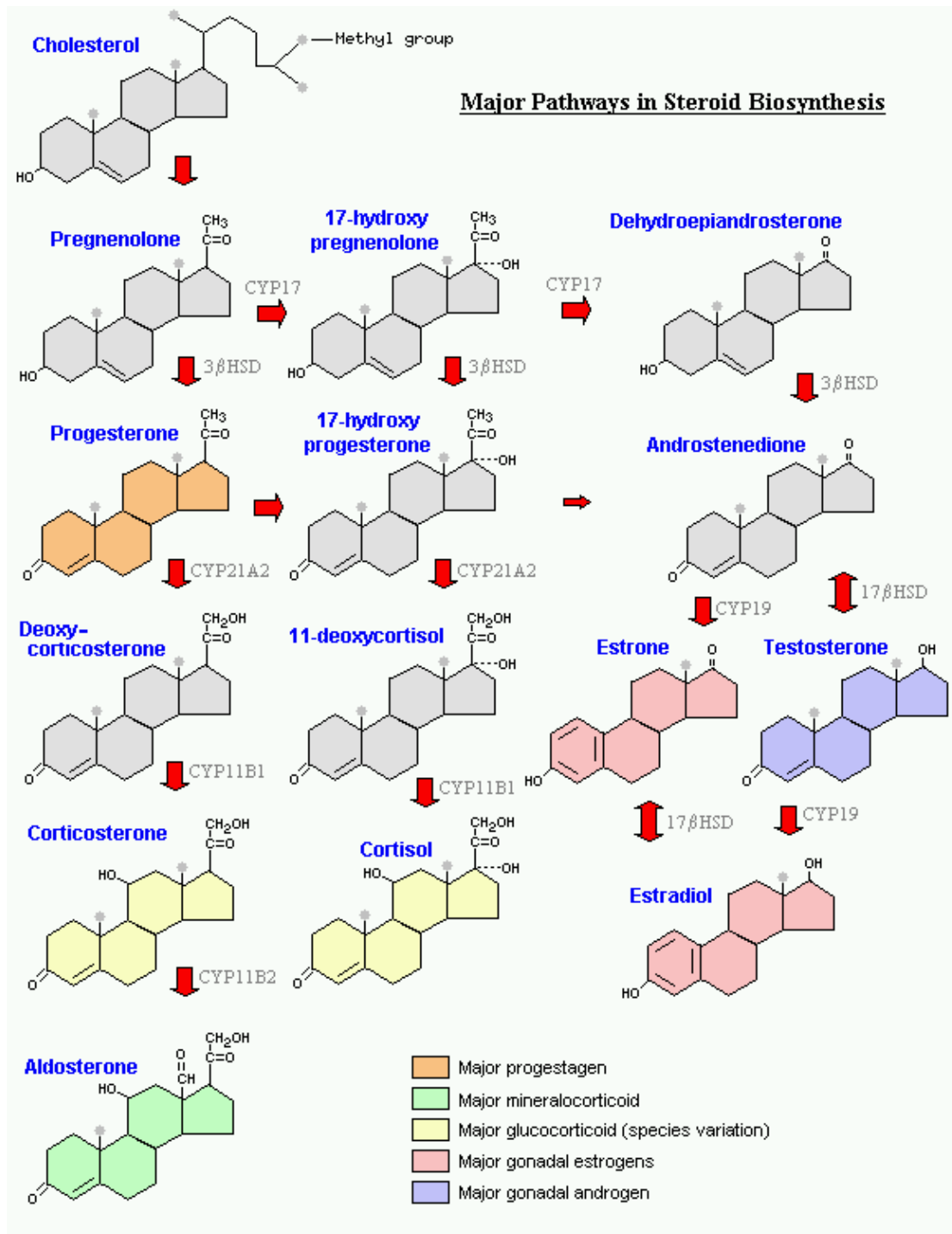
Από τα συμμετέχοντα στην βιοσύνθεση των στεροειδών ένζυμα το P450<sub>sc</sub> και το CYP11B βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και

απαιτούν αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που παρέχεται από το σύστημα adrenodoxin/adrenodoxin reductase. Τα P450c17 και P450c21 ευρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η απαιτούμενη μεταφορά ηλεκτρονίων γίνεται με το ένζυμο P450 οξειδοαναγωγή μέσω σύζευξης με το NADPH. Μεταλλάξεις σε αυτά τα ενζυμικά συστήματα προκαλούν νόσο [1]. Τέλος το 3βHSD ευρίσκεται και αυτό συνδεδεμένο με μεμβράνες (λείο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και μιτοχόνδρια, πιθανά ανάλογα με το είδος και τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο) και είναι σε σύζευξη με το NADH [4].

Η στεροειδογένεση περιγράφεται σχηματικά στις Εικ. 3 και 4.



Εικ.3



Εικ. 4

## 2.2 Ιστοειδική σύνθεση στεροειδών ορμονών από τον φλοιό των επινεφριδίων.

Η βιοσύνθεση των στεροειδών προχωρά ανάλογα με την ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων στην οποία επιτελείται, μέσω ειδικής για κάθε ζώνη ενζυμικής

έκφρασης. Έτσι, η εξωτερική σπειροειδής ζώνη εκκρίνει μόνο αλατοκορτικοειδή επειδή σ'αυτην δεν εκφράζεται το P450c17. Από την άλλη στην ενδιάμεση στηλιδωτή ζώνη παράγονται μόνο γλυκοκορτικοειδή λόγω μη έκφρασης του CYP11B2, ενώ η παραγωγή ανδρογόνων από την εσωτερη δικτυωτή ζώνη διαμεσολαβείται από την ειδική έκφραση του κυτοχρώματος b5, το οποίο προσδίδει την απαραίτητα δραστικότητα 17, 20 λυάσης στο P450c17 για την σύνθεση DHEA. Οι ορμόνες που παράγονται σε μεγαλύτερη ποσότητα από τον επινεφριδιακό φλοιό είναι τα ανδρογόνα (>20mg/day), ακολουθούν τα γλυκοκορτικοειδή σε ποσότητα 10-20 mg/day κορτιζόλης και τα αλατοκορτικοειδη που εκκρίνονται σε μικρότερες ποσότητες (100-150 μg/day αλδοστερόνης) [1]. Ο έλεγχος της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών και εν μέρει τουλάχιστον των ανδρογόνων γίνεται από την ACTH ενώ ο έλεγχος της έκκρισης των αλατοκορτικοειδών από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης.

### **3. Φυσιολογικός ρόλος επινεφριδίων**

Ενώ ο μυελός των επινεφριδίων εκκρίνει κατεχολαμίνες και θεωρείται λειτουργικά ως μεταγαγγλιακό τμήμα του συμπαθητικού αυτονόμου νευρικού συστήματος, ο ρόλος του φλοιού λόγω της πληθώρας των εκκρινόμενων ορμονών είναι πολυσχιδέστερος.

#### **3.1 Ανδρογόνα και Αλατοκορτικοειδή.**

Τα εκκρινόμενα από την δικτυωτή ζώνη ανδρογόνα στους άνδρες έχουν μικρή μόνο σημασία μιας και εκκρίνονται κατά κύριο λόγο από τους όρχεις. Στις γυναίκες ωστόσο πιθανά να έχουν σημαντικότερο ρόλο με κυριότερα σημεία την τριχοφυία, την ρύθμιση της libido, την οστική πυκνότητα και την μυική ανάπτυξη [5].

Τα παραγόμενα από την σπειροειδή στοιβάδα αλατοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση ηλεκτρολυτών και ύδατος και κατ'επέκταση του δραστικού κυκλοφορούντος όγκου αίματος ως τμήμα όπως αναφέρθηκε του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης. Πιο συγκεκριμένα η

αλδοστερόνη προκαλεί κατακράτηση νατρίου και ύδατος αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση καθώς και απέκκριση καλίου και ιόντων υδρογόνου. Το κύριο όργανο – στόχος της αλδοστερόνης είναι ο άπω νεφρώνας αλλά σημαντική δράση ασκεί και στο κόλον, τους σιελογόνους αδένες, την καρδιά και αλλού.

### 3.2 Γλυκοκορτικοειδή.

Τα γλυκοκορτικοειδή τέλος ασκούν την πολυπλοκότερη από τις άλλες δύο κατηγορίες δράση. Οι κυριότερες επί μέρους δράσεις τους μπορεί να ταξινομηθούν σε μεταβολικές, ανοσολογικές, δράσεις επί της ομοιόστασης ύδατος και ηλεκτρολυτών και κατ'επέκταση επί της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης, επί του κεντρικού νευρικού συστήματος, επί του μυοσκελετικού συστήματος και ενδοκρινικές.

Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος επάγοντας την γλυκονεογένεση στο ήπαρ χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα αμινοξέα από πρωτεϊνικό καταβολισμό και γλυκερόλη από τον μεταβολισμό λιπιδίων (λιπόλυση). Στο ήπαρ επάγεται επίσης η εναπόθεση γλυκογόνου ενώ στους περιφερικούς ιστούς (λιπώδη ιστό και μυς) τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την προσληψη γλυκόζης οδηγώντας, επί μακροχρόνιας έκθεσης, σε αντίσταση στην ινσουλίνη. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι καταβολικό οδηγώντας σε αύξηση γλυκόζης και τριγλυκεριδίων αίματος με τίμημα την διάσπαση πρωτεϊνών και λιπών. Σε μακροχρόνια έκθεση τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν απώλεια μυϊκής μάζας και αδυναμία με παράλληλη αύξηση του σπλαχνικού κυρίως λίπους οδηγώντας σε παχυσαρκία. Το τελευταίο οφείλεται στο γεγονός πως παρά την λιπόλυση προκαλούν παράλληλα λιπογένεση μέσω επαγωγής της διαφοροποίησης και ανάπτυξης των λιποκυττάρων.

Οι ανοσολογικές δράσεις προκύπτουν με επαγωγή μεταγραφής αντιφλεγμονωδών παραγόντων και αναστολή μεταγραφής προφλεγμονωδών παραγόντων αλλά και με μη γενωμικές δράσεις έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό των φλεγμονωδών απαντήσεων του οργανισμού, ιδιότητα για την οποία χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε πλήθος παθήσεων. Στο περιφερικό αίμα τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν μείωση του αριθμού των T και B λεμφοκυττάρων

ανακατενέμωντάς τα από το αίμα στον λεμφικό ιστό (σπλήνα, λεμφαδένες και μυελό οστών), μείωση του αριθμού των ηωσινοφίλων και αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων. Επιπλέον ασκούνται απευθείας δράσεις επί των Β και Τ λεμφοκυττάρων όπως αναστολή σύνθεσης ανοσοσφαιρινών και επαγωγή απόπτωσης. Περαιτέρω τα κορτικοειδή σε υψηλές δόσεις αναστέλλουν την λειτουργικότητα των μακροφάγων πιθανώς επάγοντας την διαφοροποίηση ειδικών 'αντιφλεγμονωδών' φαινοτύπων [6-8] την στιγμή που σε χαμηλές δόσεις και παρουσία φλεγμονώδους ερεθίσματος φαίνεται να ευοδώνουν την ανοσολογική τους δράση. Τέλος περιορίζεται και η τοπική μη ειδική ανοσολογική απάντηση που φυσιολογικά ενορχηστρώνεται από βιοδραστικές αμίνες όπως η ισταμίνη, την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και άλλους παράγοντες.

Επί της ομοιόστασης ύδατος και ηλεκτρολυτών τα γλυκοκορτικοειδή δρουν στον άπω νεφρώνα κατακρατώντας νάτριο και ύδωρ με ταυτόχρονη απέκκριση καλίου, δράση ανάλογη της αλδοστερόνης η οποία επιτυγχάνεται μέσω του MR υποδοχέα. Οι αλατοκορτικοειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στον άπω νεφρώνα εξαρτώνται από τον ρυθμό σύνθεσής τους σε σχέση με την ενεργότητα του ενζύμου 11β-HSD που μεταβολίζει την κορτιζόλη στον ανενεργό μεταβολίτη κορτιζόνη. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών στον υπόλοιπο νεφρό προκαλεί αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και κατ'επέκταση της διούρησης και αύξηση της κάθαρσης του ελευθέρου ύδατος.

Υποδοχείς κορτικοειδών εκφράζονται επίσης στον εγκέφαλο διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στην διαφοροποίηση, ανάπτυξη και επιβίωση των νευρώνων ενώ επιδρούν θετικά στην πλαστικότητα των συνάψεων. Τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν σημαντικά στην συμπεριφορά, την διάθεση και τις γνωσιακές λειτουργίες ενώ στην αρχή της ζωής καθορίζουν την ένταση των επιπτώσεων του στρες. Επομένως τα επίπεδα κορτιζόλης και η ακεραιότητα του άξονα HPA είναι καθοριστικοί παράγοντες της ψυχικής υγείας κάτι που αντιπροσωπεύεται στις ψυχιατρικές εκδηλώσεις της εμμένουσας υπερκορτιζολαιμίας. Κατάθλιψη, άγχος, διέγερση, ληθαργικότητα και ψυχώσεις συμπεριλαμβάνονται σε αυτές.

Τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν ακόμα στον μεταβολισμό των οστών αναστέλλοντας τους οστεοβλάστες και προκαλώντας, επί μακροχρόνιας έκθεσης σε

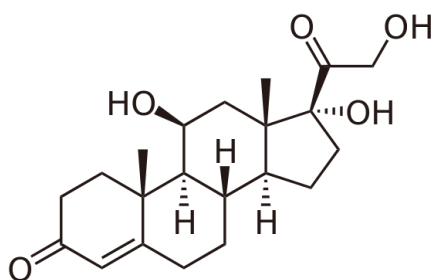


υψηλά επίπεδα, οστεοπενία και οστεοπόρωση. Η δράση τους ακόμη επεκτείνεται στο γαστρεντερικό σύστημα, το δέρμα, τους ενδοκρινείς αδένες και το σύνολο εν γένει των ιστών και οργάνων.

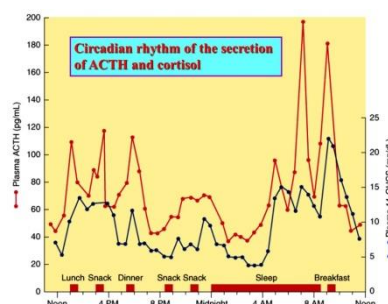
Συνοψίζοντας, ο φλοιός των επινεφριδίων ενεργοποιούμενος από οποιοδήποτε στρεσογόνο ερέθισμα προσπαθεί να εξασφαλίσει επάρκεια κυκλοφορίας και υποστρωμάτων για παραγωγή ενέργειας και ταυτοχρόνως ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση. Η ενεργοποίηση λοιπόν του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης ορού είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση σε οξείες καταστάσεις που απειλούν την ομοιόσταση του οργανισμού (κρίσιμη νόσος) όπως ενδεικτικά είναι οι βαριές λοιμώξεις εκφραζόμενες κλινικά ως σήψη και σηπτικό shock και μη λοιμώδεις καταστάσεις όπως το ARDS, οι ΚΕΚ, η τραυματική και η εγκευματική νόσος, η μετά μείζων χειρουργείο περίοδος.

#### 4. Ρύθμιση έκκρισης κορτιζόλης

Η κορτιζόλη, ο χημικός τύπος της οποίας απεικονίζεται στην Εικ. 5, εκκρίνεται κατά ώσεις και εμφανίζει κιρκάδιο ρυθμό με υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης ορού το πρωί και χαμηλότερα την νύχτα, όπως άλλωστε και η ACTH (Εικ. 6).

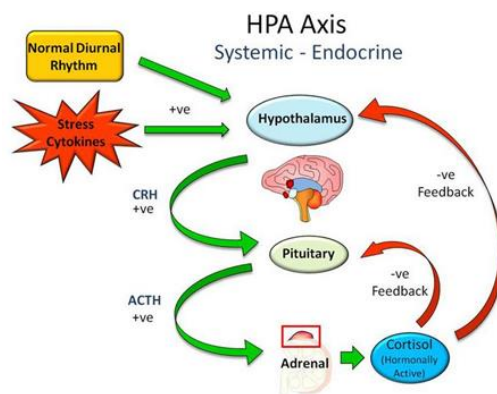


Εικ. 5



Εικ. 6

Η έκκρισή της ρυθμίζεται στα πλαίσια του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφρίδια ( Εικ. 7).

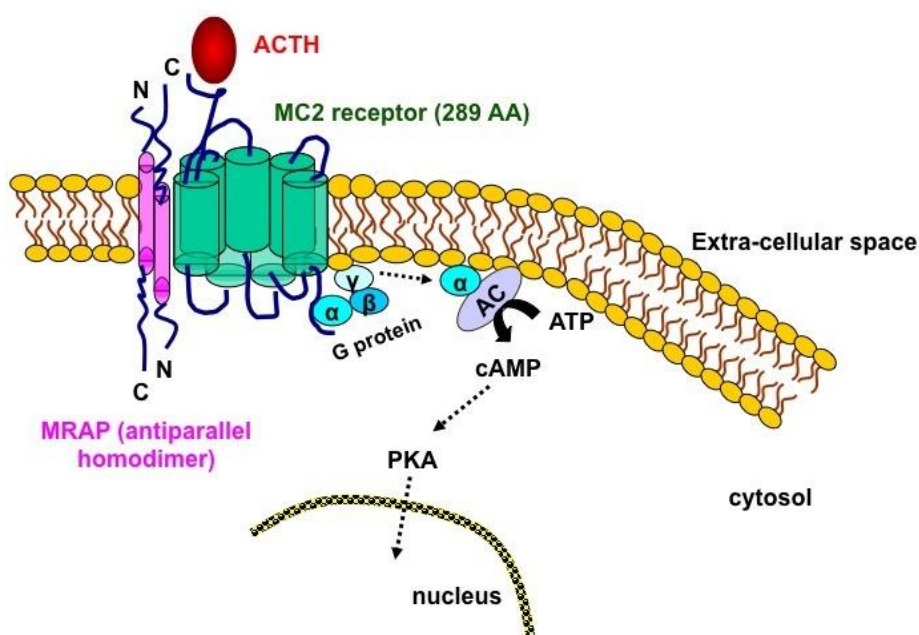


Εικ. 7

Ως αποτέλεσμα οποιουδήποτε στρεσογόνου ερεθίσματος (αλλά και στα πλαίσια της βασικής έκκρισης) ενεργοποιείται το Κ.Ν.Σ. που με τη σειρά του διεγείρει τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου για απελευθέρωση CRH (corticotropin releasing hormone). Απελευθερώνεται επίσης και αργινίνη – βαζοπρεσσίνη (AVP), η γνωστή μας αντιδιουρητική ορμόνη, από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης παραγόμενη στον παρακοιλιακό και τον υπεροπτικό πυρήνα του υποθαλάμου. Η CRH που προσεγγίζει την υπόφυση μέσω του υποθαλαμο-υποφυσιακού πυλαίου συστήματος αγγείων και η ADH που απελευθερώνεται από τους τελικούς άξονες της νευροϋπόφυσης (οπίσθιος λοβός υπόφυσης) δρουν συνεργιστικά απελευθερώνοντας ACTH (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η ACTH εν συνεχεία προάγει την σύνθεση κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων. Η κυκλοφορούσα κορτιζόλη ασκεί με την σειρά της αρνητική ανάδραση τόσο σε επίπεδο υποθαλάμου όσο και υπόφυσης προκειμένου να αποφευχθεί η υπερπαραγωγή της.

Η ACTH προκειμένου να ασκήσει την δράση της συνδέεται με τον υποδοχέα της, MC2R (melanocortin receptor, type 2), ο οποίος βρίσκεται κυρίως στην στηλιδωτή ζώνη (zona fasciculata). Πρόκειται για μεμβρανικό υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G που αποτελείται από 297 αμινοξέα, έχει 7 υδρόφοβα ενδομεμβρανικά τμήματα και δρα αυξάνοντας το ενδοκυττάριο c-AMP. Απαραίτητη για την δράση του είναι η σύνδεση της MRAP1 (melanocortin 2 receptor accessory protein). Το αυξημένο ενδοκυττάριο c-AMP ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια της πρωτεϊνικής κινάσης A και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKA, PKC) με

περαιτέρω ενεργοποίηση και άλλων συστημάτων κινασών ώστε με φωσφορυλίωση να ενεργοποιηθούν κρίσιμοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι CREM (c-AMP responsive element modulator) και CREB (c-AMP responsive element binding protein). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση της μεταγραφής πρωτεϊνών απαραίτητων για την στεροειδογένεση, την διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μεταξύ των παραγόμενων πρωτεϊνών είναι και η StAR που συναντήσαμε ανωτέρω. Επιπλέον της αυξημένης μεταγραφικής δραστηριότητας η σύνδεση ACTH-MC2R προκαλεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της εστεράσης της χοληστερόλης με αποτέλεσμα απελευθέρωση ελεύθερης χοληστερόλης στο κυτταρόπλασμα.



Εικ.8

Τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικ. 8. Αξίζει να σημειωθεί πως η κατά ώσεις έκκριση της κορτιζόλης είναι απαραίτητη για την ανταπόκριση των γονιδίων – στόχων. Η συνεχής έκκριση θα μπορούσε να προκαλέσει ‘απευαισθητοποίηση’ της μεταγραφικής απάντησης [14-16].

## 5. Κινητική κορτιζόλης

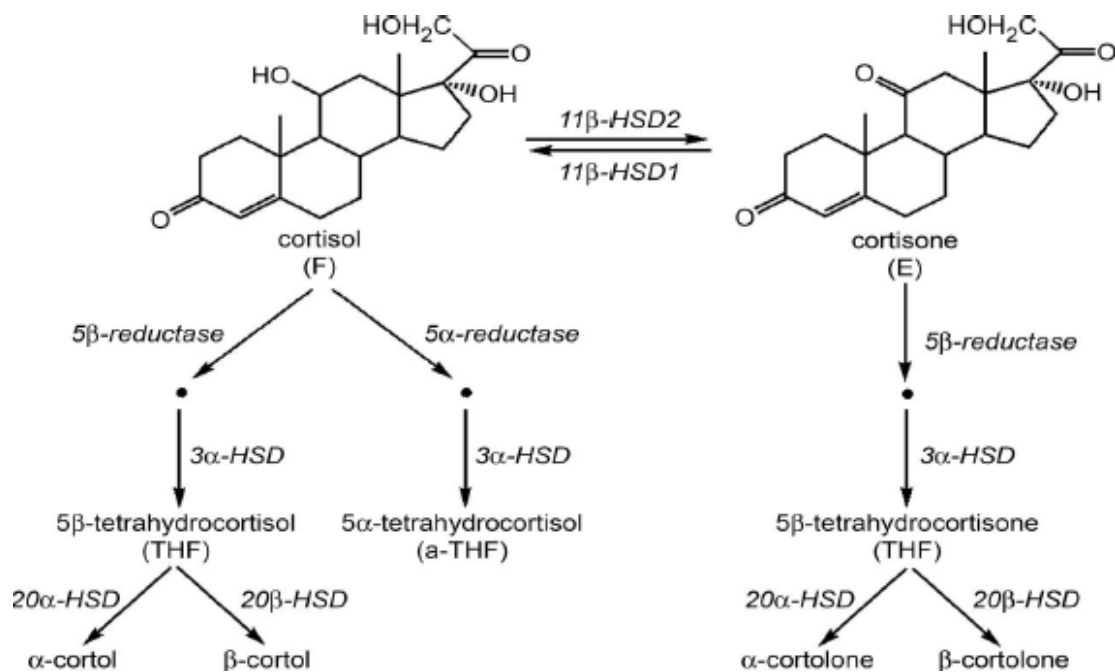
### 5.1 Μεταφορά της κορτιζόλης στο αίμα.

Η κορτιζόλη κυκλοφορεί στο πλάσμα κατά 90% περίπου συνδεδεμένη με πρωτεΐνες. Ο κύριος φορέας κορτιζόλης είναι η δεσμεύουσα τα κορτικοστεροειδή σφαιρίνη (CBG – corticosteroid binding globulin) και σε πολύ μικρότερο βαθμό η αλβουμίνη. Ένα ποσοστό περίπου 10% της κορτιζόλης του πλάσματος κυκλοφορεί ελεύθερο και αποτελεί την δραστική της μορφή. Εντούτοις στην κλινική πράξη συνήθως μετράται η ολική κορτιζόλη δεδομένου πως ο προσδιορισμός της ελεύθερης είναι τεχνικά δύσκολος και δαπανηρός.

Τόσο η CBG όσο και η αλβουμίνη είναι αρνητικές πρωτεΐνες οξείας φάσης και τα επίπεδά τους στον ορό μειώνονται στην κρίσιμη νόσο και μάλιστα ανάλογα με την σοβαρότητά της [18]. Αυτό με την σειρά του οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερης κορτιζόλης με μείωση του όγκου κατανομής της και κατά συνέπεια αύξηση του ρυθμού κάθαρσής της και μείωση του χρόνου ημιζωής της. Έχει μάλιστα βρεθεί πως στους σηπτικούς ασθενείς η μείωση της CBG συσχετίζεται με τα επίπεδα της IL-6 [19].

### 5.2 Μεταβολισμός της κορτιζόλης.

Η κορτιζόλη αφού ολοκληρώσει την αποστολή της αδρανοποιείται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς. Τα σημαντικότερα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό της κορτιζόλης στο ήπαρ είναι η 5-α και η 5-β αναγωγάση ενώ στους νεφρούς μέσω της 11β-hydroxysteroid dehydrogenase τύπου 2 ( 11β-HSD2) η κορτιζόλη μετατρέπεται αρχικά στον ανενεργό μεταβολίτη κορτιζόνη (Εικ. 9). Αξίζει να σημειωθεί πως η κορτιζόνη μπορεί να μετατραπεί εκ νέου σε δραστική κορτιζόλη μέσω του ισοενζύμου 11β-HSD1, διαδικασία που επιτελείται κυρίως στο ήπαρ, τον λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες και ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για τις ανεπιθύμητες ενέργειες στην θεραπευτική χορήγηση κορτιζόλης.



Εικ. 9

## 6. Μηχανισμός δράσης κορτικοειδών στα όργανα-στόχους

### 6.1 Γενωμικές και μη γενωμικές δράσεις των κορτικοειδών.

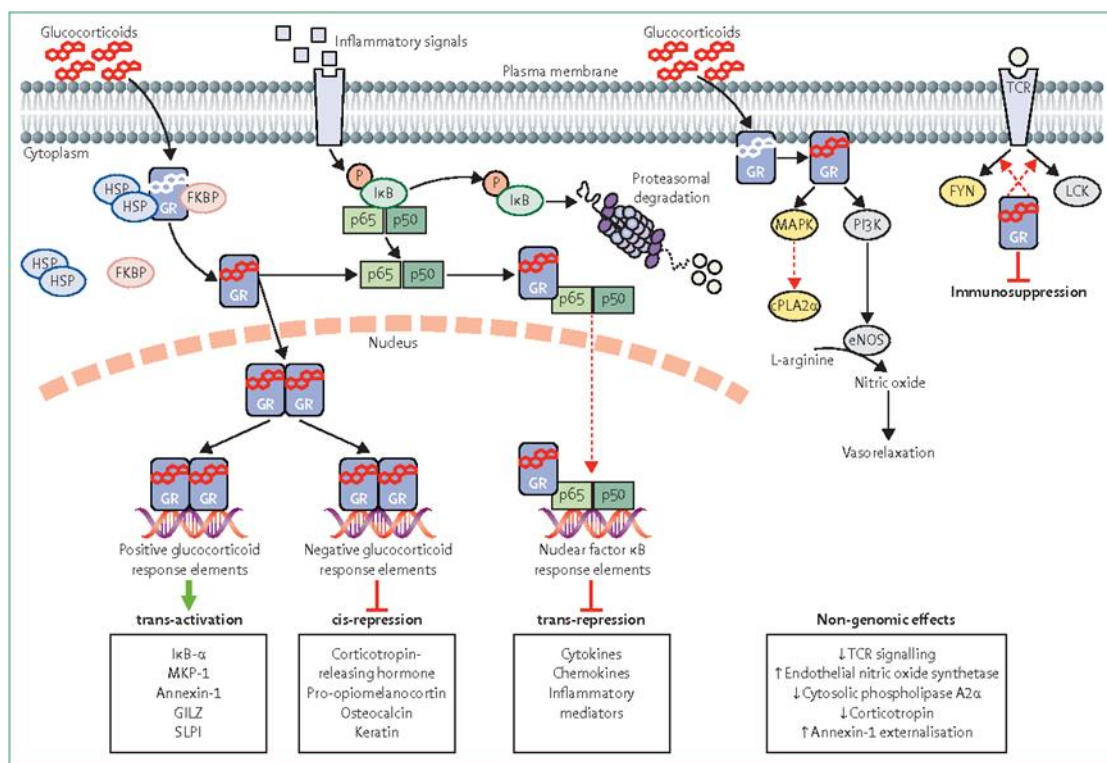
Η κορτιζόλη ασκεί τόσο γενωμικές όσο και μη γενωμικές δράσεις. Επιπρόσθετα ασκεί την δράση της συνδεόμενη είτε με μεμβρανικούς υποδοχείς είτε, δεδομένου πως είναι λιπόφιλο μόριο, διαπερνώντας την λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης παθητικά για να συνδεθεί με τον υποδοχέα της στο κυτταρόπλασμα. Οι μη γενωμικές δράσεις έπειτα από σύνδεση με μεμβρανικούς υποδοχείς εκδηλώνονται γρήγορα, εντός λεπτών, μέσω μονοπατιών κινάσης. Για παράδειγμα ενεργοποιώντας το μονοπάτι της MAPK (mitogen-activated protein kinase) αναστέλλεται η φωσφολιπάση A2α του κυτταροπλάσματος και συνεπώς η σύνθεση αραχιδονικού οξέος και εικοσανοειδών, ασκώντας έτσι αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ η ενεργοποίηση της PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) επάγει την ενδοθηλιακή συνθάση του NO [20] αν και είναι επίσης γνωστό πως η συστηματική έκθεση σε κορτικοειδή αναστέλλει την

παραγωγή NO με γενωμικό τρόπο δράσης , μηχανισμός απαραίτητος για την επιβίωση ζωικών μοντέλων σήψης μετά χορήγηση LPS [21].

Οι περισσότερες αλλά και σημαντικότερες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών όμως λαμβάνουν χώρα μετά την παθητική είσοδό τους στο κυτταρόπλασμα και την σύνδεσή τους με τον υποδοχέα τους (GR – glucocorticoid receptor). Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέα, ο υποδοχέας των αλατοκορτικοειδών (MR – mineralocorticoid receptor) και ο κλασικός GR. Και οι δύο τύποι υποδοχέων συνδέουν τόσο κορτιζόλη όσο και αλδοστερόνη. Στους ιστούς που εκφράζεται η αλατοκορτικοειδική δράση, αυτή ρυθμίζεται περισσότερο ως αποτέλεσμα αυξημένης έκφρασης του 11β-HSD2 και μετατροπής της κορτιζόλης στην ανενεργό κορτιζόνη παρά λόγω ιστοειδικής έκφρασης MR που ούτως ή άλλως δεσμεύει κορτιζόλη η οποία και κυκλοφορεί στο πλάσμα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο MR παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τα κορτικοειδή και γιαυτό θεωρείται σημαντικός για την σηματοδότηση σε χαμηλές συγκεντρώσεις κορτικοειδών. Παρά την συμμετοχή του MR σε κάποιες απαντήσεις σε φλεγμονώδεις διεργασίες, ο κλασικός υποδοχέας GR θεωρείται πολύ κομβικότερος στην απάντηση του οργανισμού σε καταστάσεις στρες και φλεγμονής. Σε κατάσταση ηρεμίας ο GR ευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με άλλες πρωτεΐνες (chaperone proteins) όπως οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (hsp90) και οι ανοσοφιλίνες FKBP51 και FKBP52. Μετά την σύνδεση με την κορτιζόλη, ο GR υφιστάμενος αλλαγές διαμόρφωσης αποδεσμεύεται από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκό του και εισέρχεται στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια όπου συνδέεται ως ομοδιμερή σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA που αποκαλούνται GRE (glucocorticoid responsive elements). Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων (θετικά GRE) που παράγουν αντιφλεγμονώδεις πρωτεΐνες, διαδικασία που είναι γνωστή ως trans-activation ή την αναστολή της μεταγραφής ορισμένων άλλων (αρνητικά GRE) με την διαδικασία αυτή να είναι γνωστή ως cis-repression.

Τέλος αξίζει να αναφερθεί πως ο GR ασκεί γενωμικές δράσεις και χωρίς να συνδέεται με κορτιζόλη. Παράγοντες όπως η αυξημένη θερμοκρασία και το pH και οι δυνάμεις διάτμησης (shear stress) προάγουν την μετακίνηση του αδέσμευτου υποδοχέα στον πυρήνα και την δέσμευσή του σε διαφορετικές περιοχές του DNA σε σχέση με τον δεσμευμένο με κορτιζόλη υποδοχέα [23]. Ο συνδεδεμένος με

κορτιζόλη GR μπορεί να αναστείλει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων και με μη γενωμικό τρόπο. Ενώνεται για τον σκοπό αυτό με τον μεταγραφικό παράγοντα p65, που συνιστά την μια υπομονάδα του NFκB, εμποδίζοντας έτσι το ετεροδιμερές p65-p50, που συνιστά τον ενεργό NFκB να εισέλθει στον πυρήνα και να δράσει στο DNA (trans-repression). Επιπλέον το σύμπλοκο κορτιζόλης – GR μπορεί να τροποποιήσει την σηματοδότηση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) αναστέλλοντας τις FRK (FYN oncogene related kinase) και LCK (lymphocyte specific protein tyrosine kinase). Όλα τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικ. 10.



**Figure 2: Molecular mechanisms of glucocorticoid action during the inflammatory process**  
 GR=glucocorticoid receptor. HSP=heat shock proteins. FKBP=FK binding proteins. IκB=inhibitor of kappa B. p65=transcription factor p65. p50=transcription factor p50. MAPK=mitogen-activated protein kinases. PI3K=phosphatidylinositol 3-kinase. TCR=T-cell receptor. FYN=FYN oncogene-related kinase. LCK=lymphocyte-specific protein tyrosine kinase. MKP-1=MAPK phosphatase 1. GILZ=glucocorticoid-induced leucine zipper protein. SLPI=secretory leukoprotease inhibitor.

Πηγή: Charmandari, Nicolaidis, Chrousos, 2014.

Εικ. 10

Πέρα από τον κυρίως απαντώμενο στην φύση τύπο υποδοχέα, τον GRα, υπάρχει και ο GRβ που προκύπτει με εναλλακτικό μάτισμα στην περιοχή που συνδέει το κορτικοειδές. Ο GRβ δεν δύναται να συνδεθεί με κορτικοειδές και να ασκήσει έτσι τις δράσεις του, βρίσκεται όμως στον πυρήνα του κυττάρου και

λειτουργεί ανασταλτικά επί του GR-α. Διαταραχή της σχέσης GR-α/GR-β φαίνεται να σχετίζεται με αντίσταση στα κορτικοειδή [22].

## 6.2 Ιστοειδική δράση κορτιζόλης.

Η εξειδίκευση της δράσης των κορτικοειδών ανάλογα το κύτταρο και κατ'επέκταση τον ιστό επιτυγχάνεται με διαφορετική έκφραση θετικών και αρνητικών μεταγραφικών συμπαραγόντων αλλά και με τον διαφορετικό για κάθε ιστό βαθμό μεθυλίωσης και της διαφορετικής δομής της χρωματίνης στην περιοχή των διαφόρων γονιδίων.

## 7. Ανεπάρκεια φλοιού επινεφριδίων

### 7.1 Πρωτοπαθής, Δευτεροπαθής και Τριτοπαθής ανεπάρκεια φλοιού επινεφριδίων.

Η φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια ταξινομείται ως πρωτοπαθής (νόσος Addison), δευτεροπαθής ή τριτοπαθής (κεντρική φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια) ανάλογα την εντόπιση του αιτίου στα επινεφρίδια, την υπόφυση ή τον υποθάλαμο αντίστοιχα. Η φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές πρωϊνής κορτιζόλης πλάσματος ( $< 3 \text{ mcg/dl}$ ). Η πρωτοπαθής χαρακτηρίζεται επιπλέον από αντιρροπιστικά αυξημένη ACTH, χαμηλή αλδοστερόνη πλάσματος με αυξημένη ρενίνη και χαμηλή DHEAS. Η δευτεροπαθής και η τριτοπαθής από μειωμένα επίπεδα τόσο κορτιζόλης όσο και ACTH, φυσιολογικές γενικά συγκεντρώσεις αλδοστερόνης και ρενίνης και μειωμένα ανδρογόνα.

Για την διάγνωση της φλοιοεπινεφριδιακής ανεπάρκειας χρησιμοποιείται κυρίως η δοκιμασία πρόκλησης με ACTH (synachten test) κατά την οποία χορηγούνται ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά 250μg συνθετικής ACTH (ACTH 1-24) και μετρώνται τα βασικά επίπεδα κορτιζόλης αίματος και τα επίπεδα μετα από 30 και 60 λεπτά. Φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια διαγιγνώσκεται αν η μέγιστη συγκέντρωση κορτιζόλης μετά την πρόκληση με ACTH είναι  $< 18\text{-}20\text{mcg/dl}$ . Η μειωμένη απάντηση στην κεντρική ανεπάρκεια συμβαίνει λόγω



‘απευαισθητοποίησης’ και προοδευτικής ατροφίας του φλοιού ελλείπει ACTH. Η διαφοροδιάγνωση μεταξύ πρωτοπαθούς και κεντρικής γίνεται από τα επίπεδα ACTH πλάσματος (φυσιολογικές πρωινές τιμές 4,5-12 pmol/L). Στις περιπτώσεις ήπιας πρωτοπαθούς ανεπάρκειας ή σύντομα (4-6 εβδομάδες) μετά την κεντρική βλάβη που οδήγησε σε δευτεροπαθή ανεπάρκεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια δοκιμασία αλλά με μικρότερη δόση (1μg) ACTH προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία. Στην διάγνωση της δευτεροπαθούς ανεπάρκειας μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλες δυναμικές δοκιμασίες εκτός της ACTH όπως η δοκιμασία υπογλυκαιμίας με ινσουλίνη, η δοκιμασία γλυκαγόνης, η δοκιμασία μετυραπόνης και η δοκιμασία με CRH που μπορεί επιπλέον να διακρίνει μεταξύ δευτεροπαθούς και τριτοπαθούς φλοιοεπινεφριδιακής ανεπάρκειας.

Τα συχνότερα αίτια πρωτοπαθούς ανεπάρκειας είναι:

- Φυματίωση (7-20%).
- Αυτοάνοσης αιτιολογίας (80-90%), είτε μεμονομένη (40%) είτε στα πλαίσια αυτοάνοσων πολυενδοκρινικών συνδρόμων (APS – autoimmune polyendocrine syndrome). Στα σύνδρομα αυτά περιλαμβάνονται το APS1 που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και χαρακτηρίζεται επιπλέον από υποπαραθυρεοειδισμό και χρόνια βλεννογονοδερματική καντιντίαση, το APS2 που είναι το συχνότερο, εμφανίζεται σε ηλικίες μεταξύ 20 – 40 ετών και χαρακτηρίζεται επιπλέον από ΣΔ1, θυρεοειδίτιδα, λεύκη και κοιλιοκάκη και το APS4.
- Λοιμώδη αίτια (AIDS, μυκητιάσεις).
- Αμφοτερόπλευρη αιμορραγία επινεφριδίων είτε λόγω αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου είτε στα πλαίσια σηπτικού σοκ (χαρακτηριστικά ως σύνδρομο Waterhouse-Friederichsen απότοκο σηψαιμίας από μηνιγγιτιδόκοκκο).
- Διήθηση επινεφριδίων λόγω μεταστάσεων, λεμφώματος, σαρκοείδωσης, αιμοχρωμάτωσης, αμυλοείδωσης.
- Επινεφριδιεκτομή.
- Φάρμακα όπως η ετομιδάτη, η φαινοβαρβιτάλη, τα αντιπηκτικά, η φαινυτοΐνη, η ριφαμπικίνη και η κετοκοναζόλη.

- Διάφορα γενετικά αίτια όπως η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων, η αδρενολευκοδυστροφία, η συγγενής λιποειδική επινεφριδιακή υποπλασία, το σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz και τα σύνδρομα αντίστασης στην ACTH.

Τα αίτια δευτεροπαθούς ανεπάρκειας περιλαμβάνουν:

- Προηγηθείσα εξωγενής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών.
- Χωροκατακτητικές εξεργασίες υπόφυσης όπως αδένωμα > 1 εκατοστό και σπάνια κακοήθειες, άλλοι όγκοι όπως κραιοφαρυγγίωμα, μηνιγγίωμα και μεταστάσεις.
- Διηθητικές και κοκκιωματώδεις νόσοι όπως TBC, σαρκοείδωση, ακτινομύκωση, ιστιοκύτωση Χ και κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα (Wegener).
- Λεμφοκυτταρική υποφυσίτιδα.
- Υποφυσιακή αποπληξία (Sheehan's syndrome που συμβαίνει μετά τον τοκετό και προκαλείται από ισχαιμική νέκρωση της υπόφυσης λόγω βαριάς αιμορραγίας και υποογκαιμικού σοκ).
- Ιατρογενής (χειρουργείο, ακτινοβολία).
- Μεμονωμένη ανεπάρκεια ACTH.
- Σύνδρομο ανεπάρκειας προοπιομελανοκορτίνης - POMC deficiency syndrome (παχυσαρκία, κόκκινα μαλλιά).

Τα αίτια της τριτοπαθούς φλοιοεπινεφριδιακής ανεπάρκειας περιλαμβάνουν:

- Χωροκατακτητικές εξεργασίες όπως όγκοι στην περιοχή του υποθαλάμου (κραιοφαρυγγίωμα ή μεταστάσεις κυρίως από πνεύμονα και στήθος).
- Ιατρογενής μετά από χειρουργικές επεμβάσεις στην περιοχή του υποθαλάμου ή ακτινοβολία της περιοχής για κακοήθειες εξεργασίες του Κ.Ν.Σ. ή του ρινοφάρυγγα.
- Κάταγμα βάσης κρανίου.
- Λοιμώξεις όπως μηνιγγίτιδα.
- Διηθητικά και κοκκιωματώδη νοσήματα όπως TBC, ακτινομύκωση, σαρκοείδωση, ιστιοκύτωση Χ, αιμοχρωμάτωση και κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα (Wegener).

- Συνθετικά και ενδογενή κορτικοειδή.

Η κλινική εικόνα της ανεπάρκειας του φλοιού των επινεφριδίων περιλαμβάνει πτώση της αρτηριακής πίεσης και ορθοστατική υπόταση, πυρετό και στις γυναίκες απώλεια του τριχωτού του εφηβαίου και της μασχάλης. Το δέρμα στην πρωτοπαθή φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζει την χαρακτηριστική μελάγχρωση λόγω αυξημένων επιπέδων MSH (melanotropin) η οποία παράγεται ως παραπροϊόν από την POMC (proopiomelanocortin) κατά την διαδικασία απελευθέρωσης ACTH. Στην δευτεροπαθή φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια το δέρμα είναι ωχρό (χαρακτηριστική 'αλαβάστρινη επιδερμίδα'). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ακόμα αδυναμία, εύκολη κόπωση, ανορεξία, και απώλεια βάρους.

Τα εργαστηριακά ευρήματα είναι ελαττωμένο νάτριο (περισσότερο στην πρωτοπαθή), υπογλυκαιμία, από την γενική αίματος αναιμία με σχετική λεμφοκυττάρωση και ηωσινοφιλία, το δε κάλιο είναι αυξημένο στην πρωτοπαθή και φυσιολογικό στην δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται ακόμα από μεταβολική οξέωση.

Αυτή η κλινική εικόνα αφορά την κλασική νόσο του Addison που εγκαθίσταται προοδευτικά εντός μηνών ή και ετών. Η οξεία πλήρης ανεπάρκεια όπως σε επινεφριδιακή αιμορραγία ονομάζεται κρίση Addison, είναι επείγον ιατρικό πρόβλημα και εκδηλώνεται με ναυτία και έμετους, κοιλιακό άλγος και προοδευτικά ληθαργικότητα, κυκλοφορική καταπληξία και κώμα. Η αντιμετώπισή της συνίσταται σε χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε υψηλές δόσεις (υπερφυσιολογικές ή δόσεις στρες) όπως υδροκορτιζόνη 100mg ενδοφλεβίως κάθε 6 ώρες, αναπλήρωση υγρών, αντιμετώπιση υπερκαλιαιμίας, ενδεχόμενα χορήγηση αγγειοσυσπαστικών, αποκατάσταση υπάρχοντων διαταραχών πηκτικότητας και φυσικά διερεύνηση και αντιμετώπιση υποκείμενης αιτίας με άμεση έναρξη εμπειρικής χορήγησης αντιβιοτικών.

## 7.2 Φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια σχετιζόμενη με κρίσιμη νόσο (Critical illness related corticoid insufficiency – CIRCI).

Κρίσιμη νόσος ή βαριά νόσος είναι οποιαδήποτε νοσολογική οντότητα προκαλεί τέτοιας έκτασης εκτροπή των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού

ώστε να καθίσταται απειλητική για την ζωή, οδηγώντας σε πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο. Οι ασθενείς αυτοί συχνά απαιτούν μηχανική υποστήριξη και συνεχή παρακολούθηση (monitoring) των ζωτικών λειτουργιών τους και για τον λόγο αυτό νοσηλεύονται σε ειδικά τμήματα των νοσοκομείων, τις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Στις νοσολογικές αυτές οντότητες περιλαμβάνονται το μείζων τραύμα, η μείζονα χειρουργική επέμβαση, η εγκαυματική νόσος, το ARDS, οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η καρδιοαναπνευστική ανακοπή και γενικά οποιαδήποτε νόσος έχει επιδεινωθεί τόσο ώστε να χαρακτηρίζεται κρίσιμη.

Ιδιαίτερα σημαντική θέση τόσο λόγω επίπτωσης όσο και λόγω αυξημένης θνητότητας κατέχει η σήψη και η σηπτική καταπληξία. Το σηπτικό σύνδρομο είναι η πρώτη αιτία θανάτου των ασθενών που νοσηλεύονται στην ΜΕΘ. Σύμφωνα με τους νέους ορισμούς (Sepsis - 3) ως σήψη ορίζεται η απειλητική για την ζωή ανεπάρκεια οργάνων που οφείλεται στην απορρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή στη λοίμωξη. Σε κλινικό περιβάλλον ορίζεται ως αύξηση του SOFA score κατά 2 ή περισσότερες μονάδες ως αποτέλεσμα λοιμώδους διεργασίας (θνητότητα περίπου 10%). Το αρχικό SOFA score ασθενών χωρίς γνωστή προϋπάρχουσα ανεπάρκεια οργάνου θεωρείται μηδέν. Ο τρόπος υπολογισμού του παρουσιάζεται στην Εικ. 11.1 Για εκτίμηση ασθενών εκτός νοσοκομείου ή στο ΤΕΠ που παρουσιάζουν εικόνα συμβατή με λοίμωξη, η διάγνωση του σηπτικού συνδρόμου γίνεται χρησιμοποιώντας το απλούστερο qSOFA (11.2). qSOFA $\geq$ 2 σε τέτοιους ασθενείς είναι δείκτης πτωχής πρόγνωσης και δηλώνει παρουσία σήψης. Η σηπτική καταπληξία είναι η βαρύτερη υποκατηγορία της σήψης στην οποία οι διαταραχές σε κυτταρικό επίπεδο και επίπεδο μικροκυκλοφορίας αυξάνουν σημαντικά την θνητότητα (>40%). Κλινικά ορίζεται ως σήψη με εμμένουσα υπόταση, παρά την επαρκή αναζωογόνηση με κρυσταλλοειδή, που απαιτεί την χορήγηση αγγειοσυσπαστικών για διατήρηση ΜΑΠ  $\geq$  65mmHg και επίπεδα γαλακτικού οξέως στον ορό > 2 mmol/L. Σύμφωνα με τους νέους ορισμούς δεν χρησιμοποιούνται πλέον τα κριτήρια του SIRS για την διάγνωση της σήψης και δεν υφίσταται πλέον ο όρος της βαριάς σήψης.

Σε όλες τις ανωτέρω καταστάσεις ενεργοποιείται από τον οργανισμό, ως αμυντικό μέσο, μια συστηματική φλεγμονώδης απάντηση που συνίσταται α) στην

ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφρίδια και του αυτόνομου συμπαθητικού νευρικού συστήματος (μεταιχμιακό σύστημα – υπομέλας τόπος), β) στην αντίδραση οξείας φάσης με την απελευθέρωση στην συστηματική κυκλοφορία των πρωτεϊνών οξείας φάσης και γ) στην απάντηση των τελικών οργάνων στόχων .

## THE SEQUENTIAL ORGAN FAILURE ASSESSMENT (SOFA) SCORE

SYSTEM	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b> PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
<b>Coagulation</b> Platelets ×10 <sup>3</sup> /uL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Liver</b> Bilirubin mg/dL (umol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
<b>Cardiovascular</b>	MAP ≥70mmHg	MAP <70mmHg	Dopamine <5 or Dobutamine (any dose)	Dopamine 5.1 - 15 or Epinephrine ≤ 0.1 or Norepinephrine ≤ 0.1	Dopamine >15 or Epinephrine >0.1 or Norepi- nephrine >0.1
<b>CNS</b> GCS Score	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal Creatinine, mg/dl (umol/L)</b> <b>Urine Output, ml/d</b>	<1.2 (110)	1.2 -1.9 (110-170)	2.0 - 3.4 (171- 299)	3.5 - 4.9 (300 -440) <500	> 5.0 (440) <200

Catecholamine Doses = ug/kg/min for at least 1hr

Εικ. 11.1

qSOFA	
RR > 22bpm	0 = Mortality < 1%
sBP < 100mmHg	1 = Mortality 2-3%
Altered GCS	≥2 = Mortality ≥10%
Screening for outcome rather than diagnosis	

Εικ. 11.2

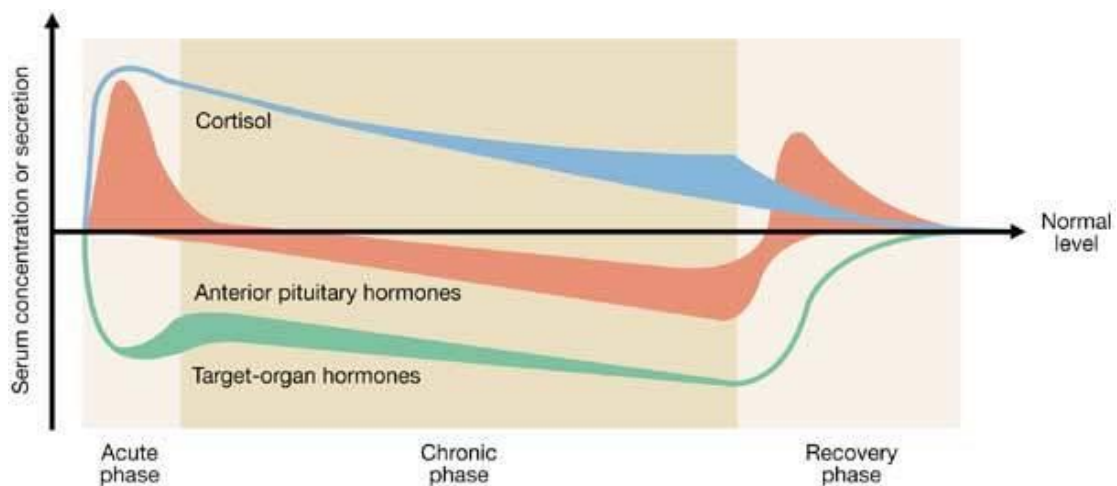
Η λειτουργική ακεραιότητα του HPA είναι απαραίτητη συνθήκη για την επιβίωση του οργανισμού σε τέτοιες συνθήκες γιατί εξασφαλίζει την παραγωγή ενέργειας, διατηρεί τον κυκλοφορούντα όγκο αίματος και περιορίζει την ένταση της φλεγμονώδους αυτής απάντησης ώστε να συμβαδίζει με τον επιβλαβή παράγοντα αποτρέποντας έτσι την ιστική βλάβη και την πολυοργανική ανεπάρκεια.

Η αρχική ενεργοποίηση του άξονα γίνεται με διέγερση του ΚΝΣ και έκκριση CRH και ADH από τον υποθάλαμο που συνεργιστικά απελευθερώνουν ACTH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η ACTH δρα επί του φλοιού των επινεφριδίων απελευθερώνοντας κορτιζόλη στο αίμα. Επιπλέον μειώνονται τα επίπεδα CBG και αλβουμίνης λόγω μειωμένης σύνθεσης στο ήπαρ και αυξημένης αποδόμησης από τις ενεργοποιημένες ελαστάσες των ουδετεροφίλων με επακόλουθο αύξηση της ελεύθερης κορτιζόλης ορού. Αυξάνεται η δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, καταργείται η ημερήσια διακύμανση της κορτιζόλης και μειώνεται η ενζυμική ενεργότητα των 5α και 5β αναγωγασών στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό και της 11β-HSD2 στους νεφρούς με αποτέλεσμα αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής και υψηλά επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα με ενισχυμένη αλατοκορτικοειδική δράση στους νεφρούς.

Η μειωμένη ενεργότητα των ενζύμων μεταβολισμού της κορτιζόλης που τελικά παίζει σημαντικότερο ρόλο από την αυξημένη σύνθεση στην υπερκορτιζολαιμία της κρίσιμης νόσου φαίνεται να διαμεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει από τα χολικά οξέα. Τα χολικά οξέα, συζευγμένα και ασύζευκτα, είναι ισχυροί αναστολείς των ενζύμων μεταβολισμού της κορτιζόλης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις μέσω συναγωνιστικής αναστολής και σε υψηλές μέσω αναστολής γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης [35-37]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως τα χολικά οξέα, κυρίως τα συζευγμένα, αυξάνουν στην κρίσιμη νόσο και αυτό οφείλεται μάλλον στην προς το αίμα μεταφορά αυτών που συντίθενται, για λόγους εξοικονόμησης ενέργειας δεδομένου πως η έκκρισή τους προς τα χοληφόρα λόγω μη ευνοϊκής κλίσης συγκέντρωσης απαιτεί κατανάλωση πολύτιμων ενεργειακών αποθεμάτων[38]. Έχει επίσης φανεί πως τα χολικά οξέα έχουν ανοσοτροποποιητική δράση σε ζωικό μοντέλο σήψης αυξάνοντας την έκφραση του υποδοχέα των κορτικοειδών στο ήπαρ [39]. Παράλληλα σε κάποιους ιστούς έχει παρατηρηθεί αυξημένη ενεργότητα 11β-HSD1 που μετατρέπει την ανενεργό κορτιζόνη σε κορτιζόλη, δράση που ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις κυττοκίνες (TNF-α, IL-1β).

Ο HPA ενεργοποιείται επίσης από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF, IL-1, IL-6. Τις πρώτες ημέρες της κρίσιμης νόσου είναι αυξημένες τόσο η κορτιζόλη όσο και η ACTH πλάσματος. Μετά την τρίτη ημέρα η συγκέντρωση της ACTH ελαττώνεται προοδευτικά φθάνοντας επίπεδα χαμηλότερα εκείνα ατόμων

χωρίς κρίσιμη νόσο ενώ η κορτιζόλη παραμένει υψηλή (ACTH – cortisol dissociation). Η εικόνα αυτή διατηρείται σε όλη την χρόνια φάση της κρίσιμης νόσου και εφόσον ο ασθενής επιβιώσει αποκαθίσταται η ‘αποσύνδεση’ της κορτιζόλης από την ACTH (Εικ. 12). Το φαινόμενο της ‘αποσύνδεσης κορτιζόλης – ACTH’ εξηγείται τουλάχιστον εν μέρει από την ενεργοποίηση των επινεφριδίων ανεξάρτητα του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης καθώς και από τον μειωμένο καταβολισμό της κορτιζόλης. Η απευθείας ενεργοποίηση των επινεφριδίων λαμβάνει χώρα μέσω των προφλεγμονωδών κυττοκινών και άλλων στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος, των αδιποκινών και του συμπαθητικού αδρενεργικού συστήματος. Η γεινίαση άλλωστε του φλοιού με τον μυελό των επινεφριδίων που αποτελεί τμήμα της συμπαθητικής απάντησης στο στρες επιτρέπει την μεταξύ τους επικοινωνία και αλληλεπίδραση [48]. Και οι δύο μηχανισμοί (απευθείας ενεργοποίηση του επινεφριδιακού φλοιού και μειωμένος καταβολισμός κορτιζόλης) οδηγούν σε καταστολή, με αρνητική ανάδραση, του κεντρικού τμήματος του άξονα.



Εικ. 12

Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η αυξημένη έκφραση iNOS και η συνακόλουθη απελευθέρωση NO που έχει παρατηρηθεί στον υποθάλαμο ζωικών μοντέλων αλλά και ανθρώπων σε σήψη [31, 32] που πιθανά οδηγεί σε απόπτωση νευρώνων και γαγγλιακών κυττάρων. Η μειωμένη έκφραση ACTH ίσως οφείλεται και στην αδυναμία αύξησης της σύνθεσης της CRH και της ADH [33]. Σημαντικό ρόλο στην ‘αποσύνδεση’ της κορτιζόλης από την ACTH φαίνεται να διαδραματίζουν επίσης η ενδοθηλίνη και το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο [29].

Η παραγωγή κορτιζόλης από τα επινεφρίδια επίσης επηρεάζεται, ιδιαίτερα μετά την αρχική φάση της κρίσιμης νόσου. Τα λιποσταγονίδια των επινεφριδιακών κυττάρων γρήγορα εξαντλούνται και σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα ACTH προκαλείται αυξημένη έκφραση του υποδοχέα SCARB1 (scavenger receptor B1) ώστε να διατηρηθεί η πρόσληψη χοληστερόλης. Νεώτερα δεδομένα αποκαλύπτουν πως η παραγωγή κορτιζόλης αυξάνεται σε μικρό βαθμό και μάλιστα λιγότερο από το διπλάσιο σε σχέση με υγιή άτομα [34], αποδίδοντας την υπερκορτιζολαιμία της κρίσιμης νόσου κυρίως στην επιβράδυνση του καταβολισμού της κορτιζόλης. Νεκροτομικές μελέτες επινεφριδίων ασθενών που κατέληξαν μετά παρατεταμένη σήψη έδειξαν μειωμένο μέγεθος επινεφριδίων και αλλαγές στην αρχιτεκτονική τους που αποδόθηκε στην ανεπαρκή έκθεση του φλοιού στην ACTH [40]. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει πως τα σταθερά αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης λόγω μειωμένου μεταβολισμού επιδρούν αρνητικά στην κατά ώσεις έκκριση της ACTH μέσω αρνητικής ανάδρασης[41].

Η απαιτούμενη για την επιβίωση γλυκοκορτικοειδική δράση απαιτεί επιπλέον την ευαισθησία των τελικών κυττάρων-στόχων. Ως αντίσταση στα κορτικοειδή περιγράφεται η μειωμένη λειτουργικότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-α) παρά τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα. Αντίσταση στα κορτικοειδή μπορεί να συμβεί συνεπεία μειωμένης συγκέντρωσης του GR, ελαττωμένης συγγένειας με την κορτιζόλη και επηρεασμένης μεταφοράς στον πυρήνα και αλληλεπίδρασης με το DNA (πυρηνικά και μιτοχονδριακά GRE) ή άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως η υπομονάδα p65 του NFκB. Η αντίσταση στα κορτικοειδή επιπλέκει την πορεία αρκετών χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το σοβαρό άσθμα, ο συστηματικός ερυθρεμάτης, η ελκώδης κολίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα [42]. Η αντίσταση στα κορτικοειδή είναι πλέον γνωστό πως επιπλέκει και την κρίσιμη νόσο με τα δεδομένα να προέρχονται κυρίως από κλινικές και πειραματικές μελέτες στα πεδία της σήψης και του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS) [43-45]. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της αντίστασης στα κορτικοειδή, της βαρύτητας της νόσου και της θνητότητας. Η διαταραχή στην σχέση CR-α/GR-β είναι αιτία ανάπτυξης αντίστασης στα κορτικοειδή. Η κρίσιμη νόσος



συνδέεται με μείωση του GR-α και αύξηση του GR-β [46-47], που όπως είδαμε λειτουργεί ανασταλτικά επί του GR-α.

Ανεπάρκεια, σχετική ή απόλυτη, του φλοιού των επινεφριδίων έχει καταστροφικές συνέπειες στην διατήρηση της ομοιόστασης οι οποίες είναι ασύμβατες με την επιβίωση. Στην κρίσιμη νόσο μπορεί να συμβεί απόλυτη ανεπάρκεια επινεφριδίων στα πλαίσια π.χ. αιμορραγίας ή θρόμβωσης ή λόγω προϋπάρχουσας πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς ανεπάρκειας. Συχνότερο όμως πρόβλημα είναι η σχετική φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια στην κρίσιμη νόσο που αρχικά περιγράφηκε το 1946 από τον Hans Selye ως 'εξάντληση' των επινεφριδίων σε στρεσογόνες για τον οργανισμό καταστάσεις και χαρακτηρίζεται από υπερλειτουργία του HPA και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ορού που όμως υπολείπονται του αναγκαίου για την βαρύτητα της κατάστασης. Ο όρος φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια σχετιζόμενη με την κρίσιμη νόσο (CIRCI – critical illness related corticoid insufficiency) εισήχθη το 2008 από τον Marik και έκτοτε χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση αυτή. Παρατηρείται σε έως και 20% των περιπτώσεων κρίσιμης νόσου και σε έως 60% των περιπτώσεων σηπτικής καταπληξίας. Παθοφυσιολογικά συσχετίζεται με διαταραχές μικροκυκλοφορίας σε οποιοδήποτε σημείο του άξονα, τα υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, την αντίσταση στα κορτικοειδή λόγω δυσλειτουργίας ή και μειωμένης έκφρασης του υποδοχέα τους, διαταραχές πηκτικότητας που οδηγούν σε αιμορραγίες και θρομβώσεις των επινεφριδίων, ηπατική ανεπάρκεια και μειωμένη χοληστερόλη πλάσματος. Ακόμα μπορεί να σχετίζεται με φαρμακευτικούς παράγοντες όπως η ετομιδάτη, η φαινοβαρβιτάλη, η φαυνοτοΐνη, η μιδαζολάμη και τα οπιοειδή και με την υποθερμία. Η φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια που σχετίζεται με την κρίσιμη νόσο χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS), είναι λειτουργική και συνήθως αναστρέψιμη.

Κλινικά η φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια στους βαρέως πάσχοντες εκδηλώνεται με κυκλοφορική καταπληξία ανθιστάμενη στην χορήγηση υγρών και αγγειοσυσπαστικών, ανεξήγητο εμπύρετο και ηωσινοφιλία. Η κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα της νόσου του Addison δεν έχουν διαγνωστική αξία στους βαρέως πάσχοντες. Η διάγνωση του CIRCI σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του 2008 που επικαιροποιήθηκαν το 2017 γίνεται είτε με τυχαία τιμή ολικής

κορτιζόλης πλάσματος < 10 µg/dl είτε με αύξηση της ολικής κορτιζόλης πλάσματος < 9 µg/dl 60 λεπτά μετά την χορήγηση 250 µg συνθετικής ACTH ενδοφλεβίως. Δεν τεκμηριώνεται από τα υπάρχοντα δεδομένα η υπεροχή κάποιας από τις δύο δοκιμασίες ή της μέτρησης της ελεύθερης σε σχέση με την ολική κορτιζόλη πλάσματος. Επιπλέον τα δεδομένα δεν επαρκούν για να γίνει σύσταση υπέρ της χρήσης της δυναμικής δοκιμασίας με χαμηλή δόση (1 µg) ACTH.

Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του Surviving Sepsis Campaign (2016) θεραπεία υποκατάστασης με ενδοφλέβια υδροκορτιζόνη σε δοσολογία 200mg ημερησίως, κατά προτίμηση σε συνεχή στάγδην έγχυση, χορηγείται στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία που δεν ανατάσσεται με χορήγηση κρυσταλλοειδών και αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες αντιμετώπισης του CIRCI (ESICM 2017) προτιμώνται οι χαμηλές δόσεις (< 400mg) για μεγαλύτερο διάστημα ( $\geq 3$  ημέρες σε πλήρη δόση) σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία που δεν ανατάσσεται με χορήγηση υγρών και απαιτεί αγγειοσυσπαστικά σε δόση > 0,1 µg/kg/min noradrenaline ή ισοδύναμη. Χωρίς να αυξάνει την επιβίωση, η χορήγηση υδροκορτιζόνης οδηγεί αποτελεσματικότερα και ταχύτερα στην ανάταξη της σηπτικής καταπληξίας. Ως συνήθης πρακτική η διακοπή της υδροκορτιζόνης μετά την ανάταξη της καταπληξίας γίνεται σταδιακά. Σε σχέση με το ARDS οι οδηγίες αντιμετώπισης του CIRCI (ESICM 2017) προτείνουν την χορήγηση μεθυλπρεδνιζολόνης στο πρώιμο μέτριο και βαρύ ARDS ( $P_{aO_2}/F_{iO_2} < 200$ ) και εντός 14 ημερών από την έναρξη. Η προτεινόμενη δοσολογία είναι 1mg/kg/ημέρα εφόσον η έναρξη της θεραπείας γίνει μέχρι την έβδομη ημέρα από την εμφάνιση του συνδρόμου και στο επίμονο ARDS μετά την έκτη ημέρα από την εμφάνισή του τροποποιείται στα 2mg/kg/ημέρα. Η επιλογή μεθυλπρεδνιζολόνης στηρίζεται στην καλύτερη φαρμακοκινητική της στον πνεύμονα όπου διεισδύει και παραμένει περισσότερο. Η διακοπή πρέπει να γίνεται σταδιακά εντός 6 έως 14 ημερών και όχι συντομότερα (εντός δύο έως τεσσάρων ημερών) ή απότομα λόγω του κινδύνου υποτροπής της φλεγμονώδους απάντησης και επανεμφάνισης του ARDS.

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Εισαγωγή.

Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια (HPA – hypothalamus – pituitary – adrenal axis) μέσω της έκκρισης κορτιζόλης είναι θεμελιώδης για την διατήρηση της ομοιόστασης και τελικά την επιβίωση τόσο στην ηρεμία όσο και σε καταστάσεις έντονου στρες όπως η κρίσιμη νόσος. Οι κυριότερες δράσεις είναι ανοσολογικές, μεταβολικές και σχετικές με την ισορροπία ύδατος και ηλεκτρολυτών αν και η κορτιζόλη δρα σε κάθε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού. Σε πολλές όμως περιπτώσεις ασθενών με κρίσιμη νόσο, και για την περίπτωση της σηπτικής καταπληξίας σε ποσοστό μέχρι 60% των περιστατικών, η ενεργοποίηση του HPA δεν φθάνει τα επίπεδα που απαιτούνται από την σοβαρότητα της νόσου παρά την παρατηρούμενη σε αρκετές περιπτώσεις υπερκορτιζολαιμία. Αυτή η σχετική φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια αποδόθηκε από τον Marik το 2008 με τον όρο CIRCI (critical illness related corticosteroid insufficiency ή φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια σχετιζόμενη με την κρίσιμη νόσο) [27].

Ως αίτια του συνδρόμου αναγνωρίζονται διαταραχές της μικροκυκλοφορίας σε οποιοδήποτε σημείο του άξονα, αιμορραγίες και θρομβώσεις των επινεφριδίων, η υποθερμία, φαρμακευτικοί παράγοντες, η ηπατική ανεπάρκεια και η μειωμένη χοληστερόλη πλάσματος.

Η ανεπαρκής για την ένταση του στρες ενεργοποίηση του άξονα HPA μπορεί να οφείλεται στην απορρύθμιση του ίδιου του άξονα, στην διαταραχή του μεταβολισμού της κορτιζόλης που εκδηλώνεται τόσο ως μειωμένος καταβολισμός όσο και ως μειωμένη σύνθεση και στην μειωμένη απάντηση των περιφερικών ιστών στα κορτικοειδή που είναι σημαντικότερος παράγοντας για την τελική βιολογική δράση από τα ίδια τα επίπεδα κορτιζόλης στον ορό.

Αντίσταση στα κορτικοειδή συμβαίνει λόγω μειωμένης λειτουργικότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών τύπου α (GR-α), ισομορφή η οποία και είναι υπεύθυνη για την βιολογική γλυκοκορτικοειδική δραστηριότητα. Η μειωμένη λειτουργικότητα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μειωμένης συγκέντρωσης, επηρεασμένης συγγένειας με το πρόσδεμα (κορτιζόλη) ή διαταραχής της μεταφοράς του συμπλόκου GR-α – κορτιζόλης στον πυρήνα καθώς και της

αλληλεπίδρασής του με γενωμικές περιοχές και μεταγραφικούς παράγοντες. Γίνεται λοιπόν εμφανές πως και η αντίσταση στα κορτικοειδή έχει πολλαπλές συνιστώσες καθιστώντας το συνολικό πρόβλημα της ανεπάρκειας των κορτικοειδών στην κρίσιμη νόσο εξαιρετικά πολυπαραγοντικό και πολύπλοκο.

Τελευταία έχει αναδειχθεί η σημασία της διαφορικής έκφρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην κρίσιμη νόσο. Πέρα από την κλασσική ισομορφή GR-α έχουν διαπιστωθεί και οι GR-β, GR-P που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του αρχικού m-RNA και εκφράζονται σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται να διαδραματίζει στην κρίσιμη νόσο ο GR-β που δεν συνδέεται με κορτικοειδή έχει όμως εντοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου και ασκεί ανασταλτική επί του GR-α δράση [53]. Διαταραχή στην έκφραση των GR-α και GR-β έχει φανεί να συσχετίζεται με αντίσταση στα κορτικοειδή.

## 2. Σκοπός της μελέτης.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της έκφρασης των GR-α και GR-β ισομορφών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με κρίσιμη νόσο που δεν έλαβαν κορτικοειδή και νοσηλεύθηκαν σε μονάδα εντατικής θεραπείας και για διάστημα δύο εβδομάδων.

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης μετρήθηκε το m-RNA των δύο ισομορφών με τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

## 3. Υλικό και μέθοδοι.

### Σχεδιασμός μελέτης

Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη παρατήρησης ασθενών με κρίσιμη νόσο που νοσηλεύθηκαν στην Πολυδύναμη ΜΕΘ του Νοσοκομείου 'Ο Ευαγγελισμός' για το διάστημα μεταξύ Απριλίου 2017 και Νοεμβρίου 2017.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου 'Ο Ευαγγελισμός' και ήταν σύμφωνη με την Διακήρυξη του Ελσίνκι.

### Πληθυσμός της μελέτης

Ελέγχθησαν όλοι οι ασθενείς που εισήχθησαν στην ΜΕΘ το διάστημα διενέργειας της μελέτης. Τα κριτήρια αποκλεισμού από την μελέτη περιελάμβαναν ηλικία μικρότερη των 18 ετών, εγκυμοσύνη, διαπιστωμένη κατάσταση εγκεφαλικού θανάτου, κακοήθη νοσήματα, μη ανάγκη διασωλήνωσης και μηχανικού αερισμού κατά την διάρκεια παραμονής στην ΜΕΘ, επανεισαγωγή στην ΜΕΘ ή διακομιδή του ασθενούς από άλλη ΜΕΘ, μεταδοτικά νοσήματα (λοίμωξη με τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου – HIV, ηπατίτιδα), λήψη κορτικοειδών από του στόματος σε δοσολογία ισοδύναμη με  $\geq 1$  mg/Kg/ημέρα πρεδνιζόνης και για χρονικό διάστημα ενός μήνα ή περισσότερο πριν από την είσοδο στην ΜΕΘ και λήψη κορτικοστεροειδών εντός της ΜΕΘ (π.χ υδροκορτιζόνη για σηπτική καταπληξία).

Κατά την είσοδο στην ΜΕΘ καταγράφηκαν η ηλικία, το φύλο, η βασική νοσολογική κατηγορία (παθολογική, χειρουργική, τραύμα) και οι κλίμακες βαρύτητας APACHE II και SOFA. Για την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε σήψη και σηπτική καταπληξία χρησιμοποιήθηκαν οι ορισμοί κατά sepsis-3 [51]. Καταγράφηκε επίσης η διάρκεια παραμονής στην ΜΕΘ και η θνητότητα στις 28 ημέρες.

### Λήψη δειγμάτων αίματος – απομόνωση πολυμορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων

Δείγματα φλεβικού αίματος λαμβάνονταν σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία, ήτοι: εντός 48 ωρών από την εισαγωγή του ασθενούς (βασικά επίπεδα), και εν συνεχεία δις εβδομαδιαίως για τις επόμενες δύο εβδομάδες ή μέχρι το εξιτήριο ή το θάνατο του ασθενούς. Δεν λαμβάνονταν περαιτέρω δείγματα αίματος από τον ασθενή και η μελέτη σταματούσε εάν αυτός αποσωληνωνόταν και σταματούσε τον μηχανικό αερισμό ή ξεκινούσε λήψη

κορτικοειδών λόγω σηπτικής καταπληξίας. Για κάθε ασθενή τα βασικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) κατά την εισαγωγή ορίστηκαν ως το σημείο αναφοράς και οι επόμενες τιμές εκφράστηκαν ως πολλαπλάσιά του. Τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα στα οποία μετρήθηκε ο GR απομονώθηκαν από 3ml δείγματος φλεβικού αίματος σε 17% κιτρικό οξύ που αφέθηκε να καθιζήσει σε περιβάλλον 3% Dextran σε 0,9% NaCl για μία ώρα. Το πλούσιο σε λευκοκύτταρα υπερκείμενο διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση σε διάλυμα Histopaque (Sigma). Μετά την λύση των ερυθροκυττάρων με υποτονικό σοκ σε παγωμένο απεσταγμένο νερό τα πολυμορφοπύρρηνα ανακτήθηκαν εκ νέου στην μορφή εναιωρήματος σε Trifast (Peflab) και αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι την απομόνωση του RNA τους.

#### Εκχύλιση ολικού RNA και αξιολόγηση της ποιότητάς του

Το ολικό RNA απομονώθηκε από τα πολυμορφοπύρρηνα χρησιμοποιώντας Trifast (Peflab) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του ολικού RNA αξιολογήθηκαν η μεν πρώτη με φασματοφωτομετρία στα 260 και 280 nm, η δε δεύτερη εκτιμώντας την ακεραιότητα του RNA με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης - φορμαλδεύδης. Το RNA αποθηκεύθηκε στους -80°C.

#### Αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR)

Ένα μg ολικού RNA μεταγράφηκε αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA μονής έλικας (c-DNA) σε 20 ml μίγματος αντίδρασης χρησιμοποιώντας το kit της Takara και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τον πολλαπλασιασμό των mRNAs του GAPDH, το οποίο είναι ένα ενδογενές γονίδιο αναφοράς, και των GR-α και GR-β εφαρμόστηκε μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος RT-PCR με την χρήση του Kapa SYBR® Green PCR Master Mix (Sigma – Aldrich). Για την ενίσχυση των αλληλουχιών του mRNA του GAPDH και των GR-α και GR-β χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν βάσει πληροφοριών από την βάση δεδομένων αλληλούχισης για γονίδια, mRNAs και πρωτείνες του NCBI και με την βοήθεια του λογισμικού

Primer Express Program. Για την αποφυγή πολλαπλασιασμού του γενωμικού DNA οι εκκινητές σχεδιάστηκαν να περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο συνεχόμενα εξόνια.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές: για το GAPDH ως αριστερός (forward) εκκινητής ο αποτελούμενος από 19 νουκλεοτίδια 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3' και ως δεξιός (αντίστροφος ή reverse) ο αποτελούμενος από 23 νουκλεοτίδια 5'-TACATGAGGGCACGGAAGATG-3'. Για το γονίδιο του GR χρησιμοποιήθηκε ο κοινός αριστερός εκκινητής 5'-CCTAAGGACGGTCTGAAGAGC-3' αποτελούμενος από 21 νουκλεοτίδια, για τον GR-α ο δεξιός εκκινητής 5'-GCCAAGTCTTGGCCCTCTAT-3' αποτελούμενος από 20 νουκλεοτίδια και για τον GR-β ο δεξιός εκκινητής 5'-CCACGTATCCTAAAAGGGCAC-3' αποτελούμενος από 21 νουκλεοτίδια. Η ποσοτική PCR διενεργήθηκε σε μικροπλάκες 96 κυψελών και ως θερμικός κυκλοποιητής χρησιμοποιήθηκε το CFX Connect της Biorad. Το μίγμα αντίδρασης είχε όγκο 25  $\mu$ l, αποτελείτο από 5 ng c-DNA, 300ng εκκινητές και ένα κιτ Kara SYBR® Green PCR Master Mix που περιείχε μεταξύ άλλων την απαραίτητη DNA πολυμεράση.

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε αρχικά την ενεργοποίηση της πολυμεράσης για τρία λεπτά στους 95°C και τον πολλαπλασιασμό του DNA σε 50 θερμικούς κύκλους (αποδιάταξη των διπλών ελίκων στους 95°C για δέκα δευτερόλεπτα και υβριδισμός των εκκινητών και επιμήκυνση των αλυσίδων για είκοσι δευτερόλεπτα στους 60°C). Για κάθε δείγμα το DNA πολλαπλασιάστηκε τρεις φορές (50 θερμικοί κύκλοι η κάθε φορά). Εν συνεχεία υπολογίστηκε η μέση τιμή για το κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) κάθε προϊόντος και ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των mRNA με χρήση της συγκριτικής μεθόδου  $2(-\Delta\Delta C(T))$  [54] και έχοντας ως βαθμονομητή τις τιμές εισαγωγής (βασικά επίπεδα). Για την κανονικοποίηση της έκφρασης των ισομορφών του GR μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του GAPDH.

#### Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μεμονωμένες τιμές, ως μέσες τιμές  $\pm$  τυπική απόκλιση (standard deviation - SD) για τις μεταβλητές με κανονική

κατανομή και ως διάμεσες τιμές με διατεταρτημοριακή διακύμανση (interquartile range – IQR) για τις μεταβλητές με ασύμμετρη κατανομή. Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης ANOVA κατά ένα παράγοντα για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και η Kruskal – Wallis ANOVA ακολουθούμενη από την δοκιμασία Dunn’s post-hoc για την εκτίμηση της έκφρασης του GR-α και του GR-β κατά την διάρκεια παρακολούθησης των δύο εβδομάδων. Η ανωτέρω στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Graphpad prism 6. Όλες οι τιμές p είναι δύο κατευθύνσεων και όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το  $p < 0,05$ .

#### 4. Αποτελέσματα.

##### Δεδομένα πληθυσμού της μελέτης

Από τους 456 ασθενείς που αξιολογήθηκαν το διάστημα που διενεργήθηκε η μελέτη, τελικά συμπεριελήφθησαν στην μελέτη οι 50. Η συχνότερη αιτία αποκλεισμού από την μελέτη ήταν η χρήση κορτικοστεροειδών πριν ή κατά την εισαγωγή τους στην ΜΕΘ. Ένας ασθενής απεβίωσε, οκτώ (8) αποσωληνώθηκαν και εννέα (9) έλαβαν κορτικοστεροειδή αμέσως μετά την πρώτη αιμοληψία και αποκλείστηκαν από περαιτέρω αιμοληψίες. Τριάντα δύο (32) ασθενείς έδωσαν πάνω από ένα δείγμα αίματος και συμμετείχαν στην στατιστική ανάλυση. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία και φύλο), η βασική νοσολογική τους κατηγορία, τα σκορ βαρύτητας APACHE II και SOFA, η διάρκεια του απαιτούμενου μηχανικού αερισμού, η σηπτική τους κατάσταση και η θνητότητα στις εικοσιοκτώ (28) ημέρες παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

##### Έκφραση των ισομορφών του GR (GR-α και GR-β) στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς

Η έκφραση του GR-α σε σχέση με τον χρόνο παραμονής στην ΜΕΘ παρουσιάζεται στην Εικ. 13.1. Τέσσερις ημέρες μετά την εισαγωγή παρατηρήθηκε διάμεση μείωση του GR-α mRNA κατά τέσσερις φορές (IQR: 2-42) ( $p < 0,0001$ ). Το GR-α mRNA παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα και κατά τις υπόλοιπες μετρήσεις με διάμεση μείωση κατά 2,5 φορές (IQR: 1-16,  $p < 0,05$ ) και

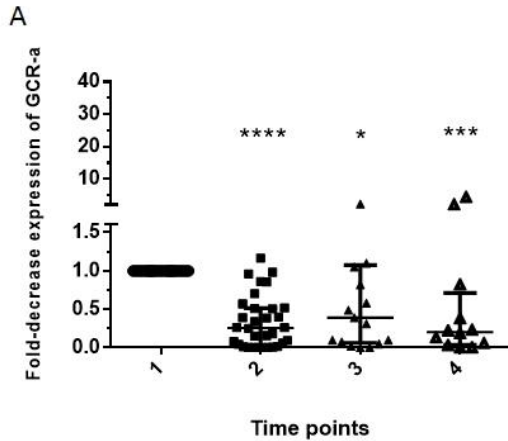


κατά 4,9 φορές από τις βασικές μετρήσεις (IQR: 1,4 – 27,  $p < 0,001$ ) στην τρίτη και τέταρτη μέτρηση αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασης του GR- $\beta$  mRNA κατά την διάρκεια της νοσηλείας των ασθενών στην ΜΕΘ παρουσιάζονται στην Εικ. 13.2.

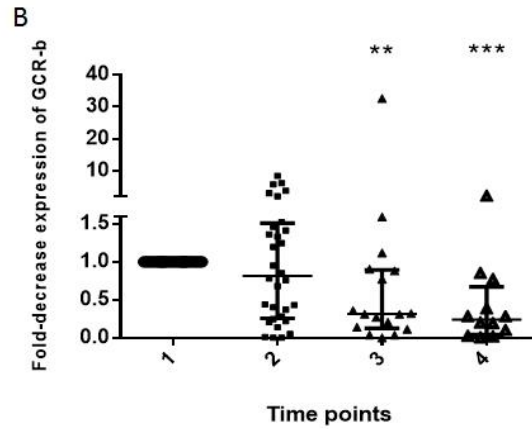
**Πίνακας 1. Characteristics of the ICU patient group**

Characteristics	Patients
Number of patients (N)	32
Age (years)	54 $\pm$ 20
Gender	
Male	20 (62.5%)
Female	12 (37.5%)
Diagnosis	
Medical	7 (21.9%)
Surgical or Trauma	25 (78.1%)
APACHE II score	17 (14-22)
SOFA score	8 (7-10)
LoS (days)	26 $\pm$ 19
Duration of mechanical ventilation (days)	16 $\pm$ 10
Sepsis or septic shock	11 (34.4%)
ICU mortality	9 (28.1%)
28-day outcome	7 (21.9%)

Data are expressed as percentages of total related variable (%) and mean  $\pm$  SD for normally distributed variables and median (IQR) for skewed data. Definition of abbreviations: APACHE= Acute physiology and chronic health evaluation; ICU= Intensive care unit; LoS= Length of stay; SOFA= Sequential organ failure assessment. APACHE II and SOFA scores were estimated at ICU admission.



Εικ. 13.1



Εικ.13.2

Σε αντίθεση με τα επίπεδα έκφρασης του GR-α, τα επίπεδα του GR-β παρέμειναν αμετάβλητα τέσσερις ημέρες μετά την εισαγωγή. Στην συνέχεια όμως μειώθηκαν με διάμεση μείωση 3,2 φορές (IQR: 1,12 – 7,9,  $p < 0,01$ ) και 4,2 φορές (IQR: 1,49 – 23,7,  $p < 0,001$ ) κατά την τρίτη και τέταρτη μέτρηση αντίστοιχα.

## 5. Συζήτηση.

Στην μελέτη αυτή μετρήθηκαν διαδοχικά για διάστημα δύο εβδομάδων τα επίπεδα έκφρασης του GR-α και GR-β mRNA βαρέως πασχόντων ασθενών που νοσηλεύθηκαν σε ΜΕΘ και δεν έλαβαν κορτικοειδή. Και οι δύο ισομορφές του GR ελαττώθηκαν κατά την πορεία της κρίσιμης νόσου με την διαφορά πως η πτώση της έκφρασης του GRβ έλαβε χώρα αργότερα. Εξίσου ενδιαφέρον ήταν και το εύρημα πως η έκφραση των GR υποδοχέων παρουσίασε μεγάλη μεταβλητότητα, τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και στον ίδιο ασθενή τις διάφορες χρονικές στιγμές.

Η σχετική φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια στην κρίσιμη νόσο είδαμε πως μπορεί να οφείλεται στην απορρύθμιση του ίδιου του άξονα, στις διαταραχές του μεταβολισμού της κορτιζόλης (σύνθεση και απενεργοποίηση) καθώς και στη μειωμένη απάντηση των ιστών στην κορτιζόλη (αντίσταση). Πιθανό ρόλο στην αντίσταση στα κορτικοειδή παίζουν η μειωμένη έκφραση του υποδοχέα τους [56, 57], η ελαττωμένη συγγένεια με το πρόσδεμα [58,59], η διαταραχή στην μεταφορά στον πυρήνα και στην αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες και περιοχές DNA [60, 61]. Εκτός του κλασσικού υποδοχέα GR-α που κυρίως

εκφράζεται υπάρχουν και άλλες ισομορφές, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, με σπουδαιότερη την GR-β που εκφράζεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από τον GR-α. Παρά το γεγονός αυτό όμως επειδή αυτές οι δύο ισομορφές έχουν διαφορετική δράση, όπως αναφέρθηκε ήδη, διαταραχή της σχέσης τους μπορεί να είναι αιτία αντίστασης στα κορτικοειδή.

Αυξημένη έκφραση του GR-β έχει διαπιστωθεί σε πολλά νοσήματα που σχετίζονται με αντίσταση στα κορτικοειδή όπως στο σοβαρό άσθμα, την λευχαιμία, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, την ελκώδη κολίτιδα και την ρευματοειδή αρθρίτιδα [55]. Μελέτες, έχουν δείξει αυξημένη ουδετεροφιλική έκφραση GR-β ως απάντηση στην κρίσιμη νόσο [44]. Έχουν επίσης δείξει πως η αυξημένη έκφραση GR-β και ο μειωμένος λόγος GR-α/GR-β σχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου σε παιδιά με βρογχιολίτιδα [63]. Υπάρχουν ακόμα δεδομένα πως η μειωμένη έκφραση του υποδοχέα GR-α διαμεσολαβείται από το microRNA-124 που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή [46], υποδηλώνοντας πως η θεραπεία με αυτά θα μπορούσε να επιδεινώσει την αντίσταση στα κορτικοειδή παρουσία αυξημένης έκφρασης GR-β. Ωστόσο ο GR-β για να ασκήσει την επικρατούσα ανασταλτική δράση επί του GR-α θα πρέπει να υπερεκφραστεί σε σχέση με αυτόν. Στα περισσότερα κύτταρα ο GR-α εκφράζεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τον GR-β, γεγονός που γεννά ερωτηματικά για τον ρόλο του τελευταίου στην αντίσταση στα κορτικοειδή [65].

Πρόσφατη μελέτη έδειξε αύξηση της ενεργότητας του GR-α στην οξεία φάση της σήψης και μάλιστα αυτό συσχετίστηκε με χειρότερη έκβαση [43]. Επιδεινώνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης των υποδοχέων GR και της απάντησης των ιστών στα κορτικοειδή, μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς με βαριά νόσο έδειξε πως τα ολικά και τα κυτταροπλασματικά επίπεδα του GR είναι σημαντικά μειωμένα αλλά όχι τα επίπεδα στον πυρήνα [64].

Εξ'όσων γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη που επιχειρεί να προσδιορίσει το χρονικό προφίλ της έκφρασης των δύο σπουδαιότερων ισομορφών του GR κατά την διαδρομή της κρίσιμης νόσου σε ασθενείς που δεν έλαβαν κορτικοειδή. Στην ομάδα ασθενών που μελετήθηκε, τα επίπεδα τόσο του GR-α όσο και του GR-β παρουσίασαν πτωτική πορεία αλλά αυτά του GR-β παρέμειναν σταθερά για τις πρώτες τέσσερις ημέρες. Απαιτούνται επιπλέον μελέτες προκειμένου να καθορισθεί η σημασία της αύξησης του λόγου GR-β/GR-α στο αρχικό στάδιο της κρίσιμης νόσου, οι παράγοντες που την καθορίζουν και

εάν ο βαθμός στον οποίο παρατηρείται στα PMNs του περιφερικού αίματος σχετίζεται με την έκβαση. Επίσης παρουσιάστηκε υψηλή μεταβλητότητα τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και για τον ίδιο ασθενή στην πορεία του χρόνου, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορετική ανταπόκριση στα κορτικοειδή. Φαίνεται πως το χρονικό σημείο έναρξης χορήγησης κορτικοειδών είναι αρκετά σημαντικός παράγοντας ανταπόκρισης.

Η λειτουργία του HPA στην κρίσιμη νόσο παραμένει ελλιπώς κατανοητή. Αλληλεπιδρά σε όλα τα επίπεδά του με το νευρικό και το ενδοκρινικό σύστημα που βρίσκονται σε κατάσταση έντονης διέγερσης. Η αντίσταση στα κορτικοειδή παραμένει ένα κλινικό πρόβλημα με πολλά ερωτηματικά σχετικά με τους μηχανισμούς ανάπτυξής του, την ρύθμισή τους και τους ενδεδειγμένους θεραπευτικούς χειρισμούς. Επίσης ο ακριβής ρόλος της ισομορφής GR-β, ο ρόλος των υπολοίπων ισομορφών του υποδοχέα και η συμμετοχή του GR-β στην εκδήλωση αντίστασης στα κορτικοειδή δεν έχει πλήρως καθορισθεί όπως δεν έχουν καθορισθεί πλήρως οι παράγοντες που ελέγχουν το εναλλακτικό μάτισμα στην βασική κατάσταση και το έντονο στρες. Η πολυπλοκότητα του ζητήματος ενισχύεται αν υπολογισθεί ο διαφορετικός βαθμός έκφρασης ανά κύτταρο και ιστό τόσο συνολικά του GR όσο και της αναλογίας των ισομορφών του. Θα χρειασθεί περαιτέρω βασική έρευνα και κλινικές μελέτες για να αποσαφηνισθούν περισσότερο τα σημεία αυτά.

## Βιβλιογραφία

1. Arlt W, Stewart PM (2005) Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 34(2): 293-313.
2. Nussey S, Whitehead S (2001) *Endocrinology: An integrated approach.* Oxford: BIOS Scientific Publishers.
3. Stocco DM, Clark BJ (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* 17(3): 221-44.
4. Miller WL and Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Re.* 32(1): 118-15.
5. Snyder PJ (2001) Editorial: The Role of Androgens in Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* Volume 86, Issue 3.
6. Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, et al (2007) Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood.* 109(3): 1265–74.
7. Giles KM, Ross K, Rossi AG, Hotchin NA, Haslett C, Dransfield I (2001) Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac. *J Immunol.* 167(2): 976–86.
8. Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I (2003) Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol.* 178(1): 29–36.
9. Petrillo MG, Bortner CD, Cidlowski JA (2017) Glucocorticoids: Inflammation and Immunity, In: Geer E. (eds) *The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease,* Springer, Cham, 2017.
10. Coutinho AE, Karen EC (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol.* 335(1): 2–13.
11. Pierluigi F, Pieranna F, Giovanni D (2009) Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids. *Psychiatry and Clinical Neurosciences.* 63: 613–622.

12. Margioris AN, Tsatsanis C, ACTH Action on the Adrenals. Endotext [Internet]. Last Update: October 26, 2016.
13. Boonen E, Van den Berghe G (2014) Novel insights in the HPA-axis during critical illness. *Acta Clin Belg.* 69(6): 397-406.
14. Sarabdjitsingh RA, Conway-Campbell BL, Leggett JD, Waite EJ, Meijer OC, de Kloet ER, et al (2010) Stress responsiveness varies over the ultradian glucocorticoid cycle in a brain-region-specific manner. *Endocrinology.* 151(11): 5369–79.
15. Spiga F, Waite EJ, Liu Y, Kershaw YM, Aguilera G, Lightman SL (2011) ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion. *Endocrinology.* 152(4):1448–57.
16. Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, et al (2008) Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol.* 11(9):1093–102.
17. Annane D, Pastores SM, Arlt W, Balk RA, Beishuizen A, Briegel J, Carcillo J, Christ-Crain M, Cooper MS, Marik PE, Meduri GU, Olsen KM, Rochweg B, Rodgers SC, Russell JA, Van den Berghe G. (2017) Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI): a narrative review from a Multispecialty Task Force of the Society of Critical Care Medicine (SCCM) and the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Intensive Care Med.* 43(12):1781-1792.
18. Nenke MA, Rankin W, Chapman MJ et al (2015) Depletion of high affinity corticosteroid-binding globulin corresponds to illness severity in sepsis and septic shock; clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 82(6):801–807.
19. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I et al (2001) Patterns of corticosteroidbinding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med* 27:1584–1591.
20. Charmandari E, Nicolaidis NC, Chrousos GP (2014) Adrenal insufficiency. *Lancet.* 383(9935):2152–2167.
21. Goodwin JE, Feng Y, Velazquez H, Sessa WC (2013) Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(1):306–311.
22. Oakley RH, Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 132(5):1033–1044.

23. Scheschowitsch K, Leite JA, Assreuy J (2017) New insights in glucocorticoid receptor signaling – More than just a ligand-binding receptor. *Frontiers in Endocrinology*. Volume 8, Article 16.
24. Nicolaides NC, Chrousos GP, Charmandari E (2017) Adrenal Insufficiency. *Endotext*.
25. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, MD, MSc, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 315(8): 801–810.
26. Selye H (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*. 6: 117–230.
27. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I, Tsagarakis S, Singer M, Chrousos GP, Zaloga G, Bokhari F, Vogeser M (2008) Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. 36(6): 1937-49.
28. Annane D, Pastores SM, Rochwerg B, Arlt W, Balk RA, Beishuizen A, Josef Briegel J, Carcillo J, Christ-Crain M, Cooper MS, Marik PE, Umberto Meduri G, Olsen KM, Rodgers SC, Russell JA, Van den Berghe G (2017) Guidelines for the diagnosis and management of critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI) in critically ill patients (Part I): Society of Critical Care Medicine (SCCM) and European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) 2017. *Crit Care Med*. 45(12):2078-2088.
29. Vermes I, Beishuizen A, Hampsink RM, Haanen C (1995) Dissociation of plasma adrenocorticotropin and cortisol levels in critically ill patients: possible role of endothelin and atrial natriuretic hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 80(4): 1238-42.
30. Hamrahian AH, Fleseriu M (2017) Evaluation and management of adrenal insufficiency in critically ill patients-disease state review. *Endocr Pract*. 23(6): 716-725.
31. Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A et al (1996) Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med*. 2(5): 581–584.

32. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G et al (2003) Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 362(9398): 1799–1805.
33. Polito A, Sonnevile R, Guidoux C et al (2011) Changes in CRH and ACTH synthesis during experimental and human septic shock. *PLoS One*. 6(11): e25905.
34. Boonen E, Vervenne H, Meersseman P et al (2013) Reduced cortisol metabolism during critical illness. *N Engl J Med*. 368: 1477–1488.
35. Ackermann D, Vogt B, Escher G, et al (1999) Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by bile acids in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 30: 623–629.
36. McNeilly AD, Macfarlane DP, O’Flaherty E, et al (2010) Bile acids modulate glucocorticoid metabolism and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obstructive jaundice. *J Hepatol*. 52: 705–711.
37. Stauffer AT, Rochat MK, Dick B, et al (2002) Chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and cause cortisol-induced transcriptional activation of the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 277: 26286–26292.
38. Vanwijngaerden YM, Wauters J, Langouche L, et al (2011) Critical illness evokes elevated circulating bile acids related to altered hepatic transporter and nuclear receptor expression. *Hepatology*. 54: 1741–1752.
39. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, et al (2013) Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 305(6): G427–G438.
40. Boonen E, Langouche L, Janssens T, et al (2014) Impact of duration of critical illness on the adrenal glands of human intensive care patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 99: 1569–1582.
41. Boonen E, Meersseman P, Vervenne H, et al (2014) Reduced nocturnal ACTH-driven cortisol secretion during critical illness. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 306(8): E883–E892.
42. Marik PE (2009) Critical illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest*. 135(1): 181–193.
43. Vardas K, Iliia S, Sertedaki A, et al (2017) Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality. *Intensive Care Med Exp*. 5(1): 10.



44. Guerrero J, Gatica HA, Rodriguez M, Estay R, Goecke IA (2013) Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression of glucocorticoid isoforms receptors: a prospective cohort study and in vitro experimental assay. *Crit Care*. 17(3): R107.
45. Meduri GU, Tolley EA, Chrousos GP, Stentz F (2002) Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 165(7): 983–991.
46. Ledderose C, Möhnle P, Limbeck E, et al (2012) Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124—induced downregulation of glucocorticoid receptor- $\alpha$ . *Crit Care Med*. 40(10): 2745-53.
47. Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, et al (2008) Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea pig lungs using methylprednisolone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295(6): L998–L1006.
48. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis *Endocr Rev* 1998; 19: 101–43.
49. Eva Boonen and Greet Van den Berghe Cortisol metabolism in critical illness: implications for clinical care. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014 Jun;21(3):185-92.
50. Boonen E, Bornstein SR, Van den Berghe G New insights into the controversy of adrenal function during critical illness. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Oct;3(10):805-15.
51. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
52. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones

- AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017 Mar;43(3):304-377.
53. C M Bamberger, A M Bamberger, M de Castro, and G P Chrousos Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest.* 1995 Jun; 95(6): 2435–2441.
54. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.
55. Karen Dendoncker, Claude Libert Glucocorticoid resistance as a major drive in sepsis pathology, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017 Jun;35:85-96.
56. Ma L, Fang M, Liang Y, Xiang Y, Jia Z, Sun X, Wang Y, Qin J Low expression of glucocorticoid receptor alpha isoform in adult immune thrombocytopenia correlates with glucocorticoid resistance. *Ann Hematol.* 2013 Jul;92(7):953-60.
57. Bergquist M, Jirholt 2, Nurkkala M, Rylander C, Hedenstierna G, Lindholm C Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxic shock. *J Infect.* 2014 Aug;69(2):113-22
58. Liu LY, Sun B, Tian Y, Lu BZ, Wang J. Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A2 in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:878–881.
59. Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol.* 1993;151:3460–3466.
60. Pariente CM, Pearce BD, Pisell TL, Sanchez CI, Po C, Su C, Miller AH. The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* . 1999;140:4359–4366. doi: 10.1210/en.140.9.4359.
61. Kino T, Chrousos GP. Tumor necrosis factor alpha receptor- and Fas-associated FLASH inhibit transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by binding to

and interfering with its interaction with p160 type nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*. 2003;278:3023–3029.

62. Hélène Prigent,<sup>1</sup> Virginie Maxime,<sup>1</sup> and Djillali Annane, Science review: Mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids, *Crit Care*. 2004; 8(4): 243–252.

63. Diaz PV, Pinto RA, Mamani R, Uasapud PA, Bono MR, Gaggero AA, et al. Increased expression of the glucocorticoid receptor beta in infants with RSV bronchiolitis. *Pediatrics*. 2012 Oct;130(4):e804-11. PubMed PMID: 23008453. Epub 2012/09/26. eng.

64. Indyk JA, Candido-Vitto C, Wolf IM, Venkataraman S, Munoz R, Saladino RA, et al. Reduced glucocorticoid receptor protein expression in children with critical illness. *Hormone research in paediatrics*. 2013;79:169-78. PubMed PMID: 23548248. Epub 2013/04/04. eng.

65. Goecke A, Guerrero J. Glucocorticoid receptor beta in acute and chronic inflammatory conditions: clinical implications. *Immunobiology*. 2006;211(1-2):85-96. PubMed PMID: 16446173. Epub 2006/02/01. eng.