



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΛΑΪΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ**

**ΚΕΝΤΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TLRs ΣΤΟ
ΕΝΤΕΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΝΕΦΡΟΥΣ ΣΕ ΣΗΠΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΩΝ:
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΛΒΙΑ ΚΡΙΒΑΝ

ΙΑΤΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος Θ. ΛΙΑΚΑΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

Στη Μαρία, γιατί πιστεύει σε αυτό που κάνω.
Στους γονείς μου, για όλα όσα μου έχουν προσφέρει και
για την αδιάκοπη πίστη τους και το στήριγμά τους.
Στην Άντρεα, γιατί πιστεύει ότι όλοι οι στόχοι είναι εφικτοί.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας περιεχομένων	3
Πρόλογος	6
Γενικά Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής	9
Όρκος Ιπποκράτη	10
Βιογραφικό Σημείωμα	12
Περίληψη	35
Περίληψη στην αγγλική	37
Πίνακας Συντομογραφιών	38
Γενικό Μέρος.....	46
1. Εισαγωγή- Σήψη.....	47
1.1 Ιστορία	47
1.2 Επιδημιολογία	47
1.3 Ορισμός Σήψης.....	48
1.4 Παλαιότεροι ορισμοί.....	50
1.4.1 Σήψη 1	50
1.4.2 Σήψη 2	51
1.4.3 Σήψη 3.....	52
1.5 Παθοφυσιολογία της Σήψης	54
1.5.1 Είδη Ανοσολογικής Απάντησης.....	54
1.5.2 Δείκτες Σήψης	55
1.5.2.α Κυτοκίνες	57
1.5.2.β Ιντερλευκίνη 18	58
1.5.2.γ Ιντερλευκίνη 18 και φλεγμονή	60
2. Μελέτη Σήψης	63
2.1 Σοβαρότητα Ανθρώπινης Σήψης.....	63
2.2 Η Σήψη ως ανοσοκατασταλτική διαταραχή.....	64
2.3 Ζωικά Μοντέλα Σήψης	69
2.4 TLRs.....	73

2.4.i MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι (MyD88-dependent pathway).....	82
2.4.ii TRIF-μεσολαβούμενη οδός (MyD88-independent pathway / TRIF-dependent pathway).....	83
2.4.1 TLR 1, 2, 6	84
2.4.2 TLR 3	86
2.4.3 TLR 4	88
2.4.4 TLR 7, 9	91
2.5 Σήψη και Νεφρική Βλάβη	93
2.5.1 NGAL	95
2.5.2 IL-18	98
2.5.3 Αίτια ONA	98
2.5.4 Παθοφυσιολογία Σηπτικής ONA	101
2.5.5 Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια (ONA) και TLRs	104
Ειδικό Μέρος.....	108
3. Σκοπός της Μελέτης – Μεθοδολογία –Αποτελέσματα.....	109
3.1 Εισαγωγή	109
3.2 Σκοπός Μελέτης	110
3.3 Μεθοδολογία	111
3.3.1 Ζωικά πρότυπα-Εργαστηριακές συνθήκες	111
3.3.2 Πειραματικό μοντέλο / διαδικασία απολίνωσης τυφλού.....	111
3.3.3 Βιοχημική ανάλυση δειγμάτων αίματος	114
3.3.4 Τεχνική Elisa για IL-18 και NGAL	115
3.3.5 Ιστολογική επεξεργασία.....	117
3.3.6 Ιστολογία.....	119
3.3.6.1 Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης.....	119
3.3.7 Ανοσοφθορισμός	121
3.3.8 Μορφομετρική ανάλυση	122
3.3.9 Ποσοτική ανάλυση αντίδρασης αλυσίδας πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο	123
3.3.10 Στατιστική ανάλυση	129

3.4 Αποτελέσματα	129
3.4.1 Βιοχημικά και ανοσολογικά αποτελέσματα	129
3.4.2 Παθολογοανατομικές εξετάσεις	132
3.4.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός σε πραγματικό χρόνο με τη μέθοδο της αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης μεταγραφής της πολυμεράσης σε νεφρικούς και εντερικούς ιστούς.....	136
4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	141
Συμπεράσματα	146
Βιβλιογραφία	148

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών μετά από την ανάθεση του θέματος από τον Καθηγητή Χειρουργικής κ. Θεόδωρο Λιακάκο. Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα Ιστολογίας και στο Βιοχημικό εργαστήριο του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών από την κα Άλκηστις Καπελούζου. Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αυτοχρηματοδοτούμενη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Καθηγητή κ. Θεόδωρο Λιακάκο, Διευθυντή Α΄ Χειρουργικής Κλινικής Λαϊκού Νοσοκομείου, για τη διαρκή του καθοδήγηση και επίβλεψη της εκπόνησης αυτού του εγχειρήματος. Η αδιάκοπη συμμετοχή και παρέμβασή του σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού πρωτοκόλλου και της έρευνας με στήριξαν ηθικά και επιστημονικά για την ολοκλήρωση και συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής. Η εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, η αστείρευτη στήριξή του και η μετάδοση τόσων ετών εμπειρίας και γνώσης αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της επιστημονικής μου σταδιοδρομίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Μαχαίρα, Διευθυντή Γ΄ Χειρουργικής Κλινικής Αττικού Νοσοκομείου μέχρι τη συνταξιοδότησή του τον Αύγουστο του 2018, για την αμέριστη και αστείρευτη υποστήριξή του, την επιστημονική καθοδήγηση και το αδιάκοπο ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια της ειδικότητάς μου, καθώς και της εκπόνησης της διατριβής μου. Το ήθος και ο χαρακτήρας του, η αδιάκοπη όρεξή του για εκπαίδευση και μετάδοση γνώσης και εμπειρίας αποτελούν ανεκτίμητα εφόδια για την μετέπειτα επιστημονική μου σταδιοδρομία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Καθηγητή της Γ΄ Χειρουργικής Κλινικής Αττικού Νοσοκομείου, κ. Ευάγγελο Μισιακό, για την υποστήριξη και θερμή συμμετοχή του στην ολοκλήρωση και διεκπεραίωση αυτής της διδακτορικής διατριβής. Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή

Καθηγητή της Α' Χειρουργικής Κλινικής Λαϊκού Νοσοκομείου, κ. Αλέξανδρο Χαραλαμπίδου, που ανέλαβε ενεργό ρόλο κατά το τέλος της διατριβής και συνέβαλλε καταλυτικά στην ολοκλήρωση και επιμέλειά της.

Ευχαριστώ θερμά και την Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Παυλάκη, με έδρα την Παθολογοανατομία της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, που με την αμέριστη υπομονή και καθοδήγησή της με βοήθησε και υποστήριξε σε αυτό το έργο. Η πολυετής και λεπτομερής κατάρτισή της σε αυτό το δύσβατο για γενικούς χειρουργούς μονοπάτι της επιστήμης αποδείχθηκε ανεκτίμητη και καταλυτική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αλκιβιάδη Κωστάκη, Διευθυντή του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής, για την άμεση πρόσβαση και αξιοποίηση των μέσων έρευνας που διαθέτει το κέντρο του. Η αφοσίωσή του και η αγάπη του για την ιατρική έρευνα αποτελούν στήριγμα και έμπνευση για όλους τους νέους επιστήμονες και υποψήφιους διδάκτορες.

Δεν μπορώ να παραλείψω τον κ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο, υπεύθυνο της Μονάδας Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για τη στήριξη και διαρκή συμβουλή στον καθορισμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς όλους τους συνεργάτες και συναδέλφους που συνέβαλαν και βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Συγκεκριμένα, την κ. Άλκηστη Καπελούζου, για την άγρυπνη και αδιάκοπη επιμέλεια και επιτήρηση, διεξαγωγή και εκτέλεση των πειραμάτων, όπως επίσης και τη συλλογή και ανάλυση των δεδομένων. Τον κ. Μιχαήλ Κατσιμπούλα, για την αμεσότητα, διαθεσιμότητα και υπευθυνότητα που τον διακρίνει. Πρόκειται για έναν ιδιαίτερα καταρτισμένο επιστήμονα με αστείρευτη υπομονή και όρεξη για έρευνα που επιμελήθηκε όλων των πειραματικών μοντέλων σήψης. Τους συνεργάτες κ. Χρυσόστομο Αραβανή και κ. Ανάργυρο Μπακόπουλο για την πολύτιμη συνεργασία τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης. Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμότατα όλο το τεχνικό προσωπικό του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών για

την ουσιαστική φροντίδα των πειραματόζων και την επιμέλεια των μέσων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Σύλβια Κριβάν

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου: 22 Φεβρουαρίου 2012

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 5 Απριλίου 2012

Μέλη 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Καθηγητής Κος Θεόδωρος-Κωνσταντίνος Λιακάκος, Διευθυντής Α΄ Χειρουργικής Κλινικής, Λαϊκό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ, Αθήνα. Επιβλέπων μέλος
2. Καθηγητής Κος Ευάγγελος Μισιακός, Γ΄ Χειρουργική Κλινική, Αττικό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ, Αθήνα
3. Αναπληρωτής Καθηγητής Κος Αλέξανδρος Χαραλαμπόπουλος, Α΄ Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ, Αθήνα

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 8 Αυγούστου 2012

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής και ορισμού 7μελούς εξεταστικής επιτροπής: 29 Μαΐου 2019

Ημερομηνία παρουσίασης διατριβής: 15 Ιουνίου 2020

Βαθμός: Άριστα

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Κος Πέτρος Π. Σφηκάκης, Καθηγητής Παθολογίας, Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ, Αθήνα

Μέλη 7μελούς εξεταστικής επιτροπής:

1. Θεόδωρος Λιακάκος, Καθηγητής Χειρουργικής
2. Ευάγγελος Μισιακός, Καθηγητής Χειρουργικής
3. Αλέξανδρος Χαραλαμπόπουλος, Αν. Καθηγητής Χειρουργικής
4. Νικόλαος Νικητέας, Καθηγητής Χειρουργικής
5. Παύλος Πατάπης, Αν. Καθηγητής Χειρουργικής
6. Σχίζας Δημήτριος, Επικ. Καθηγητής Χειρουργικής
7. Παπαλάμπρος Αλέξανδρος, Επικ. Καθηγητής Χειρουργικής

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
 ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
 ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
 ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
 ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΞΕΑ ΓΕΝΕΤΗ,
 ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΣΙΖΟΝΤΙ
 ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΣΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
 ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
 ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΣΙΩΣΙ ΜΑΘΗΣΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
 ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΘΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
 ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
 ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
 ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΕΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ,
 ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΙΟΜΑΙ ΕΠ' ΨΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
 ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΡΑΧΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ,
 ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
 ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΠΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΝΔΕ' ΟΜΟΙΩ ΔΕ
 ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
 ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ
 ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
 ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
 ΕΠ' ΨΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΤΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
 ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΠΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
 ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
 ΔΟΥΛΩΝ, Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
 ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑ-
 ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
 ΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
 ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΣΙΝ ΕΠΑΥΡΑΤΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΑ-
 ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
 ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΡΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΩΣ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΚΤΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΡΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ, ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ, ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΡΗΜΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΕΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΨΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΡΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΩΤΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ, ΕΙΣ ΘΕΑΣ ΔΕ ΔΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΡΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΤΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΩΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ, ΕΦ' ΟΕΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΣΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ, ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΓΓΟΚΡΑΤΗΣ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Σύλβια Κριβάν
Διεύθυνση Κατοικίας: ██████████
T.K.: ██████████
Περιοχή: ██████████
Τηλ. Επικοινωνίας: ██████████
Κινητό: ██████████
e-mail: navirk@hotmail.com

Προσωπικά στοιχεία

Ημερομηνία γέννησης: 06.10.1979

Τόπος γέννησης: Μπρνο, Τσεχία

Οικογενειακή κατάσταση: άγαμη

Υπηκοότητα: ελληνική

- 13.02.2019 Επίτιμο μέλος του Royal College of Surgeons, Λονδίνο,
Ηνωμένο Βασίλειο (τελετή απονομής 9-10.07.2019)
- 01.08.2014 Άδεια τίτλου ιατρικής ειδικότητας Χειρουργικής, χορηγηθείσα
από τη Γενική Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας και
Κοινωνικής Μέριμνας, Τμήμα Υπηρεσιών Υγείας,
Περιφέρεια Αττικής, Αθήνα
- 06.08.2004 Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος, χορηγηθείσα
από τη Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Αθηνών-Πειραιώς, Ελλάδα

Ιατρική εκπαίδευση

- 20.07.2004 «Πτυχίο Ιατρικής», βαθμός 7,64 (Λίαν Καλώς)
- 10.1998-07.2004 Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο, Ελλάδα

Κλινική άσκηση

01.09.04-30.09.04	Τμήμα Ιατρικής, Brown University, Providence, Rhode Island, USA Κλινική άσκηση στη γενική χειρουργική
29.09.03-30.04.04	Πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών Erasmus Socrates στο University of Graz/ Medical University Graz, Austria Κλινική άσκηση σε Παιδιατρική, Γυναικολογία-Μαιευτική, Νευρολογία, Ψυχιατρική, Ωτορινολαρυγγολογία, Οφθαλμολογία, Ιατροδικαστική
01.08.03-31.08.03	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο, Ελλάδα Κλινική άσκηση στην Αγγειοχειρουργική
01.10.02-30.06. 03	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο, Ελλάδα Κλινική άσκηση σε Παθολογία, Καρδιολογία, Γαστρεντερολογία, Πνευμονολογία, Γενική Ιατρική, Ογκολογική Γενική Χειρουργική, Ουρολογία, Αναισθησιολογία
01.08.02-31.08.02	HeIMSiC (Hellenic Medical Students International Committee) Καλοκαιρινό πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών, Olomouc, Τσεχία (IFMSA) Κλινική άσκηση στην Γενική Χειρουργική

Μεταπτυχιακές σπουδές

- 01.02.2019-παρόν** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στην Ιατρική Εκπαίδευση
(Postgraduate Certificate in Medical Education)
University of Bedford, Ηνωμένο Βασίλειο
- 05.04.2012-παρόν** Υποψήφιος Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του
Πανεπιστημίου Αθηνών με στόχο την εκπόνηση
διδακτορικής διατριβής με τίτλο: “ΙΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TLRS ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΟ
ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΝΕΦΡΟΥΣ ΣΕ ΣΗΠΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΩΝ:
Πειραματική μελέτη”
- 01.11.2009-05.06.2013** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Άριστα (8,52)
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Πανεπιστημίου
Αθηνών με θέμα “Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική,
ρομποτική χειρουργική και τηλεχειρουργική”,
Καθηγητής Χειρουργικής Κος Χρήστος Π. Τσιγκρής

Προϋπηρεσία

- 06.05.2019-παρόν Επιστημονικός Συνεργάτης Γενικής Χειρουργικής
Εξειδίκευση στη Βαριατρική
Royal Derby Hospital, Uttoxeter Rd, Derby DE22 3NE, Ηνωμένο Βασίλειο
- 17.11.2015-03.05.2019 Επιστημονικός Συνεργάτης Γενικής Χειρουργικής
Εξειδίκευση σε Ανώτερο Πεπτικό και Βαριατρική
Luton and Dunstable Hospital, Lewsey Road, Luton, LU4 0DZ, Ηνωμένο Βασίλειο
- 01.03.2015-12.11.2015 Γενική Χειρουργός Συνεργάτης κ. Γ. Α. Σπηλιόπουλου
Κλινική «Ιατρικό Κέντρο Αθηνών», Περιστερί, Αθήνα, Ελλάδα

- 01.03.2014-28.02.2015 Ιατρός Γενικής Χειρουργικής σε παράταση παραμονής
Γ' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική-Αγγειοχειρουργική Μονάδα
Διευθυντής: Καθηγητής Αν. Μαχαίρας
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», Χαϊδάρι, Αθήνα, Ελλάδα
- 29.08.2008-28.02.2014 Ειδικευόμενη ιατρός Γενικής Χειρουργικής
Γ' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική-Αγγειοχειρουργική Μονάδα
Διευθυντής: Καθηγητής Αν. Μαχαίρας
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», Χαϊδάρι, Αθήνα, Ελλάδα
- 14.10.2013-14.02.2014 Κλινική άσκηση (Stage) με εκπαιδευτική άδεια στην
Κλινική Γενικής Χειρουργικής και Ήπατος-Χοληφόρων στο
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Ρεν, Γαλλία (CHU Rennes, France)
Διευθυντής: Prof. Karim Boudjema
- 18.09.2007-28.08.2008 Βοηθός χειρουργού, συνεργάτης κ. Γ. Α. Σπηλιόπουλου
Κλινική Λευκός Σταυρός Αθηνών
Παπαδιαμαντοπούλου 16 και Γ. Σισίνη 1, 115 28, Αθήνα
- 01.02.2008-28.08.2008 Εφημερεύουσα Ιατρός
Κλινική Λευκός Σταυρός Αθηνών
Παπαδιαμαντοπούλου 16 και Γ. Σισίνη 1, 115 28, Αθήνα
- 13.04.2006-17.09.2007 Ετήσια υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου και πέντε (5)
μήνες παράταση (αγροτικός ιατρός)
Κέντρο Υγείας Θήρας, Φηρά, Σαντορίνη, Κυκλάδες, Ελλάδα
- 13.01.2006-12.04.2006 Τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση σε Γενική
Χειρουργική και Παθολογία
Γενικό Νοσοκομείο Σύρου «Βαρδάκειο και Πρώιο»
Ερμούπολη, Σύρος, Κυκλάδες, Ελλάδα

01.07.2005-10.01.2006 Κλινική άσκηση στη Γενική Χειρουργική
Γ' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική-Αγγειοχειρουργική Μονάδα
Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Μ. Καρατζάς
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», Χαϊδάρη, Αθήνα, Ελλάδα

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

- 1. Laparoscopic repair of lumbar hernia, mini review and case presentation.**
Sylvia Krivan, Farhan Rashid. Hellenic Journal of Surgery (submitted for publication 28.05.2019)
- 2. Paraduodenal hernias: a systematic review of the literature.**
Schizas D., Apostolou K., **Krivan S.**, et al. Hernia (2019).
<https://doi.org/10.1007/s10029-019-01947-3>
- 3. Amyand hernia: a rare case report.**
Sylvia Krivan, Andrea Giorga, Omer Al-taan. Scientific Repository, Surgical Case Reports (2019) | ISSN 2613-5965. <http://dx.doi.org/10.31487/j.SCR.2019.02.013>
- 4. Increased expression of Toll-like receptors 2, 3, 4 and 7 mRNA in the kidney and intestine of a septic mouse model.**
Sylvia Krivan, Alkistis Kapelouzou, Stylianos Vagios, et al. Scientific reports (2019) 9:4010 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40537-2>
- 5. Concomitant Ventral Hernia Repair and Bariatric Surgery: A retrospective analysis from a United Kingdom based Bariatric Centre**
Sylvia Krivan, Andrea Giorga, Marco Barreca, Vigyan Jain, Omer Al-taan.
Surg Endosc. 2018 Oct 19. doi:10.1007/s00464-018-6492-6

6. **Ten-year survival outcome of patients with potentially operable gastric cancer.**

Anna Koumarianou, **Sylvia Krivan**, Nicholaos Machairas, et al. *Ann Gastroenterol* 2019; 32 (1): 1-8, DOI: <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0320>

7. **Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Complications and Short-Term Results.**

Sylvia Krivan, George Spiliopoulos, Christos Tsigkris, Nikolaos Nikiteas. *Hellenic Journal of Surgery* (2015) 87:5, 357-363, Epub 2015 Nov

8. **A retrospective study of treatments and outcome in gastric cancer patients: A report from a single institution.**

Anna Koumarianou, **Sylvia Krivan**, Pavlos Patapis, Evangelos Missiakos, et al. *Journal of Clinical Oncology*, 2014 ASCO Annual Meeting Abstracts. Vol 32, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2014: e15089, Epub 2014 Jun 11

9. **Minimally Invasive Oesophagectomy-Presentation of Our Technique.**

D. Bistarakis, **S. Krivan**, K. Petropoulos, A. Bakopoulos, V. Zymvragoudakis, T. Liakakos . *Hellenic Journal of Surgery* (2013) 85:5, 342-346. Epub 2013 Oct 9

10. **Fish-mouth appearance of the ampulla of Vater.**

Iosif Beintaris, Demetrios Polymeros, **Silvia Krivan**, Konstantinos Triantafyllou. *Annals of Gastroenterology* (2013) 26, 73

11. **Arteriovenous malformation of the pancreas.**

Charalabopoulos A, Macheras N, **Krivan S**, Petropoulos K, Misiakos E, Macheras A. *Case Reports in Medicine* 2011; 2011:612657. Epub 2011 Jul 6

12. **Endopancreatic bile duct cholangiocarcinoma in a patient with Peutz-Jeghers syndrome.**

Charalabopoulos A, **Krivan S**, Machairas N, Misiakos E, Machairas A. *HPB Surg.* 2011; 2011:364570. Epub 2011 Jun 13

Ανακοινώσεις, Αναρτήσεις Εργασιών

Προφορικές ανακοινώσεις

- 1. Λαπαροσκοπική Sleeve Γαστρεκτομή: περιγραφή της τεχνικής μας.**
IFSO 2015, 20^ο Παγκόσμιο Συνέδριο της Διεθνούς Ομοσπονδίας της Χειρουργικής της Παχυσαρκίας και των Μεταβολικών Διαταραχών, Hofburg Imperial Palace, Αυστρία, 26-29 Αυγούστου 2015
Σύλβια Κριβάν, et al.
- 2. Απόφραξη λεπτού εντέρου: αιτιολογία, διάγνωση και θεραπευτική προσέγγιση**
29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Φόρουμ 2014, Hilton, Αθήνα, Ελλάδα, 12-15 Νοεμβρίου 2014
Ε. Μισιακός, Σύλβια Κριβάν, et al.
- 3. Χειρουργικά αποτελέσματα και φυσική ιστορία της πρωκτικής σήψης σε παιδιά άνω των δυο ετών**
39ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 22-25 Μαΐου 2013
Α. Χαραλαμπόπουλος, Ν. Ζάβρας, Σ. Κριβάν, Κ. Κοπανάκης, Ε. Καπετανάκης, Κ. Ροδίτης, Δ. Σωτηρόπουλος, Α. Μαχαίρας
- 4. Βρεφικές περιπρωκτικές πυραμοειδείς προσεκβολές: περιγραφή δύο περιστατικών**
39ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 22-25 Μαΐου 2013
Ν. Ζάβρας, Σ. Κριβάν, et al.
- 5. Ταξινόμηση πρωκτικών συριγγίων σε ενήλικα άτομα του γενικού πληθυσμού**
39ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 22-25 Μαΐου 2013
Α. Χαραλαμπόπουλος, Κ. Κοπανάκης, Σ. Κριβάν, Ε. Καπετανάκης, Δ. Σωτηρόπουλος, Η. Τζέπη, Ν. Ζάβρας, Α. Μαχαίρας

6. Αγγειακό τραύμα άκρων

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Καρούκη Μαρία, Λάζαρης Ανδρέας, Μαστοράκη Σωτηρία, Σερέτης Κωνσταντίνος, Μπακόπουλος Ανάργυρος, **Κριβάν Σύλβια**, Ντόμη Βασιλεία, Αθανασιάδης Δημήτριος, Βασδέκης Σπύρος, Μαχαίρας Αναστάσιος

7. Χειρουργική Αντιμετώπιση μεσεντερίου ισχαιμίας. Επειρία πενταετίας 2007-2012

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Ροδίτης Κωνσταντίνος, Σχίζας Δημήτριος, Πετρόπουλος Κωνσταντίνος, **Κριβάν Σύλβια**, Μαστοράκη Σωτηρία, Μισιακός Ευάγγελος, Λάζαρης Ανδρέας, Μαχαίρας Αναστάσιος

8. Οι περιφερικές παρακάμψεις στα κνημιαία αγγεία σε ασθενείς με γάγγραινα του άκρου πόδα

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής, Αθήνα, Ελλάδα, 22-24 Μαΐου 2012

Λάζαρης Αν., Καρούκη Μ., Μαστοράκη Σ., Σερέτης Κ., Αθανασιάδης Δ., Μπακόπουλος Αν., **Κριβάν Σ.**, Σωτηρόπουλος Δ., Χαραλαμπόπουλος Αν., Πατάνης Π., Μαχαίρας Αν., Βασδέκης Σπ.

9. Χειρουργικές επεμβάσεις στην οξεία εκκολπωματίτιδα

37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 17-21 Μαΐου 2011

Α. Χαραλαμπόπουλος, Κ. Πετρόπουλος, Δ. Τσαπραλής, Δ. Σχίζας, **Σ. Κριβάν**, Π. Ξυλαρδιστός, Σ. Παπαγρηγοριάδης

10. Βασικά χαρακτηριστικά στα αμαρτώματα της παιδικής ηλικίας και η σημασία τους για το παιδί και την οικογένεια

37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 17-21 Μαΐου 2011

Ν. Ζάβρας, **Σ. Κριβάν**, Κ. Πετρόπουλος, Π. Ξυλαρδιστός, Δ. Σχίζας, Γ. Μαρτίκος, Α. Χαραλαμπίδης

11. Συσχέτιση ΣΔ τύπου II και δεικτών φλεγμονής

37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 17-21 Μαΐου 2011

Χ. Σαχ, **Σ. Κριβάν**, Α. Μαμζέρη, Χ. Κελίδης

12. Ασυμπτωματική λοίμωξη από H. Pylori ατόμων του πληθυσμού μας

36ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 4-8 Μαΐου 2010

Χ. Σαχ, **Σ. Κριβάν**, Α. Μαμζέρη, Χ. Κελίδης

13. Χειρουργική αντιμετώπιση νευροενδοκρινικού όγκου του ορθού

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροενδοκρινικών όγκων, Λουτράκι, Ελλάδα, 18-20 Σεπτεμβρίου 2009

Α.Χαραλαμπίδης, **Σ.Κριβάν**, Δ.Σχίζας, S.Papagrigroriadis

14. Ο ρόλος των βακτηριδίων που σχετίζονται με τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα στην αιτιολογία των λοιμώξεων του κατώτερου ουροποιητικού στην πρωτοβάθμια περίθαλψη

21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Χαλκιδική, Ελλάδα, 22-26 Απριλίου 2009

Χ.Σαχ, Α.Μαμζέρη, Α.Παρασχάκη, **Σ.Κριβάν**, Δ.Μίχας, Α.Σύρου, Ε.Στιλποπούλου, Χ.Κελίδης

15. Συμμόρφωση με την αντιπερτασική θεραπεία στη Σαντορίνη

14th WONCA Europe Regional Conference, Κωνσταντινούπολη, Τουρκία, 4-7 Σεπτεμβρίου 2008

Χ.Σαχ, Δ.Κολονιάρης, **Σ.Κριβάν**, Α.Σύρου, Π.Μπούρας, Ε.Ντόβις, Α.Μαμζέρη, Χ.Κελίδης

16. Κλινικοεργαστηριακή διερεύνηση και αντιμετώπιση της οξείας πυελονεφρίτιδας στο Κέντρο Υγείας Θήρας, Σαντορίνη

19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, (ΕΛΕΓΕΙΑ), Χερσόνησος Ηρακλείου Κρήτης, Ελλάδα, 11-15 Απριλίου 2007

Χ. Σαχ, Α. Μαμζέρη, **Σ. Κριβάν**, Δ. Κολονιάρης, Α. Σκαρπέλος, Κ. Μπίκου, Α. Παπανδρέου, Ε. Ντόβις, Χ. Κελίδης

Βιντεοπροβολές

1. Ελάχιστα επεμβατική οισοφαγεκτομή-παρουσίαση της τεχνικής μας

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Μπισταράκης Δημήτριος, **Κριβάν Σύλβια**, Πετρόπουλος Κωνσταντίνος, Μπακόπουλος Ανάργυρος, Ζυμβραγουδάκης Βασίλειος, Λιακάκος Θεόδωρος

2. Λαπαροσκοπική διαγαστρική εκτομή όγκου GIST καρδιοοισοφαγικής συμβολής

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Μπισταράκης Δημήτριος, Ντόμη Βασιλεία, **Κριβάν Σύλβια**, Μπακόπουλος Ανάργυρος, Πετρόπουλος Κωνσταντίνος, Λιακάκος Θεόδωρος

3. Αχαλασία οισοφάγου-Επανεπέμβαση στο ανώτερο πεπτικό

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Μπισταράκης Δημήτριος, Σωτηρόπουλος Δημήτριος, Σχίζας Δημήτριος, Ντόμη Βασιλεία, **Κριβάν Σύλβια**, Μπακόπουλος Ανάργυρος, Λιακάκος Θεόδωρος

Αναρτημένες ανακοινώσεις

1. **Retrospective analysis of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) success rate and complications**

EAES 2019, 27th International congress of the European Association for Endoscopy Surgery, Seville, Spain, 12-15.06.2019 (accepted for poster presentation)

Sylvia Krivan et al.

2. **Wilkie's syndrome or Superior Mesenteric Artery Syndrome: A case report.**

31st Panhellenic Surgical Conference and the International Surgical Forum, Athens, Greece, 21-24.11.2018

Sylvia Krivan, et al.

3. **Incidence of Laparoscopic Cholecystectomy post Bariatric Surgery.**

IFSO 2018, 23rd World Congress, Dubai World Trade Center- United Arab Emirates, 26-29.09.2018

Sylvia Krivan, et al.

4. **Amyand's hernia: A rare entity.**

EAES 2018, 26th International congress of the European Association for Endoscopy Surgery, ExCel London, UK, 30.05-01.06.2018

Sylvia Krivan, et al.

5. **Gastric Leak after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy.**

IFSO-EC 2018, 8th European Congress of IFSO, Megaron International Conference Center, Athens, Greece, 17-19.05.2018

Sylvia Krivan, et al.

6. **Concomitant Ventral Hernia Repair and Bariatric Surgery: A retrospective analysis**

IFSO 2017, 22nd World Congress, QEII Centre, London, UK, 29.08-02.09.2017

Sylvia Krivan, et al.

7. **A rare case with an intrahepatic accessory splenic cyst.**

IHPBA 2016, 12th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Sheraton WTC, Sao Paulo, Brazil, 20-23.04.2016

Sylvia Krivan, et al.

8. **Pancreatic Cystic Neoplasms-10year experience.**

IHPBA 2016, 12th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Sheraton WTC, Sao Paulo, Brazil, 20-23.04.2016

Sylvia Krivan, et al.

9. **Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: staple-line reinforcement and prevention of hemorrhage.**

IFSO 2015, 20th World Congress, Hofburg Imperial Palace, Austria, 26-29 August 2015

Sylvia Krivan, et al.

10. **Laparoscopic Sleeve Gastrectomy and benefits of this procedure.**

IFSO 2015, 20th World Congress, Hofburg Imperial Palace, Austria, 26-29 August 2015

Sylvia Krivan, et al.

11. **Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Complications and Short-Term Results.**

IFSO 2015, 20th World Congress, Hofburg Imperial Palace, Austria, 26-29 August 2015

Sylvia Krivan, et al.

12. **Gas Gangrene: Three uncommon locations treated with the Vacuum-Assisted Closure Technique**

99th Annual Clinical Congress 2013, American College of Surgeons, Washington DC, USA, 6-10 Οκτωβρίου 2013

Konstantinos Roiditis, Dimitrios Sotiropoulos, Evangelos Misiakos, Ira Tzepi, Nikolas Machairas, **Sylvia Krivan**, Paul Patapis, Nikolaos Zavras, Anastasios Machairas

13. **Metastatic squamous cell lung carcinoma to the pancreas. A rare case.**

10th E-AHPBA Διετές Συνέδριο, Βελιγράδι, Σερβία, 29-31 Μάιος 2013

Schizas D., Ntomi V., **Krivan S.**, Tsapralis D., Misiakos E., Zavras N., Machairas A.

14. **Η αμυλοείδωση του ήπατος ως σπάνιο αίτιο εμφάνισης ανώδυνου αποφρακτικού ικτέρου μετά λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή**

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Μισιακός Ευάγγελος, Ροδίτης Κωνσταντίνος, Σχίζας Δημήτριος, Πετρόπουλος Κωνσταντίνος, **Κριβάν Σύλβια**, Πατάπης Παύλος, Ζάβρας Νικόλαος, Μαχαίρας Αναστάσιος

15. **Παραγαγγλίωμα δωδεκαδακτύλου: σπάνιος νευροενδοκρινής όγκος**

28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012, Αθήνα, Ελλάδα, 21-24 Νοεμβρίου 2012

Κριβάν Σύλβια, Τσαπραλής Δημήτριος, Μισιακός Ευάγγελος, Σχίζας Δημήτριος, Τζέπη Ήρα-Μαρία, Ντόμη Βασιλεία, Μαχαίρας Αναστάσιος

16. **Παραεδρικά συρίγγια και αποστήματα της παιδικής ηλικίας**

37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 17-21 Μαΐου 2011

Α. Χαραλαμπόπουλος, Δ. Σχίζας, Κ. Πετρόπουλος, **Σ. Κριβάν**, Π. Ξυλαρδιστός, Α. Μαχαίρας, Ν. Ζάβρας

17. **Συσχετισμός λιθίασης και λοίμωξης ουροποιητικού συστήματος**

37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 17-21 Μαΐου 2011

Χ. Σαχ, Α. Μαμζέρη, **Σ. Κριβάν**, Χ. Κελίδης

18. **Εντοπισμένη νόσος Caroli με συνοδό ενδοηπατική λιθίαση**

27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, Αθήνα, Ελλάδα, 24-27 Νοεμβρίου 2010

Σ. Κριβάν, Δ. Σχίζας, Γ. Μαρτίκος, Π. Πατάπης, Κ. Πετρόπουλος, Α. Χαραλαμπίδης, Γ. Καρατζάς

19. **Gender-based treatment outcomes in diabetic hypertensive patients**

15th WONCA Europe 2009, Basel, Ελβετία, 16-19 Σεπτεμβρίου 2009

Χ.Κελίδης, Α.Μαμζέρη, Α.Σύρου, **Σ.Κριβάν**, Δ.Μίχας, Ε.Γογοδώνη, Χ.Σαχ

20. **Multiple modifiable risk factors for ischemic stroke in elderly**

15th WONCA Europe 2009, Basel, Ελβετία, 16-19 Σεπτεμβρίου 2009

Χ.Σαχ, Α.Σύρου, **Σ.Κριβάν**, Δ.Μίχας, Ε.Γογοδώνη, Α.Παρασχάκη, Χ.Κελίδης

21. **Πρόληψη του κινδύνου εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στον πληθυσμό της Σαντορίνης**

21^o Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Χαλκιδική, Ελλάδα, 22-26 Απριλίου 2009

Χ.Σαχ, Δ.Κολονιάρης, **Σ.Κριβάν**, Ε. Στυλιανοπούλου, Α.Ανδρέου, Δ.Μίχας, Χ.Δημητρίου, Χ.Κελίδης

22. **Risk factors related to coronary artery disease in Santorini island-Greece**

14th WONCA Regional Conference, Κωνσταντινούπολη, Τουρκία, 4-7 Σεπτεμβρίου 2008

Χ.Σαχ, Α.Σύρου, Δ.Μίχας, **Σ.Κριβάν**, Ε.Ντόβις, Χ.Κελίδης

23. **Outcome of ST segment elevated versus non-elevated acute myocardial infarction**

14th WONCA Regional Conference, Κωνσταντινούπολη, Τουρκία, 4-7 Σεπτεμβρίου 2008

Χ.Σαχ, Δ.Μίχας, Π.Μπούρας, Δ.Κολονιάρης, **Σ.Κριβάν**, Ε.Ντόβις, Χ.Κελίδης

24. **Significance of serum magnesium and electrolyte levels in acute myocardial infarction**

18th WONCA World Conference (18^o Παγκόσμιο Συνέδριο), Σιγκαπούρη, 24-27 Ιουλίου 2007

Χ. Σαχ, Α. Παπανδρέου, **Σ. Κριβάν**, Χ. Κελίδης

25. **Screening test μικρολευκωματινουρίας σε διαβητικούς ασθενείς**

19^o Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, (ΕΛΕΓΕΙΑ), Χερσόνησος Ηρακλείου Κρήτης, Ελλάδα, 11-15 Απριλίου 2007

Χ. Σαχ, Α. Παπανδρέου, Α. Μαμζέρη, **Σ. Κριβάν**, Δ. Κολονιάρης, Α. Σκαρπέλος, Κ. Μπίκου, Ε. Ντόβις, Χ. Κελίδης

Εκπαιδευτική προϋπηρεσία

1. Εξετάσεις OSCE βετών φοιτητών ιατρικής στο Ηνωμένο Βασίλειο
2. Καθημερινή διδασκαλία νεότερων γιατρών και φοιτητών ιατρικής κατά τη διάρκεια των πρωινών επισκέψεων σε κλινική εξέταση, λήψη ιστορικού, διαφορική διάγνωση, καθώς και ερμηνεία των ιατρικών αποτελεσμάτων και της περαιτέρω διαχείρισης των ασθενών.
3. Instructor, BLS/AED (Basic Life support/ Automatic External Defibrillator), European Resuscitation Council, Brussels, Belgium
4. BLS/AED provider εκπαιδευτικές συνεδρίες:
15 Μαρτίου 2009, Σαντορίνη, Εμπορείο, Ελλάδα
14 Μαρτίου 2009, δύο (2) συνεδρίες, Σαντορίνη, Εμπορείο, Ελλάδα
9 Δεκεμβρίου 2007, δύο (2) συνεδρίες, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα
8 Δεκεμβρίου 2007, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα
15 Ιουλίου 2007, Σαντορίνη, Κέντρο Υγείας Θήρας, Φηρά, Ελλάδα
14 Ιουλίου 2007, δύο (2) συνεδρίες, Σαντορίνη, Κέντρο Υγείας Θήρας, Φηρά, Ελλάδα
29 Μαΐου 2004, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

3 Αυγούστου 2003, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Ιούνιος 2003, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Μάιος 2003, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

5. Tutorials / Προφορική παρουσίαση σε συναδέλφους και φοιτητές ιατρικής:

16.12.2018 Ετήσια αποτελέσματα και επιπλοκές ERCP (audit)

19.05.2017 Βαριατρική Χειρουργική και ταυτόχρονη
αποκατάσταση κοιλιοκήλης (audit)

15.12.2016 Χειρουργική της Παχυσαρκίας

14.11.2016 Μετεγχειρητική φροντίδα

23.06.2016 Γαστρικός καρκίνος

13.05.2016 Καρκίνος οισοφάγου

19.02.2009 Εντερική και Παρεντερική Διατροφή

29.01.2009 Καρκίνος παγκρέατος

23.10.2008 Γαστρικός καρκίνος και καρκίνος της γαστροοισοφαγικής
συμβολής

6. Κλινική διδασκαλία, 3ο Χειρουργικό Τμήμα, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Αττικών

Σεπ 2008-Μάιος 2009 Σχέση ιατρού-ασθενούς, Δεοντολογία

Σεπ 2009-Μάιος 2010 Κλινική Εξέταση, Επείγουσα Ιατρική

Σεπ 2010-Μάιος 2011 Χειρουργική Ογκολογία και Παρηγορητική Χειρουργική

Σεπ 2011-Μάιος 2012 Χειρουργικές τεχνικές και επεμβάσεις

Σεπ 2012-Μάιος 2013 Σπάνιες περιπτώσεις, ανασκόπηση της διεθνούς
βιβλιογραφίας και της evidence based medicine

7. Κλινική διδασκαλία φοιτητών ιατρικής 4ου και 6ου έτους κατά τη διάρκεια
της κλινικής τους άσκησης στα πλαίσια της ειδικότητας και της εξειδίκευσης

Κάθε ακαδημαϊκό έτος από το 2008 διδασκαλία σε θέματα λήψης ιστορικού,
κλινικής εξέτασης, βασικών χειρουργικών αρχών, διαχείρισης και αντιμετώπισης

επειγόντων περιστατικών, διαφορικής διάγνωσης και ερμηνείας των εργαστηριακών και απεικονιστικών εξετάσεων

Εθελοντικές δραστηριότητες

1. Ιαν 2006-Απρ 2006 Ιατρική περίθαλψη και παροχή πρώτων βοηθειών σε τοπικά ποδοσφαιρικά παιχνίδια, Σύρος, Ελλάδα
2. Απρ 2006-Σεπ 2007 Ιατρική περίθαλψη και παροχή πρώτων βοηθειών σε τοπικά ποδοσφαιρικά παιχνίδια, Σαντορίνη, Ελλάδα
3. Μάι 2006-Σεπτ 2007 Μέλος ιατρικών ομάδων για την ενημέρωση του τοπικού πληθυσμού σε θέματα προληπτικής ιατρικής, στα πλαίσια της ιατρικής άσκησης υπαίθρου
4. Μάι 2006- Σημεία και συμπτώματα Σεξουαλικώς μεταδιδόμενων ασθενειών και αντισύλληψης
5. Ιούν 2006 Προληπτικός έλεγχος ενδοκρινικών διαταραχών με αναλύσεις αίματος και υπερηχογράφημα θυρεοειδούς αδένα
6. Ιαν 2007-Μάι 2007 Πληθυσμιακός έλεγχος για διαβήτη, αναιμία, καρκίνο και άλλες ασθένειες
7. Ιούλ 2007 Διδασκαλία ιατρών και τοπικού πληθυσμού σε BLS / AED, Σαντορίνη, Ελλάδα
8. Αύγ 2004 Εθελοντική Συμμετοχή στις ιατρικές υπηρεσίες, Ολυμπιακοί Αγώνες, Αθήνα, Ελλάδα
9. Απρ 2007 Μέλος της Ιατρικής ομάδας διάσωσης κατά την βύθιση του θαλάσσιου κρουαζιερόπλοιου Sea Diamond, υπεύθυνη για μεγάλο αριθμό περιστατικών τραυματισμού και ασφάλειας των επιβατών, καθώς επίσης συμμετοχή στη διαλογή και διαχείριση των ασθενών, Σαντορίνη, Ελλάδα
10. 01.05.12-30.06.12 Πρόεδρος της επιτροπής παροχής εξωσυμβατικών υλικών, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών, Αθήνα

Βραβεία/Υποτροφίες

13.02.2015 1ο βραβείο, ετήσια υποτροφία για εξειδίκευση στη γενική χειρουργική

Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία

13.02.2015 Βραβείο 3^{ης} θέσης, Ετήσιες Εθνικές Χειρουργικές Εξετάσεις

Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία

07.02.2014 Βραβείο 2^{ης} θέσης, Ετήσιες Εθνικές Χειρουργικές Εξετάσεις

Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία

08.02.2013 Βραβείο 2^{ης} θέσης, Ετήσιες Εθνικές Χειρουργικές Εξετάσεις

Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία

21-24.11.2012 Βραβείο καλύτερης παρουσίασης βίντεο, τίτλος: "Ελάχιστα επεμβατική οισοφαγεκτομή-παρουσίαση της τεχνικής μας"

28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2012

1.11.09-23.07.13 Υποτροφία για το μεταπτυχιακό με τίτλο: Ρομποτική Χειρουργική: "Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική επέμβαση, ρομποτική χειρουργική και τηλεχειρουργική"

Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή

Μέλος επιστημονικών εταιρειών

14 Δεκ 2018-παρόν Ενεργό μέλος της Αγγλικής Εταιρείας Ανωτέρου Πεπτικού/Παχυσαρκίας (BOMSS/AUGIS)

9 Ιουλ 2015-παρόν Ενεργό μέλος της Ελληνικής και Παγκόσμιας Χειρουργικής Εταιρείας Παχυσαρκίας (FSO / IFSO)

Ιούν 2015-παρόν Ενεργό μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης Ενδοσκοπικής Χειρουργικής και άλλων επεμβατικών τεχνικών, καθώς και της Ελληνικής Εταιρείας Ενδοσκοπικής Χειρουργικής και άλλων επεμβατικών τεχνικών (EAES και HAES)

4 Δεκ 2014 Τακτικό μέλος της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας

30.10.12-σήμερα Ενεργό μέλος της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας

Συνέδρια

Ετήσια παρακολούθηση και παρουσίαση αναρτημένων δημοσιεύσεων στα Διεθνή Συνέδρια IFSO και EAES

7 Μαρ 2018 16^ο Ετήσιο Διεθνές Οισοφαγογαστρικό Συμπόσιο.
RCS, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο

18 Μαρ 2016 15ο Συμπόσιο Bill Owen : Οισοφαγογαστρικός καρκίνος:
Γνωρίστε τους ειδικούς.
RCS, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο

10.2010-11.2015 Μηνιαία Εκπαιδευτικά Σεμινάρια
Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία, Αθήνα

19-21 Φεβρ 2015 Εργαστήριο για την περιτοναϊκή κακοήθεια
Ξενοδοχείο Divani Caravel, Αθήνα

19-20 Δεκ 2014 1ο σεμινάριο για την προηγμένη ανοικτή χειρουργική
Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία και Πειραματικό Ερευνητικό Κέντρο ΕΛΠΕΝ, Πικέρμι,
Αθήνα

15-16 Νοεμ 2014 1ο Προηγμένο Λαπαροσκοπικό Σεμινάριο Χειρουργικής
Στερεών Οργάνων
Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία και Πειραματικό Ερευνητικό Κέντρο ΕΛΠΕΝ, Πικέρμι,
Αθήνα

11-12 Ιουλ 2014 5ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Λαπαροσκοπικής
Χειρουργικής Ανωτέρου Πεπτικού
Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία και Πειραματικό Ερευνητικό Κέντρο ΕΛΠΕΝ, Πικέρμι,
Αθήνα

8-10 Νοεμ 2012 3ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο Προχωρημένης
Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής
Εκπαιδευτική Επιτροπή της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας, του 1ου
Χειρουργικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών και του Ερευνητικού και
Πειραματικού Κέντρου "ΕΛΠΕΝ", Πικέρμι, Αθήνα

11 Νοεμ 2011 Επίπεδο εμπειρογνομένων στην "Μεθοδολογία Ιατρικής
Έρευνας"
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών, Αθήνα

2 Νοεμ 2011 Επίπεδο εμπειρογνομένων σε "Συλλογή, Ανάλυση και
Στατιστική Αξιολόγηση Βάσεων Δεδομένων με Χρήση Στατιστικού Λογισμικού"
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών, Αθήνα

9-10 Απρ 2011 Μεταπτυχιακό Σεμινάριο Εντερικής και Παρεντερικής
Διατροφής "Ακαδημία Διατροφής"
Εκπαιδευτική Επιτροπή της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας, Αθήνα

22 Μαΐου 2009 Εργαστήριο "Αγγειακή πρόσβαση με καθοδήγηση με υπερήχους"

9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής και Διεθνές Φόρουμ, Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Μέγαρο Μουσικής, Αθήνα

4-8 Οκτ 2008 Εκπαιδευτικό Λαπαροσκοπικό Σεμινάριο "Λαπαροσκοπική συρραφή: Βασικό μάθημα, Ινομυωματεκτομή"

Ζαγορά 12, Αθήνα

10-11 Μαΐου 2008 Εκπαιδευτικό Λαπαροσκοπικό Σεμινάριο "Προηγμένη συρραφή"

Ζαγοράς 12, Αθήνα

Εκπαιδευτικά Σεμινάρια

7 Ιουλ 2017 Εργαστήριο Προχωρημένων Λαπαροσκοπικών Δεξιοτήτων (Barreca)

F Younis, O Al-taan

Luton and Dunstable Hospital, Luton, Ηνωμένο Βασίλειο

14 Σεπτ 2016 Εργαστήριο Προχωρημένων Λαπαροσκοπικών Δεξιοτήτων

F Younis, M Barreca

Luton and Dunstable Hospital, Luton, Ηνωμένο Βασίλειο

21 Δεκ 2013 Μαθήματα ATLS (Προηγμένη Υποστήριξης Ζωής στο Τραύμα) για Ιατρούς

ACS (American College of Surgeons), Ιατρική Σχολή, Αθήνα

23-25 Ιουν 2011 DSTC (Σεμινάριο οριστικής χειρουργικής επέμβασης τραυμάτων)

iatsic (διεθνής σύλλογος για χειρουργική επέμβαση τραυμάτων και εντατική φροντίδα), Αθήνα

Οκτ 2006 Παροχέας ATLS (Προηγμένη Υποστήριξη Ζωής στο Τραύμα)
ACS (American College of Surgeons)
Νοσοκομείο Mediterraneo, Αθήνα

Σεπτ 2004 Παροχέας ALS (Προηγμένη Υποστήριξη Ζωής)
ERC, Ελούντα, Κρήτη

Απρ 2003 Εκπαιδευτής BLS / AED
ERC, Ηράκλειο, Κρήτη

Ιαν 2003 Παροχέας BLS / AED
ERC, Ηράκλειο, Κρήτη

Ξένες Γλώσσες

1. Ελληνική: μητρική γλώσσα, γραπτώς και προφορικώς
2. Τσέχικη: μητρική γλώσσα, γραπτώς και προφορικώς
3. Αγγλική: άπταιστα, γραπτώς και προφορικώς (Certificate of Proficiency, University of Cambridge, άδεια επάρκειας και διδασκαλίας από 28.09.04) (IELTS Certificate από 25 Ιουλίου 2015 Μέσος όρος 8.5, Αριθμός πιστοποίησης 15GR003061KRIS005A)
4. Γερμανική: άριστα, γραπτώς και προφορικώς (Certificate of Mittelstufe Deutsch des Österreichischen Sprachdiploms Deutsch, ACTILINGUA Language Studies) Παρακολούθηση εντατικών σεμιναρίων διάρκειας 6 μηνών από τον Οκτώβριο του 2004 έως τον Μάρτιο του 2005, στο ABC-Bildungsinstitut στη Βιέννη της Αυστρίας
5. Γαλλική: επίπεδο A2, γραπτώς και προφορικώς (Diplome d'etudes en langue francaise, Delf A2, numero de diplome: 030001-201305J-2131889)

Προσωπικά ενδιαφέροντα και σχετικές δημοσιεύσεις

Συγγραφή Λογοτεχνίας και Ποίησης

Σύμβαση Πνευματικού Έργου με εκδοτικό οίκο Βασιλείου για το ιδιόχειρο λογοτεχνικό σύγγραμμα «Ηλέκτρα», Αθήνα, 26.10.2002 (κυκλοφόρησε το Μάρτιο 2007 με τίτλο «Άσ'τη να φύγει»)

Μέλος Ελληνικής Εταιρείας Ιατρών Λογοτεχνών (Ε.Ε.Ι.Λ.) από 17 Οκτωβρίου 2008

Συγγραφέας πεζού και ποιητικού κειμένου στην τοπική εφημερίδα “Αμπελιώνας”

Λογοτεχνία, Μουσική, Κινηματογράφος

Κολύμβηση, Ταξίδια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) είναι βασικοί ρυθμιστές της φυσικής και επίκτητης ανοσίας και εκφράζονται έντονα κατά τη διάρκεια της σηψαιμίας. Έτσι, η μελέτη της έκφρασης των TLRs σε ένα ζωικό μοντέλο σήψης μπορεί να υποδεικνύει την πιθανή τους συσχέτιση με την οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA) σε μια σηπτική κατάσταση.

Υλικό-Μέθοδοι: Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 72 αρσενικοί μύες C57BL/6J. Τυχαία, τα ζώα χωρίστηκαν σε 6 ομάδες (N = 12/ομάδα): 3 ομάδες ελέγχου και 3 σηπτικές ομάδες ανάλογα με το χρόνο ευθανασίας (24ώρες, 48ώρες και 72ώρες). Οι σηπτικές ομάδες υποβλήθηκαν σε διαδικασία απολίνωσης και διάτρησης του τυφλού με βελόνη (CLP) για την πρόκληση περιτονίτιδας, ενώ οι ομάδες ελέγχου υποβλήθηκαν σε πλασματική επέμβαση. Διεξήχθησαν αιματολογικές εξετάσεις στον ορό για ανίχνευση βιοδεικτών ανοσίας. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού (IF), της μορφομετρίας και της ποσοτικής αντίδρασης αλυσίδας πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) αξιολογήθηκαν σε νεφρικούς και εντερικούς ιστούς για την έκφραση των TLR 2, 3, 4 και 7 κατά τη διάρκεια της σήψης.

Αποτελέσματα: Στο τέλος κάθε πειραματικής περιόδου, διαπιστώσαμε ότι οι TLRs 2, 3, 4 και 7 εκφράζονται και στους δύο ιστούς με διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και μεταξύ των χρονικών σημείων. Επίσης βρήκαμε ότι τα επίπεδα του mRNA ήταν σημαντικά υψηλότερα στην αξιολόγηση της qRT-PCR στις σηπτικές ομάδες από ό,τι στις ομάδες ελέγχου τόσο στους νεφρούς όσο και στους εντερικούς ιστούς, παρουσιάζοντας μια σταθερή αύξηση στις σηπτικές ομάδες καθώς ο χρόνος ευθανασίας παρατείνεται ($p < 0,05$).

Συμπέρασμα: Συνολικά, η μελέτη μας υποστηρίζει ότι η έκφραση των TLRs 2, 3, 4 και 7 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους νεφρούς των σηπτικών μυών και ειδικότερα ότι αυτοί οι TLRs είναι ευαίσθητοι και ειδικοί δείκτες για τη σηψαιμία. Επίσης, η μελέτη μας ενισχύει τη διαγνωστική σημασία των TLRs στην ONA και

παρέχει νέα δεδομένα για αυτούς σε μοντέλα σηπτικών μυών και κατά επέκταση στην ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (MODS).

Λέξεις-κλειδιά: σήψη, νεφρός, υποδοχείς TLR, MODS

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Background: Toll-like receptors (TLRs) are key regulators of innate and adaptive immunity and are highly expressed during sepsis. Thus, studying the expression of TLRs in an animal septic model might indicate their possible association with acute kidney injury (AKI) in sepsis.

Methods: Seventy-two male C57BL/6J mice were used for this study. Randomly, these animals were divided into 6 groups (N=12/group): 3 control and 3 septic groups depending on the euthanasia time (24h, 48h, 72h). Septic groups underwent cecal ligation and puncture (CLP) to induce peritonitis, while control groups had a sham operation. Hematological tests were performed in serum for immune biomarkers; immunofluorescence (IF), morphometry and qRT-PCR analysis was used on both kidney and intestine tissues to evaluate the expression of TLRs 2, 3, 4 and 7 in a septic process.

Results: At the end of each experimental period, we found that TLRs 2, 3, 4 and 7 were expressed in both tissues but there were differences between those at various time points. Also, we found that mRNA levels were significantly higher in qRT-PCR evaluation in septic groups than control groups in both kidney and intestinal tissues; showing a steady increase in the septic groups as time to euthanasia was prolonged ($p < 0.05$).

Conclusion: Overall, our study provides a suggestion that TLRs 2, 3, 4 and 7 are highly increased in the kidneys of septic mice and especially, that these TLRs are sensitive and specific markers for sepsis. Finally, our study supports the diagnostic importance of TLRs in AKI and provides new data about them in septic mice models and in multi organ dysfunction syndrome (MODS) in general.

Keywords: sepsis, kidney, TLR, MODS

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ακρωνύμιο	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
ACCP	American College of Chest Physicians	Αμερικανική Ακαδημία Ιατρών του Θώρακα
AKIN	Acute Kidney Injury Network	Οργάνωση ΟΝΑ
ALT	Alanine aminotranferase	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
ALP	Alkaline phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση
ΑΠ		Αρτηριακή Πίεση
APC	Antigen-Presenting Cell	Αντιγόνο-παρουσιαστικό κύτταρο
AP-1	Activator Protein 1	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης 1
aPPT	Activated Partial Thromboplastin Time	Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Ανεπάρκειας
AST	Aspartate aminotransferase	Ασπαρτική τρανσαμινάση
AT	Antithrombin	Αντιθρομβίνη
B cells	B lymphocytes	B λεμφοκύτταρα
BP	Binding Protein	Δεσμευτική πρωτεΐνη
°C	Celcius degree	Βαθμός Κελσίου
C group	Control group	Ομάδα ελέγχου
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome	Αντισταθμιστική Αντιφλεγμονώδης Απάντηση
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis	Πρόκληση περιτονίτιδας με χρήση ενδοπρόθεσης στο ανιόν κόλον
CD14, 36, 48, 64	Cluster of Differentiation glycoproteins	Ενσωματωμένες μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
CKD	Chronic Kindey Disease	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ)
CLP model	Ceacal Ligation and Puncture	Απολίνωση τυφλού και διάτρηση ενδογενούς προστατευτικού φραγμού
cm	centimetre	Εκατοστό
CpG DNA	Cytidine-phosphateguanosine-DNA	Κυτιδίνη-φωσφατογουανοσίνη DNA
CpG ODN	Cytidine-phosphateguanosine Oligodeoxynucleotide	Κυτιδίνη-φωσφατογουανοσίνη Ολιγονουκλεοτίδιο
CR	Creatinine	Κρεατινίνη

CREB	cAMP Response Element Binding	Πρωτεΐνη δέσμησης στοιχείων κυκλικής AMP
CRP	C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
Ct	Threshold Cycle	Κατώφλι κύκλου
CXCL8 (IL-8)	chemokine (CXC motif) ligand 8	Ιντερλευκίνη-8
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	3,3'-Διαμινοβενζιδίνη
DAMPs	Danger or Damage Associated Molecular Patterns	Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με κίνδυνο ή βλάβη
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	
Dbil (D.B)	Direct bilirubin	Άμεση χολερυθρίνη
DC	Dendritic Cells	Δενδριτικά κύτταρα
ddH₂O	Sterile ultra-pure water	
DEAF1	Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1	Παραμορφωμένος επιδερμικός αυτορυθμιστικός παράγοντας 1
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Πυροκαρβονικό διαιθύλιο
dH₂O	Distilled water	Απεσταγμένο νερό
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation	Διάχυτη Ενδοαγγειακή Πήξη (ΔΕΠ)
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Dock2	Dedicator of cytokinesis 2	Υπεύθυνος κυτοκίνης 2
DPX	Di-n-butyl Phthalate	Δι-n-βουτυλο-φθαλάτης
dsDNA	Double strand DNA	Διπλής έλικας DNA
DTT	Dithiothreitol	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ενζυμική Ανοσοπροσοφητική Ανάλυση
EP-PCR	End-point PCR	Τελικού σημείου PCR
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase	Εξωκυττάρια κινάση ρυθμιζόμενη από σήματα
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine	Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Ιατρικής Περίθαλψης
ESRD	End Stage Renal Disease	Τελικό στάδιο νεφρικής νόσου
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
FADD	Fas-associated protein with death domain	Fas-συνδεδεμένη πρωτεΐνη με πεδίο θανάτου
FAS (FasR) or APO-1 (APT)	Apoptosis antigen 1	Αντιγόνο απόπτωσης 1
FasL	FAS ligand	FAS συνδέτης

FSL1	Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1	Λιποπεπτίδιο που ενεργοποιεί ινοβλάστες 1
G	Guanine	Γουανίνη
g	gram	Γραμμάριο
g	Gravitational force (relative centrifugal)	Δύναμη βαρύτητας
GAC	Glycosaminoglycans	Γλυκοσαμινογλυκάνες
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική διυδρογενάση
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidase	Γάμμα-γλουταμινική τρανσφεράση
gp96	Heat shock protein	Μέλος οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ 90
h	Hours	Ώρες
H₂O₂	Hydrogen peroxidase	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
ΗΠΑ		Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
HCMV	Human Cytomegalovirus	Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός
HCO₃⁻	Bicarbonate (hydrogen carbonate)	Διττανθρακικό
ΗΕΓ		Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1	Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας-1
H&E	Haematoxylin & Eosin stain	Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen-DR isotope	Ανθρώπινο Αντιγόνο Λευκοκυττάρων-DR ισότοπος
HSV	Herpes Simplex Virus	Ανθρώπινος Απλός Ερπητοϊός
HumaTrol N	Lyophilized bovine serum (normal range)	Φυσιολογικός βόειος ορός
HumaTrol P	Lyophilized bovine serum (abnormal range)	Παθολογικός βόειος ορός
IB	NF-B Inhibitor	Αναστολέας NF-B
ICU	Intensive Care Unit	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ)
IF	Immunofluorescence	Ανοσοφθορισμός
IFN-γ	Interferon γ	Ιντερφερόνη γ
IgG	Immunoglobulin- G	Ανοσοσφαιρίνη-G
IIBEAA	BRFAA	Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών
IκB	I kappa B kinase	Ι καππα Β κινάση
IHC	Immunohistochemistry	Ανοσοϊστοχημεία

IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	Αναστολέας κινάσης NF-κB
IL1β,4,6,10,18	Interleukin-1β,-4,-6,-10,-18	Ιντερλευκίνη-1β,-4,-6,-10,-18
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase	Κινάση σχετιζόμενη με υποδοχέα IL-1
IRF	Interferon-Regulatory Factor	Ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης
JNK	c-Jun N-terminal kinases	c-JUN N-τελική κινάση
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes	Νεφρική Νόσος: Βελτίωση παγκόσμιων αποτελεσμάτων
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1	
K63	Lysine 63 ubiquitin chains	Λυσίνη 63 αλυσίδων ουβικουΐτινης
LBP	LPS Binding Protein	Πρωτεΐνη δέσμησης λιποπολυσακχαρίτη LPS
LPS model	Bolus injection of toxin e.g. lipopolysaccharide	Εγχυση ενδογενούς τοξίνης
LPS	Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
LRO	Lysosome related organelles	Λυσοσώματα
LRR	Leukine-Rich Repeats	Επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη
lt/ml	litre/milliliter	λίτρο/μιλλίτερ
LTA	Lipoteichoic acid	Λιποθεικό οξύ
LY	Lymphocytes	Λεμφοκύτταρα
M (MO)	Monocells/Macrophages	Μονοκύτταρα/Μακροφάγα
MAL	MyD88 Adaptor-Like	MyD88 προσαρμοστής
MALP2	Activating Macrophages Lipopeptide 2	Λιποπεπτίδιο 2 που ενεργοποιεί μακροφάγα
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MEK)
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase	MAP κινάση κινάση κινάση
MAS	Macrophage-Activation Syndrome	Σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων
MC	Mesangial Cells	Κύτταρα αγγύλης (μεσαγγειακά κύτταρα)
MC	Mastocells	Μαστοκύτταρα
MD2	Myeloid Differentiation protein 2	Μυελοειδής πρωτεΐνη διαφοροποίησης 2
ΜΕΘ		Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

mg/kg	milligram per kilogram	χιλιογραμμάριο ανά κιλογραμμάριο
mg/dL	milligram per deciliter	χιλιογραμμάριο ανά δέκατο λίτρου
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor	Ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων
ml	milliliter	Χιλιοστόλιτρο
μl	microliter	Μικρόλιτρο
μm	micrometer	Μικρόμετρο
mmHg	millimeter of mercury	χιλιοστά στήλης υδραργύρου
MMLV	Murine Leukemia Virus transcriptase	Αντίστροφη τρανσκριπτάση MMLV
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome	Σύνδρομο Πολυ-Οργανικής Ανεπάρκειας
mol/l	mole per liter	
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
MTAL	Medullary Thick Ascending Limb	Μυελική μοίρα παχέος ανιόντος σκέλους
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88	Μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88
nd	non detectable	μη ανιχνεύσιμο
NEMO (IKKγ)	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	Αναστολέας κινάσης NF-κB
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	Πυρηνικός παράγοντας ενισχυτή κάπα λεπτής αλύσου ενεργοποιημένων Β κυττάρων
ng/ml	nanogram per milliliter	Νανογραμμάριο ανά χιλιοστόλιτρο
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin	Σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων
NHE	Sodium-Hydrogen Exchanger	Εναλλάκτης νατρίου-υδρογόνου
NK	Natural Killer cells	Κύτταρα φυσικοί φονείς
NO	Nitric Oxide	Νιτρικό οξείδιο
NRF2 (NFE2L2)	Nuclear Factor (erythroid-derived-2)-like 2	Πυρηνικός παράγοντας (προερχόμενος από ερυθροειδή) τύπου 2
O₂	Oxygen	Οξυγόνο
ONA		Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια
o/n	overnight	Διανυκτέρευση
p-value	probability (statistical significance)	Στατιστική σημαντικότητα

P38	p38 MAP kinase	Κινάση της ομάδας MAP
PaCO₂	Partial pressure of carbon dioxide	Μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα
PAF	Platelet Activating Factor	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	Μοριακά πρότυπα παθογόνων
Pam3Cys	Synthetic binder of TLR2 lipopeptide	Συνθετικός συνδέτης του TLR2
PBS	Phosphate Buffer Solution	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
PCI model	Peritoneal Contamination and Infection	Μοντέλο εξωγενούς χορήγησης βιώσιμων παθογόνων με επακόλουθη περιτοναϊκή μόλυνση
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PCT	Procalcitonin	Προκαλσιτονίνη
pDC	plasmacytoid Dendritic Cells	Πλασματοκυτοειδή δενδριτικά κύτταρα
PFA	Paraformaldehyde	Παραφορμαλδεύδη
pg/ml	picogram per milliliter	πικογραμμάριο ανά χιλιοστόλιτρο
PGN	Peptidoglycan	Πεπτιδογλυκάνη
pH	potential of Hydrogen	Ενεργός οξύτητα
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	Φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη 3 κινάση
PIRO	Predisposition, Infection/Insult, Response, Organ dysfunction	Προδιάθεση, Λοίμωξη, Απόκριση, Ανεπάρκεια
pM	Affinity binding IL18+BP	Συγγένεια δέσμευσης IL-18+BP
PPAR_γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	υποδοχέας γ ενεργοποιούμενος από πολλαπλασιαστή υπεροξειδάσης
PRRs	Pattern Recognition Receptors	Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων δομών
PT	Prothrombin Time	Χρόνος προθρομβίνης
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR	Αντίδραση αλυσίδας πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment	Ταχεία Αξιολόγηση Διαδοχικής Ανεπάρκειας Οργάνων
r²	r-squared method	Έλεγχος καλής προσαρμογής
RBC	Red Blood Cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια

RBF	Renal Blood Flow	Νεφρική ροή αίματος
sCr	serum Creatinine	Κρεατινίνη ορού
RIP1	Receptor-Interacting serine/threonine Protein 1	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα 1
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage kidney disease	Κίνδυνος, Βλάβη, Ανεπάρκεια, Απώλεια οργάνου και Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου
rpm (r/m)	revolutions per minute	Περιστροφή ανά λεπτό
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
ROS	Reactive Oxygen Species	Αντιδραστικά είδη οξυγόνου
RQ1	RNA Qualified	
RSV	Respiratory Syncytial Virus	Πρωτεΐνη σύντηξης αναπνευστικού συγκυτιακού ιού
RT	Room Temperature	Θερμοκρασία δωματίου
S group	Septic group	Ομάδα σήψης
SCCM	Society of Critical Care Medicine	Εταιρεία Κρίσιμης Ιατρικής Περίθαλψης
sCr	serum Creatinine	Κρεατινίνη ορού
SD	Standard Deviation	Τυπική Απόκλιση
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome	Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης
sNGAL	serum NGAL	Σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων ορού
ssRNA	Single strand RNA	RNA μονής έλικας
T cells	T lymphocytes	T λεμφοκύτταρα
TAB	TAK binding protein	Πρωτεΐνη δέσμησης TAK
TAK	Transforming growth factor beta-Activated Kinase	β-ενεργοποιημένη κινάση μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα
Tbil (T.B)	Total bilirubin	Ολική χολερυθρίνη
TBK	Serin/Threonin protein kinase or TANK Binding Kinase	Κινάση σύνδεσης TANK ή σερίνης/θρεονίνης
TEΠ		Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών
TEC	Tubular Epithelial Cells	Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα
TGF-β	Transforming Growth Factor β	Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας βήτα
Th	T helpers	T βοηθητικά κύτταρα
TIR	Toll-IL1 Receptor	Ενδοκυττάριος Toll / IL-1 υποδοχέας

TLRs	Toll-Like Receptors	Υποδοχείς τύπου Toll
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα
T.P	Total Protein	Ολική πρωτεΐνη
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1	Υποδοχέας ενεργοποίησης που εκφράζεται στα μυελοειδή κύτταρα-1
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor	Παράγοντας σχετιζόμενος με τον υποδοχέα του TNF
TRAM (TICAM2)	TRIF Related Adaptor Molecule	Μόριο προσαρμογέα σχετιζόμενο με TRIF
TRI	Trizol reagent	Αντιδραστήριο της Trizol
TRIF (TICAM1)	TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β	Περιοχή TIR που περιέχει πρωτεΐνη προσαρμογής που προκαλεί INF-β
Tween20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate	
U	Unit	Μονάδα
U	Uridine	Ουριδίνη
U/L	Units per Liter	μονάδες ανά λίτρο
U/μg	Unit per microgram	μονάδα ανά μικρογραμμάριο
U.A	Uric Acid	Ουρικό οξύ
UBC13	Ubiquitin conjugating enzyme E2 13	Ενζυμο σύζευξης E2-ουβικουϊτίνης
uNGAL	urine NGAL	Σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων ούρων
UR	Urea	Ουρία
UVV1A	Ubiquitin conjugating enzyme E2	Ενζυμο σύζευξης E2-ουβικουϊτίνης
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1	Μόριο 1 προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
WBC	White Blood Cells	Λευκά αιμοσφαίρια
XNA		Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΣΗΨΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ

Η «σήψη» είναι μια λέξη που προέρχεται από την αρχαία ελληνική και δηλώνει τη βακτηριακή αποσύνθεση των ζωικών ή φυτικών οργανικών υλικών. Ανευρίσκεται στα ομηρικά έπη με το ρήμα «σήπω», που σήμαινε αποσυντίθεται. Η κλινική εκδήλωση της σήψης ήταν ήδη γνωστή από τον Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.). Ο όρος χρησιμοποιήθηκε από τον Αριστοτέλη, τον Πλούταρχο και τον Γαληνό και έχει διατηρηθεί σχεδόν अपαράλλακτος μέχρι σήμερα^{1,2,3}. Ο Αβικέννας (980-1037 μ.Χ.) παρατήρησε ότι η σηψαιμία συνοδευόταν συνήθως από πυρετό. Ωστόσο, μόλις τον 18ο αιώνα συνδέθηκε η αποσύνθεση με την παρουσία βακτηριδίων και μικροοργανισμών από τον Louis Pasteur. Ο Ignaz Semmelweis παρατήρησε ότι τα μέτρα υγιεινής μείωσαν τη γυναικεία θνησιμότητα κατά τον τοκετό. Το 1914, τέθηκαν τα θεμέλια για έναν σύγχρονο ορισμό της σηψαιμίας από τον Hugo Schottmüller, ο οποίος αναφέρει την παρουσία λοίμωξης ως αναπόσπαστο συστατικό της νόσου. Δεκαετίες αργότερα, ο Lewis Thomas διαδίδει τη θεωρία ότι «... είναι η απάντηση του υποδοχέα ... που κάνει την ασθένεια»⁴. Αυτή η θεωρία πυροδότησε πειραματικές και κλινικές μελέτες, οι οποίες τελικά μετατόπισαν την εστίαση της έρευνας της σήψης από τον λοιμώδη παράγοντα στην ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Ο William Osler (1849-1919) ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε ότι: «εκτός από λίγες περιπτώσεις, ο ασθενής φαίνεται να πεθαίνει από την απάντηση του οργανισμού στη μόλυνση και όχι από τη μόλυνση»⁵.

Τέλος, ο Roger Bone και οι συνεργάτες του όρισαν τη σηψαιμία ως ένα σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της μόλυνσης^{6,7}.

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η σήψη είναι ένα από τα ακριβότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως, με κόστος άνω των 20 δισεκατομμυρίων δολαρίων στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ)⁸. Πρόκειται για μία από τις πλέον διαδεδομένες αιτίες θνησιμότητας στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Η επίπτωσή της αυξάνεται, και ήδη στην πάροδο των τελευταίων 10 ετών διπλασιάστηκε⁹. Τα ποσοστά

θνησιμότητας από σήψη ανέρχονται στο 28.3% στην Αμερική και 41% στην Ευρώπη, ενώ μια πολυκεντρική μελέτη σε Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία έδειξε παραδόξως μείωση στο 18-20%^{10,11,12,13,14}.

Η σηψαιμία είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας και η κύρια αιτιολογία εισαγωγής στη ΜΕΘ^{15,16}. Η επίπτωσή της αυξάνεται σταδιακά λόγω πολλών παραγόντων. Μερικοί από αυτούς είναι η καλύτερη πρόληψη και η παράταση του προσδοκώμενου ορίου θνητότητας¹⁷. Οι εισαγωγές στο νοσοκομείο λόγω σήψης έχουν ξεπεράσει τους ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο καθώς και έμφραγμα του μυοκαρδίου¹⁸. Παρά την πρόοδο στην αντιμετώπισή της, η θνησιμότητα της σήψης παραμένει υψηλή την τελευταία 20ετία, αγγίζοντας το 30-40% σε περίπτωση σηπτικού σοκ, που αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της και αντικατοπτρίζει την κύρια αιτία θανάτου στη ΜΕΘ¹⁹.

1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΣΗΨΗΣ

Η σηψαιμία ορίστηκε ως η «*απειλητική για τη ζωή δυσλειτουργία οργάνου που προκαλείται από μια μη ρυθμισμένη απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη*»^{20,21}. Ο ξενιστής αντιδρά στο εισβάλλον παθογόνο με ποικίλους τρόπους^{22,23,24}. Η προφλεγμονώδης απόκριση μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια αντιρροπιστική αντιφλεγμονώδης αντίδραση. Όταν η φλεγμονή επιλυθεί γρήγορα, προκύπτει ίαση και καταπολέμηση της φλεγμονώδους εξεργασίας. Ωστόσο, σε πολλούς ασθενείς, η αντιφλεγμονώδης απάντηση παραμένει και οδηγεί σε κατάσταση ανοσοκαταστολής, που σχετίζεται με δευτερογενείς λοιμώξεις και συνεπώς αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα²⁵.

Μεταξύ των προδιαθεσικών παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν σήψη, ανήκουν κυρίως η παρατεταμένη παραμονή ασθενών στη ΜΕΘ, ο αυξανόμενος ηλικιωμένος πληθυσμός, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος από κακοήθεις νόσους και η επιθετική τους θεραπεία, οι αυξανόμενες μεταμοσχεύσεις και η χρήση συναφών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, οι επεμβατικές τεχνικές, η αντοχή στα αντιβιοτικά και οι ενδο- ή εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις^{26,27}.

Οι ορισμοί της σήψης, της σοβαρής σήψης και του σηπτικού σοκ προτάθηκαν σε διεθνείς διασκέψεις που πραγματοποιήθηκαν το 1991, το 2001 και πρόσφατα το

2016 (Πίνακας 1.3). Οι κατευθυντήριες γραμμές παρέχουν αποτελεσματική αξιοποίηση των επίκαιρων γνώσεων^{28,29}.

Πίνακας 1.3: Ορισμός SIRS, σήψης, σοβαρής σήψης και σηπτικού σοκ
(Τροποποίηση από Kent Doi et al, Oct 2009)

Ορισμοί σήψης	
Πάθηση	Περιγραφή
SIRS	2 ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια: θερμοκρασία <36°C ή >38°C Καρδιακή συχνότητα >90σφυγμοί/λεπτό Αναπνευστική συχνότητα >20αναπνοές/λεπτό ή PaCO ₂ <32mmHg Λευκά αιμοσφαίρια>12000/mm ³ ή <4000/mm ³ ή >10% άωρες μορφές
Σήψη	SIRS ως απάντηση σε τεκμηριωμένη λοίμωξη (καλλιέργεια ή χρώση Gram αίματος, πτυέλων, ούρων ή φυσιολογικά αποστειρωμένου σωματικού υγρού θετικού για παθογόνους μικροοργανισμούς ή εστία λοίμωξης που προσδιορίζεται οπτικά)
Σοβαρή σήψη	Σηψαιμία και τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες ενδείξεις υποάρδευσης ή δυσλειτουργίας οργάνων: περιοχές κυάνωσης δέρματος, τριχοειδική επαναπλήρωση >3δευτερόλεπτα, διούρηση <0.5ml/kg για τουλάχιστον 1 ώρα ή αιμοκάθαρση, γαλακτικό οξύ >2mmol/l, απότομη αλλαγή στην ψυχική κατάσταση ή μη φυσιολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (HEΓ), αριθμός αιμοπεταλίων <100.000 κύτταρα/ml ή διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (DIC), οξεία πνευμονική βλάβη/ARDS και καρδιακή δυσλειτουργία (ηχοκαρδιογραφία)
Σηπτικό σοκ	Σοβαρή σήψη και μία από τις ακόλουθες καταστάσεις: συστηματική μέση αρτηριακή πίεση (ΑΠ) <60mmHg (<80mmHg σε προϋπάρχουσα υπέρταση) μετά από 20-30ml/kg αμυλοειδούς διαλύματος ή 40-60ml/kg κρυσταλλοειδούς διαλύματος ή πνευμονική τριχοειδική πίεση ενσφηνώσεως 12-20mmHg και ανάγκη για ντοπαμίνη >5μg/kg/min ή νορεπινεφρίνη/επινεφρίνη <0,25μg/kg/min για να διατηρηθεί η μέση ΑΠ >60mmHg (>80mmHg σε προϋπάρχουσα υπέρταση)

Η Εκστρατεία Επιβίωσης από Σήψη δημοσιεύει από τη δεκαετία του 2000 κατευθυντήριες γραμμές θεραπείας με βάση τους ορισμούς της σήψης και στόχο τη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας³⁰. Η τέταρτη αναβαθμισμένη κατευθυντήρια γραμμή δημοσιεύθηκε πρόσφατα για να βελτιώσει τα αποτελέσματα³¹.

Η πολυπλοκότητα της νόσου είναι υπεύθυνη για τη δυσκολία στη διάγνωση της. Απώτερος σκοπός είναι η λεπτομερής κατανόηση της παθοφυσιολογίας που επιτυγχάνεται με συνεχή πρόοδο σε ποικίλους τομείς τόσο της ιατρικής όσο και της τεχνολογίας. Πρόσφατα, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρήθηκε απότοκος της σήψης^{32,33}. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαία η ύπαρξη αξιόπιστων και έγκυρων κριτηρίων διάγνωσης καθώς και η διαρκής αναθεώρησή τους³⁴.

1.4 ΠΑΛΑΙΟΤΕΡΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

1.4.1 ΣΗΨΗ 1

Το 1991, στο Σικάγο, η Εταιρεία Κρίσιμης Ιατρικής Περίθαλψης (SCCM) και η Αμερικανική Ακαδημία Ιατρών του Θώρακα (ACCP) όρισαν τη σηψαιμία ως μια «*συνεχιζόμενη διαδικασία*»³⁵. Η σήψη ισοδυναμούσε με δύο ή περισσότερα κριτήρια SIRS, επιπλέον της γνωστής ή υποπτευόμενης λοίμωξης (Πίνακας 1.4.1), ενώ η σοβαρή σήψη ορίστηκε ως κλινική σήψη συνοδευόμενη από δυσλειτουργία οργάνου, υποάρδευση ή υπόταση. Κατά επέκταση, στο σηπτικό σοκ παρατηρείται ταυτόχρονη συμμετοχή πολλαπλών οργάνων (καρδιαγγειακό, νεφρικό, αναπνευστικό, ηπατικό, αιματολογικό, κεντρικό νευρικό σύστημα, ανεξήγητη μεταβολική οξέωση και άλλα). Το σηπτικό σοκ ορίστηκε ως υπόταση μη ανταποκρινόμενη σε ενδοφλέβια χορήγηση υγρών/αγγειοσυσπαστικών και υποάρδευση.

Πίνακας 1.4.1: Η σήψη ορίζεται ως SIRS, με λοιμώδεις αίτιο³⁶. (Τροποποίηση από Daniel Remick, May 2007)

Κριτήρια για το σύνδρομο συστημικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Αμερικανικό Κολλέγιο Πνευμονολόγων/ Κοινότητα Ιατρικής Περίθαλψης βαρέως πασχόντων)

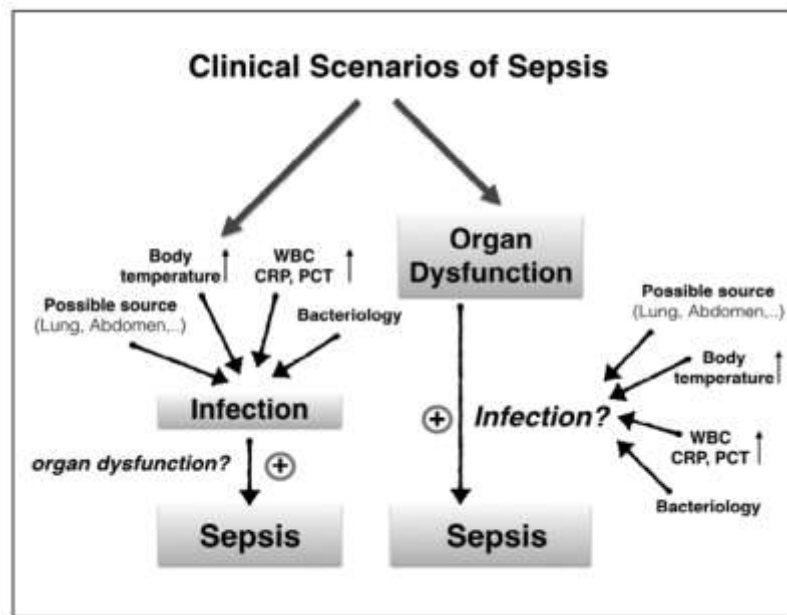
2 ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια:

6. θερμοκρασία $<36^{\circ}\text{C}$ ή $>38^{\circ}\text{C}$
7. καρδιακή συχνότητα >90 σφυγμοί/λεπτό
8. αναπνευστική συχνότητα >20 αναπνοές/λεπτό ή $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$ ή ανάγκη μηχανικού αερισμού
9. λευκά αιμοσφαίρια $>12000/\text{mm}^3$ ή $<4000/\text{mm}^3$ ή $>10\%$ άωρες μορφές

1.4.2 ΣΗΨΗ 2

Το 2001, η SCCM, η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Ιατρικής Περίθαλψης (ESICM), η ACCP, η Αμερικανική Εταιρεία Θωρακοχειρουργικής και η Εταιρεία Χειρουργικών Λοιμώξεων πραγματοποίησαν τη δεύτερη συνάντηση για αναθεώρηση και τροποποίηση των ανωτέρω ορισμών. Έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν τα συνεχώς αυξανόμενα σημεία και συμπτώματα της σηψαιμίας. Κατηγοριοποιήθηκαν ύποπτα ή τεκμηριωμένα ευρήματα της σήψης σε γενικά, φλεγμονώδη, αιμοδυναμικά, δυσλειτουργίες οργάνων και παραλλαγές διήθησης ιστού. Επιπλέον, εισήχθη ο ρόλος των βιοχημικών δεικτών στην πρόωμη διάγνωση³⁷.

Ως εκ τούτου, η σήψη περιγράφηκε ως κλινικό σύνδρομο σε συνδυασμό με βλάβη οργάνων, αλλά τα παλιά διαγνωστικά κριτήρια για τη σήψη διατηρήθηκαν (Πίνακας 1.4.2). Η σοβαρή σήψη ορίστηκε ως «σήψη που περιπλέκεται από δυσλειτουργία οργάνου». Ως αποτέλεσμα, δεν υπήρχε διαφορά στα διαγνωστικά κριτήρια σε σύγκριση με τους παλιούς ορισμούς. Σε αυτή τη συνάντηση προτάθηκε ένα σύστημα σταδιοποίησης της σήψης με το ακρωνύμιο PIRO. Το P αντιπροσωπεύει την προδιάθεση (προϋπάρχουσα συν-νοσηρότητα) που αυξάνει τη θνησιμότητα. Το I την προσβολή ή λοίμωξη, όπου ορισμένοι παθογόνοι οργανισμοί είναι πιο θανατηφόροι από άλλους. Το R αντιπροσωπεύει την απόκριση στη λοίμωξη, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης του SIRS. Το τελευταίο γράμμα O σημαίνει δυσλειτουργία οργάνου και περιλαμβάνει την ανεπάρκεια οργάνων ή την αποτυχία ενός συστήματος (Εικόνα 1.4.2).



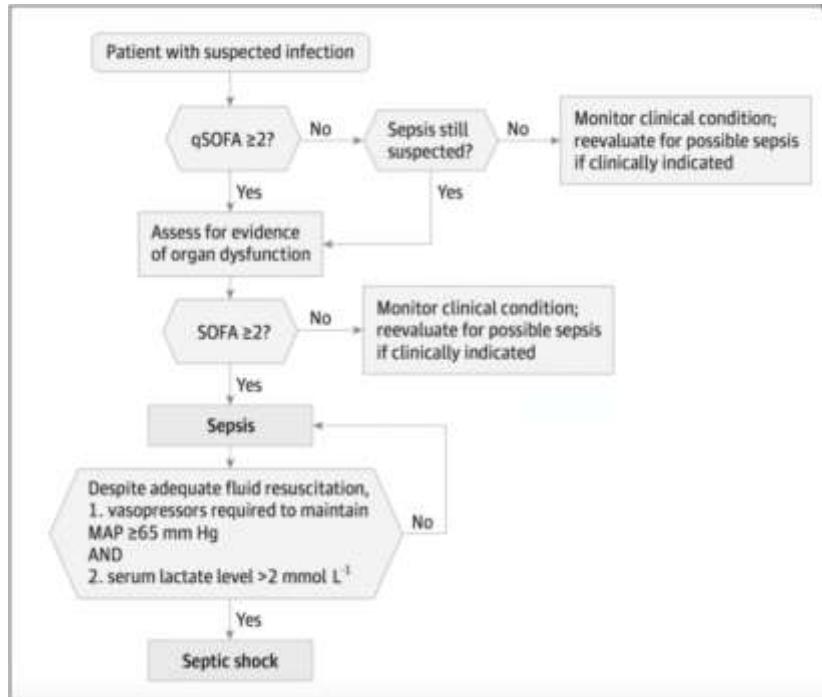
Εικόνα 1.4.2: Κλινικά σενάρια σήψης (Fethi Gul et al, Jun 2017)

1.4.3 ΣΗΨΗ 3

Πρόσφατα, οι εκ νέου αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες (2016), επικεντρώθηκαν στη δυσλειτουργία οργάνου. Το σύνδρομο SIRS θεωρείται χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας για διάκριση μεταξύ σήψης και μη και τα κριτήριά του επηρεάζονται πολυπαραγοντικά, έχοντας ταυτόχρονα χαμηλή εξειδίκευση τις πρώτες 24 ώρες από την εισαγωγή στη ΜΕΘ. Αναθεωρήθηκαν οι διεθνείς ορισμοί της σηψαιμίας και του σηπτικού σοκ. Επίσης, αναπτύχθηκε το σύστημα βαθμολόγησης qSOFA (Quick Sequential Organ Failure Assessment) για έγκαιρη διάγνωση ταυτόχρονης δυσλειτουργίας οργάνων στη σηψαιμία, δίνοντας έμφαση στην αναγκαιότητα της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας της σήψης.

Η σήψη, πλέον, ορίζεται ως μια «απειλητική για τη ζωή δυσλειτουργία οργάνου που προκαλείται από μια ανεπαρκή απάντηση ξενιστή σε λοίμωξη». Το σηπτικό σοκ ορίζεται από επίπεδα γαλακτικού >2 mmol/L, υποογκαιμία και έναρξη αγγειοδιασταλτικών για να διατηρηθεί η μέση αρτηριακή πίεση >65 mmHg (Εικόνα 1.4.3)³⁸. Μια αύξηση δύο ή περισσότερων στοιχείων στο σύστημα SOFA πιστοποιεί δυσλειτουργία οργάνου και επακόλουθα, αύξησε την ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα >10% (Πίνακας 1.4.3). Κατά συνέπεια, όταν εντοπίζεται

νεοεμφανιζόμενη και ανεξήγητη δυσλειτουργία οργάνου, η σήψη πρέπει να μπαίνει πρώτη στη διαφοροδιάγνωση.



Εικόνα 1.4.3: Αλγόριθμος κλινικών κριτηρίων που προσδιορίζουν τους ασθενείς με σηψαιμία και σηπτικό σοκ (Fethi Gul et al, Jun 2017)

Πίνακας 1.4.3: Κριτήρια SOFA (Fethi Gul et al, Jun 2017)

The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score

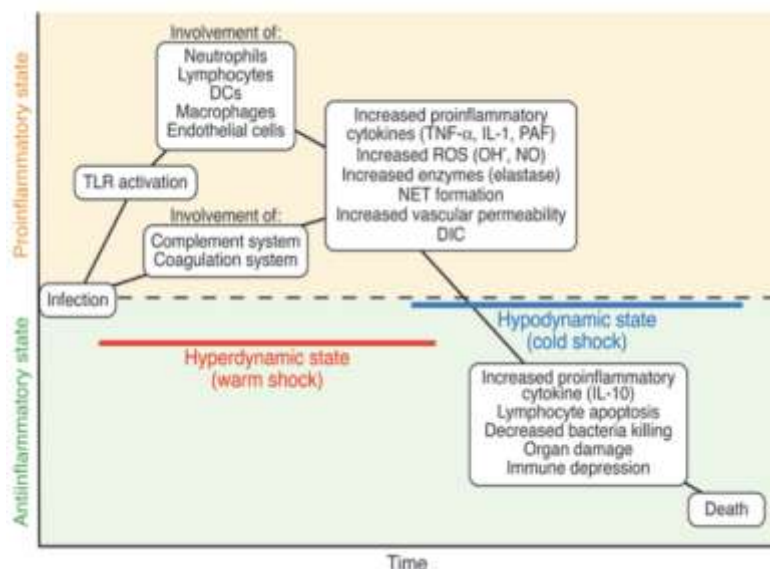
SOFA score	1	2	3	4
Respiration				
----with respiratory support----				
PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)	<400	<300	<200	<100
Coagulation				
Platelets ×10 ³ /mm ³	<150	<100	<50	<20
Liver				
Bilirubin (mg dL ⁻¹)	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular				
Hypotension	MAP <70	Dopamine ≤5 or dobutamine (any)	Dopamine >5 or norepinephrine ≤0.1	Dopamine >15 or norepinephrine >0.1
Central Nervous System				
Glasgow Coma Score	13-14	10-12	6-9	<6
Renal				
Creatinine (mg dL ⁻¹) or urine output (mL)	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 or <500	>5.0 or <200

MAP: mean arterial pressure; vasoactive medications administered for at least 1 hr (dopamine and norepinephrine μg kg⁻¹ min⁻¹).

1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ

1.5.1 ΕΙΔΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανοσοαπόκρισεων κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης: η πρώιμη συστηματική φλεγμονώδης απόκριση (SIRS) και η όψιμη αντισταθμιστική αντιφλεγμονώδης απάντηση (CARS)^{39,40,41}. Κοινοί βιοδείκτες SIRS είναι οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η προκαλσιτονίνη (PCT). Τα επίπεδα ορού αυτών των πρωτεϊνών αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης^{42,43}. Ευαίσθητοι βιοδείκτες σήψης που αυξάνονται ραγδαία είναι επίσης οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α), και οι ιντερλευκίνες-1-βήτα (IL-1β), -6 (IL-6), -8 (IL-8) και -18 (IL-18)^{44,45,46,47,48}. Μέτρια αύξηση αυτών των προφλεγμονωδών κυτοκινών στην κυκλοφορία παρέχει προστατευτικό ρόλο και προάγει αντιμικροβιακή ανοσοαπόκριση. Αντίθετα, η υπερβολική αύξησή τους, γνωστή ως «καταιγίδα κυτοκίνης», συσχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα λόγω ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων⁴⁹. Συμπερασματικά, ένα προφίλ κυτοκίνης ορού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης σοβαρότητας της νόσου⁵⁰. Η δεύτερη φάση της ανοσοαπόκρισης χαρακτηρίζεται ως CARS και προκαλείται από την έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-4, IL-10). Η βαθιά ανοσοκαταστολή στη σήψη θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες νοσηρότητας και θνησιμότητας κατά την εξέλιξη της νόσου. Οι TNF-α, IL-1β και IL-6 δεν θεωρούνται βιολογικοί μάρτυρες εκλογής, λόγω της μικρής ημίσειας ζωής τους, αν και αυξάνονται περισσότερο και γρηγορότερα από την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (Εικόνα 1.5.1)^{51, 52}. Τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι ενδεχομένως η IL-18 να είναι ο πιο ευαίσθητος και ειδικός διαγνωστικός δείκτης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας λόγω σήψης, καθιστώντας τη υποψήφια ως βιοδείκτη της σηπτικά επαγόμενης ΟΝΑ⁵³.



Εικόνα 1.5.1: Απλοποιημένη κλινική πορεία σήψης: η εξέλιξη της νόσου είναι περίπλοκη, μη γραμμική και ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή. Επιλεγμένα γεγονότα και διαδικασίες, κοινές μεταξύ ασθενών και ορισμένων ζωικών μοντέλων. (Kent Doi et al, Oct 2009)

1.5.2 ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΗΨΗΣ

Η σηψαιμία είναι μία από τις πιο κοινές βλαβερές καταστάσεις μεταξύ των βαρέως πασχόντων και εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας, παρά την εξαιρετική διαχείρισή της τα τελευταία χρόνια⁵⁴. Περιγράφεται ως συστηματική φλεγμονώδης απόκριση (SIRS) που σχετίζεται με υποψία ή αποδεδειγμένη λοίμωξη. Η σηψαιμία μπορεί να είναι ποικίλης αιτιολογίας και καθορίζει βαθμούς φλεγμονωδών και μεταβολικών αποκρίσεων, τόσο στην πρώιμη όσο και στην όψιμη φάση^{55,56}. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και η ιντερλευκίνη-18 (IL-18) είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, ενώ η ιντερλευκίνη-10 και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας βήτα (TGF-β) είναι γνωστές ως αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όλες παραγόμενες ταχέως στη ρύθμιση της σηψαιμίας.

Στους ενήλικες, η σήψη ορίζεται ως σύνθετο κλινικό σύνδρομο σοβαρής συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS). Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικές και ανοσολογικές αντιδράσεις, οι οποίες συνδέονται με βακτηριακές ή μυκητιασικές

λοιμώξεις^{57, 58, 59}. Η παθογένεση της σηψαιμίας συνδέεται με διαταραχές μικροκυκλοφορίας, αιμοδυναμικές και κυτταρικές μεταβολές, οι οποίες προκαλούν ανισορροπία μεταξύ της ροής του αίματος και των απαιτήσεων του μεταβολικού ιστού. Το αποτέλεσμα αυτού του καταρράκτη αντιδράσεων είναι η δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων, υπεύθυνη για τη σοβαρή και συχνά θανατηφόρο μορφή της νόσου⁶⁰.

Η αναγνώριση ενός ή περισσότερων συστατικών του εισβάλλοντος οργανισμού αποτελούν το εναρκτήριο ερέθισμα της σήψης. Μεταξύ αυτών των συστατικών είναι οι Gram (-) ενδοτοξίνες ή οι εκκρινόμενες εξωτοξίνες. Το αποτέλεσμα είναι η διέγερση της τοπικής και συστηματικής απελευθέρωσης ενδογενών φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως οι κυτοκίνες TNF-α, INF-γ, IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-18. Η απελευθέρωση των τελευταίων ευνοεί τη μετανάστευση και ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων^{61, 62}. Βιολογικά δραστικοί μεσολαβητές παράγονται ως αποτέλεσμα της διέγερσης πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, ιστιοκυττάρων, αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, τα αγγειοδραστικά πεπτίδια, η ισταμίνη, η βραδυκινίνη και το νιτρικό οξείδιο (NO). Η παραγωγή και η απελευθέρωση αυτών των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (φυσική ανοσοαπόκριση) μπορεί να προκαλέσει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, χαρακτηριστική της αρχικής φάσης της σήψης^{63,64}. Στη συνέχεια, μετά από την υπερφλεγμονώδη φάση, ειδικά σε ασθενείς που αναπτύσσουν σοβαρή σήψη, παρατηρείται ένα αντισταθμιστικό αντιφλεγμονώδες σύνδρομο απόκρισης, το λεγόμενο CARS^{65,66}.

Για τη διάγνωση της πρώιμης σηψαιμίας και την πρόβλεψη της σοβαρότητας της νόσου σε πρώιμα στάδια προτάθηκαν ως αξιόπιστοι βιολογικοί δείκτες οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-8 και IL-18 και οι αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-10 και TGF-β^{67,68,69,70}.

1.5.2.α Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι σχετικά μικρά μόρια με βραχεία διάρκεια ημίσειας ζωής στον ορό. Η διάρκεια ημίσειας ζωής τους ποικίλλει από λεπτά έως μερικές ώρες. Σε σηπτικούς ασθενείς παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση⁷¹.

Στη δεκαετία του 1990, η σηψαιμία θεωρήθηκε ότι συσχετίζεται με μια επιδεινούμενη απελευθέρωση κυρίως προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6 και IL-18), η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων (MIF). Έτσι, προέκυψε η έκφραση "θύελλα κυτοκίνης"⁷². Ωστόσο, πρόσφατη έρευνα σχετικά με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στη σηψαιμία υποδεικνύει ότι η έντονη προφλεγμονώδης απόκριση εξουδετερώνεται από ορισμένες αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-10, του TGF-β και της IL-4, οι οποίοι προσπαθούν να αποκαταστήσουν την ανοσολογική ισορροπία^{73,74,75}.

Η αρχική άμυνα του οργανισμού εκδηλώνεται με το φυσικό ανοσοποιητικό σύστημα. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση των προ-φλεγμονωδών οδών σηματοδότησης. Αναπόσπαστα τμήματα αυτής της αλυσίδας αντιδράσεων είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης-1, καθώς και η επεξεργασία των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-1β και IL-18 στις βιολογικά ενεργές μορφές τους⁷⁶. Πρόκειται για τις πρώτες κυτταροκίνες άμυνας, που έχουν εμπλακεί στη δημιουργία της απόκρισης Τ-βοηθού, υπεύθυνες για τη διαίωνιση της φλεγμονής. Από την άλλη πλευρά, η έκκριση μπορεί να προάγει αγγειοδιαστολή, εξαγγείωση ανοσοκυττάρων, καθώς και κυτταρικό θάνατο⁷⁷. Υπάρχουν πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που υποδεικνύουν μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ των ιντερλευκινών και της οργανικής ανεπάρκειας καθώς και του σηπτικού σοκ, με ταυτόχρονη αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας. Περαιτέρω έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ταυτόχρονη εξουδετέρωση της IL-1β και της IL-18 μπορεί να έχει θεραπευτική συνδρομή στην αντιμετώπιση του σηπτικού σοκ^{78,79}.

1.5.2.6 Ιντερλευκίνη 18

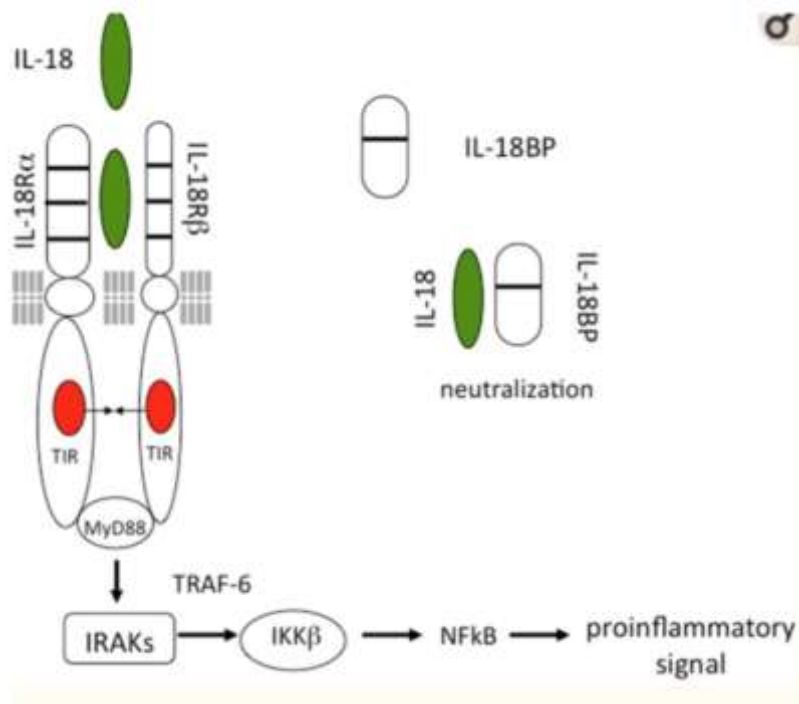
Η περιγραφή της ιντερλευκίνης-18 (IL-18) ως "παράγοντα επαγωγής ιντερφερόνης- γ (IFN- γ)" πραγματοποιήθηκε το 1989. Για τα επόμενα έξι χρόνια, μέχρι τη μοριακή κλωνοποίηση του παράγοντα επαγωγής IFN- γ , έφερε το όνομα IL-12⁸⁰. Μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση ενδοτοξίνης απομονώθηκε στον ορό μυών. Πρόκειται για μια αρχικά αδρανή πρόδρομο μορφή και μετέπειτα ενδοκυτταρική κυτοκίνη, παρουσιάζοντας ομοιότητες με την IL-1 και συγκεκριμένα με την IL-1 β . Αντίθετα, η τριτοταγής δομή του προδρόμου της IL-18 σχετίζεται με τον πρόδρομο της IL-37. Από το 1995, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σηπτικών μοντέλων μυών με παρουσία ή έλλειψη IL-18, με στόχο την πιστοποίηση του ρόλου της στην προαγωγή της φλεγμονής και των ανοσολογικών αποκρίσεων^{81,82,83}.

Ωστόσο, η IL-18 και η IL-1 β παρουσιάζουν πολλές διαφορές ως προς την βιολογία τους. Χαρακτηριστικά, σε υγιή άτομα και μύες, δεν παρατηρείται γονιδιακή έκφραση της IL-1 β σε μονοκύτταρα του αίματος, αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντιθέτως, ο πρόδρομος της IL-18 ανιχνεύεται σε μονοκύτταρα αίματος, επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού, περιτοναϊκά μακροφάγα, κερατινοκύτταρα και το σπληνικό παρέγχυμα υγιούς μυός, όπως συμβαίνει με την IL-1 α και την IL-33⁸⁴.

Ο πρόδρομος της IL-18 έχει μοριακό βάρος 24.000 και υποβάλλεται σε επεξεργασία από την ενδοκυτταρική κασπάση-1 πρωτεάσης κυστεΐνης. Η τελευταία, διασπά τον πρόδρομο σε ένα ενεργό ώριμο μόριο βάρους 17.200. Η αδρανής προ-κασπάση-1 ενεργοποιείται αρχικά σε ενεργή κασπάση-1, όπως και με την επεξεργασία της IL-1 β . Στη συνέχεια, η ώριμη IL-18 εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Ωστόσο, πάνω από 80% του προδρόμου της IL-18 παραμένει αμετάβλητο μέσα στο κύτταρο. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι μύες με έλλειψη κασπάσης-1 δεν απελευθερώνουν κυκλοφορούσα IFN- γ μετά από έγχυση ενδοτοξίνης, σε αντίθεση με τους μύες άγριου τύπου. Όπως προαναφέρθηκε, ο πρόδρομος της IL-18 ανευρίσκεται σε κερατινοκύτταρα, ενδοθηλιακά και εντερικά επιθηλιακά κύτταρα σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Κύριες πηγές για την απελευθέρωση της δραστικής IL-18 είναι τα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Αντιθέτως, ο αδρανής πρόδρομος παραμένει στο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα των

μεσεγγυματικών κυττάρων. Τέλος, ο πρόδρομος IL-18 απελευθερώνεται από κύτταρα που πεθαίνουν και υποβάλλεται σε επεξεργασία εξωκυτταρικά, πιθανότατα από πρωτεάσες ουδετερόφιλων όπως πρωτεϊνάση-3⁸⁵.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5.2.β, η IL-18 σχηματίζει ένα σύμπλεγμα σηματοδότησης χαμηλής συγγένειας συνδέοντας την άλφα αλυσίδα IL-18 (IL-18Ra). Πρόκειται για την αλυσίδα πρόσδεσης του συνδέτη για την ώριμη IL-18. Στα κύτταρα που εκφράζουν τον συν-υποδοχέα, που ονομάζεται βήτα αλυσίδα υποδοχέα IL-18 (IL-18Rβ), σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα υψηλής συγγένειας, το οποίο στη συνέχεια σηματοδοτεί. Παρόμοια σύμπλοκα σχηματίζονται από άλλα μέλη της οικογένειας IL-1 με τον συν-υποδοχέα. Η IL-18Ra εκφράζεται από τα περισσότερα κύτταρα, αν και δεν παρατηρείται το ίδιο για την IL-18Rβ. Η IL-18Rβ εκφράζεται σε T και δενδριτικά κύτταρα αλλά όχι σε μεσεγγυματικά κύτταρα⁸⁶. Σε απουσία IL-18Rβ, η IL-18 δεσμεύεται με IL-18Ra χωρίς προ-φλεγμονώδες σήμα. Μετά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς, οι περιοχές του υποδοχέα Toll-IL-1 (TIR) συμπλησιάζονται. Όπως και για την IL-1, ακολουθεί καταρράκτης διαδοχικής ενεργοποίησης της MyD88, των τεσσάρων IRAKs και του TRAF6 που ακολουθείται από την αποδόμηση της IκB και την απελευθέρωση του NF-κB, όπως αναφέρεται εκτενώς παρακάτω⁸⁷. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές μεταξύ της σηματοδότησης IL-1 και IL-18. Με λίγες εξαιρέσεις, η IL-1α ή η IL-1β θεωρούνται ενεργές σε κύτταρα με εύρος νανογραμμαρίων ή πικογραμμαρίων ανά χιλιοστόλιτρο. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της IL-18 των κυττάρων που εκφράζουν τις δύο αλυσίδες υποδοχέων IL-18 απαιτεί τουλάχιστον 10-20 ng / mL και ενίοτε υψηλότερα επίπεδα^{88,89}.



Εικόνα 1.5.2.β: Μεταγωγή σήματος ιντερλευκίνης-18. Η IL-18 σχηματίζει σύμπλεγμα σηματοδότησης με IL-18Rα. Ο συν-υποδοχέας IL-18Rβ προσλαμβάνεται για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα υψηλής συγγένειας. Μετά, οι TIR ενεργοποιούν τα MyD88, IRAKs, TRAF6 και NF-κB. Η IL-18BP (εξωκυτταρικό διαμέρισμα) συνδέεται με ώριμη IL-18 και εμποδίζει τη δέσμευση στον υποδοχέα IL-18. (Εικόνα από Charles A. Dinarello et al, 2013)⁹⁰

1.5.2.γ Ιντερλευκίνη 18 και φλεγμονή

Η ιντερλευκίνη-18 προκαλεί αύξηση στα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, σύνθεση νιτρικού οξειδίου και παραγωγή χημειοκίνης, ιδιότητες παρόμοιες με άλλων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Κλινικές μελέτες σε ένα μοντέλο μυών με μελάνωμα έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της IL-18 μειώνει τη μετάσταση⁹¹. Επιπρόσθετα, η IL-18 φαίνεται να επάγει τον συνδέτη του FAS (FasL), λόγω της ηπατικής βλάβης που λαμβάνει χώρα στο σύνδρομο ενεργοποίησης μακροφάγων (MAS)⁹². Η επαγωγή πυρετού, ωστόσο, δεν είναι σημαντική ιδιότητα της IL-18^{93,94}. Σε αντίθεση με την IL-1 και τον TNF-α, η IL-18 δεν επάγει την κυκλοοξυγενάση-2 και επομένως απουσιάζει η παραγωγή προσταγλανδίνης E2⁹⁵. Η IL-18 έχει χορηγηθεί σε ανθρώπους για τη θεραπεία του καρκίνου προκειμένου να αυξηθεί η δραστηριότητα και η επέκταση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων. Τελευταία, η θεραπευτική εστίαση για την IL-18 έχει μετατοπιστεί στην

παρεμπόδιση της δραστηριότητάς της, κυρίως σε αυτοάνοσες ασθένειες⁹⁶. Φαίνεται να υπάρχει ένας ρόλος για την παρεμπόδιση της IL-18 στη νόσο του Crohn. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές δράσεις της IL-18 οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την IFN- γ . Για παράδειγμα, η IL-18 αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεογλυκάνης σε χονδροκύτταρα⁹⁷, ενέργεια απαραίτητη για τη διατήρηση του υγιούς χόνδρου. Η IL-18 επίσης αυξάνει την έκφραση του μορίου-1 προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων (VCAM-1) σε ενδοθηλιακά κύτταρα ανεξάρτητα από την IFN- γ . Το VCAM-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σκλήρυνση κατά πλάκας, σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες καθώς και στη μεταστατική διαδικασία⁹⁸.

Η IL-18BP ανακαλύφθηκε κατά την αναζήτηση των διαλυτών υποδοχέων για την IL-18⁹⁹. Πρόκειται για μία εκλεκτικά εκκρινόμενη πρωτεΐνη με εξαιρετικά υψηλή συγγένεια για την IL-18 (400 pM) (Εικόνα 1.5.2.β)¹⁰⁰. Ωστόσο, ανήκει σε ξεχωριστή οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών αφού δεν αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης του εξωκυτταρικού συνδέτη του υποδοχέα IL-18, αλλά μάλλον κωδικοποιείται από ένα ξεχωριστό γονίδιο. Η IL-18BP περιέχει μόνο μία περιοχή IgG ενώ ο υποδοχέας IL-1 Τύπου II περιέχει τρεις περιοχές. Η χαρακτηριστική ιδιότητα της IL-18BP σε ανοσοαποκρίσεις είναι η ελάττωση των αποκρίσεων Th1 με δέσμευση σε IL-18 και έτσι μείωση της επαγωγής IFN- γ . Εφόσον η IL-18 επηρεάζει επίσης τις αποκρίσεις Th2, η IL-18BP έχει ιδιότητες ελέγχου απόκρισης κυτοκίνης Th2¹⁰¹. Η πρωτεΐνη σύνδεσης IL-18 έχει ένα κλασικό πεπτίδιο σήματος και επομένως εκκρίνεται εύκολα. Τα επίπεδα ορού σε υγιή άτομα κυμαίνονται από 2.000-3.000 pg / mL σε σύγκριση με τα επίπεδα της IL-18 (80-120 pg / mL). Επιπλέον, η IL-18BP δεσμεύει την IL-18 με συγγένεια 400 pM, μια συγγένεια σημαντικά υψηλότερη από αυτή της IL-18Ra. Επειδή ένα μοναδικό μόριο IL-18BP συνδέεται με ένα μόριο IL-18, μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η αναλογία δεσμευμένης έναντι ελεύθερης IL-18¹⁰².

Μία μοναδική ιδιότητα της IL-18BP είναι ότι το μόριο δεσμεύει επίσης την IL-37¹⁰³ και με αυτόν τον τρόπο, ενισχύει την ικανότητα της IL-18BP να αναστέλλει την επαγωγή της IFN- γ από την IL-18. Η IL-37 συνδέεται με την IL-18Ra με πολύ χαμηλή συγγένεια, αλλά σε μύες που εκφράζουν ανθρώπινη IL-37 παρατηρείται μια βαθιά αντιφλεγμονώδης αντίδραση, ιδιαίτερα κυτοκινών που προκαλούνται από LPS και ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων¹⁰⁴. Οι μύες που εκφράζουν ανθρώπινη IL-37 είναι

επίσης ανθεκτικοί στην κολίτιδα¹⁰⁵. Έτσι, η αντιφλεγμονώδης ιδιότητα της IL-37 μπορεί να επηρεαστεί από τη συγκέντρωση της IL-18BP. Καθώς η συγκέντρωση της IL-18BP αυξάνει και δεσμεύει την IL-37, υπάρχει η πιθανότητα η IL-37 να γίνεται λιγότερο διαθέσιμη ως αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη. Σε χαμηλή δοσολογία της IL-18BP, υπάρχει μειωμένη φλεγμονή σε ένα μοντέλο ρευματοειδούς αρθρίτιδας αλλά, καθώς αυξάνεται η δράση της IL-18BP χάνονται οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της IL-18BP¹⁰⁶.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΨΗΣ

Υψηλός πυρετός, σοκ και αναπνευστική ανεπάρκεια είναι μερικές από τις εκδηλώσεις της σηψαιμίας. Λόγω των ανωτέρω εκδηλώσεων, παλαιότερα θεωρείτο ότι η σηψαιμία αντιπροσώπευε μια ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση¹⁰⁷. Το γεγονός ότι σε σηπτικούς ασθενείς παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNF-α), ιντερλευκίνης 1 και άλλων κυτοκινών, οδήγησε στην έννοια της σηψαιμίας ως καταιγίδας κυτοκίνης. Το αποτέλεσμα ήταν οι φαρμακευτικές εταιρείες να ξεκινήσουν πολλές κλινικές δοκιμές, π.χ. ανταγωνιστές TNF και ιντερλευκίνης 1, αναστολείς υποδοχέων Toll και ανταγωνιστές ενδοτοξίνης στη σηψαιμία^{108,109}. Η ανασκόπηση αυτών των μελετών αποδεικνύει ότι τόσο η προφλεγμονώδης όσο και η αντίθετη αντιφλεγμονώδης ανταπόκριση συμβαίνουν ταυτόχρονα στη σήψη¹¹⁰. Οι διαβαθμίσεις και οι συνδυασμοί της απόκρισης στη σήψη ποικίλλουν, από ταχεία παραγωγή τόσο προφλεγμονωδών όσο και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών έως κυριαρχία αντιφλεγμονωδών κυτοκινών ή παγκοσμίως υποβαθμισμένη παραγωγή κυτοκίνης^{111,112,113,114,115}.

2.1 Σοβαρότητα Ανθρώπινης Σήψης

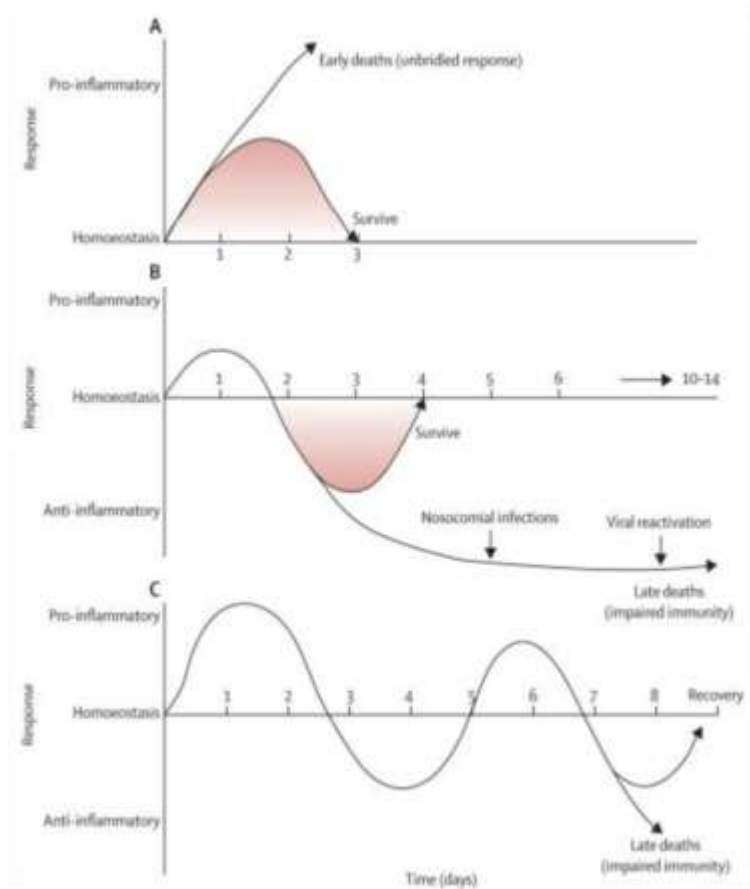
Η μαζική φλεγμονή από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Ωστόσο, βελτιωμένοι αλγόριθμοι θεραπείας έχουν ως αποτέλεσμα περισσότεροι ασθενείς να επιβιώνουν κατά την πρώιμη υπερφλεγμονώδη φάση^{116,117}. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι ποσοστό 70% των θανάτων από σηψαιμία επέρχεται μετά τις πρώτες 3 ημέρες έως και εβδομάδες αργότερα. Σε μεγάλο ποσοστό (80%)¹¹⁸ ασθενείς της ΜΕΘ καταλήγουν από ανεπίλυτες σηπτικές εστίες. Η μετεγχειρητική πνευμονία ή η περιτονίτιδα δεν είναι απαραίτητως η κύρια αιτία θανάτου. Για την ακρίβεια στους περισσότερους ασθενείς που πεθαίνουν από σήψη η πραγματική αιτία θανάτου και η ανεπάρκεια οργάνων είναι άγνωστη. Υποστηρίζεται ότι μια παρατεταμένη κυτταρική αδράνεια μπορεί να ευθύνεται για τη δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων στη σηψαιμία^{119,120}. Συχνά, η απόφαση του συγγενικού περιβάλλοντος να προβεί σε παρηγορητικά μέτρα έναντι επιθετικών μέτρων υποστήριξης, λόγω σοβαρής προϋπάρχουσας συν-νοσηρότητας και μικρής

πιθανότητας ανάκαμψης, μπορεί να ευθύνεται για τη δυσμενή κατάληξη αυτής της κατηγορίας ασθενών. Ωστόσο, πολλοί ασθενείς σε μονάδες εντατικής θεραπείας δεν αναρρώνουν λόγω συνεχούς λοίμωξης, παρά τα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και τα επιθετικά μέτρα αντισηψίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να μην εξαλείφονται οι λοιμώξεις πολλών ασθενών και επιπλέον να αναπτύσσονται δευτεροπαθείς νοσοκομειακές λοιμώξεις^{121,122}. Επομένως θεραπείες που ενισχύουν την ανοσολογική επάρκεια, αποσκοπούν σε ταχύτερη επίλυση της πρωτοπαθούς λοίμωξης και στην πρόληψη των θανατηφόρων δευτερογενών λοιμώξεων.

2.2 Η Σήψη ως ανοσοκατασταλτική διαταραχή

Αμέσως μετά την έναρξη της σήψης, ξεκινούν ταυτόχρονα οι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις διαδικασίες. Ωστόσο, παρατηρείται επικράτηση της πρώιμης φλεγμονώδους φάσης, η βαρύτητα της οποίας εξαρτάται από τα ίδια τα παθογόνα, το βακτηριακό φορτίο και τους γενετικούς παράγοντες του ξενιστή. Ως παράδειγμα μπορούμε να αντιπαραθέσουμε την εκδήλωση και εξέλιξη της σήψης σε έναν προηγουμένως υγιή νεαρό ενήλικα και έναν ηλικιωμένο με σοβαρή συν-νοσηρότητα. Στην περίπτωση του νεαρού, η βαριά σηψαιμία πιθανότατα θα έχει μια βαθιά υπερφλεγμονώδη απόκριση προκαλούμενη από τη θύελλα κυτοκίνης. Το αποτέλεσμα εκδηλώνεται με σοκ, υψηλό πυρετό και ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (Εικόνα 2.2.α). Εάν ο ασθενής πεθάνει τις πρώτες ημέρες, η κατάληξη πιθανότατα να είναι απότοκος υπερευαισθησίας από κυτοκίνες και ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων. Στον αντίποδα, για έναν αιμοκαθαιρόμενο διαβητικό ηλικιωμένο ασθενή η εμφάνιση πνευμονίας ενδέχεται να μην παρουσιάζει προφανή σημάδια σηψαιμίας. Οι μόνες ενδείξεις σε αυτό το σενάριο μπορεί να είναι η μειωμένη ψυχική κατάσταση καθώς και η αποτυχία της αιμοκάθαρσης λόγω υπότασης, υποθερμίας και δυσανεξίας στη γλυκόζη. Η σηψαιμία μπορεί να είναι καταλυτική στην υπερφλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη φάση. Ωστόσο, νέες θεραπείες έχουν οδηγήσει σε παράταση της άμυνας του οργανισμού με μετατόπιση προς την ανοσοκατασταλτική φάση. Επίσης, η σηψαιμία χαρακτηρίζεται όλο και συχνότερα ως ασθένεια ηλικιωμένων. Ειδικότερα το 60% των ασθενών με σήψη και το 75% των θανάτων από αυτή σε αναπτυγμένες χώρες

με προηγμένες υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης και σύγχρονες ΜΕΘ, είναι σε ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών¹²³. Οι ηλικιωμένοι διακρίνονται από ένα λιγότερο αποτελεσματικό ανοσοποιητικό σύστημα σε σύγκριση με νεαρούς υγιείς οργανισμούς. Πρόκειται για τη λεγόμενη ανοσοεπισχυτικότητα¹²⁴. Οι παράγοντες λοιπόν που συμβάλλουν στην υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας από τη σήψη στους ηλικιωμένους ασθενείς είναι τόσο η συν-νοσηρότητα όσο και η ανοσοεπισχυτικότητα.



Εικόνα 2.2.α: Νέες κατευθυντήριες οδηγίες σήψης: Διάγνωση σε μοριακό επίπεδο και βιοδείκτες (Richard Hotchkiss et al, Mar 2013)

Σύμφωνα με τους τρέχοντες ορισμούς υπάρχει προοδευτική αλληλουχία μεταξύ λοίμωξης, σήψης, σοβαρής σήψης και σηπτικού σοκ. Τα αίτια του SIRS ποικίλλουν ανάλογα με την κλινική εκδήλωση, όπως λοίμωξη, ισχαιμία, παγκρεατίτιδα, βλάβη ιστών, πολλαπλό τραύμα, αιμορραγικό σοκ ή δυσλειτουργία οργάνου λόγω ανοσοκαταστολής. Η σηψαιμία ορίζεται ως η συστηματική

αντίδραση στη λοίμωξη. Μιμείται το SIRS, με τη διαφορά ότι πρέπει να οφείλεται σε λοίμωξη.

Για να ορίσουμε τη σήψη απαιτείται η παρουσία λοίμωξης και τουλάχιστον δύο σημεία συστηματικής φλεγμονής. Όταν η σήψη οδηγεί σε δυσλειτουργία ενός τουλάχιστον απομακρυσμένου οργάνου προκύπτει η σοβαρή σήψη. Σηψαιμία με υπόταση ανθεκτική στη χορήγηση ενδοφλέβιων υγρών χαρακτηρίζεται ως σηπτικό σοκ¹²⁵.

Όπως προαναφέρθηκε, η πρώιμη έντονη φλεγμονώδης απόκριση στη σήψη, γνωστή και ως «καταιγίδα κυτοκίνης», είναι συνδυασμός ενεργοποίησης προφλεγμονωδών κυτοκινών και αντιφλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού ως απάντηση στο εν λόγω ερέθισμα. Αυτό το φαινόμενο ονομάστηκε από τον RC Bone σύνδρομο αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απόκρισης (CARS)¹²⁶. Αρκετά συχνά, ασθενείς που επιβιώνουν από την πρώιμη σήψη αναπτύσσουν δευτερογενείς νοσοκομειακές λοιμώξεις. Οι υπεύθυνοι οργανισμοί μπορεί να μην είναι τυπικά παθογόνοι σε ανοσοκατασταλμένους ξενιστές. Επιπλέον μπορεί να υποστούν επανενεργοποίηση λανθάνοντων ιών^{127,128,129}. Απότοκος αυτών των γεγονότων είναι ότι την πρώιμη υπερφλεγμονώδη κατάσταση, διαδέχεται μία υποφλεγμονώδης κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανοσοκαταστολή (ανοσοπαράλυση). Τα χαρακτηριστικά της ανοσοπαράλυσης είναι τα χαμηλά επίπεδα επιφανειακής έκφρασης μονοκυτταρικής HLA-DR (mHLA-DR) και η δυσλειτουργία ανοσοκυττάρων^{130,131}. Εκδηλώνεται με την απώλεια απόκρισης υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου σε αντιγόνα θετικού ελέγχου, με αποτυχία καταπολέμησης της πρωτοπαθούς λοίμωξης και ανάπτυξη νέων δευτερογενών λοιμώξεων¹³². Ασθενείς που πεθαίνουν από σηψαιμία έχουν βιοχημικά, κυτταρομετρικά και ανοσοϊστοχημικά ευρήματα παρόμοια της ανοσοκαταστολής, γεγονός που ενισχύει αυτή τη θεωρία^{133,134}.

Η κλινική εκδήλωση της σήψης ενδέχεται να μιμείται εκείνη της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης από στείρα φλεγμονή (δηλητηρίαση, παγκρεατίτιδα, έγκαυμα, τραύμα) με αποτέλεσμα δυσκολία στη διαφοροδιάγνωσή τους¹³⁵. Το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως αποδείχθηκε τα τελευταία χρόνια, αφορά περισσότερο τις οντότητες που προκαλούν βλάβες παρά εκείνες που είναι ξένες¹³⁶,

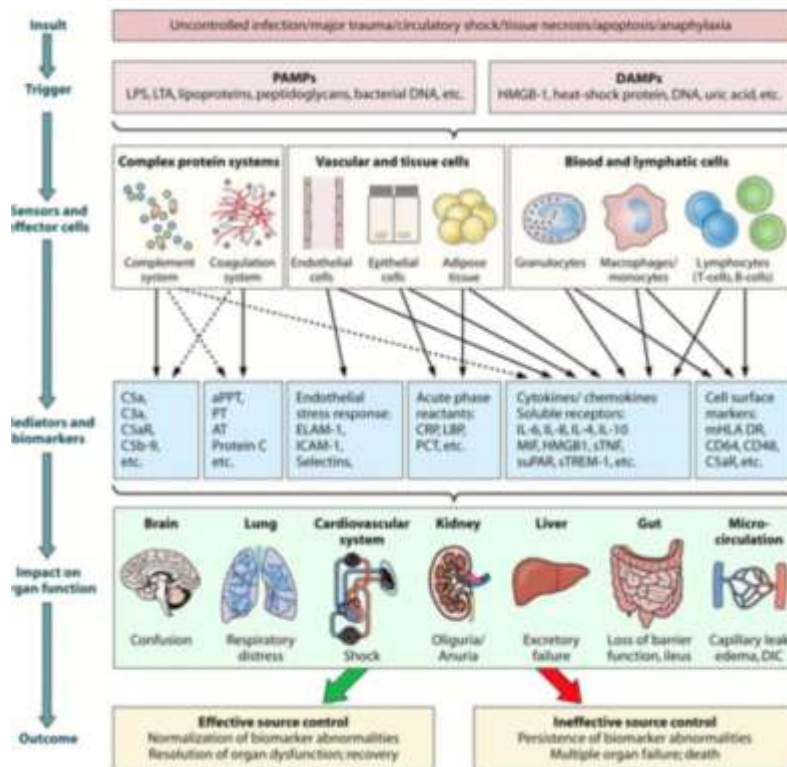
γνωστές ως ενδογενείς αλαρμίνες και σήματα κινδύνου ή μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με κίνδυνο/βλάβη (DAMPs). Η σοβαρή σωματική βλάβη ή το τραύμα προκαλούν κυτταρική νέκρωση, η οποία με τη σειρά της απελευθερώνει μιτοχονδριακό DNA στην κυκλοφορία, δηλαδή φλεγμονώδη σήματα¹³⁷. Φυσικά ανοσοκύτταρα ενεργοποιούνται από τα μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με μικροβιακά παθογόνα (PAMPs), μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs). Επομένως, μια απόκριση οξείας φάσης διεγείρεται από τα DAMPs, η οποία είναι βιολογικά σύμφωνη με τα PAMPs που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (Εικόνα 2.2.β). Έτσι εξηγείται η δυσκολία στη διάκριση μεταξύ SIRS από λοίμωξη ή μη. Επιπρόσθετα, δυσχερής παραμένει η αναγνώριση μορίων ή μοριακών μοτίβων της απόκρισης του ξενιστή που επιτρέπουν αυτή τη διάκριση.

Ως βιοδείκτης ορίζεται η ποσοτικοποιήσιμη μέτρηση της βιολογικής ομοιόστασης που ορίζει τι είναι «*φυσιολογικό*». Με αυτό τον τρόπο, παρέχεται ένα πλαίσιο αναφοράς για την πρόβλεψη του «*μη φυσιολογικού*»¹³⁸. Έχει επίσης οριστεί ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών απαντήσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση¹³⁹. Βασική προϋπόθεση είναι να παρέχει έγκαιρη πληροφόρηση ανεξάρτητα από εκείνη που είναι άμεσα διαθέσιμη από δεδομένα ρουτίνας. Η έννοια του βιοδείκτη και η χρησιμότητά του εξετάσθηκε πρώτη φορά στο Διεθνές Φόρουμ Σήψης το 2005¹⁴⁰. Τα συμπεράσματα αυτής της σύσκεψης περιληπτικά ήταν: 1) Η σηψαιμία είναι μια έννοια και όχι μια μετρήσιμη παθολογική διαδικασία. Περιγράφεται ως η ασθένεια που προκύπτει από την αντίδραση του ξενιστή στη λοίμωξη. 2) Πρόκειται για πολύπλοκη έννοια που καθορίζεται από την τεκμηρίωση της λοίμωξης καθώς και της αντίδρασης σε αυτή. 3) Είναι μια μη ειδική απόκριση. Τα κριτήρια που την ορίζουν ανευρίσκονται στις φυσιολογικές αλλαγές σε ζωτικές παραμέτρους, κοινές σε πολλές διαφορετικές διεργασίες. 4) Οι βιοδείκτες μπορούν να ορίσουν τη σήψη ως μια ομάδα διαφορετικών βιοχημικών διαταραχών¹⁴¹.

Για να οριστεί μια παράμετρος ως βιοδείκτης θα πρέπει να αντικατοπτρίζει τη βιολογία της σηψαιμίας. Θα πρέπει να αποτυπώνει τις βιοχημικές αλλαγές σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο. Υπάρχουν επτά ομάδες φλεγμονωδών μεσολαβητών σύμφωνα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες: αγγειοδραστικές αμίνες

και πεπτίδια, θραύσματα συστατικών συμπληρώματος, κυτοκίνες, χημειοκίνες, μεσολαβητές λιπιδίων και πρωτεολυτικά ένζυμα^{142,143}. Οι βιοχημικές μεταβολές στο επίπεδο του πλάσματος (συμπλήρωμα, σύστημα πήξης, καλλικρεΐνης-κίνινης) και οι δείκτες ενεργοποίησης ή κακής ρύθμισης κυτταρικών στοιχείων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα) είναι τα κυρίαρχα πεδία έρευνας, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στην απελευθέρωση ενός αριθμού μεσολαβητών και μορίων (κυτοκίνες, χημειοκίνες και πρωτεΐνες οξείας φάσης)¹⁴⁴ (Εικόνα 2.2.β). Εκατοντάδες μεσολαβητές και μεμονωμένα μόρια περιλαμβάνονται στην απάντηση του ξενιστή στη σήψη. Πολλά από αυτά έχουν προταθεί ως βιοδείκτες σηψαιμίας^{145,146}. Ωστόσο, ο εντοπισμός ενός μοναδικού βιοδείκτη στη διάγνωση της σήψης είναι απίθανος.

Στην πλειοψηφία της ανθρώπινης σήψης και των πειραματικών μοντέλων, η φλεγμονώδης απόκριση χαρακτηρίζεται από μια προφλεγμονώδη φάση ποικίλλου έντασης. Σε αυτό το στάδιο, ενεργοποιούνται φυσικά ανοσολογικά μόρια όπως λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, συμπλήρωμα και σύστημα πήξης. Σε κλινικό επίπεδο παρατηρούνται τυπικά σημάδια συστηματικής φλεγμονής όπως πυρετός, λευκοκυττάρωση, αυξημένος καρδιακός δείκτης, αυξημένη καρδιακή και αναπνευστική συχνότητα, δυσλειτουργία οργάνων και αγγειοοίδημα (Εικόνα 2.2.β). Το επόμενο στάδιο μπορεί να είναι μια ανεργική φάση, όπου οι μηχανισμοί αυτοί παύουν να λειτουργούν. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου υπάρχει μεγάλη ευαισθησία σε δευτερογενείς λοιμώξεις^{147,148}.



Εικόνα 2.2.β: Απλοποιημένη απεικόνιση της πορείας της φλεγμονώδους αντίδρασης. PAMPs ή DAMPs απελευθερώνονται λόγω ερεθίσματος, ανιχνεύονται από PRRs σε κυτταρική επιφάνεια, ενδοσώματα ή πυρήνες αισθητήριων κυττάρων, ιστών/οργάνων ή πρωτεϊνών/μορίων καθώς και από το συμπλήρωμα. Οι αισθητήρες λειτουργούν ως μέσα πρόκλησης διαταραχής του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω ποικίλων προ- ή αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών ή βιοδεικτών. Το υποκείμενο ερέθισμα μπορεί ή όχι να καταπολεμηθεί και η ανεπάρκεια οργάνων μπορεί να είναι παροδική ή μόνιμη. (Konrad Reinhart et al, Oct 2012)

2.3 ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΗΨΗΣ

Τα ζωικά μοντέλα σήψης πρέπει να είναι σε θέση να αναπαράγουν την πολυπλοκότητα της ανθρώπινης σήψης και της θεραπείας της στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) και να μιμούνται την εξέλιξη και τη σοβαρότητα της ανθρώπινης σήψης. Οφείλουν επίσης να αναπαράγουν βασικές αιμοδυναμικές και ανοσολογικές φάσεις, να αντιγράφουν τα ιστολογικά ευρήματα σε ζωικά όργανα (όπως πνεύμονες, ήπαρ, νεφροί, και άλλα) και να δείχνουν ποικιλία μεταξύ των διαφόρων ζωικών ειδών^{149,150}.

Για τη μελέτη της ανθρώπινης σήψης, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα τρωκτικών. Έχουν περιγραφεί τρεις μεγάλες κατηγορίες Ζωικών Μοντέλων Σήψης: (α) Ένεση μιας εξωγενούς τοξίνης (LPS), (β) Μεταβολή του ενδογενούς προστατευτικού φραγμού (εντερική διαφυγή) του ζώου, όπως απολίνωση και διάτρηση του τυφλού (CLP) ή colon ascendens stent peritonitis (CASP) και (γ) Έγχυση ή ενστάλλαξη εξωγενών βακτηριδίων (PCI)^{151,152,153,154,155}. Και τα τρία μοντέλα έχουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα και εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο ως προς το ποιο από αυτά είναι το πλέον κατάλληλο¹⁵⁶.

Το μοντέλο απολίνωσης και διάτρησης του τυφλού (CLP) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο σήψης. Χαρακτηρίζεται από σημαντική συμβατότητα με την ανθρώπινη σήψη τόσο σε ανοσιακό όσο και σε βιοχημικό και αιμοδυναμικό επίπεδο^{157,158,159}. Το κύριο πλεονέκτημα του μοντέλου CLP είναι ότι το περιτόναιο αποικίζεται με μικτή μικροβιακή χλωρίδα από το ίδιο το ζώο. Ωστόσο, υπάρχουν και μειονεκτήματα. Η ποσότητα της διαφυγής εντερικού περιεχομένου είναι δύσκολο να ελεγχθεί λόγω του μεγέθους ή του αριθμού των διατρήσεων και έτσι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στα αποτελέσματα της σήψης. Επομένως η τυποποίηση του μοντέλου αυτού είναι πιο δύσκολη από τα μοντέλα LPS ή PCI. Επιπλέον, οι συγκρίσεις μεταξύ των μελετών πρέπει να γίνονται με προσοχή διότι η εντερική χλωρίδα μεταξύ ζώων ή διαφόρων ειδών δεν είναι ομοιόμορφη. Επίσης παρατηρούνται αποκλίσεις στις χειρουργικές επεμβάσεις (θέση ράμματος, μέγεθος βελόνας, αριθμός διατρήσεων) καθώς και στη μετεγχειρητική φροντίδα. Όλα τα ανωτέρω μπορεί να έχουν τεράστιο αντίκτυπο στην ποσότητα των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών που απελευθερώνονται στο περιτόναιο και στον ορό και κατά επέκταση στην εξέλιξη της νόσου^{160,161}.

Σε γενικές γραμμές τα LPS και PCI μοντέλα συμπεριφέρονται διαφορετικά σε σύγκριση με το μοντέλο CLP. Πρόκειται για μη θανατηφόρες, συστημικές φλεγμονές που επηρεάζουν τις εκκρίσεις κυτοκίνης, τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες, τη λειτουργικότητα των οργάνων και τη γενική κατάσταση της υγείας με διαφορετικό μηχανισμό από το μοντέλο CLP. Τα μοντέλα LPS και PCI επάγουν ταχεία έναρξη της φλεγμονής με πρόωρη αύξηση κυτοκινών και οξειδωτικού στρες. Επίσης ευθύνονται για την απότομη υπογλυκαιμία, τη μειωμένη ικανότητα βιομετατροπής

και ανοσοκυτταρικής διήθησης της κυκλοφορίας εντός του ήπατος και του σπληνός, καθώς και την απόπτωση εντός του τελευταίου. Η χορήγηση LPS εμφανίζει τα ισχυρότερα φλεγμονώδη αποτελέσματα έναντι όλων των μοντέλων. Ακόμη σε μοντέλα LPS και PCI μυών, εμφανίζονται θετικά αποτελέσματα σε διάστημα 72 ωρών μετά την έναρξη χορήγησης θεραπείας. Σε αυτό συμβάλλουν πιθανότατα επαγόμενοι προστατευτικοί μηχανισμοί. Αντιθέτως, σε CLP μοντέλα η έναρξη θεραπείας συνοδεύεται από μια παρατεταμένη πορεία της νόσου με επιδείνωσή της μέχρι και το πέρας 3 ημερών.

Καθίσταται λοιπόν προφανές, ότι για την εξασφάλιση των πειραματικών στόχων είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις διαφορές στα σηπτικά μοντέλα, ακόμη και τη διάρκεια της χρονικής περιόδου ενός πειραματικού μοντέλου σήψης. Το μοντέλο LPS είναι το πιο κατάλληλο για την αξιολόγηση των επιπτώσεων στην οξεία φλεγμονή. Οι συστηματικές επιδράσεις είναι εύκολα αναγνωρίσιμες και μετρήσιμες. Επιπλέον ο LPS είναι εύκολο να χορηγηθεί, κάτι που καθιστά το ίδιο το μοντέλο ιδιαίτερα αναπαραγωγίμο. Βεβαίως, η έγχυση του LPS δεν αναπαράγει ακριβώς την πορεία της ανθρώπινης σήψης, ενώ η CLP θεωρείται το μοντέλο εκλογής για τη συμβατότητα. Ωστόσο, με το μοντέλο της CLP η χρονική περίοδος που επιλέγεται πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, αφού η θεραπεία επάγει μια επιβράδυνση στην πορεία της φλεγμονής. Συμπερασματικά, κάθε ζωικό μοντέλο σήψης έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αυτά πρέπει να σταθμίζονται με τις πειραματικές παραμέτρους που θέλουμε να διερευνήσουμε καθώς και με τον γενικό στόχο της εκάστοτε επιμέρους μελέτης (Πίνακας 2.3)¹⁶².

Πίνακας 2.3: Περιγραφή των Ζωικών Μοντέλων Σήψης (Τροποποίηση από Kent Doi et al, Oct 2009)

Ζωικό Μοντέλο	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ένεση εξωγενούς τοξίνης (LPS)	Απλή, αναπαραγώγιμη, αξιόπιστη, χαμηλό κόστος, στείρα, μερικές ομοιότητες με την παθοφυσιολογία της ανθρώπινης σήψης	Πρώιμη και παροδική αύξηση φλεγμονωδών μεσολαβητών πιο έντονη από της ανθρώπινης σήψης, φυσιολογικά διαφορετική από τη βακτηριακή περιτονίτιδα
Διάρρηση και απολίνωση του τυφλού (CLP)	Απλή, τυποποιημένη, χαμηλό κόστος, μεγάλη ομοιότητα με κλινική ασθένεια, πρώιμη σιωπηρή περίοδος, μέτρια και καθυστερημένη αύξηση μεσολαβητών, πολλαπλή βακτηριακή χλωρίδα	Ποικιλία ανάλογα με την ηλικία και τη βαρύτητα, πρώιμη αιμοδυναμική περίοδος σε ορισμένα μοντέλα
Έγχυση ή ενστάλαξη εξωγενών βακτηριδίων (PCI)	Απλή, τυποποιημένη, πρώιμη υπερδυναμική ανταπόκριση όπως στον άνθρωπο	Αμετάβλητη στην ενδονεφρική μικροκυκλοφορία, ανάγκη μεγάλων ζώων, ένταση εργατικού δυναμικού, ενδοκοιλιακά μοντέλα αποστήματος που δεν συνδέονται με θάνατο και δεν μιμούνται τη θανατηφόρα ανθρώπινη περιτονίτιδα

2.4 TLRs

Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) είναι κωδικοποιημένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, τύπου I της βλαστικής σειράς, που εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, B κύτταρα, ειδικούς τύπους T κυττάρων και ακόμη και σε μη-ανοσοκύτταρα όπως ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα.

Η ονομασία Toll αρχικά εφευρέθηκε για έναν υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας, υπεύθυνο του ραχιαίου προσανατολισμού στο έμβρυο *Drosophila*¹⁶³. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι ο υποδοχέας Toll εμπλέκεται στην ανοσολογική άμυνα της *Drosophila*, έναντι του εισβάλλοντος μύκητα *Aspergillus fumigatus*¹⁶⁴. Ένα χρόνο αργότερα ανακαλύφθηκε ανθρώπινο ομόλογο, του υποδοχέα Toll της *Drosophila*¹⁶⁵. Έλαβε το όνομά του από την ομοιότητά του με την πρωτεΐνη, που κωδικοποιήθηκε από το γονίδιο toll, το οποίο προσδιορίστηκε στη *Drosophila* το 1985 από την Christiane Nüsslein-Volhard¹⁶⁶. Έχει ειπωθεί ότι οι ερευνητές ήταν τόσο έκπληκτοι, που φώναξαν αυθόρμητα στα γερμανικά "*Das ist ja toll!*". ("*Αυτό είναι υπέροχο!*")¹⁶⁷.

Έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα είδη θηλαστικών εκφράζουν μεταξύ 10-15 διαφορετικών υποδοχέων τύπου Toll. Δεκατρείς TLRs (TLR 1 έως TLR 13) έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπους και μύες μαζί, αλλά δεν είναι απαραίτητα παρόντες σε όλα τα θηλαστικά^{168,169,170}. Για παράδειγμα, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ανάλογη με τον TLR 10 στους ανθρώπους, υπάρχει σε μύες αλλά φαίνεται ότι έχει υποστεί ενός βαθμού βλάβη σε κάποιο σημείο στο παρελθόν από ρετροϊό. Από την άλλη πλευρά, οι TLRs 11, 12 και 13 εκφράζονται μόνο σε μύες. Άλλα θηλαστικά μπορεί να εκφράζουν TLRs που δεν βρίσκονται στους ανθρώπους¹⁷¹.

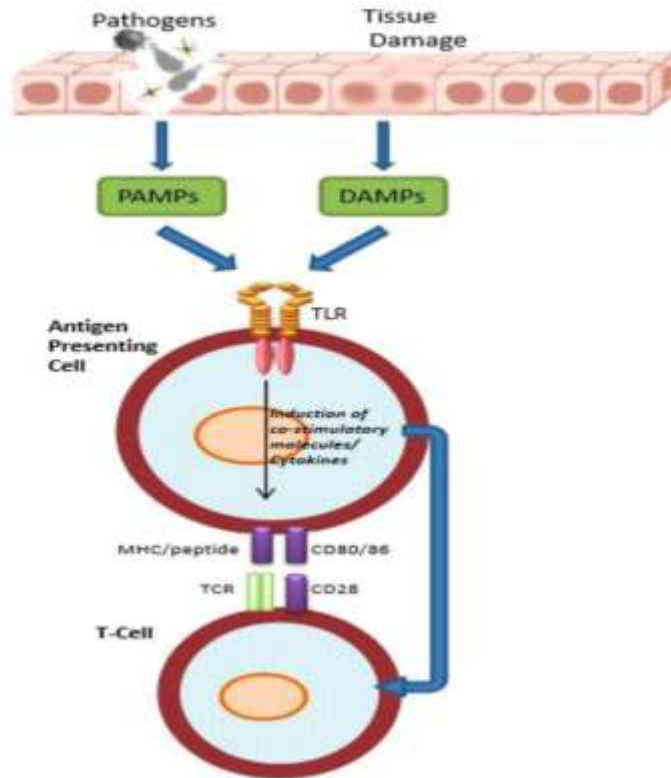
Οι TLRs μπορούν να εκφράζονται εξωκυτταρικά στην κυτταρική επιφάνεια (TLRs 1, 2, 4, 5 και 6) ή ενδοκυτταρικά σε διαμερίσματα, όπως τα ενδοσώματα και τους συνδέτες τους κυρίως τα νουκλεϊνικά οξέα, τα οποία απαιτούν εσωτερικοποίηση του ενδοσώματος πριν από τη σηματοδότηση (TLRs 3, 7, 8 και 9). Οι διαμεμβρανικές καθώς και οι εγγύτερα της μεμβράνης περιοχές, είναι απαραίτητες για την κυτταρική διαμερισματοποίηση τέτοιων υποδοχέων¹⁷².

Οι TLRs κατασκευάζονται με μία εξωκυττάρια περιοχή πλούσια σε λευκίνη (LRR) και έναν ενδοκυττάριο Toll / IL-1 υποδοχέα (TIR)¹⁷³. Οι LRR, που βρίσκονται σε

πολλές πρωτεΐνες, αναγνωρίζουν τους συνδέτες και μεταδίδουν το σήμα¹⁷⁴. Ο τομέας LRR και η διαμεμβρανική περιοχή διαχωρίζονται από έναν καρβοξυτελικό LRR τομέα. Επίσης τμήμα της TIR περιοχής του TLR, είναι απαραίτητο για την ενδοκυττάρια σηματοδότηση^{175,176,177}.

Οι TLRs μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε διάφορες υποοικογένειες. Κάθε μία από αυτές αναγνωρίζει τα σχετικά PAMPs: Οι TLR 1, 2 και 6 αναγνωρίζουν τα λιπίδια, ενώ οι υποομάδες TLR 7, 8 και 9 αναγνωρίζουν τα νουκλεϊνικά οξέα. Επιπλέον, οι TLRs μπορούν να αναγνωρίσουν αρκετούς δομικά μη σχετιζόμενους συνδέτες. Για παράδειγμα, ο TLR 4 αναγνωρίζει μια πολύ αποκλίνουσα συλλογή από συνδέτες όπως λιποπολυσακχαρίτη (LPS), φυτική διτερπενική πακλιταξέλη, πρωτεΐνη σύντηξης αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV), ινωδονεκτίνη και πρωτεΐνες θερμικού σοκ. (Πίνακας 2.4.α, 2.4.β και 2.4.γ)

Οι TLRs λειτουργούν ως βασικοί ρυθμιστές της φυσικής και επίκτητης ανοσίας και ως υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων (PRRs). Αναγνωρίζουν τα σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (PAMPs), τα οποία είναι μοναδικά για τα μικρόβια αλλά και απαραίτητα για την επιβίωσή τους¹⁷⁸. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος, που στη συνέχεια οδηγεί στην ενεργοποίηση της επίκτητης, ειδικής για το αντιγόνο ανοσοανεπάρκειας. (Εικόνα 2.4.α)



Εικόνα 2.4.α: Μεσολάβηση των υποδοχέων τύπου Toll στην ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας. TLRs μεσολαβούν στην αναγνώριση PAMPs ή DAMPs. Ακολουθεί επίκτητη ανοσοαπόκριση από αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα. Αυτά αυξάνουν τα συνδιεγερτικά σήματα, επεξεργάζονται τα αντιγόνα και ενεργοποιούν παρθένα T-κύτταρα^{179,180}. (Theodoros Eleftheriadis et al, 2012)

Πίνακας 2.4.α: Αναγνώριση μικροβιακών στοιχείων από τους TLRs

Μικροβιακά συστατικά	Είδη	TLRs
Βακτήρια		
LPS	Gram (-) βακτήρια	TLR 4
Διακυλο-λιποπεπτίδια	Μυκόπλασμα	TLR 6/TLR 2
Τριακυλο-λιποπεπτίδια	Βακτήρια και Μυκοβακτήρια	TLR 1/TLR 2
LTA	Στρεπτόκοκκος Ομάδας Β	TLR 6/TLR 2
PG	Gram (+) βακτήρια	TLR 2
Πορίνες	Neisseria	TLR 2
Λιποαραβινομαννάνη	Μυκοβακτήρια	TLR 2
Φλαγκελίνη	Βακτήρια φλαγκελίνης	TLR 5
CpG-DNA	Βακτήρια και Μυκοβακτήρια	TLR 9
Απροσδιόριστα	Ουροπαθογόνα βακτήρια	TLR 11
Μύκητες		
Zyosan	Σακχαρομύκητας cerevisiae	TLR 6/TLR 2
Φωσφολιπομαννάνη	Candida albicans	TLR 2
Μαννάνη	Candida albicans	TLR 4
Γλυκονοξυλομαννάνη	Cryptococcus neoformans	TLR 2/TLR 4
Παράσιτα		
tGPI-mutin	Τρυπανόσωμα	TLR 2
Γλυκοζινοφωσφολιπίδια	Τρυπανόσωμα	TLR 4
Αιμοζωΐνη	Πλασμώδιο	TLR 9
Μόριο τύπου προφυλλίνης	Τοξόπλασμα gondii	TLR 11
Ιοί		
DNA	Ιοί	TLR 9
dsRNA	Ιοί	TLR 3
ssRNA	RNA ιοί	TLR 7/TLR 8
Πρωτεΐνες φάκελοι	RSV, MMTV	TLR 4
Πρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνης	Ιός ιλαράς	TLR 2
Απροσδιόριστα	HCMV, HSV1	TLR 2
Ξενιστής		
Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60,70		TLR 4
Ινωδογόνο		TLR 4

Πίνακας 2.4.6: Αντιπροσωπευτικοί υποδοχείς τύπου Toll και οι ειδικοί τους συνδέτες¹⁸¹ (Τροποποίηση από Sylvia Knarr, 2010)

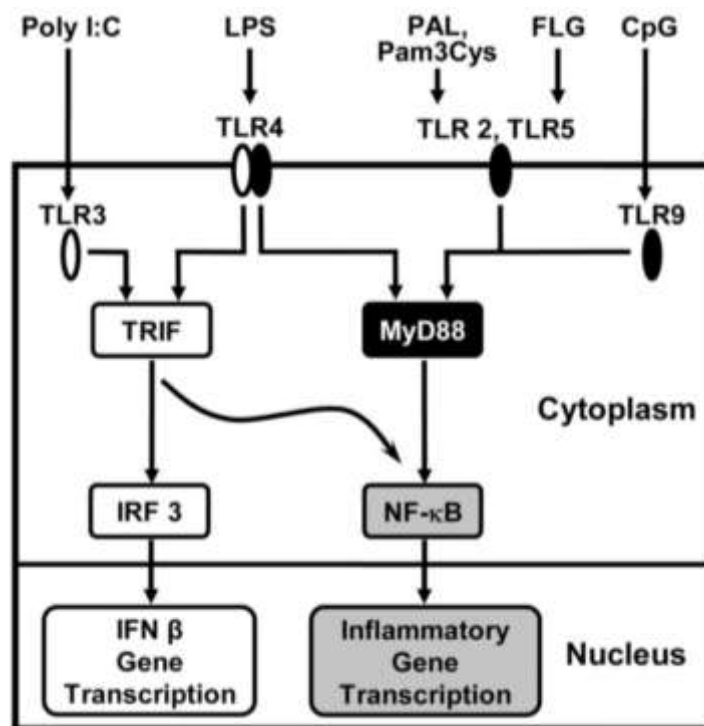
TLRs	PAMPs
TLR 2	Βακτηριακές λιποπρωτεΐνες (Pam3Cys, MALP-2) Λιποθειικό οξύ (LTA) Πεπτιδογλυκάνη (PGN) Zymosan
TLR 3	Διπλής έλικας RNA (dsRNA) (Poly [I:C])
TLR 4	Λιποπολυσακχαρίτης (LPS)
TLR 5	Φλαγγελίνη
TLR 7, TLR 8	Μονής έλικας RNA (ssRNA) Μικρές αντιϊκές ενώσεις
TLR 9	Μη μεθυλιωμένο CpG DNA

Πίνακας 2.4.γ: Οι υποδοχείς τύπου Toll, η έκφρασή τους σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα και οι εξωγενείς συνδέτες αυτών (Hans-Joachim Anders et al, 2004)

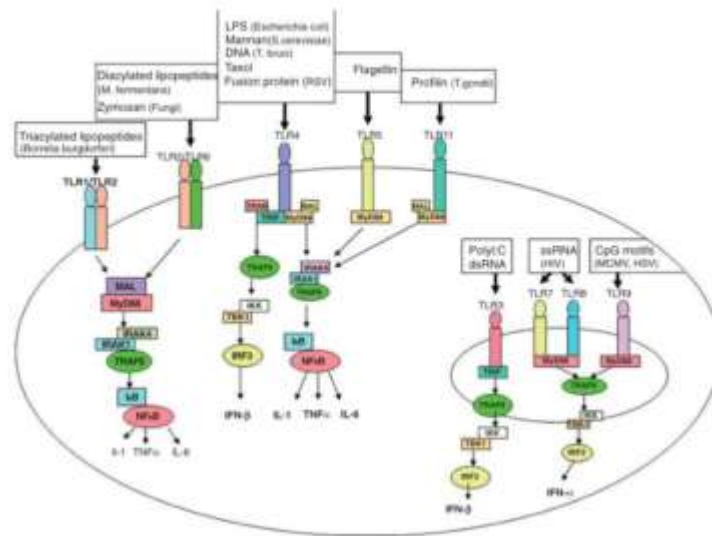
TLR	TLR και ανοσοκύτταρα	Συνδέτης	Προέλευση συνδέτη
TLR 1	M, DC, B, MC, NK	Διαλυτοί παράγοντες Τριακετυλιωμένες λιποπρωτεΐνες	Neisseria μηνιγγιτιδόκοκκου Μυκοβακτήρια
TLR 2	M, B, NK, DC	Λιποπρωτεΐνες, πεπτιδογλυκάνη, μοντουλίνη Γλυκολιπίδια, λιποπρωτεΐνες LPS Lipoara binomannan Λιποπρωτεΐνες/πεπτίδια Zygosan GPI άγκυρες Πρωτεΐνη A εξωτερικής μεμβράνης Διαλυτοί παράγοντες Πολυμερή μαννουρονικού οξέως	Gram(+) βακτήρια Σταφυλόκοκκος Σπιροχέτες Σπιροχέτες, H. pylori Μυκοβακτήρια Άλλα βακτήρια Ζυμομύκητες Τρυπανόσωμα cruzi Κλεμψιέλλα Neisseria μηνιγγιτιδόκοκκου Ψευδομονάδα aeruginosa
TLR 3	DC	dsRNA, ssRNA	Ιοί
TLR 4	M, N	LPS Λιποθειϊκά οξέα Ταξόλες Πρωτεΐνη F Πολυμερή μαννουρονικού οξέως	Gram(-) βακτήρια Gram(+) βακτήρια Φυτά Ιοί RS Ψευδομονάδα aeruginosa
TLR 5	M, DC	Φλαγγελίνη	Βακτήρια με flagella
TLR 6	M	Μοντουλίνη Zygosan Πρωτεΐνη A εξωτερικής μεμβράνης Διακετυλιωμένα λιποπεπτίδια	Σταφυλόκοκκος Ζυμομύκητες Μπορέλλια burgdorferi Μυκοβακτήρια
TLR 7	M, DC	Ιμιδαζοκινολίνες Ανάλογα γουανοσίνης	Αντιϊκές ενώσεις
TLR 8	TLR8	Ιμιδαζοκινολίνες	Αντιϊκές ενώσεις
TLR 9	DC, B	Μη μεθυλιωμένο CpG DNA	Βακτήρια, ιοί
TLR 10	B	?	?

M: μονοκύτταρα, NK: κύτταρα NK, B: B κύτταρα, T: T κύτταρα, MC: μαστοκύτταρα, DC: δενδριτικά κύτταρα, N: ουδετερόφιλα

Τόσο το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι όσο και η TRIF-εξαρτώμενη οδός είναι μονοπάτια σηματοδότησης με μεσολάβηση TLR, που όπως υποστηρίζεται επάγουν γονιδιακή έκφραση¹⁸². Όπως είναι σήμερα γνωστό, η σηματοδότηση με μεσολάβηση TLR εκφράζεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: α) MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι, οδηγώντας κυρίως στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών / χημειοκινών, β) TRIF-εξαρτώμενη οδός, που οδηγεί από μόνη της στην παραγωγή και των δύο IFN τύπου I, καθώς επίσης και στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών / χημειοκινών και γ) η μοναδική περίπτωση για τον TLR 4 στην οποία ενεργοποιούνται και οι δύο οδοί (MyD88 και TRIF)^{183,184}. (Εικόνα 2.4.β, 2.4.γ, 2.4.δ)

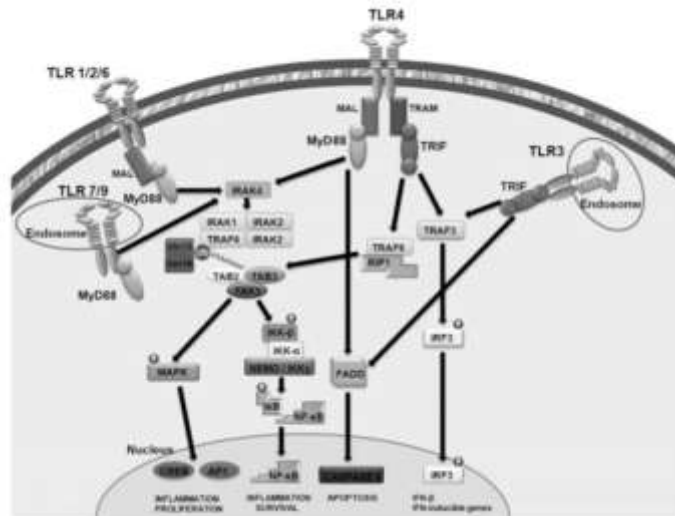


Εικόνα 2.4.β: Περιγραφή των MyD88-dependent και independent μονοπατιών. Με μαύρο χρώμα διαφοροποιείται το MyD88 εξαρτώμενο μονοπάτι, ενώ το ανεξάρτητο υποδηλώνεται με λευκό. Ο TLR 4 μπορεί να ακολουθήσει και τις δύο οδούς. Τα κοινά τμήματα των δύο οδών φέρουν γκρι απόχρωση και υποδηλώνουν ότι τόσο η MyD88 dependent όσο και η MyD88 non dependent οδός προκαλούν φλεγμονώδεις κυτοκίνες μέσω του NF-κB. (Τροποποίηση από Aranya Bagchi et al, Jan 2007)



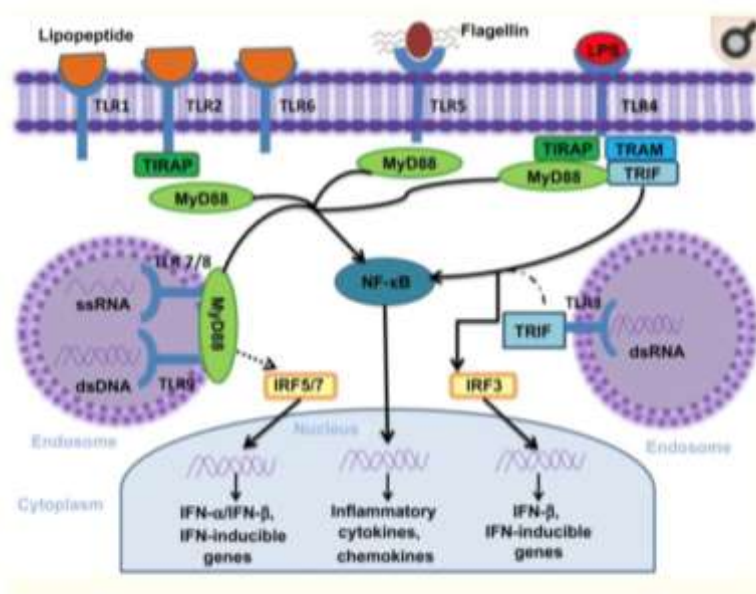
Εικόνα 2.4.γ: Ενεργοποίηση προφλεγμονωδών και αντι-ικτών αποκρίσεων από τους TLRs. Η σηματοδότηση των TLRs ξεκινά από ένα συγκεκριμένο σύνολο παθογόνων^{185,186}.

Διαφορετικές προσαρμοστικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση μεταγενέστερων παραγόντων μεταγραφής. Οι TLR 2, 4 και 11 χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες MAL και MyD88 για να ενεργοποιήσουν τον NF-κB. Μετά τη σύνδεση, προσλαμβάνονται οι IRAK1, IRAK4 και TRAF6. Με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται το σύμπλεγμα IκB, το οποίο με τη σειρά του φωσφορυλιώνεται και απελευθερώνει NF-κB για την ενδοκυτταρική μεταφορά του. Με τον τρόπο αυτό, παράγονται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Αντίθετα, οι TLR 3 και 4 χρησιμοποιούν την TRIF για να ενεργοποιήσουν την IRF3. Οι IKK και TBK1 προσλαμβάνονται από τα TRIF και TRAM και ενεργοποιούν την IRF3. Η τελευταία με τη σειρά της επάγει τον προαγωγό IFN-β για να αυξήσει την έκφραση των IFN-επαγώγιμων γονιδίων. Τέλος, οι TLR 7, 8 και 9 προσλαμβάνουν MyD88 και οδηγούν στη φωσφορυλίωση της IRF3 και τελικά στην παραγωγή αντι-ικτών κυτοκινών (IFN-α). (Susan Carpenter et al, May 2007)



Εικόνα 2.4.δ: Σηματοδότηση του ανθρώπινου υποδοχέα τύπου Toll¹⁸⁷. Όλοι οι TLRs, εκτός από τον TLR 3, προσλαμβάνουν MyD88 άμεσα (TLR 5, 7, 8 και 9) ή έμμεσα μέσω MAL (TLR 1, 2, 4 και 6). Για τον TLR 4 υπάρχει και το ενδιάμεσο μονοπάτι με πρόσληψη TRIF έμμεσα μέσω TRAM. Αντίθετα, ο ενδοσωμάτιος TLR 3 προσλαμβάνει TRIF και σηματοδοτεί μόνο μέσω της οδού που εξαρτάται από την TRIF. Η οδός TRIF οδηγεί στην ενεργοποίηση της IRF3 και στην καθυστερημένη ενεργοποίηση του NF-κB μέσω των RIP-1 και TRAF6. Η οδός MyD88 οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων μεταγραφής, όπως CREB, AP-1 και NF-κB. Επιπλέον, η MyD88 προσλαμβάνει FADD που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Οι CREB και AP-1 είναι υπεύθυνες για τη φλεγμονή και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο NF-κB προκαλεί φλεγμονή και προάγει την επιβίωση των κυττάρων. Η IRF3 παράγει INF και προκαλεί μεταγραφή INF γονιδίων. Τέλος, η κασπάση 8 προκαλεί απόπτωση κυττάρων¹⁸⁸. (Theodoros Eleftheriadis et al, 2012)

Έχουν περιγραφεί τέσσερις πρωτεΐνες προσαρμογών που εμπλέκονται σε αυτές: ο μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88 (MyD88), η πρωτεΐνη τύπου MAL ή πρωτεΐνη προσαρμογέα Toll / ιντερλευκίνη-1-υποδοχέα TIR (TIRAP), η πρωτεΐνη προσαρμογής που περιέχει TIR που προκαλεί ιντερφερόνη-β (TRIF ή TICAM1) και το μόριο προσαρμογέα που σχετίζεται με TRIF (TRAM ή TICAM2)¹⁸⁹. Πρόσφατα, προστέθηκε σε αυτή την οικογένεια και μία πέμπτη πρωτεΐνη προσαρμογέα, γνωστή ως sterile α και armadillo motif-containing protein¹⁹⁰. (Εικόνα 2.4.ε).



Εικόνα 2.4.ε: TLR και βασικοί προσαρμογείς σήματος. (Τροποποίηση από Patricia Valles et al, 2014)

2.4.i MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι (MyD88-dependent pathway)

Η οδός MyD88 χρησιμοποιεί τον προσαρμογέα σηματοδότησης MyD88 και τον προσαρμογέα γεφύρωσης TIRAP/MAL (TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor like) και οδηγεί σε πρώιμη ενεργοποίηση του NF-κB και παραγωγή κυτοκινών όπως TNF-α, IFN και ιντερλευκινών¹⁹¹.

Μετά τη δέσμευση του TLR μέσω των πεδίων TIR στο C-τελικό άκρο της MyD88, αυτή σχηματίζει ένα σύμπλοκο με μέλη της οικογένειας κινάσης IRAK (κινάση σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1, IL-1 receptor-associated kinase). Στη συνέχεια, η IRAK4 ενεργοποιεί την IRAK1. Η τελευταία αυτοφωσφορυλιώνεται σε αρκετές θέσεις και απελευθερώνεται από τη MyD88. Η IRAK1 συνεργάζεται με ένα από τα μέλη της οικογένειας TRAF (παράγοντας σχετιζόμενος με τον TNF υποδοχέα, TNF receptor associated factor), την TRAF6 λιγάση. Η TRAF6 με τη βοήθεια ενζύμων (UBC13 και UBV1A) προάγει τη σύνδεση με K63 τόσο τη ίδιας της TRAF6, όσο και του συμπλόκου πρωτεΐνης κινάσης TAK1 (μέλος της οικογένειας MAPKKK). Οι ρυθμιστικές υπομονάδες TAB1, TAB2 και TAB3 αλληλεπιδρούν με την TRAF6 και ενεργοποιούν την TAK1. Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την οδό συμπλέγματος IKK-NF-κB και το μονοπάτι MAPK. Το σύμπλεγμα

IKK αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ και την ρυθμιστική υπομονάδα NEMO (ονομαζόμενη επίσης IKKγ). Η TAK1 δεσμεύεται στο σύμπλεγμα IKK, με αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνει και να ενεργοποιεί την IKKβ. Το σύμπλεγμα IKK φωσφορυλιώνει την ανασταλτική πρωτεΐνη IκBα του NF-κB, η οποία υφίσταται αποικοδόμηση πρωτεασώματος. Έτσι, ο NF-κB μετακινείται στον πυρήνα για να προκληθεί έκφραση του προφλεγμονώδους γονιδίου. Η ενεργοποίηση TAK1 έχει επίσης ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μελών της οικογένειας MAPK (ERK1/2, p38, JNK). Η τελευταία ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας AP-1 ή σταθεροποιεί το mRNA για τη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Με την εξαίρεση των TLR 3 και TLR 4, όλοι οι TLRs που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα σηματοδοτούνται αποκλειστικά μέσω του MyD88 εξαρτώμενου μονοπατιού. Ο TLR 4 είναι ο μοναδικός υποδοχέας που ενεργοποιεί και τις δύο οδούς¹⁹².

2.4.ii TRIF-μεσολαβούμενη οδός (*MyD88-independent pathway / TRIF-dependent pathway*)

Η TRIF μεσολαβούμενη οδός σηματοδοτεί τη διέγερση της IFN-β, η οποία με τη σειρά της προκαλεί τον προσαρμογέα που περιέχει Toll-IL-1R και οδηγεί σε παραγωγή IFN-β¹⁹³. Η ίδια οδός ενεργοποιείται επίσης μέσω του NF-κB με καθυστέρηση, οδηγώντας στην παραγωγή TNF και άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών¹⁹⁴. Ο TLR 3, ο οποίος αναγνωρίζει το ιικό dsRNA, επάγει φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF, IFN-β, IL-6) αποκλειστικά μέσω της TRIF οδού. Ο TLR 4 έχει τη μοναδική ικανότητα να ενεργοποιεί και τα δύο μονοπάτια.

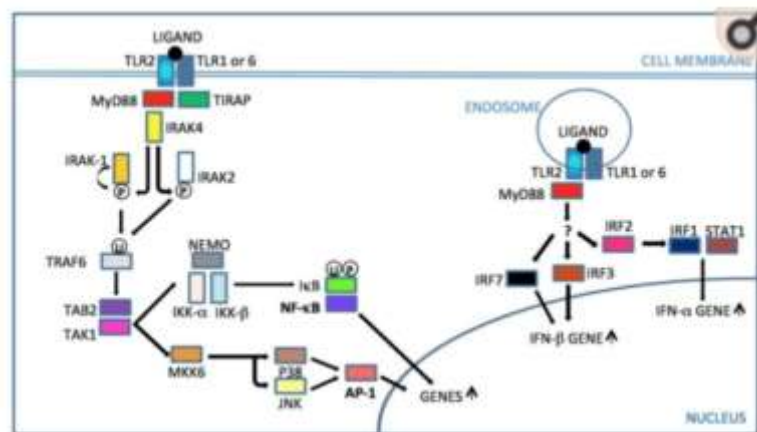
Η TRIF αλληλεπιδρά με δύο μέλη της οικογένειας TRAF. Η TRAF6 προσλαμβάνει την κινάση RIP-1 για την ενεργοποίηση του συμπλόκου TAK1, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των NF-κB και MAPKs καθώς και την επαγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Αντίθετα, η TRAF3 προσλαμβάνει τις σχετικές με IKK κινάσες, TBK1 και IKKι μαζί με NEMO για φωσφορυλίωση της IRF3. Στη συνέχεια, η IRF3 σχηματίζει ένα διμερές και μετακινείται στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα, όπου επάγει την έκφραση γονιδίων IFN τύπου I¹⁹⁵.

Οι λιγάσες της οικογένειας Pellino E3 εμπλέκονται στη σηματοδότηση των TLRs¹⁹⁶. Η Pellino-1 φωσφορυλιώνεται από την TBK1 / IKKι και έτσι διευκολύνει την ουβικιτινίωση της RIP-1. Με τον τρόπο αυτό, διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από TRIF NF-κΒ με την πρόσληψη RIP-1. Τέλος, η Pellino-1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση της IRF3 με δέσμευση στην DEAF-1, έναν παράγοντα μεταγραφής που διευκολύνει τη δέσμευση της IRF3 στον προαγωγό IFN-β^{197,198}.

2.4.1 TLR 1, 2, 6

Ο TLR 2 είναι ένας υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας, ο οποίος ανταποκρίνεται σε λιποπρωτεΐνες και λιποπεπτίδια από ένα μεγάλο φάσμα παθογόνων (*Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* και *Mycoplasma fermentans*)¹⁹⁹. Αναγνωρίζει μια ευρεία περιοχή μικροβίων λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει ετεροδιμερή με τους TLR 1 και 6. Τα ετεροδιμερή TLR 1/TLR 2 ή TLR 2/TLR 6 ανταποκρίνονται στα τρι- ή διακυλιωμένα λιποπεπτίδια από μικροβιακές μεμβράνες αντίστοιχα. Τα ετεροδιμερή του TLR 2 πιστεύεται ότι ανήκουν στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και προκαλούν κυρίως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Αντίθετα, η έκφραση των TLR 1 και 6 στην κυτταρική επιφάνεια δεν έχει πιστοποιηθεί, λόγω της απουσίας αντισωμάτων για την ανίχνευση αυτών των TLRs. Επιπρόσθετα, μια προηγούμενη μελέτη αναφέρει ότι ο TLR 2 εντοπίζεται και στα φαγοσώματα²⁰⁰. Ο TLR 2 λοιπόν, σχηματίζει συνδυαστικά συμπλέγματα ως απάντηση σε διαφορετικά μικροβιακά ερεθίσματα. Ένα νέο σύμπλοκο συνδέτη έχει προταθεί για την ενεργοποίηση με συνδέτες διακυλογλυκερόλης, περιλαμβανομένων των λιποπεπτιδίων: το CD36 μπορεί να δεσμεύει προσδέτες και να τα μεταφέρει στο βοηθητικό μόριο CD14, το οποίο με τη σειρά του ενσωματώνει τον προσδέτη σε ετεροδιμερή TLR 2 / TLR 6 (FSL-1, MALP-2 και LTA) ή σε ετεροδιμερή TLR 2 / TLR 1 (λιπομαννάνη)²⁰¹. Παρόμοια με τον TLR 4, αυτά τα συμπλέγματα σχηματίζονται μέσα σε λιπιδικές σχεδίες, δηλαδή σε έναν περιορισμένο χώρο που καθορίζει τον μηχανισμό ενδοκυτταρικής σηματοδότησής τους, καθώς και έναν μηχανισμό ταξινόμησης που θα ορίσει τη μετάβασή τους από την επιφάνεια στο εσωτερικό του κυττάρου²⁰². Τα μόρια CD14 και CD36 αγκυροβολούν στις σχεδίες αυτές και διαμεσολαβούν στην μετάβαση του

συμπλόκου εντός της συσκευής Golgi. Ο ρόλος αυτών των μορίων είναι η ενίσχυση των αποκρίσεων, καθώς και η μείωση των συγκεντρώσεων που απαιτούνται για την αναγνώριση και τη σηματοδότηση του υποδοχέα²⁰³. Μετά τη διέγερση των προσδέτων, τα ετεροδιμερή του TLR 2 πυροδοτούν μια εξαρτώμενη από MyD88 ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης, η οποία είναι κοινή σε όλους τους TLRs, εκτός από τον TLR 3. Αυτή η οδός προκαλεί πυρηνική μετατόπιση του πυρηνικού παράγοντα-Β (NF-Β) για τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής και της επακόλουθης παραγωγής φλεγμονώδους κυτοκίνης (Εικόνα 2.4.1). Ο καταρράκτης αντιδράσεων προκαλεί επίσης τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης / θρεονίνης (MAPKs) που μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη μεταγραφή των φλεγμονωδών γονιδίων, όσο και τη σταθερότητα του mRNA αυτών των μεταγραφών με επαγωγή πρωτεΐνης ενεργοποίησης 1 (AP-1)²⁰⁴.



Εικόνα 2.4.1: Σηματοδότηση TLR 2. Αναγνωρίζεται ο συνδέτης και γίνεται διμερής αναδιάταξη του TLR 2. Η TIR του TIRAP δεσμεύει την TIR του TLR 2 και προσλαμβάνει MyD88. Στη συνέχεια, προσλαμβάνονται οι IRAK, η IRAK4 φωσφορυλιώνεται (P) σε IRAK1, διαχωρίζεται από το σύμπλεγμα και ενεργοποιεί την TRAF6. Η IRAK2 ενεργοποιεί επίσης την TRAF6 σε δεύτερο χρόνο. Η ουβικιτινωμένη (U) TRAF6 ενεργοποιεί την αλληλουχία ενεργοποίησης του TAB2 - TAK1 - IKK συμπλέγματος. Η φωσφορυλίωση IκB και η ουβικιτινίωση από το σύμπλοκο IKK οδηγεί στην αποικοδόμηση και απελευθέρωση της μετατόπισης του NF-κΒ στον πυρήνα για τη ρύθμιση των γονιδίων. Η TAK1 ενεργοποιεί επίσης την MKK6 για επακόλουθη ενεργοποίηση JNK και p38, για ενεργοποίηση AP-1 και μεταγραφή γονιδίων κυτοκινών και βοηθητικών μορίων. Εσωκλεισμένο σύμπλοκο υποδοχέα που πυροδοτείται από ένα ιικό πρόσδεμα μπορεί να ενεργοποιήσει μέσω μιας

άγνωστης οδού IRF7/3 τη ρύθμιση γονιδίου IFN-β ή IRF2/IRF1/STAT1 για τη ρύθμιση γονιδίου IFN-α. (Laura Oliveira-Nascimento, Front Immunol, 2012)

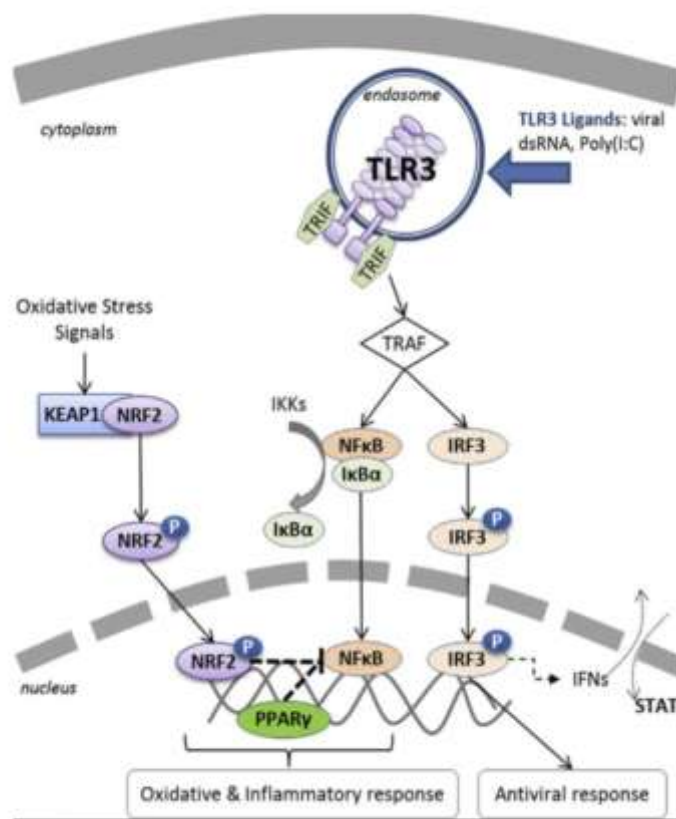
2.4.2 TLR 3

Ο TLR 3 διαμεσολαβεί την απόκριση σε μονοκλωνικό (ssRNA) και δίκλωνο ιικό RNA (dsRNA), συμπεριλαμβανομένου του poly (I:C)²⁰⁵. Η ενεργοποίηση του TLR 3 προκαλεί επαγωγή των αντι-ιικών και προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6 και IFN τύπου 1), ενίσχυση της απόπτωσης καθώς και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DC)²⁰⁶. Ο TLR 3 εκφράζεται σε DCs, αστροκύτταρα, κύτταρα Schwann, κύτταρα T, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, πειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα και ηπατοκύτταρα. Ανευρίσκεται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα και τα ενδολυσοσώματα. Παρόλα αυτά, τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζονται να εκφράζουν μοναδικά αυτόν τον TLR στην κυτταρική τους επιφάνεια²⁰⁷. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, ο εν λόγω υποδοχέας εκφράζεται και στην επιφάνεια των μακροφάγων²⁰⁸. Η λοίμωξη από ιούς οδηγεί στην έκφραση TLR 3 στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά η έκφραση TLR 3 μπορεί να οδηγηθεί κατά τη διάρκεια χρόνιας φλεγμονής απουσία ιού ή υποπροϊόντων ιών.

Ο TLR 3 αναγνωρίζει κυρίως το dsRNA, το οποίο προέρχεται από το γονιδίωμα του ιού που παρουσιάζεται εξωκυτταρικά. Πρόκειται για αυτό το γονιδίωμα του ιού, που απελευθερώνεται από κατεστραμμένα κύτταρα ξενιστές ή/και ιικά σωματίδια. Για να προκληθεί σηματοδότηση του TLR 3, τα μόρια dsRNA πρέπει να έχουν μήκος τουλάχιστον 40-50 bp. Η δέσμευση του TLR 3 σε μόρια dsRNA γίνεται σε δύο θέσεις. Επιπλέον, ο TLR 3 αντιλαμβάνεται κυρίως μη μεθυλιωμένα μόρια RNA. Το dsRNA αποκτά πρόσβαση στο ενδοσωμικό διαμέρισμα με φαγοκυττάρωση κυττάρων μολυσμένων με ιό ή αποπτωτικών κυτταρικών υπολειμμάτων, καθώς και με εσωτερίκευση αντισωμάτων που συνδέονται με ιούς ή αυτοφαγία. Η ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος από τον TLR 3, έχει σαν αποτέλεσμα την απόκριση ιντερφερόνης τύπου I (IFN). Ο TLR 3 μεταδίδει σήματα μέσω της οδού TRIF, η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση και την πυρηνική μετατόπιση της IRF3. Με αυτό τον τρόπο, πυροδοτείται η μεταγραφή και η έκκριση της IFN-β. Η σηματοδότηση TLR 3/TRIF

ενεργοποιεί επίσης τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) και τη μεταγραφή γονιδίων φλεγμονωδών κυτοκινών²⁰⁹.

Εν κατακλείδι, η ενεργοποίηση του TLR 3 επιδεινώνει και/ή ενισχύει την προϋπάρχουσα φλεγμονή, που σχετίζεται κυρίως με το νεφρό και τον γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπροσθέτως, ο συνδέτης TLR 3 ενισχύει τη συστηματική υπερφλεγμονώδη ανταπόκριση που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της σήψης²¹⁰. Έχει αποδειχθεί ότι, ο TLR 3 εκφράζεται σε νεφρικούς ιστούς μύος και ανθρώπου, και ειδικότερα στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα²¹¹. Φαίνεται ότι εκφράζεται σε αυτά τα κύτταρα φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα και αυξάνεται μετά από πρόκληση με LPS in vitro μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα ωρών^{212,213}. Η ιδέα ότι ο TLR 3 εμπλέκεται στην ΟΝΑ, έχει την ρίζα της στην υπόθεση ότι μετά την κυτταρική βλάβη, μπορούν να απελευθερωθούν κυτταροπλασματικά νουκλεοτίδια (δηλ. RNA), τα οποία στη συνέχεια θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν γειτονικά κύτταρα και συνεπώς να προκαλέσουν φλεγμονή^{214,215} (Εικόνα 2.4.2).



Εικόνα 2.4.2: Οδός σηματοδότησης TLR 3. Ο TLR 3 εκφράζεται σε ενδοσωματικά διαμερίσματα. Αναγνωρίζει ιικό dsRNA και το συνθετικό ανάλογο poly (I:C). Ενεργοποίηση της οδού TLR 3 επάγει τη φωσφορυλίωση της IRF3 με μετατόπιση της τελευταίας στον πυρήνα. Έτσι, παράγεται αντι-ική απόκριση με έκκριση της IFN τύπου 1. Επίσης, προκαλείται αποικοδόμηση IκBa από IKK, διευκολύνοντας τη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα. Τελικά, γίνεται ενεργοποίηση της μεταγραφής φλεγμονωδών κυτοκινών και ενζύμων που οδηγεί σε συσσώρευση αντιδραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου. Η ενεργοποίηση των PPARg και NRF2 λειτουργεί αντισταθμιστικά. Τα σήματα οξειδωτικού στρες επάγουν μια μεταβολή της διαμόρφωσης στην ανασταλτική πρωτεΐνη NRF2, KEAP1, με αποτέλεσμα μετατόπιση του NRF2 στον πυρήνα και σύνδεση με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης (ARE), που προάγουν τη γονιδιακή μεταγραφή αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ενζύμων. Το PPARg μειώνει την έκφραση και τη δραστικότητα του NF-κB²¹⁶. (McDowell et al, *Neuropharmacology* 2017)

2.4.3 TLR 4

Ο TLR 4 είναι το πρώτο ανθρώπινο ομόλογο του υποδοχέα Toll της *Drosophila* που περιγράφεται²¹⁷. Αναγνωρίζει σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα, όπως λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ιικό δίκλωνο RNA καθώς και ιικό και βακτηριακό CpG DNA. Ακόμη, δημιουργεί έμφυτες ανοσοαποκρίσεις σε παθογόνους παράγοντες ενεργοποιώντας έναν καταρράκτη προφλεγμονωδών αντιδράσεων. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), ένας ισχυρός ανοσοδιεγερτής και ο αιτιολογικός παράγοντας του ενδοτοξικού σοκ είναι το κύριο συστατικό του εξωτερικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηριδίων. Ο TLR 4 είναι επίσης ικανός να αποκρίνεται σε συστατικά μυκητιασικών παθογόνων^{218,219}. Άλλοι συνδέτες του TLR 4 περιλαμβάνουν την ταξόλη²²⁰ και την πρωτεΐνη σύντηξης από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό²²¹.

Ο TLR 4 χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αναγνώρισης εξωγενών μορίων από παθογόνα, τα ονομαζόμενα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) και ιδιαίτερα τα μόρια από gram(-) βακτηρίδια (π.χ., LPS). Επιπρόσθετα, εμπλέκεται στην αναγνώριση ενδογενών μορίων, τα οποία είναι γνωστά ως μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με κίνδυνο/βλάβη (DAMPs) και απελευθερώνονται από τραυματισμένους ιστούς και νεκρωτικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται

ενεργοποίηση μιας ισχυρής προφλεγμονώδους απόκρισης. Η φλεγμονή πυροδοτεί μια αντίδραση του οργανισμού με προστατευτικό ρόλο, πολύπλοκη αλλά και αλυσιδωτή. Η ακεραιότητα και η αναστροφή της βλάβης του οργάνου αποτελούν τον κύριο στόχο. Οι ισορροπίες ωστόσο είναι πολύ λεπτές με αποτέλεσμα, η υπερβολική ή ανεπαρκώς ρυθμισμένη φλεγμονώδης απάντηση να αποβεί επιβλαβής για τον οργανισμό. Σε αρκετές ασθένειες μικροβιακής (Gram(-) λοιμώξεις) ή μη αιτιολογίας (βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης) υπάρχει εμπλοκή ενεργοποίησης του TLR 4 που, υπό ορισμένες συνθήκες, μπορεί να συμβάλλει στην πρόοδο της νόσου.

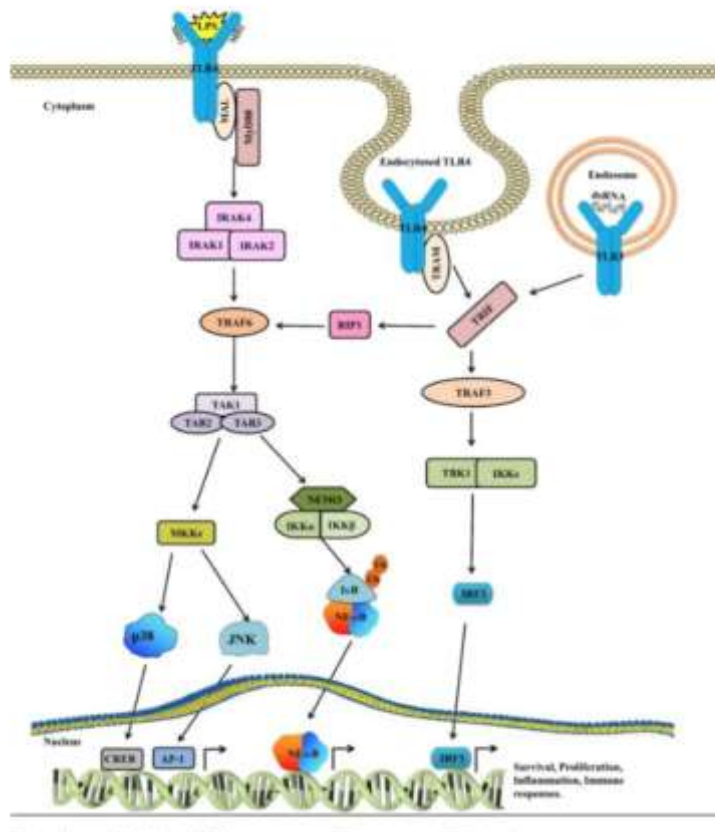
Ο TLR 4 είναι ο μοναδικός μεταξύ των TLRs που ενεργοποιεί δύο διακριτές οδούς σηματοδότησης. Η πρώτη οδός ενεργοποιείται από τους προσαρμογείς TIRAP και MyD88 και προκαλεί επαγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Η δεύτερη, ενεργοποιείται από τους προσαρμογείς TRIF και TRAM, με επακόλουθη έκφραση ιντερφερονών τύπου I. Οι Ruslan Medzhitov et al έδειξαν ότι οι δύο οδοί σηματοδότησης εκδηλώνονται διαδοχικά και επιπλέον, ότι η οδός TRAM-TRIF λειτουργεί μόνο μετά από ενδοκυττάρωση του TLR 4 από πρώιμα ενδοσώματα²²². Συγκεκριμένα, η εμπλοκή του συνδέτη του TLR 4 στη μεμβράνη του πλάσματος επάγει την οδό TIRAP/MyD88. Στη συνέχεια, ο υποδοχέας μεταφέρεται μέσα σε ενδοσώματα για να εμπλέξει την οδό TRAM/TRIF. Πιστοποιείται λοιπόν ότι, ο TRAM είναι ένας προσαρμογέας διαλογής που καθορίζει τη θέση της ενδοκυτταρικής σήμανσης του TLR και οι υποδοχείς που επάγουν την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I σημαίνουν από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα²²³.

Ο TLR 4 δρα ως υποδοχέας λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και συνεργάζεται με την πρωτεΐνη μυελοειδούς παράγοντα διαφοροποίησης 2 (MD-2) και το CD14, προκειμένου να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα που αλληλεπιδρά με τον LPS. Μετά τη δέσμευση LPS, λαμβάνει χώρα διμερισμός δύο συμπλόκων TLR 4/MD-2 και πρόσληψη των μορίων MyD88 και TIRAP μεταξύ των περιοχών TIR, στην κυτταροπλασματική ουρά του TLR 4 και εκείνων που υπάρχουν στους προσαρμογείς. Αυτός ο καταρράκτης αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης επιτρέπει μεταγενέστερη σηματοδότηση και μεσολαβεί στην ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα και ενός πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), με

αποτέλεσμα την επαγωγή των προφλεγμονωδών γονιδίων, όπως αυτά που κωδικοποιούν TNF- α , IL-6 και IL-1 β ²²⁴.

Η διαμεσολαβούμενη από MyD88 σηματοδότηση λαμβάνει χώρα κυρίως στη μεμβράνη του πλάσματος και συνεπάγεται ταχεία πρόσληψη πρωτεϊνών MyD88 και MAL. Αυτή η δέσμευση διεγείρει την πρόσληψη και φωσφορυλίωση των σχετιζόμενων με IL-1R κινασών (IRAKs), τη συσχέτιση του παράγοντα 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TRAF6) και την ενεργοποίηση του β -ενεργοποιημένου κινάσης μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα 1 (TAK1). Η τελευταία πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση των προσαρμοστικών πρωτεϊνών, της πρωτεΐνης σύνδεσης TAK1 και της πρωτεΐνης δέσμευσης TAK1 (TAB2 και TAB3). Η TAK1, με τη σειρά της, ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (MAPK), την JUN N-τελική κινάση (JNK), την p38 (MAPK), τις εξωκυτταρικές κινάσες που ρυθμίζονται από τα γονίδια MAPK3/MAPK1 αντίστοιχα (ERK1/2) και το σύμπλεγμα κινάσης I κ B (IKK). Σημαντικοί παράγοντες μεταγραφής, όπως ο πυρηνικός παράγοντας B (NF-B) και η ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1 (AP-1), προάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών^{225,226,227,228} (Εικόνα 2.4.3).

Η ενεργοποίηση του TRIF μεσολαβούμενου μονοπατιού λαμβάνει χώρα στο ενδοσωμικό διαμέρισμα μετά την εσωτερίκευση του συμπλόκου TLR 4/MD-2. Περιλαμβάνει την πρόσληψη πρωτεϊνών προσαρμογής TRIF και TRAM, την ενεργοποίηση του παράγοντα 3 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TRAF3) και τέλος, την επαγωγή πυρηνικής μετατόπισης του ρυθμιστικού παράγοντα 3 (IRF3) με μεσολάβηση κινάσης 1 δέσμευσης TANK (TBK) και IKK ϵ . Ο παράγοντας μεταγραφής IRF3 προάγει την παραγωγή IFN τύπου I (Εικόνα 2.4.3). Το CD14 ευνοεί την εσωτερίκευση του συμπλέγματος υποδοχέα, παρόλο που η ανεξάρτητη από CD14 μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα στο ενδόσωμα και η σηματοδότηση TRIF έχουν πρόσφατα περιγραφεί^{229,230}.



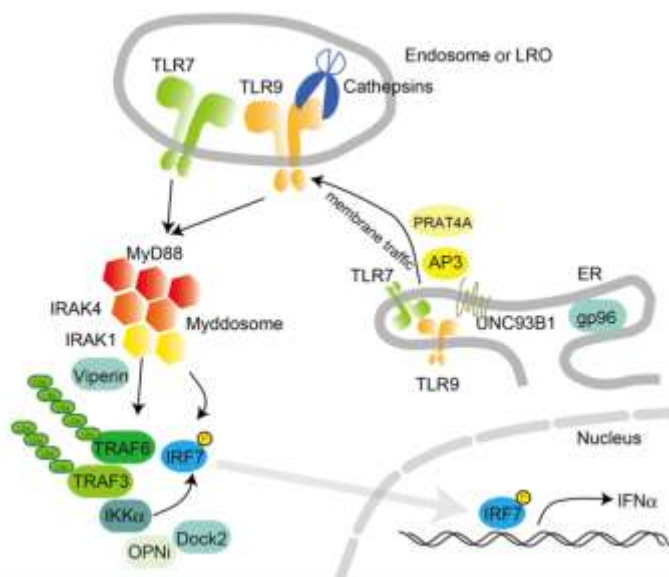
Εικόνα 2.4.3: Οδός σηματοδότησης TLR 4. Ο TLR 4 ενεργοποιείται με LPS, ενώ τα CD14 και MD-2 δρουν ως βοηθητικές πρωτεΐνες για τη δημιουργία του συμπλόκου LPS/TLR 4. Ο TLR 4 διμερίζεται και προσλαμβάνει MyD88/MAL και TRIF/TRAM για την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης. Το ενεργοποιημένο MyD88/MAL ενεργοποιεί τα σύμπλοκα IRAK4, TRAF6, TAK1 και IKK, ενώ το TRIF/TRAM σηματοδοτεί μέσω RIP1 έως TRAF6/TAK1 και IKK. Έπειτα, και οι δύο οδοί συγκλίνουν στο NF-κB που διατηρείται στην αδρανή κατάσταση με IκB και αποικοδομείται από πρωτεασώματα, για την ενδοπυρηνική μετατόπισή του. Η TAK1 ενεργοποιεί τον NF-κB και φωσφορυλιώνει τις MAPK για περαιτέρω ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης. Η οδός TRIF/TRAM ενεργοποιεί τον NF-κB και την IRF3 για πρόκληση αντι-ιικής απάντησης²³¹. (Τροποποίηση από Yesudhas et al, Front Immunol 2014)

2.4.4 TLR 7, 9

Οι TLR 7 και 9 είναι σημαντικοί μεσολαβητές της φυσικής ανοσοαπόκρισης του οργανισμού στη λοίμωξη. Και οι δύο υποδοχείς είναι δομικά σχεδόν πανομοιότυποι και βρίσκονται σε ενδοσωμικά διαμερίσματα. Επιπλέον, αναγνωρίζουν νουκλεϊκά οξέα και σηματοδοτούν μέσω της MyD88 εξαρτώμενης

οδού²³². Ο TLR 7 αναγνωρίζει ιικό μονόκλωνο RNA, ενώ ο TLR 9 αναγνωρίζει μη μεθυλιωμένο DNA με CpG μοτίβα. Αμφότεροι, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσοαπόκρισης, όσο και στην ιική παθογένεση^{233,234}. Οι υποδοχείς TLR 7 και 9 καθώς και οι αγωνιστές τους μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να επηρεάζουν την κυτταρική απόκριση στην διέγερση των παθογόνων παραγόντων. Οι φυσικοί και συνθετικοί αγωνιστές TLR 7 αναστέλλουν την προκαλούμενη από CpG-ODN παραγωγή IFNα από πλασματοκυτοειδή δενδριτικά κύτταρα και τα Β κύτταρα μετά από συνδιέγερση TLR 7/TLR 9²³⁵. Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι οι TLR 7 και 9 ανταποκρίνονται στο πλούσιο σε γουανοσίνη (G) και ουριδίνη (U) RNA μονής έλικας (ssRNA) από τον ανθρώπινο ιό ανοσοανεπάρκειας-1 (HIV-1)²³⁶ και από τους ιούς ssRNA, όπως το ρινοπυρηνικό αντιγόνο Δάγκειος και τη γρίπη.

Τα πλασματοκυτοειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs, επίσης γνωστά ως κύτταρα που παράγουν IFN) είναι ένα υποσύνολο DCs που εκκρίνουν γρήγορα μεγάλες ποσότητες IFN τύπου I, τυπικά IFN-α, κατά τη διάρκεια της ικής λοίμωξης. Τα pDCs εκφράζουν τους TLR 7 και TLR 9 και μπορούν να παράγουν IFN τύπου I και φλεγμονώδεις κυτοκίνες σε απόκριση προς τους συγγενείς συνδέτες τους, ιικό ssRNA και DNA. Ειδικότερα, η επαγωγή IFN τύπου I μέσω των TLR 7 και TLR 9 εξαρτάται απολύτως από το MyD88, σε αντίθεση με τους TLR 3 και 4 που χρησιμοποιούν TRIF. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι υπάρχει μία μοναδική οδός στα pDCs, που μπορεί να ελέγξει την παραγωγή IFN-α κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη MyD88. Έχει παρατηρηθεί ότι η IRF7 εκφράζεται σε pDCs, με αποτέλεσμα οι μύες με έλλειψη IRF7 να αποτυγχάνουν να παράγουν IFN-α από pDCs ως απάντηση σε αυτά τα ερεθίσματα. Αντιθέτως, pDCs με έλλειψη IRF3 παράγουν φυσιολογικές ποσότητες IFN-α ως απόκριση στους συνδέτες TLR 7 και TLR 9²³⁷. Συνολικά, η IRF7, αλλά όχι η IRF3, συμμετέχει στην παραγωγή IFN-α σε σηματοδότηση TLR 7 και TLR 9. Από την άποψη αυτή, η IRF7 έχει αποδειχθεί ότι συνδέει MyD88, IRAK4 και TRAF6 (Εικόνα 2.4.4). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι σε απόκριση προς τους συνδέτες TLR 7 και TLR 9, η IRF7 φωσφορυλιώνεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα²³⁸.



Εικόνα 2.4.4: Ενδοκυτταρική σηματοδότηση TLRs σε pDCs. Ενεργοποίηση TLR 7 και 9 στα pDCs μέσω της MyD88, προσλαμβάνει την IRAK4. Το σύμπλεγμα MyD88 περιέχει επίσης TRAF3, TRAF6, IRAK4, IRAK1, IKKα, OPN1 και Dock2. Ακολουθεί άμεση ή έμμεση πρόσληψη IRF7 προς φωσφορυλίωση από IKKα και/ή IRAK1. Τα ένζυμα UNC93B1, PRAT4A και AP3 συμβάλλουν στην εντόπιση και μετακίνηση των TLR 7 και 9 από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο λυσόσωμα (LRO). Ακολουθεί μετατροπή των TLRs σε ώριμες μορφές με καθειψίνες. Τα pDCs χρησιμοποιούν μια ξεχωριστή οδό σηματοδότησης από αυτή σε cDCs ή μακροφάγα για να επάγουν τη σύνθεση μεγάλης ποσότητας IFN τύπου I. Το gp96, ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ 90, λειτουργεί συνοδευτικά για τους περισσότερους TLRs²³⁹.

(Τροποποίηση από Kawasaki et al, Front Immunol. 2014)

2.5 ΣΗΨΗ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA) είναι μια συνηθισμένη επιπλοκή σε ασθενείς στη ΜΕΘ^{240,241}. Παρατηρείται σε ποσοστό μέχρι 57% των βαρέως πασχόντων και η σηψαιμία είναι το συχνότερο αίτιο στο 50% αυτών^{242,243}. Η ONA σχετίζεται με υψηλή συνολική θνητότητα (40-60%)^{244,245,246,247} καθώς και επιβλαβείς βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες εκβάσεις με τη μορφή χρόνιας νεφρικής νόσου (ΧΝΑ) ή τελικού σταδίου νεφρικής νόσου (ESRD)^{248,249,250}.

Σε γενικές γραμμές η σηπτική ONA ορίζεται ως σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζουν τα καινούρια κριτήρια Σήψης (Sepsis-3)²⁵¹ καθώς και ο νεότερος ορισμός της ONA από τον Οργανισμό «Νεφρική Νόσος: Βελτίωση παγκόσμιων αποτελεσμάτων» (KDIGO)²⁵² (Πίνακας 2.5). Πρόκειται για μια βελτιωμένη και

αναβαθμισμένη εκδοχή του ακρωνυμίου RIFLE (Κίνδυνος, Βλάβη, Ανεπάρκεια, Απώλεια οργάνου και Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου) καθώς και της Οργάνωσης ONA (AKIN)^{253,254}, που χαρακτηρίζαν τη νεφρική δυσλειτουργία ως απότομη μείωση της λειτουργίας των νεφρών κατά τη διάρκεια μιας περιόδου ωρών έως ημερών, με επακόλουθο τη συσσώρευση κρεατινίνης, ουρίας και άλλων μεταβλητών.

Σήμερα, σύμφωνα με τον Οργανισμό KDIGO, η αύξηση της κρεατινίνης ορού μεγαλύτερη ή ίση με 0,3 mg/dL (26,5 μmol/L) εντός 48 ωρών χαρακτηρίζει την ONA. Παρατηρείται δηλαδή, αύξηση της κρεατινίνης ορού τουλάχιστον 1,5 φορά της αρχικής τιμής κατά τις τελευταίες 7 ημέρες. Αντίστοιχα, ο όγκος ούρων ανευρίσκεται μικρότερος από 0,5 mL ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους ανά ώρα για 6 ώρες (ολιγουρία)²⁵⁵.

Ο κύριος βιοδείκτης για τον ορισμό της ONA θεωρείτο ο ρυθμός αύξησης της κρεατινίνης ορού. Ωστόσο, ο βαθμός νεφρικής δυσλειτουργίας μπορεί να υποτιμηθεί εξαιτίας αλλαγών στον όγκο κατανομής, πτώσης στην παραγωγή κρεατινίνης σε ασθενείς με προχωρημένη χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΑ)²⁵⁶ και απώλεια μυϊκής μάζας σε ασθενείς με κρίσιμη νόσο^{257,258}.

Πίνακας 2.5 Κριτήρια KDIGO: Ορισμός και σταδιοποίηση της νεφρικής ανεπάρκειας (Τροποποίηση από Vahid Mohsenin, Sept 2017)

Στάδιο AKIN	Κρεατινίνη ορού	Παραγωγή ούρων
1	1.5-1.9 φορές της τιμής αναφοράς ή αύξηση $\geq 0.3 \text{ mg/dL}$ ($\geq 26.5 \text{ μmol/L}$)	$< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ για 6-12 ώρες
2	2.0-2.9 φορές της τιμής αναφοράς	$< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ για > 12 ώρες
3	3.0 φορές της τιμής αναφοράς ή αύξηση κρεατινίνης ορού $\geq 4.0 \text{ mg/dL}$ ($\geq 353.6 \text{ μmol/L}$) ή έναρξη αιμοκάθαρσης ή σε ασθενείς < 18 ετών, μείωση $\text{eGFR} < 35 \text{ mL/min}$ ανά 1.73 m^2	$< 0.3 \text{ mL/kg/h}$ για > 24 ώρες ή ανουρία > 12 ώρες

Πιο αναλυτικά, η τρέχουσα διάγνωση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ONA) δεν στηρίζεται στη μέτρηση ενός δείκτη οξείας βλάβης αλλά σε έναν δείκτη νεφρικής

λειτουργίας σταθερής κατάστασης, που ονομάζεται κρεατινίνη ορού προερχόμενη από μυς (sCr). Σε συνθήκες μη σταθερής κατάστασης, όπως η ONA, η sCr είναι ένα αναδρομικό, μη ευαίσθητο και ακόμη και παραπλανητικό μέτρο νεφρικής βλάβης. Η sCr είναι αναδρομική επειδή πρέπει να συσσωρεύεται επί πολλές ημέρες, μια καθυστέρηση η οποία υπόκειται σε εξω-νεφρικές τροποποιήσεις, όπως μυϊκή μάζα και δίαιτα²⁵⁹. Ο δείκτης δεν είναι ευαίσθητος διότι μπορεί να χρειαστεί να αποφευχθεί η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας κατά 50% για να αυξηθεί επαρκώς η sCr για ιατρική παρακολούθηση, ενώ τα επίπεδα που υπολείπονται αυτού του ορίου συνήθως απομακρύνονται, παρά τη γνωστή τους συσχέτιση με την υπερβολική θνησιμότητα και την παρατεταμένη νοσηλεία²⁶⁰. Η sCr είναι παραπλανητική, επειδή το επίπεδό της αντανακλά συχνά παροδικές φυσιολογικές προσαρμογές στις μεταβολές όγκου ή την παρουσία χρόνιας νεφροπάθειας (CKD) αντί της ONA. Το πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η μέτρηση της sCr αποτυγχάνει να προσδιορίσει τον κυτταρικό τύπο που τραυματίζεται οξέως, αν και αυτός ο εντοπισμός καθορίζει με κριτικό τρόπο το φυσικό ιστορικό της νόσου και την απόκρισή της στη θεραπεία²⁶¹. Αυτά τα δεδομένα απαιτούν νέες μεθόδους, που μπορούν να εντοπίσουν τραυματισμένα κύτταρα στις αρχικές φάσεις της ONA.

2.5.1 NGAL

Η NGAL αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε ισχαιμικούς νεφρούς χρησιμοποιώντας γονιδιακές συστοιχίες²⁶² και στη συνέχεια σε νοσοκομειακούς ασθενείς που χρησιμοποιούν ανοσοσφαιρίνες²⁶³. Οι μετέπειτα μελέτες σε ενήλικες²⁶⁴, παιδιά²⁶⁵, μύες^{266,267}, αρουραίους και χοίρους έχουν δείξει ότι η NGAL ορού και ούρων (sNGAL και uNGAL αντίστοιχα) αυξάνονται πρώιμα στα βιο-υγρά μετά από βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, υποξία, τοξικότητα φαρμάκου και βακτηριακές λοιμώξεις^{268, 269, 270} πριν η sCr αυξηθεί. Ωστόσο, όπως και οι περισσότεροι υποψήφιοι βιοδείκτες, η προέλευση της πρωτεΐνης, η σχέση της με τη βλάβη *in vivo* και οι μηχανισμοί της έκφρασής της είναι ανεπαρκώς καθορισμένοι, απαιτώντας ζωικά μοντέλα για την επίλυση αυτών των θεμελιωδών προβλημάτων²⁷¹.

Πρόσφατα, η εμφάνιση των νεφρικών βιοδεικτών έχει πυροδοτήσει πολλές μελέτες που διερευνούν τη χρήση τους ως πρόωρους προγνωστικούς παράγοντες της ΟΝΑ²⁷². Η σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων (NGAL), ένας από αυτούς τους βιοδείκτες, παράγεται στον περιφερικό νεφρώνα και η συγκέντρωσή της αυξάνεται όταν υπάρχει σωληναριακή κυτταρική βλάβη^{273,274,275}. Η αύξηση των επιπέδων NGAL σε περίπτωση κυτταρικής βλάβης, δηλαδή οξείας σωληναριακής βλάβης, προηγείται της αύξησης της κρεατινίνης στον ορό^{276,277}.

Πρόσφατη μελέτη²⁷⁸ αποδεικνύει την ιδιαίτερη χρησιμότητα της NGAL στην κλινική εφαρμογή. Προσφέρει τη δυνατότητα διάκρισης, εντός των πρώτων 72 ωρών, μεταξύ ολιγουρικών κρίσιμων ασθενών με ΟΝΑsCr ή με λειτουργική αναστρέψιμη σπειραματική προσαρμογή. Η ΟΝΑsCr μπορεί να αποκλεισθεί με την προσθήκη μέτρησης NGAL σε έναν ολιγουρικό ασθενή. Επιπλέον, η NGAL δεν υστερεί ενός πολυπαραγοντικού μοντέλου γνωστών παραγόντων κινδύνου. Συμβάλλει στον εντοπισμό ή την εξαίρεση της ΟΝΑsCr σε ολιγουρικούς ασθενείς, ακόμη και όταν η τιμή της κρεατινίνης ορού πριν από την εισαγωγή καθώς και άλλοι παράγοντες κινδύνου, είναι άγνωστοι. Με βάση τα ανωτέρω, η NGAL δύναται να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό ασθενών με ολιγουρία λόγω λειτουργικής προσαρμογής κατά την πρώιμη εισαγωγή στη ΜΕΘ. Συμπερασματικά, όταν εμφανιστεί ολιγουρία, οι χαμηλές τιμές NGAL μπορεί να αποκλείσουν τη δομική κυτταρική βλάβη που υποδηλώνει ΟΝΑsCr.

Σύμφωνα με μια άλλη πρόσφατη μελέτη, όλα τα επεισόδια ολιγουρίας δε φέρουν τον ίδιο κίνδυνο νεφρικής ανεπάρκειας²⁷⁹. Στη μελέτη αυτή, οι μετρήσεις έγιναν σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση με πρωτοεμφανιζόμενη ολιγουρία. Επομένως, επιλέχθηκαν μόνο ασθενείς που κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ παρουσίασαν 6 συνεχόμενες ώρες ολιγουρίας σε κάποιο χρονικό διάστημα. Η κρεατινίνη ορού και η παραγωγή ούρων χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας, όπως ορίζεται στην ΟΝΑ. Ωστόσο, καθώς η εμφάνιση ολιγουρίας εκδηλώνεται μακρύτερα από την αρχική νεφρική βλάβη, οι βιοδείκτες με χρονική πορεία παρόμοια με την NGAL μπορεί να γίνουν λιγότερο ειδικοί²⁸⁰.

Παρομοίως, οι Egal et al²⁸¹ απέδειξαν ότι οι μετρήσεις της NGAL έχουν πρόσθετη αξία για την έγκαιρη διάγνωση της ONAsCr σε μια ομάδα ολιγουρικών ασθενών με προδιαθεσικούς παράγοντες. Επίσης, απέδειξαν ότι μπορούν να εφαρμοστούν σε ένα κλινικό περιβάλλον. Η μέτρηση της NGAL μόνο σε πληθυσμούς υψηλής προδιάθεσης επιδρά θετικά στη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας των βιοδεικτών για την ONA²⁸². Επιπρόσθετα, η NGAL βελτιώνει μόνο τη διαφοροποίηση μεταξύ της λειτουργικής ολιγουρίας και της ολιγουρίας λόγω νεφρικής βλάβης, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα μετά την αρχική νεφρική βλάβη. Για το λόγο αυτό, είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται νωρίς κατά την είσοδο στη ΜΕΘ ή λίγο μετά από ένα συμβάν που οδηγεί στην αρχική νεφρική βλάβη. Τέλος, σε ολιγουρικούς ασθενείς, η NGAL μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιήσει τα άτομα άνευ ONAsCr, χωρίς να χρειάζεται μια προηγούμενη ή μεταγενέστερη μέτρηση της κρεατινίνης ορού. Λαμβάνοντας υπόψη πρακτικές δυσκολίες, όπως η συχνότητα μέτρησης της κρεατινίνης ορού και η έλλειψη διαθέσιμων δεδομένων πριν από την εισαγωγή στη ΜΕΘ, η NGAL είναι ένας έγκαιρος δείκτης της νεφρικής έκβασης.

Η αυξημένη τιμή της NGAL παρέχει έγκαιρη προειδοποίηση για την ενεργοποίηση παρεμβάσεων για να σταματήσει η περαιτέρω νεφρική βλάβη σε ολιγουρικούς ασθενείς. Σε αυτόν τον πληθυσμό με πιθανή ONAsCr, θα πρέπει να επιλέγεται η αναζωογόνηση με υγρά μόνο για την αποκατάσταση των συστηματικών αιμοδυναμικών μεταβλητών και θα πρέπει να διακόπτονται οι νεφροτοξικοί παράγοντες. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, η NGAL είναι σε θέση να προσαρμόσει τα κριτήρια ένταξης για να δημιουργήσει μελέτες πρώιμης παρέμβασης παρόμοιες με την μελέτη STOP-ONA²⁸³, που περιλαμβάνει ασθενείς μόνο αφού αρχίσει να αυξάνεται η κρεατινίνη του ορού. Με αυτό τον τρόπο, επιταχύνεται η έναρξη αντιρροπιστικής ή θεραπευτικής παρέμβασης. Το πιο σημαντικό είναι ότι η μέτρηση της NGAL μπορεί να συμβάλλει στη διαφοροποίηση μεταξύ δομικής νεφρικής βλάβης και λειτουργικής προσαρμογής. Οι ασθενείς με υψηλότερη NGAL αλλά χωρίς αύξηση της κρεατινίνης ορού θα πρέπει να ταξινομούνται ως υποκλινική μορφή ONAsCr²⁸⁴. Αυτοί οι ασθενείς έχουν χειρότερη έκβαση από εκείνους με χαμηλή τιμή NGAL και καμία αύξηση της κρεατινίνης ορού,

πιθανότητα λόγω επαρκών νεφρικών αποθεμάτων²⁸⁵, υποδηλώνοντας ότι η υποκλινική ONAsCr θα πρέπει να θεωρηθεί παρόμοια με την ONAsCr με αυξημένα επίπεδα NGAL. Αντιστρόφως, οι ασθενείς με ONAsCr μπορεί να έχουν σχετικά χαμηλά επίπεδα NGAL λόγω πειραματικής εξασθένησης χωρίς σωληναριακή βλάβη, η οποία σχετίζεται με χειρότερα αποτελέσματα από εκείνα με χαμηλή NGAL και αύξηση κρεατινίνης ορού^{286,287}. Το εάν οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως ONAsCr ή ως τρίτη οντότητα στα πλαίσια του ορισμού της ONA χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συνοπτικά, η NGAL είναι σε θέση να κάνει διακρίσεις μεταξύ ασθενών με κρίσιμη νόσο με ολιγουρία που σχετίζεται με ONAsCr και με ολιγουρία λόγω λειτουργικής προσαρμογής. Ειδικότερα, η NGAL ως μέρος ενός πολυπαραγοντικού μοντέλου είναι σε θέση να αποκλείσει την ONAsCr, ενώ ως ένας μόνο δείκτης μπορεί να εντοπίσει ολιγουρικούς ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο για ONAsCr. Με αυτό τον τρόπο, η NGAL θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της κλινικής διαχείρισης ασθενών που εμφανίζουν πρώιμη ολιγουρία. Έτσι, οι κλινικοί ιατροί μπορούν να μειώσουν περαιτέρω τη νεφρική βλάβη και να εντοπίσουν ασθενείς με υποκλινική ONAsCr. Ωστόσο, επειδή η κρεατινίνη του ορού είναι ένα ατελές διαγνωστικό πρότυπο για την πραγματική νεφρική κυτταρική βλάβη, απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες για την επιβεβαίωση αυτών των υποθέσεων²⁸⁸.

2.5.2 IL-18

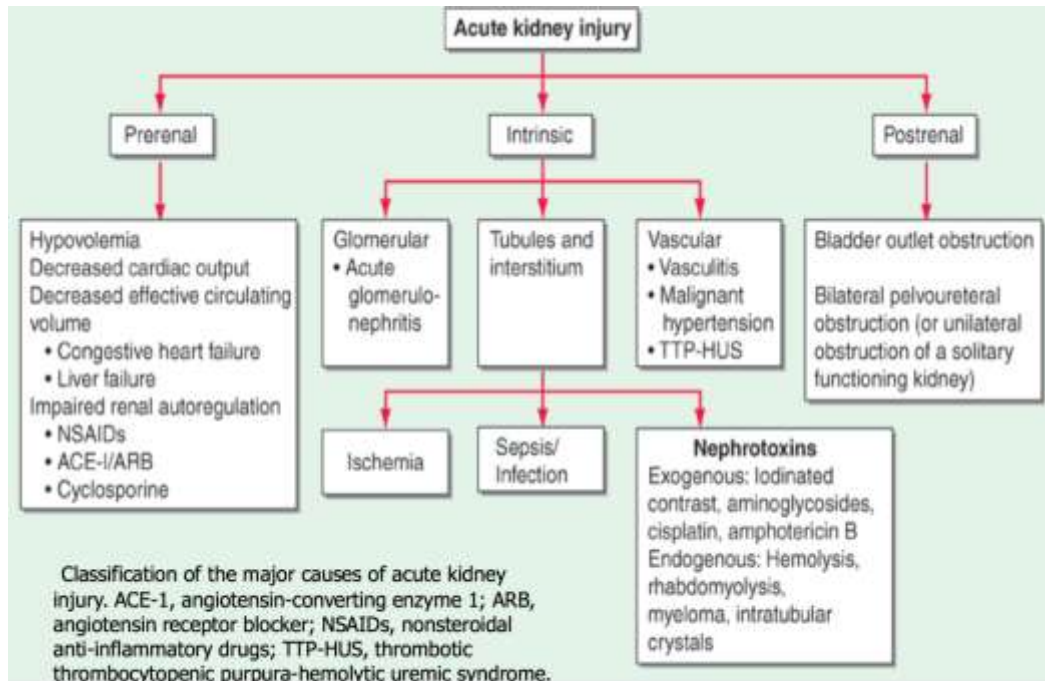
Όπως προαναφέρθηκε, η IL-18 είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που απελευθερώνεται πρώιμα και άμεσα σε μια φλεγμονώδη αντίδραση και συγκεκριμένα στον τραυματισμό των νεφρικών σωληναρίων. Σε αντίθεση με την κρεατινίνη του ορού, πρόκειται για έναν πρώιμο διαγνωστικό δείκτη υψηλής ειδικότητας της νεφρικής δυσλειτουργίας. Η κρεατινίνη, αν και χρησιμοποιείται συνήθως στην κλινική πρακτική και στις κλινικές δοκιμές, είναι ένας φτωχός δείκτης νεφρικής ανεπάρκειας. Η αύξηση της κρεατινίνης ορού δεν σχετίζεται άμεσα με τη σωληναριακή βλάβη στην ONA, αλλά είναι το αποτέλεσμα της απώλειας της λειτουργίας διήθησης που συμβαίνει κατά την ONA. Υπάρχει επίσης καθυστέρηση

στην ανιχνεύσιμη αύξηση της κρεατινίνης ορού. Για το λόγο αυτό, σύγχρονες μελέτες έχουν στραφεί προς την ανίχνευση πιο ειδικών δεικτών φλεγμονής και νεφρικής ανεπάρκειας. Η IL-18 πληρεί τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις σε ένα μεγάλο βαθμό, πράγμα που την καθιστά βιοδείκτη της νεφρικής δυσλειτουργίας σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους^{289,290,291,292,293,294}.

2.5.3 ΑΙΤΙΑ ΟΝΑ

Η παθογένεση της ΟΝΑ είναι πολύπλοκη. Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν: αύξηση ηλικίας, αναιμία, καρδιακή, ηπατική και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και έκθεση σε νεφροτοξικούς παράγοντες (αντιβιοτικά, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα και σκιαγραφικές ουσίες). Επίσης, η λοίμωξη, η σήψη, το σοκ, η ανάγκη για μηχανικό αερισμό και η χειρουργική επέμβαση αναγνωρίζονται ως υψηλού κινδύνου παράγοντες για την ανάπτυξη ΟΝΑ²⁹⁵.

Αναλυτικότερα, τα αίτια της ΟΝΑ διακρίνονται σε προνεφρικά, νεφρικά και μετανεφρικά. Στα προνεφρικά αίτια συμπεριλαμβάνονται η αφυδάτωση, η αιμορραγία και η μείωση του κυκλοφορούντος όγκου για οποιοδήποτε λόγο (σηψαιμία, σοκ, αφυδάτωση, εγκαύματα, βαριά τραύματα, μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις, θρόμβωση νεφρικών αρτηριών). Στα νεφρικά αίτια ανήκουν η οξεία σωληναριακή νέκρωση, τα νεφροτοξικά φάρμακα όπως ιωδιούχα σκιαγραφικά, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και αμινογλυκοσίδες, η σπειραματονεφρίτιδα και οι ενδογενείς νεφροτοξίνες, όπως η μυοσφαιρίνη και οι ελαφρές αλυσίδες. Τέλος, στα μετανεφρικά αίτια συγκαταλέγεται η μηχανική απόφραξη (Εικόνα 2.5.3).



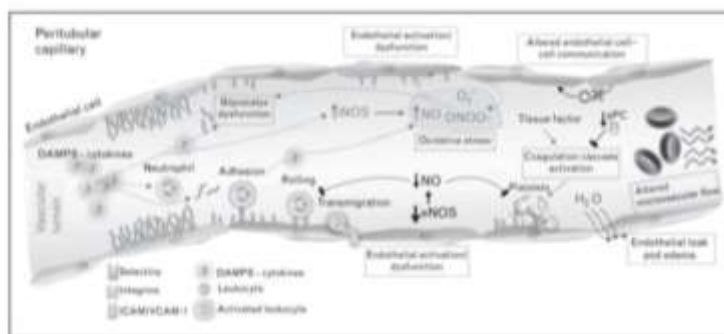
Source: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition: www.accessmedicine.com Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 2.5.3: Σχηματική αναπαράσταση των συχνότερων αιτιών οξείας νεφρικής ανεπάρκειας.

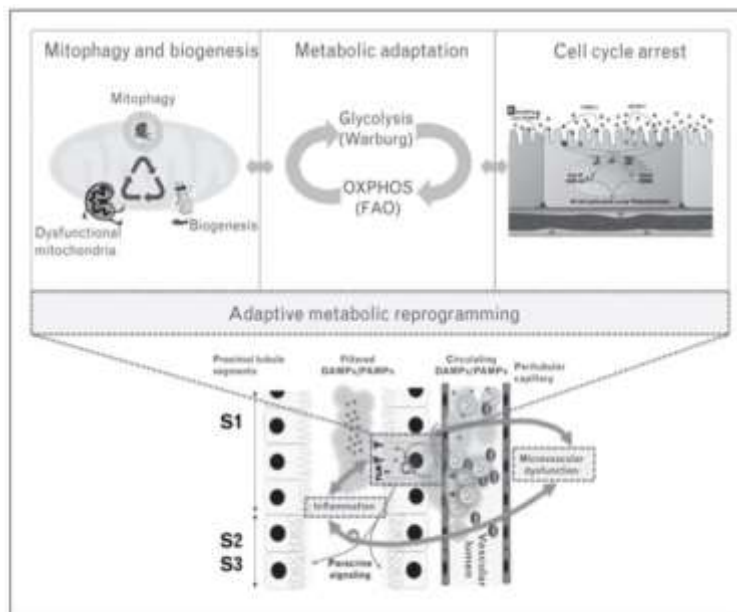
2.5.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΣΗΠΤΙΚΗΣ ΟΝΑ

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η σήψη προκαλεί ΟΝΑ δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι η ΟΝΑ αναπτύσσεται σε σηπτικά ζώα παρά την κανονική ή αυξημένη νεφρική ροή αίματος (RBF)^{296,297}, δε συνδέεται πάντα με μειωμένη RBF²⁹⁸ και παρατηρείται στο 25% των ασθενών με μη σοβαρή πνευμονία, χωρίς υπόταση ή προηγούμενη νοσηλεία σε ΜΕΘ²⁹⁹.

Η σηπτική ΟΝΑ χαρακτηρίζεται από μια ήπια ιστολογία με εστιακές περιοχές σωληναριακής βλάβης αλλά ελάχιστο κυτταρικό θάνατο^{300,301}. Επομένως, πρόκειται για επίκτητη αντίδραση επιβίωσης των σωληναριακών κυττάρων και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός είναι ζωτικής σημασίας. Παρατηρούνται 3 κύριες αλλαγές ανεξάρτητα από το είδος, το στάδιο της νόσου, τη σοβαρότητα ή το όργανο που εξετάστηκε: διάχυτες ανωμαλίες ροής μικροκυκλοφορίας (περισωληναριακή και σπειραματική)^{302,303}, φλεγμονή^{304,305} και κυτταρικές βιοενεργειακές αποκρίσεις των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων (TEC) σε τραυματισμό³⁰⁶. (Εικόνα 2.5.4.α και 2.5.4.β)



Εικόνα 2.5.4.α: Μηχανισμοί ανάπτυξης μικροαγγειακής κυκλοφορίας: ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, βλάβη και αποβολή της στιβάδας γλυκοκυττάρων, αυξημένη ενεργοποίηση λευκοκυττάρων, εξασθένιση της παραμόρφωσης ερυθρών αιμοσφαιρίων, προσκόλληση και πρόσληψη, πρόσφυση αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης με απόθεση ινώδους³⁰⁷. (Hernando Gomez et al, Dec 2016)



Εικόνα 2.5.4.6: Πιθανό μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ επαγόμενης από σηψαμία μικροαγγειακής δυσλειτουργίας, φλεγμονής και μεταβολικής απόκρισης από TECs.

(Hernando Gomez et al, Dec 2016)

Η παθοφυσιολογία της σηπτικής ΟΝΑ πρέπει να διαφοροποιείται από την ισχαιμική ΟΝΑ, όπου η συστηματική υπόταση και η μειωμένη νεφρική ροή αίματος (RBF) οδηγούν σε οξεία σωληναριακή νέκρωση. Στη σηπτική ΟΝΑ, παρατηρείται μια ανεξάρτητη από RBF μικροκυκλοφορική δυσλειτουργία στο νεφρικό παρέγχυμα που επάγεται από φλεγμονώδεις μεσολαβητές, διήθηση ανοσοκυττάρων και απορρύθμιση συνθάσης νιτρικού οξειδίου^{308, 309, 310, 311}. Η προκύπτουσα ανακατανομή της ροής αίματος από το νεφρικό μυελό στον φλοιό, καθώς και μια γενική επιδείνωση της μικροκυκλοφορικής οξυγόνωσης, οδηγούν σε τραυματισμό των σωληναρίων και σχηματισμό αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Ωστόσο, η χαμηλή αρτηριακή πίεση και η νεφρική υπο-άρδευση συμβάλλουν επίσης στη νεφρική βλάβη σε σηπτικό σοκ.

Κατά τη διάρκεια της σήψης, παρατηρείται ελάχιστη νέκρωση και απόπτωση στους νεφρούς³¹². Αυτό υποδηλώνει κυτταρική απόκριση, επιτυχή στην πρόληψη του θανάτου και άρα έναν πιθανό προσαρμοστικό μηχανισμό³¹³. Τα TECs διαθέτουν μηχανισμό αναγνώρισης του φλεγμονώδους σήματος, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων τύπου Toll (TLR 2 και 4) και επομένως, συμβάλλουν στη διατήρηση της

κυτταρικής ακεραιότητας και περιορίζουν τα προαποπτωτικά ερεθίσματα³¹⁴. Με αυτό τον τρόπο, επαναπρογραμματίζεται ο μεταβολισμός για να δώσει προτεραιότητα στην κατανάλωση ενέργειας. Διατηρείται η ενεργειακή ομοιόσταση, η λειτουργία των κυτταρικών οργάνων μέσω διαδικασιών ελέγχου ποιότητας (γενική αυτοφαγία και μιτοφαγία) και επιτυγχάνεται ο περιορισμός της κυτταρικής κυκλοφορίας και της αναπαραγωγής του DNA.

Τα μιτοχόνδρια είναι κοινοί στόχοι φλεγμονώδους βλάβης. Προκαλείται δυσλειτουργία, αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και επομένως βλάβη στο κύτταρο ξενιστή. Ωστόσο, με διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου, το κύτταρο μπορεί να υπερασπιστεί τα τραυματισμένα μιτοχόνδρια. Γίνεται προσπάθεια σύντηξης και σχάσης (αποκατάσταση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων), μιτοφαγίας (χώνεψη και εξάλειψη εκείνων πέραν των δυνατοτήτων επισκευής)³¹⁵ και βιογένεσης (ανασύσταση δεξαμενής υγιών μιτοχονδρίων).

Κατά τη διάρκεια της σήψης, η φλεγμονή³¹⁶ που προκαλείται από τους TLRs και το οξειδωτικό στρες^{317,318} είναι ισχυρός ενεργοποιητής της μιτοφαγίας και βιογένεσης³¹⁹. Στο νεφρό, η μιτοφαγία ενεργοποιείται ήδη 3 ώρες μετά τη σήψη που προκαλείται από CLP. Η δυσλειτουργία κυττάρων και οργάνων, καθώς και η δυσμενής έκβαση είναι απότοκος ανεπαρκούς ενεργοποίησης της μιτοφαγίας σε ασθενείς με κρίσιμη νόσο³²⁰. Αντίθετα, η διέγερση της μιτοφαγίας προστατεύει τα κύτταρα και τη λειτουργία των οργάνων, με επιτυχή ρύθμιση της σηψαιμίας³²¹. Επίσης, η μειωμένη αυτοφαγία συσχετίζεται με αυξημένους δείκτες ONA³²². Τέλος, η βιογένεση παίζει ρόλο στην προστασία των TEC σε φλεγμονή και η ενεργοποίησή της είναι φυσική απόκριση των TEC κατά τη διάρκεια της σηψαιμίας³²³.

Συμπερασματικά, η μιτοφαγία και η βιογένεση προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα: αφαίρεση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, μειωμένη παραγωγή ROS/δραστικών αζωτούχων ειδών, συντήρηση και ανανέωση της μιτοχονδριακής δεξαμενής με εξοικονόμηση ενέργειας, περιορίζοντας την καταστροφή του οξειδωτικού στρες και, σήματα σε μιτοχονδριακό επίπεδο που εμποδίζουν την ενεργοποίηση της απόπτωσης^{324,325,326,327,328}.

2.5.5 Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια (ONA) και TLRs

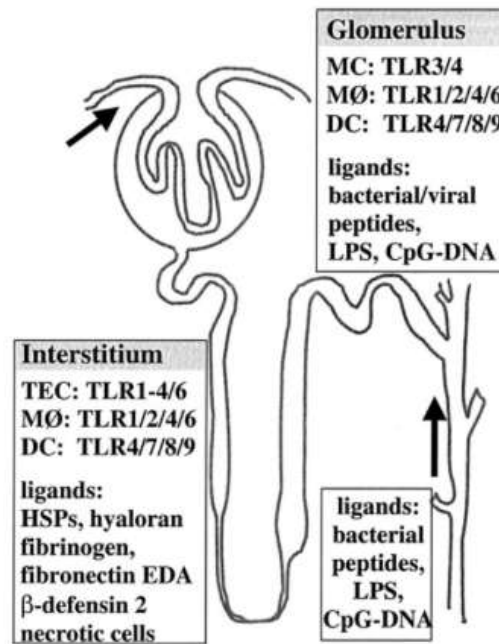
Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA) είναι αποτέλεσμα ισχαιμικού (50%) ή νεφροτοξικού (35%) τραυματισμού του οργάνου. Ωστόσο, η αιτία της ενδονοσοκομειακής ONA είναι πολυπαραγοντική ή σχετίζεται με σήψη στο 50% των περιπτώσεων³²⁹. Η σηπτικής αιτιολογίας νεφρική ανεπάρκεια είναι μια ιδιαίτερη κλινική οντότητα. Χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη παρουσία σήψης και ONA. Βιοδείκτες ορού, ειδικοί για την ONA και πειραματικά ζωικά μοντέλα, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την καλύτερη κατανόηση της παθογένειάς της. Η φυσική ανοσοαπόκριση ευθύνεται για τις αρχικές φλεγμονώδεις δράσεις στη σηψαιμία³³⁰. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχει ένα κοινό μονοπάτι υπεύθυνο για τον αρχικό τραυματισμό των σωληνωτών κυττάρων και τους μηχανισμούς φλεγμονώδους απόκρισης στους νεφρούς³³¹. Σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων μορφών νεφρικής βλάβης είναι η φλεγμονή στο σημείο της βλάβης των ιστών. Γνωρίζουμε ήδη, ότι το νεφρικό επιθήλιο προσελκύει λευκοκύτταρα κατά τον τραυματισμό με τρόπο εξαρτώμενο από τους TLRs³³². Ο ρόλος των TLRs στη νεφρική ανεπάρκεια σηπτικής αιτιολογίας περιλαμβάνει, αναγνώριση τόσο εξωγενών PAMPs όσο τοπικών και εξωγενών DAMPs. Οι τοπικοί DAMPs παράγονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής νεφρικής βλάβης, ενώ οι εξωγενείς, ως κυκλοφορούντα προϊόντα εκτεταμένου ιστικού τραυματισμού στη σήψη.

Στο νεφρό, τα μεσαγγειακά και σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν TLR 1 μέσω TLR 4 και 6³³³. Ο TLR 2 εκφράζεται στα νεφρικά σωληνάκια της εξωτερικής μοίρας του μυελού, στα νεφρικά αγγεία και στα πειραματικά τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα³³⁴ σε ανθρώπους και μύες. Όπως προαναφέραμε, οι περισσότεροι TLRs βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια. Αντίθετα, οι TLR 3 και 7 μέσω TLR 9, βρίσκονται σε ενδοκυττάρια ενδοσώματα ή λυσοσώματα. Η ευρεία κατανομή τους, τους καθιστά φύλακες φρουρούς κατά της δράσης των παθογόνων³³⁵ (Πίνακας 2.5.5).

Ο LPS είναι βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος Gram(-) βακτηρίων. Σε ένα παθογόνο σηπτικό περιβάλλον ενεργοποιεί συνεχώς τον TLR 4. Η δυσλειτουργία των νεφρικών σωληναρίων προκύπτει λόγω της βακτηριακής σήψης και της οξείας ενδοτοξαϊμίας³³⁶. Ο TLR 4 εντοπίζεται στο παχύ ανιόν σκέλος που

παίζει ρόλο στη νεφρική φυσική ανοσοαπόκριση³³⁷, αυξάνεται σε καταστάσεις σήψης³³⁸ και έχει ιδιαίτερα συσχετισθεί με την παθογένεση της ONA³³⁹. Πιο συγκεκριμένα, όταν παρατηρείται μικροβιακή μόλυνση, η μυελική μοίρα του παχέος ανιόντος σκέλους (MTAL) αποτελεί περιοχή κυτταρικής βλάβης και δυσλειτουργίας σωληναρίων. Η ενεργοποίηση του TLR 4 από τον LPS έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της επαναπορρόφησης HCO₃⁻ στην MTAL τόσο από τη βασική μεμβράνη, όσο και από την κυτταροπλασματική επιφάνεια του κυττάρου³⁴⁰. Επιπλέον, ενεργοποίηση του TLR 2 από Gram(+) βακτηριακά μόρια προκαλεί επίσης αναστολή της επαναπορρόφησης HCO₃⁻ από την MTAL. Γνωρίζουμε ότι ο TLR 2 εκφράζεται επιλεκτικά στη βασική μεμβράνη των κυττάρων MTAL³⁴¹. Επομένως, διαφορετικοί TLRs ενεργοποιούνται ανεξάρτητα και αθροιστικά από Gram(-) και Gram(+) βακτηριακά μόρια και πυροδοτούν διαφορετικά ενδοκυτταρικά σήματα, με αποτέλεσμα τη βλάβη στη λειτουργία των νεφρικών σωληναρίων³⁴² (Εικόνα 2.5.5).

Συνοψίζοντας, η ενεργοποίηση των TLR 2 και 4 σε σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει ειδικά την οδό NF-κB σε απόκριση οξειδωτικού στρες^{343, 344}. Εν τούτοις, η ενεργοποίηση των TLR 2 και 4 σε σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση CC-χημειοκινών^{345,346}, δίνοντας αυτών των TLRs ρόλο στη διαμεσολάβηση της διήθησης των διάμεσων λευκοκυττάρων, στην έναρξη της εισροής φαγοκυττάρων και στην ανοσοποιητική ενεργοποίηση με παραγωγή κυτοκίνης κατά τη διάρκεια οξείας σωληνωτής νέκρωσης. Έτσι, η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να είναι μια σύνδεση μεταξύ μηχανικής, τοξικής ή ισχαιμικής σωληνωτής κυτταρικής βλάβης. Στο τέλος, θα μπορούσε επίσης να είναι η εμφάνιση μιας φλεγμονώδους φυσικής ανοσοαπόκρισης στην παθογένεση της ONA.



Εικόνα 2.5.5: Πιθανές αλληλεπιδράσεις συνδέτη με TLR σε ενδογενή και κύτταρα διείσδυσης σε σπείραμα και νεφρικό διάμεσο ιστό. Έκθεση δυνητικών συνδέτων TLR μέσω της ροής του αίματος στο σπείραμα. Τα ενδιάμεσα κύτταρα μπορούν να εκτεθούν σε συνδέτες TLR με τοπική παραγωγή (κάτω αριστερά) ή μέσω ανιούσας λοίμωξης (κάτω δεξιά). MC: κύτταρα αγγύλης, MO: μονοκύτταρα/μακροφάγα, DC: δενδριτικά κύτταρα, TEC: σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. (Hans-Joachim Anders et al, 2004)

Πίνακας 2.5.5: Κατανομή των υποδοχέων τύπου Toll στα κύτταρα της ουροποιητικής οδού σε μύες και ανθρώπους³⁴⁷ (Theodoros Eleftheriadis et al, 2012)

TLR	Νεφρική κατανομή σε μύες	Νεφρική κατανομή σε άνθρωπο
TLR 2	Μεσαγγειακά κύτταρα Ενδοθηλιακά κύτταρα σπειραματικής δέσμης Επιθηλιακά κύτταρα ελύτρου του Bowman Εγγύς σωληνάριο Ανιόν τμήμα αγγύλης του Henle Άπω σωληνάριο Αθροιστικά σωληνάρια Ενδοθηλιακά κύτταρα Διάμεσα κύτταρα Ινοβλάστες	Μεσαγγειακά κύτταρα Ενδοθηλιακά κύτταρα σπειραματικής δέσμης Επιθηλιακά κύτταρα ελύτρου του Bowman Εγγύς σωληνάριο Άπω σωληνάριο Αθροιστικά σωληνάρια Διάμεσα κύτταρα
TLR 3	Μεσαγγειακά κύτταρα	Μεσαγγειακά κύτταρα Αθροιστικά σωληνάρια Αγγειακά κύτταρα λείων μυικών ινών
TLR 4	Μεσαγγειακά κύτταρα Ποδοκύτταρα Εγγύς σωληνάριο Εγγύς σωληνάριο συμβολής φλοιώδους-μυελώδους μοίρας Ανιόν τμήμα αγγύλης του Henle Άπω σωληνάριο Αθροιστικά σωληνάρια Ενδοθηλιακά κύτταρα Ινοβλάστες / Μυοϊνοβλάστες Επιθηλιακά κύτταρα ουροδόχου κύστης	Εγγύς σωληνάριο Πεπαχυσμένο ανιόν σκέλος αγγύλης Henle Επιθηλιακά κύτταρα ουροδόχου κύστης
TLR 5	Επιθηλιακά κύτταρα ουροδόχου κύστης	
TLR 7	Διηθητικά ανοσοκύτταρα	
TLR 9	Διηθητικά ανοσοκύτταρα Σπειραματική δέσμη Σωληνωτά επιθηλιακά Ινοβλάστες	Ποδοκύτταρα Σωληνωτά επιθηλιακά
TLR 11	Επιθηλιακά κύτταρα ουροδόχου κύστης	

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ –ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σηψαιμία ορίζεται ως μια συστημική, μη ρυθμισμένη ανοσολογική απάντηση ξενιστή σε λοίμωξη, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων (MODS) και συχνά, είναι ασυμβίβαστη με τη ζωή^{348,349}. Παραμένει η κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ)³⁵⁰. Αρκετοί διαφορετικοί μεσολαβητές, όπως οι κυτοκίνες, οι χημειοκίνες, τα προϊόντα ενεργοποίησης συμπληρώματος και οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) έχουν αναγνωριστεί ότι συμβάλλουν στην παθογένεση της σηψαιμίας. Καθένας από αυτούς συμμετέχει σε ανεξάρτητες ή κοινές οδούς. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των υπεύθυνων μηχανισμών καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την κατανόηση της ακριβούς φύσης τους^{351,352}. Για τους λόγους αυτούς, τα ζωικά μοντέλα σήψης έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα, μέχρι στιγμής, για την αναπαραγωγή της πολυπλοκότητας της ανθρώπινης σήψης. Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα είναι η απολίνωση και η διάτρηση του τυφλού (CLP), που προκαλεί περιτονίτιδα λόγω διαφυγής κοπρανώδους περιεχομένου εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας και στη συνέχεια, σήψη μέσω πολυμικροβιακής λοίμωξης, με τρόπο που μοιάζει με την ανθρώπινη ανταπόκριση^{353,354,355}.

Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής προέλευσης τύπου 1, κωδικοποιημένες με γραμμωτές σειρές, που εκφράζονται σε διάφορα ανοσοκύτταρα και μη, και ανήκουν σε μια οικογένεια υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRR)³⁵⁶. Οι TLRs αναγνωρίζουν και ενεργοποιούνται από ορισμένα σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (PAMPs)³⁵⁷, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι λιποπρωτεΐνες και οι πεπτιδογλυκάνες, τα οποία οδηγούν σε διέγερση του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος και ακολούθως στην ενεργοποίηση της ειδικής για το αντιγόνο επίκτητης ανοσίας³⁵⁸. Ο χαρακτηρισμός και η έκφραση αυτών των υποδοχέων είναι επομένως απαραίτητος για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της σηψαιμίας, και πιο συγκεκριμένα της σχετικής δυσλειτουργίας οργάνων³⁵⁹.

Η σηψαιμία είναι μια από τις συχνότερες αιτίες οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ΟΝΑ)³⁶⁰. Για πολλά χρόνια, θεωρήθηκε ότι οι αιμοδυναμικές μεταβολές που σχετίζονται με τη σηψαιμία στη μακροκυκλοφορία, που προκαλεί μειωμένη νεφρική διάχυση, ήταν υπεύθυνες για αυτό το φαινόμενο. Ο μηχανισμός αυτός ωστόσο έχει ακυρωθεί. Προτείνεται μια πιο σύνθετη διαδρομή, όπου οι αλλαγές στη μικροκυκλοφορία του νεφρού μαζί με μια επιδεινούμενη φλεγμονώδη απόκριση υποστηρίζουν μια πιο ακριβή θεωρία, η οποία όμως δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως³⁶¹. Αυτό υποδηλώνει έντονα την παρουσία μίας κοινής οδού μεταξύ των αρχικών ερεθισμάτων που προκαλούν βλάβη στα σωληνωτά κύτταρα και της φλεγμονώδους απόκρισης στους νεφρούς^{362,363}.

Εντός του νεφρού, διαφορετικοί τύποι κυττάρων εκφράζουν μερικές από τις πρωτεΐνες TLRs. Σε βακτηριακές λοιμώξεις που επηρεάζουν τους νεφρούς, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των TLRs 2, 3, 4 και 7 και επακόλουθη έκκριση χημειοκινών C-C³⁶⁴. Έτσι, η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να είναι ο κοινός παρονομαστής μεταξύ των διαφόρων μορφών βλάβης των σωληνωτών κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα η ενεργοποίηση μιας φλεγμονώδους "φυσικής" ανοσοαπόκρισης στην παθογένεση της ΟΝΑ σε σηπτική κατάσταση, όπως κατά τη διάρκεια ενός CLP μοντέλου μυών^{365,366}.

3.2 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η λεπτομερής περιγραφή και ανάλυση της έκφρασης αιματολογικών, βιοχημικών και ανοσολογικών δεικτών καθώς και η αποσαφήνιση του ρόλου των TLRs, και συγκεκριμένα των TLRs 2, 3, 4 και 7, σε νεφρικούς και εντερικούς ιστούς σε σηπτικά μοντέλα μυών. Η έκφραση αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταβάλλεται στα διάφορα στάδια της σήψης και οδηγεί στην αναγνώριση μορίων που απελευθερώνονται σε ιστική βλάβη, με απότοκο την εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης. Επομένως, η μελέτη της έκφρασης των TLRs στη σήψη μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τους παθογόνους μηχανισμούς της ΟΝΑ και να θέσει τα θεμέλια για πιθανούς μελλοντικούς θεραπευτικούς χειρισμούς.

Για το λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε αιματολογικούς, βιοχημικούς, ανοσολογικούς δείκτες καθώς επίσης και το ρόλο των TLRs 2, 3, 4 και 7 σε ένα CLP ζωικό σηπτικό μοντέλο (απολίνωση και διάτρηση του τυφλού) ανθρωπίνως ανάλογο, λαμβάνοντας νεφρικούς και εντερικούς ιστούς και μελετώντας τους με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης³⁶⁷. Απώτερος στόχος είναι η πιθανή συσχέτιση των συγκεκριμένων TLRs με το σύνδρομο δυσλειτουργίας πολλαπλών οργάνων που πυροδοτήθηκε από την ONA.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.3.1 Ζωικά πρότυπα-Εργαστηριακές συνθήκες

Σε αυτή τη μελέτη θυσιάστηκαν 72 αρσενικοί μύες C57BL/6J, ηλικίας 12-14 εβδομάδων και βάρους 20-25 γραμμαρίων, προερχόμενοι από την αποικία του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικής Έρευνας, της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από την τοπική επιτροπή δεοντολογίας (Κτηνιατρική Νομαρχία Αθηνών, 4854/27-07-2012, κωδικός EL 25 BIO 003) και πραγματοποιήθηκε στις ζωικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου μας. Τα ζώα διατηρήθηκαν σε μεμονωμένους κλωβούς, σε κοινό περιβάλλον με ελεγχόμενη θερμοκρασία (18-21°C), υγρασία (40-50%) και τεχνητό φωτισμό (12 ώρες φωτός /12 ώρες συσκότισης) με ελεύθερη πρόσβαση σε πόσιμο νερό και τροφή, χρησιμοποιώντας τυποποιημένα και ισορροπημένα διατροφικά εμπορεύματα. Όλα, ανεξαιρέτως, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις σχετικές διεθνείς οδηγίες για τη σωστή φροντίδα και χρήση των πειραματόζωνων.

3.3.2 Πειραματικό μοντέλο / διαδικασία απολίνωσης τυφλού

Τα ζώα διαιρέθηκαν τυχαία σε δύο ομάδες, τη σηπτική (S) και την ομάδα ελέγχου (C), η καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 36 μύες. Περαιτέρω διαχωρισμός σε τρεις υποομάδες πραγματοποιήθηκε σε κάθε ομάδα με τη δημιουργία έξι υποομάδων ανάλογα με το χρόνο ευθανασίας (24, 48 και 72 ώρες). Κάθε υποομάδα αποτελείται από 12 μύες (Εικόνα 3.3.2α).

Ομάδα	Ελέγχου	Σηπτική
24h	12	12
48h	12	12
72h	12	12

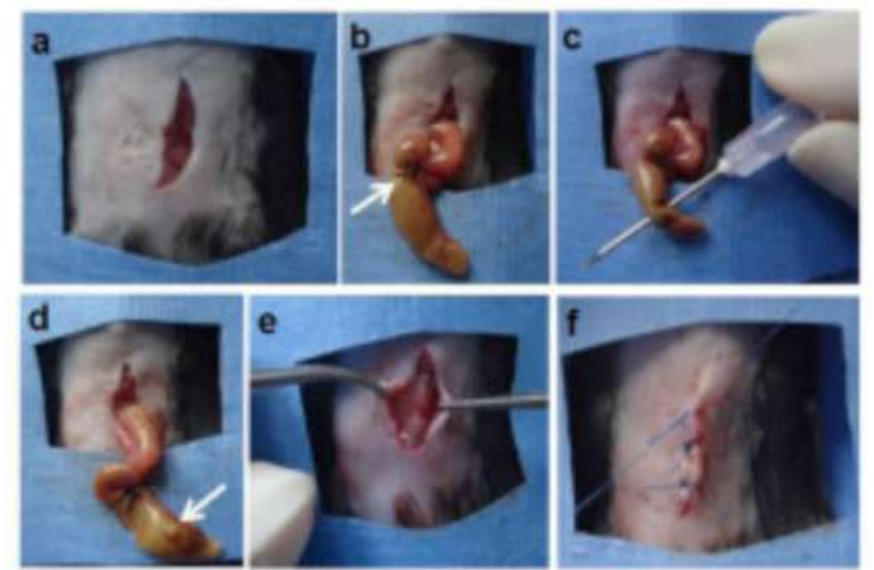
Εικόνα 3.3.2α Πειραματικό μοντέλο (ομάδες, υποομάδες ελέγχου και σηπτικές)

Όσον αφορά τη σηπτική ομάδα, πραγματοποιήθηκε απολίνωση του τυφλού (CLP) και τρώση δια βελόνης, όπως έχει ήδη δημοσιευθεί, με ελάχιστες τροποποιήσεις, για την επαγωγή πολυμικροβιακής περιτονίτιδας και τελικά σήψης^{368,369} (Εικόνα 3.3.2β). Τα πειραματόζωα έμειναν νηστικά 12 ώρες πριν από την επέμβαση και η αναισθησία προκλήθηκε με τη χρήση ισοφλουρανίου (εισαγωγή στην αναισθησία με 5% και συντήρηση με 3,5% σε ροή O₂ 0,5 lt/min). Πραγματοποιήθηκε ευπρεπισμός της κοιλιακής χώρας του ζώου με ξύρισμα και αποστείρωση με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης (Betadine, Mudipharma S.A, Switzerland). Μέσω μιας μέσης λαπαροτομίας μήκους 1 cm άνωθεν και κάτωθεν του ομφαλού, πραγματοποιήθηκε είσοδος στην περιτοναϊκή κοιλότητα και αναγνωρίστηκε το τυφλό, που στους μύες έχει σακοειδές σχήμα και εκτείνεται κάτω από την ειλεοτυφλική βαλβίδα. Χωρίς να καταστραφεί η αγγείωσή του, εκτέθηκε στο χειρουργικό πεδίο. Στη συνέχεια, το περιφερικό τριτημόριο του τυφλού απολινώθηκε με μη απορροφήσιμο ράμμα μεταξιού 3-0 (Johnson and Johnson, Εδιμβούργο, Ηνωμένο Βασίλειο), χωρίς να παρεμποδίζει τη διέλευση των κοπράνων από τον ειλεό στο παχύ έντερο. Έπειτα, το αντιμεσεντερικό χείλος του τυφλού διατρήθηκε μια φορά με μια βελόνα διαμέτρου 21-Gauge και παρατηρήθηκε διαφυγή μιας μικρής ποσότητας εντερικού περιεχομένου.

Κατά τον καθορισμό των προδιαγραφών και προϋποθέσεων του εν λόγω πειράματος, όταν διεξήχθησαν περισσότερες από μία διατρήσεις, παρατηρήθηκε σύνδρομο πρόωρης πολυοργανικής ανεπάρκειας ακόμη και θάνατος σε κάποιες περιπτώσεις πριν τις 24 ώρες. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μην μπορούν να εκπληρωθούν οι απαιτήσεις του πειράματος. Για το λόγο αυτό, καταλήξαμε στην επιλογή του συγκεκριμένου διαμετρήματος καθώς και μιας μονάχα διάτρησης με βελόνα. Το έντερο τοποθετήθηκε ξανά εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας και η

κοιλιακή χώρα κλείστηκε σε δύο στρώματα με ράμματα 4-0 πολυγαλακτίνης (Vicryl, Johnson and Johnson, Εδιμβούργο, Ηνωμένο Βασίλειο).

Οι ομάδες ελέγχου αντιμετωπίστηκαν με τον ίδιο τρόπο και υποβλήθηκαν σε πλασματική επέμβαση, δηλαδή είσοδο στην περιτοναϊκή κοιλότητα χωρίς όμως απολίνωση και διάτρηση του τυφλού, και συνεπώς χωρίς διαφυγή εντερικού περιεχομένου στην περιτοναϊκή κοιλότητα.



Εικόνα 3.3.26 Αναπαράσταση απολίνωσης τυφλού και διάτρησης με βελόνη (CLP)³⁷⁰

Όλα τα ζώα επανήλθαν από την αναισθησία με έκχυση προθερμασμένου (37°C) αλατούχου διαλύματος 1 ml. Πραγματοποιήθηκε παρακολούθησή τους ανά 30 λεπτά για τουλάχιστον 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, οι μύες τοποθετήθηκαν σε κλουβιά και διατηρήθηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 22°C, με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τρόφιμα. Μετεγχειρητικά, χορηγήθηκαν σε όλα τα ζώα υποδόριες δόσεις βουπρενορφίνης (0,05 mg/kg). Η χορήγηση αποτελείται από μία δόση κάθε έξι ώρες για τουλάχιστον δύο μέρες.

Οι μύες των σηπτικών και των ομάδων ελέγχου θυσιάστηκαν σε διάστημα 24, 48 και 72 ωρών μετά τη διαδικασία CLP και την εικονική επέμβαση αντιστοίχως, σχηματίζοντας τις προαναφερθείσες 6 υποομάδες: ως 24S, 48S και 72S ορίστηκαν οι σηπτικές υποομάδες και ως 24C, 48C και 72C οι ομάδες ελέγχου των αντίστοιχων χρονικών περιόδων. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου κάθε ομάδας

πραγματοποιήθηκε επαγωγή αναισθησίας, παρακέντηση της καρδιάς, αιμοληψία και ακολούθως ευθανασία.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ελήφθησαν νεφρικοί και εντερικοί ιστοί. Ένα μέρος των ιστικών παρασκευασμάτων του νεφρού που ελήφθη σταθεροποιήθηκε με διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και στη συνέχεια ενσωματώθηκε και μονιμοποιήθηκε σε παραφίνη για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Το υπόλοιπο τμήμα των ιστικών παρασκευασμάτων του νεφρού και όλοι οι ιστοί του εντέρου ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό (κατεργασμένο με DEPC), τοποθετήθηκαν αμέσως σε DNA/RNA απαλλαγμένα φιαλίδια και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C για μετέπειτα ανάλυση mRNA των TLRs υποδοχέων. Αργότερα καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο στους -140°C για εξέταση qRT-PCR. Η χειρουργική διαδικασία δεν παρέμεινε τυφλή στους πειραματιστές, σε αντίθεση με όλες τις άλλες πειραματικές αναλύσεις.

3.3.3 Βιοχημική ανάλυση δειγμάτων αίματος

Ο έλεγχος του σηπτικού μοντέλου και η αποφυγή ή καταγραφή τυχόν ανεπιθύμητων ενεργειών διασφαλίσθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης με καθημερινή μέτρηση του σωματικού βάρους όλων των μυών. Απαιτήθηκε μια εβδομάδα για τον εγκλιματισμό των πειραματόζων στις εργαστηριακές συνθήκες πριν την έναρξη της μελέτης. Επίσης, διενεργήθηκε σήμανση και προκαταρκτικός βιοχημικός έλεγχος. Προκειμένου να αξιολογηθεί η νεφρική βλάβη μετά την πρόκληση CLP, μετρήσαμε διαφορετικούς βιοδείκτες ορού. Πριν από την πρόκληση ευθανασίας κάθε υποομάδας (24, 48 και 72 ωρών ομάδων ελέγχου και σηπτικών) λήφθηκαν δείγματα αίματος με ενδοκαρδιακή αναρρόφηση υπό γενική αναισθησία με χορήγηση ισοφλουρανίου.

Όλα τα δείγματα υπεβλήθηκαν σε βιοχημική ανάλυση για την αξιολόγηση της νεφρικής βλάβης στο βιοχημικό εργαστήριο του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Η λήψη των δειγμάτων για τους βιοχημικούς παράγοντες πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλους δειγματοληπτικούς σωλήνες. Οι σωλήνες περιείχαν ειδική γέλη για τον διαχωρισμό του ορού από τα κύτταρα του αίματος. Τα δείγματα υπεβλήθηκαν

σε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές ανά λεπτό για διάστημα 5 λεπτών. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν δυο φορές για αποφυγή απόκλισης ή λάθους.

Οι βιοχημικές μετρήσεις περιλάμβαναν τα ακόλουθα: ουρία (Urea), κρεατινίνη (Creatinine), ολική χολερυθρίνη (Tbil) και άμεση χολερυθρίνη (Dbil) και μετρήθηκαν μέσω ενζυματικής χρωματογραφίας σε αναλυτή τύπου Chemical 2910 της εταιρείας Awareness Technology Inc (Φλόριντα, ΗΠΑ). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια της Γερμανικής εταιρείας Human (Wiesbaden, Germany). Πριν από κάθε χρήση του βιοχημικού αναλυτή έγινε βαθμονόμηση (calibration) με παθολογικό (HumaTrol P) και φυσιολογικό (HumaTrol N) βόειο ορό.

3.3.4 Τεχνική Elisa για IL-18 και NGAL

Οι ανοσολογικές μετρήσεις μας εστιάστηκαν στους μεσάζοντες ιντερλευκίνη 18 (IL-18) και σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων (NGAL). Πραγματοποιήθηκαν μέσω συσκευασμένων αντιδραστηρίων (kits) ανοσο-απορροφητικής μεθόδου συνδεδεμένου ενζύμου (Enzyme-linked immunosorbent assay ή ELISA). Για την παρούσα έρευνα, επιλέχθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα kits της Αμερικάνικης εταιρείας MBL International (Woburn, USA) για την IL-18 και της Αγγλικής εταιρείας R&D systems (Abingdon, UK) για την NGAL. Οι μετρήσεις υλοποιήθηκαν ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απορρόφηση κάθε δείκτη μετρήθηκε κάνοντας χρήση ενός φασματοφωτόμετρου αναγνώστη τύπου Elisa.

Πιο αναλυτικά, πρόκειται για μία μέθοδο με υψηλή ευαισθησία. Με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος επιτρέπεται ο ποσοτικός προσδιορισμός διαφόρων ουσιών (αντισώματα, αντιγόνα, κυτοκίνες, χημικές ουσίες, ορμόνες βιολογικών υγρών). Πρόκειται για μια μέθοδο με πολλαπλές παραλλαγές και η βάση της έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Τα διαφορετικά είδη περιλαμβάνουν την έμμεση Elisa, Elisa τύπου sandwich, ανταγωνιστική Elisa, άμεση και έμμεση κυτταρική Elisa. Οι βασικές αρχές που διέπουν όλα τα είδη περιλαμβάνουν πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια, χρήση ενζυμο-

συζευγμένου αντισώματος και χρωμογόνων υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα παραγωγή διαλυτού έγχρωμου προϊόντος και τελικά ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος³⁷¹.

Συγκεκριμένα, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μας μοντέλο ονομάζεται ELISA τύπου sandwich, όπου χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά αντισώματα (ανίχνευσης και σύλληψης) που αναγνωρίζουν διαφορετικούς αντιγονικούς επίτοπους. Για το λόγο αυτό, στην πλαστική βάση κάθε πηγαδιού σε μια συστοιχία 98 πηγαδιών (Elisa well plate) προσδένεται αντίσωμα έναντι της υπό διερεύνησης ουσίας. Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στη στερεά επιφάνεια. Ακολουθεί προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος με το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Στη συνέχεια, προστίθεται το ενζυμο-συζευγμένο δεύτερο αντίσωμα. Η ποσότητα του δεύτερου αντισώματος/ενζύμου που θα προσδεθεί είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Έπειτα, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και μέσω ενζυμικής αντίδρασης, ανιχνεύεται ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Η αρχική συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας καθορίζει την ένταση του χρωματισμού. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται κατά την sandwich Elisa περιλαμβάνει αρίθμηση και αντιστοίχιση των πηγαδιών στο well plate, με χωρισμό των στηλών σε 6 ζεύγη και μέτρηση του κάθε δείγματος 2 φορές. Ακολουθεί αντιστοίχιση του τυφλού δείγματος στο πρώτο ζεύγος στηλών (1η σειρά) και κατασκευή πρότυπης καμπύλης με αντιστοίχιση στις υπόλοιπες σειρές αυξανόμενων συγκεντρώσεων πρότυπου ορού (2η – 8η σειρά). Με αυτό τον τρόπο απομένουν 5 ζεύγη στηλών, με 8 σειρές η κάθε μία, για σύνολο 40 δειγμάτων. Συνεχίζουμε με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου ορού με αραιωτικό διάλυμα (diluent) και κατάλληλη αραιώση δειγμάτων με βαθμονομητή ώστε τελικά να εμπίπτουν στο εύρος ανίχνευσης της μεθόδου. Σε κάθε πηγαδάκι προσθέτουμε 100μl δείγματος και γίνεται επικάλυψη

με ταινία και επώαση με ανακίνηση για 2 ώρες στους 37°C. Η απόρριψη του υγρού από τα πηγάδια επιτυγχάνεται χωρίς πλύση. Στο επόμενο στάδιο, προσθέτουμε 100μl διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος και επαναλαμβάνεται επικάλυψη με ταινία, επώαση με ανακίνηση για 1 ώρα και τριπλή πλύση με ρυθμιστικό πλύσης (wash buffer) με στέγνωμα σε κάθε πλύση. Ακολουθεί προσθήκη 100μl διαλύματος δευτερογενούς αντισώματος, επικάλυψη με ταινία, επώαση με ανακίνηση για 30 λεπτά και τριπλή πλύση με ρυθμιστικό και στέγνωμα σε κάθε πλύση. Τέλος, πραγματοποιείται προσθήκη 100μl διαλύματος υποστρώματος, επικάλυψη με ταινία, επώαση με ανακίνηση στο σκοτάδι για 25 λεπτά και προσθήκη 50μl διαλύματος διακοπής αντίδρασης, ανακίνηση και φωτομέτρηση εντός 15 λεπτών³⁷².

3.3.5 Ιστολογική επεξεργασία

Στο τέλος της πειραματικής περιόδου κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκε ευθανασία. Κατά τη διαδικασία αυτή, η καρδιά εγχύθηκε με 1 ml 10% ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος φορμαλίνης μέσω καρδιακής παρακέντησης. Μετά την ευθανασία, οι νεφρικοί και εντερικοί ιστοί των πειραματόζων συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός τους σε ειδικά πλαστικά καψίδια ιστολογίας. Έγινε έγχυση με ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer solution ή PBS), με τιμή pH 7,4. Ένα μέρος από τον κάθε ιστό που ελήφθη μονιμοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος 10% φορμαλδεΐδης στους 4°C για χρονικό διάστημα 18 ωρών (overnight, o/n) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σκίνωση και εγκλεισμός των ιστών σε κύβους παραφίνης για ιστολογική ανάλυση.

Αναλυτικότερα, τα βήματα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν έντονο ξέπλυμα από τη φορμαλίνη με νερό βρύσης για χρονικό διάστημα 10 λεπτών, εμβάπτιση και παραμονή o/n σε διάλυμα αιθανόλης 70% στους 4°C, αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης, 1 ώρα / συγκέντρωση 70%, 80%, 95%, 100%, 100% σε θερμοκρασία δωματίου (RT), υδροφοβοποίηση με εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 1 ώρα σε RT (X2), εμπότιση παραφίνης με εμβάπτιση σε υγρή παραφίνη για 1 ώρα στους 60°C (X2), εγκλειση σε μπλοκ παραφίνης με χρήση καλουπιού και ψύξη στους -10°C και τελικά αποθήκευση για τουλάχιστον 24 ώρες στους -20°C (Πίνακας 3.3.5)³⁷³.

Πίνακας 3.3.5 Αναλυτική περιγραφή συσκευών και υλικών κατά την ιστολογική επεξεργασία.

Είδος – Συσκευή	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
Ιστοκινέτα	TP1020 - Semi-enclosed Benchtop Tissue Processor	Leica Biosystems GmbH Wetzlar, Germany
Μικροτόμος	RM2255 - Fully Automated Rotary Microtome	
Λεπίδες μικροτόμου	035843489 - Low Profile Microtome Blades	
Συσκευή έγκλεισης	#5100 - Tissue-Tek TEC 5	Sakura Finetek Torrance, CA, USA
Καψάκια Ιστοχημείας	0395 - embedding cassettes	KALTEK srl Padova, Italy
Σπόγγοι Ιστοχημείας	0679 - protective biopsy pads	
Rings Ιστοχημείας	0526 - embedding rings	
Καλούπια έγκλεισης	2781 - base mould - 15x15x06 mm	
Αντικειμενοφόροι πλάκες	slides poly-l-lysine	Gerhard Menzel GmbH Braunschweig, Germany
Φορμαλίνη	9713.5000 - Formalin 10%	VWR Radnor, PA, USA
Αιθανόλη	Ehtanol Absolute	
Παραφίνη	720-0250 - Parammat extra pastillated Gurr	
Ξυλένιο	X/0250/17 - Xylene Analytical reagent grade	

Οι ιστοί που είχαν εγκλεισθεί σε παραφίνη κόπηκαν σε δέκα λεπτές τομές μικροσκοπίας πάχους 5 μικρομέτρων έκαστος σε μικροτόμο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο για να διασφαλισθεί η ομοιότητα της εξεταζόμενης περιοχής και να διευκολυνθεί η μετέπειτα χρώση με πολλαπλές χρωστικές των διαφορετικών τομών. Οι τομές καθηλώθηκαν και εγκλείστηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες για την εξέτασή τους στο μικροσκόπιο.

Για την ακρίβεια, τοποθετήθηκαν αριθμημένες σε αντικειμενοφόρες πλάκες, ακολουθώντας μοτίβο τέτοιο ώστε σε κάθε μία να τοποθετούνται 3 τομές που απείχαν 50μm η μία από την επόμενη. Επιπρόσθετα, η πρώτη τομή κάθε αντικειμενοφόρου ήταν η επόμενη (5μm απόσταση) από την πρώτη τομή της προηγούμενης αντικειμενοφόρου. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε η κατανομή των υπό μελέτη τομών, ώστε ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε χρώση να ανταποκρίνεται σε ευρύτερη μέτρηση. Ακόμη εξασφαλίστηκε το γεγονός ότι η σύγκριση μεταξύ μετρήσεων διαφορετικών χρώσεων ήταν σε συνεντοπισμένα ανατομικά χαρακτηριστικά.

3.3.6 Ιστολογία

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία σε μια έρευνα είναι οι ιστοχημικές χρώσεις. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ανιχνεύονται και εντοπίζονται εντός των ιστών και των κυττάρων, χημικές ουσίες όπως DNA, λιπίδια, υδατάνθρακες και άλλα. Οι ζωντανοί ιστοί δεν είναι ιδανικά δείγματα, επειδή τα όρια των κυττάρων δεν ξεχωρίζουν, με αποτέλεσμα τα κυτταρικά συστατικά να μη φαίνονται στο μικροσκόπιο. Σε αντίθεση, οι κυτταρικές σχέσεις προσδιορίζονται με ευκρίνεια μετά από κατάλληλη επεξεργασία και σε λεπτές τομές πτωτικών ιστών. Για το λόγο αυτό εφαρμόζεται η διαδικασία παρασκευής μόνιμων παρασκευασμάτων. Αρχικά πραγματοποιείται μονιμοποίηση, έγκλειση και κοπή σε λεπτές τομές, ακολουθούμενη από χρώση, καθήλωση και έγκλειση σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρώση με την πιο ευρεία χρήση στην παθολογική ανατομική, δηλαδή χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης.

3.3.6.1 Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης

Οι ιστολογικές τομές είναι κατά βάση άχρωμες. Ο χρωματισμός τους με ιστοχημικές τεχνικές είναι απαραίτητος για να μελετηθούν στο μικροσκόπιο. Η χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (Hematoxylin+Eosin, H+E) είναι η πλέον διαδεδομένη χρώση. Πρόκειται για χρώση ρουτίνας και όπως αποκαλύπτει η ονομασία της, συνδυάζει δύο διαφορετικές χρωστικές. Κάθε χρωστική αντιδρά διαφορετικά και βάφει τον ιστό με ξεχωριστά χρώματα.

Η Αιματοξυλίνη από μόνη της δεν είναι χρωστική και δεν μπορεί να βάψει τον ιστό. Για το λόγο αυτό, η ένωσή της με τον ιστό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας διαβρωτικής ουσίας (κατιόν μετάλλου), όπως είναι το αλουμίνιο. Στο ανωτέρω σύμπλεγμα, η Αιματοξυλίνη λειτουργεί σαν μια βασική χρωστική. Τα θετικά φορτισμένα άλατα αντιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα βασεόφιλα κυτταρικά συστατικά, όπως νουκλεοπρωτεΐνες πλούσιες σε αργινίνη (ιστόνες), φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) ή θειούχες ομάδες των γλυκοσαμινογλυκανών (GAC). Η χρώση είναι μόνιμη, επιδρά σε πυρήνες, ριβοσώματα και το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και το αποτέλεσμα είναι ένα κυανό +/- μωβ χρώμα.

Η Ηωσίνη αντιθέτως, είναι μία κόκκινη φθορίζουσα χρωστική, αποτέλεσμα της δράσης του βρωμίου στη φλουορεσκίνη. Πρόκειται για όξινη, αρνητικά φορτισμένη χρωστική. Αντιδρά με τα θετικά φορτισμένα, οξεόφιλα συστατικά στον ιστό, όπως είναι οι αμινοομάδες των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Προσδίδει ένα ροζ-πορτοκαλί χρώμα, που η απόδοσή του επηρεάζεται από το pH. Όξινες συνθήκες αυξάνουν την ένταση του χρώματος. Η χρωστική της Ηωσίνης δεν είναι μόνιμη αλλά διαλυτή στο νερό³⁷⁴.

Στην παρούσα μελέτη, 10 συνεχείς τομές των 5 μm πραγματοποιήθηκαν στο νεφρικό ιστικό παρασκεύασμα και στη συνέχεια, υπεβλήθησαν σε χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης (Hematoxylin & Eosin) για τον καθορισμό της ιστικής βλάβης σε κυτταρικό επίπεδο καθώς επίσης και τη σύγκριση μεταξύ των σηπτικών και των ομάδων ελέγχου.

Το πειραματικό πρωτόκολλο της H+E χρώσης περιλαμβάνει θέρμανση των αντικειμενοφόρων πλακών στους 60°C για 5 λεπτά με επακόλουθη εμβάπτισή τους σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλένιου 100% για 10 λεπτά το καθένα και ξέπλυμα αυτού με αιθανόλη 100% για 5 λεπτά. Τα στάδια αυτά ονομάζονται τήξη, αποπαραφινοποίηση και υδροφιλοποίηση αντίστοιχα. Στη συνέχεια, γίνεται σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε υδατικά διαλύματα αιθανόλης (EtOH) μειούμενης συγκέντρωσης (95%, 80% και 50%) για 5 λεπτά το καθένα. Έπεται βύθιση σε νερό βρύσης για 5 λεπτά και τελικά εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης Harris για 60 δευτερόλεπτα. Τα επόμενα στάδια

περιλαμβάνουν ξέπλυμα σε νερό βρύσης (X3), εμβάπτιση σε αλκοολικό διάλυμα ηωσίνης 1% για 60 δευτερόλεπτα, γρήγορο ξέπλυμα (dips) σε νερό βρύσης (X3), σταδιακή αφυδάτωση με εμβαπτίσεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80%, 95%, 100% (από 10 δευτερόλεπτα το καθένα), 100% (30 δευτερόλεπτα) και βύθιση σε ξυλένιο 100% για 5 λεπτά (X2). Τέλος, εφαρμόζεται μέσο επικάλυψης (DPX) με πουάρ και καλυπτρίδα και 24ωρο στέγνωμα.

Στον ακόλουθο Πίνακα (3.3.6.1) περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά, τα διαλύματα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση H+E:

Πίνακας 3.3.6.1 Συσκευές, υλικά και διαλύματα για χρώση H+E.

Είδος	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
Αιματοξυλίνη Harris	351946T - Hamatoxylin Harris (mercury free)	VWR, Radnor, PA, USA
Ηωσίνη 1% σε αλκοόλη	RRSP37/E - Eosin sln 1%	Biostain Ready Reagents Ltd. Manchester, UK
Αιθανόλη	1lt δ/τος: Ανάμειξη 10*x ml EtOH με 1000-(10*x) ml ddH ₂ O	
Καλυπτρίδες	631-0146 - coverslips 24x50	VWR, Radnor, PA, USA
DPX mountant	36029 DPX mountant	VWR, Radnor, PA, USA
Διηθητικό Χαρτί	17630 - Filter paper 39x39 cm	Munktell & Filtrak GmbH Bärenstein, Germany

3.3.7 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε για τους TLRs 2, 3, 4 και 7 με επισημασμένο φθορίζον αντίσωμα πρωτεύον (κουνελιού) και στη συνέχεια δευτερεύον (αίγας), διαφορετικό για τον κάθε TLR και πιο συγκεκριμένα της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology, INC:

1. TLR 2: primary polyclonal antibody SC10739 (1:200)
2. TLR 3: primary polyclonal antibody SC28999 (1:200)
3. TLR 4: primary polyclonal antibody SC30002 (1:200)
4. TLR 7: primary polyclonal antibody SC30004 (1:200)
5. Specific secondary goat anti-rabbit antibody TRITC-SC 2780 (1:200).

Για την καθήλωση του δεύτερου αντισώματος οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 10% φυσιολογικού ορού αίγας αραιωμένο σε PBS για 20 λεπτά. Το επιπλέον υγρό αναρροφήθηκε από τα πλακάκια, τα οποία αποσπογγίσθηκαν.

Τα πρωτεύοντα αντισώματα αραιώθηκαν (1:200) σε 0,01 mol/l PBS, pH 7,4 και στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε τμήμα, για 1 ώρα. Ακολούθησε έκπλυση με απεσταγμένο νερό τρεις φορές για 5 λεπτά. Ποσότητα 10μg από το δευτερεύον αντίσωμα προστέθηκαν αραιωμένα με απεσταγμένο νερό και επώαστηκαν για 1 ώρα. Ακολούθησε έκπλυση με dH₂O τρεις φορές για 10 λεπτά. Προστέθηκαν 50μl DAPI σε κάθε τομή, που χρησιμεύει στην απεικόνιση του κυτταρικού πυρήνα με μπλε χρωστική. Τέλος, ο ιστός καλύφθηκε με καλυπτρίδα και χρησιμοποιήθηκε ειδική κόλλα DPX. Επιπλέον, μια τομή χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Στο κομμάτι αυτό δεν τοποθετήθηκε το δεύτερο αντίσωμα, ενώ η υπόλοιπη διαδικασία παρέμεινε ίδια.

Μετά την πάροδο 24 ωρών, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάστηκαν σε ψηφιακό μικροσκόπιο Leica DM RXA2 και DM RA2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) με κάμερα Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 V2 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Germany).

3.3.8 Μορφομετρική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία για την εκτίμηση του κλάσματος έκφρασης κάθε ιστού. Μετά την πάροδο 24 ωρών οι αντικειμενοφόρες πλάκες ήταν κατάλληλες για ανάλυση και επεξεργασία. Τοποθετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν από ψηφιακή κάμερα με τη χρήση φακού σε διάφορες μεγεθύνσεις-φωτεινότητες (X40, X100). Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με ειδικό λογισμικό ψηφιακής ανάλυσης εικόνας για την εξαγωγή δεδομένων και επεξεργασία εικόνων (stereo-investigator 10). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μορφομετρίες για τη μέτρηση του εμβαδού κάθε ιστού και πιο συγκεκριμένα το ποσοστό του υποστρώματος (a), το ποσοστό των κυτταρικών πυρήνων (b), το ποσοστό έκφρασης κάθε TLR (c) και το ποσοστό του παρεγχύματος (d). Έγινε χρήση του Προγράμματος Image J (έκδοση 1.49C, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) για την ανάλυση κάθε φωτογραφίας και του τύπου: area color brown =

$c\% \times 100 / (100 - a)\%$ για τη μέτρηση της έκφρασης των TLRs.

Πίνακας 3.3.8 Συσκευές και υλικά μορφομετρίας.

Είδος - Συσκευή	Περιγραφή	Παραγωγός
Μικροσκόπιο	Olympus CX31 Leica DMRA2	Olympus UK Ltd Hertfordshire, UK
Προσαρμογέας ψηφιακής κάμερας	N1512100 - U-TV0, 5xC-3	
Ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου	ALTRA 20 - SIS 2 Megapixel CMOS color camera	
Λογισμικό εικονοληψίας	Altras Soft Imaging System	
Λογισμικό ψηφιακής επεξεργασίας εικόνων	Stereo-investigator 10 version 10.1	MBF Bioscience, Microbrightfield. Inc, Willinston, Vermont, USA
Image J program (version 1.49C)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA	

3.3.9 Ποσοτική ανάλυση αντίδρασης αλυσίδας πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική που επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA. Χρησιμοποιεί μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA ως υπόστρωμα και δύο εκκινητές (primers), συμπληρωματικούς προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η ποσοτική PCR (qPCR ή Quantitative PCR) είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω της αξιοπιστίας της και της υψηλής ευαισθησίας της. Πρόκειται για μία γρήγορη μέθοδο που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Περιγράφονται δύο είδη αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: η τελικού σημείου (End-Point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR.

Στη Real-Time PCR (RT-PCR), παρατηρείται αξιόπιστη ποσοτική μέτρηση του προϊόντος σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Με αυτή την τεχνική παρατηρείται η σταδιακή αύξηση του φθορισμού μιας ουσίας ταυτόχρονα με τη διεξαγωγή της μεθόδου. Αντίθετα, στην PCR τελικού σημείου (End-Point PCR ή EP-PCR) πρέπει να

τελειώσει η αντίδραση για να επιτευχθεί ο υπολογισμός του προϊόντος. Έτσι, μειώνεται η αποδοτικότητα της μεθόδου, λόγω κατανάλωσης των αντιδρώντων και συσσώρευσης αναστολέων.

Στην ποσοτική ανάλυση αντίδρασης αλυσίδας πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) ολόκληρη η διαδικασία καταγράφεται με μια καμπύλη ενίσχυσης, απότοκο της μέτρησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο. Το σήμα φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με το προϊόν και εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του πρωτεύοντος υποστρώματος. Στην καμπύλη ενίσχυσης περιγράφονται τρεις φάσεις. Κατά την πρώτη ή εκθετική φάση όπως αποκαλείται αλλιώς, παρατηρούμε ακριβή διπλασιασμό του προϊόντος σε κάθε κύκλο. Σε αυτό το στάδιο, τόσο οι εκκινητές όσο και η πολυμεράση ανευρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια, ακολουθεί η δεύτερη ή γραμμική φάση, όπου παρατηρείται σταδιακή συσσώρευση αναστολέων και εξάντληση μερικών αντιδραστηρίων. Το αποτέλεσμα είναι η επιβράδυνση της αντίδρασης με μείωση της αποδοτικότητας και τελικά η μετάβαση στην τρίτη ή φάση κορεσμού, όπου η αντίδραση διακόπτεται. Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της αντίδρασης και το κατώφλι κύκλου (Ct ή threshold cycle) αποτελεί σημαντική παράμετρο. Αυτή αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που χρειάζονται για να προσεγγίσει η τιμή του φθορισμού ένα συγκεκριμένο όριο (threshold), υψηλότερο από το όριο του μη ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct, τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος³⁷⁵.

Στη μελέτη μας, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας Life Technologies – Invitrogen, το αντιδραστήριο της Trizol (TRI) χρησιμοποιήθηκε για να εξάγει ολικό RNA από δείγματα νεφρικών και εντερικών ιστών³⁷⁶. Για την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1ml tri reagent (sigma aldrich) στον ιστό, με επακόλουθη ομογενοποίηση, επεξεργασία σε πάγο με γ'νερό, φυγοκέντρηση 12.000 g (11.400 rpm) για 15 λεπτά στους 4°C, μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs και προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιου (0,2 ml / 1 ml tri reagent). Αφήνουμε τα δείγματα 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση 12.000 g (11.400 rpm) για 15 λεπτά στους 4°C και μεταφορά του υπερκείμενου (υδαρής φάση) σε νέα eppendorfs. Ακολουθεί προσθήκη 2-propanol 500 μl (0,5 ml / 1 ml tri reagent) και ανάδευση. Αφήνουμε τα δείγματα για 10 λεπτά στους 4°C. Συνεχίζουμε με φυγοκέντρηση 12.000 g (11.400 rpm) για 15 λεπτά στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml αιθανόλης 75% στο ίζημα, ανάδευση, επανάληψη της φυγοκέντρησης αυτή τη φορά σε 7.500 g (13.000 rpm) για 5 λεπτά στους 4°C και τελικά αφαίρεση της αιθανόλης. Έπειτα, διεξάγεται στέγνωμα στο eppendorf concentrator 5301 308 ventilation και φύλαξη του δείγματος στους -80°C.

Συνεχίζουμε με DNase treatment σε ίσους όγκους, επαναδιάλυση του ιζήματος RNA σε 50μl 1x DNase buffer (45 μl νερό + 5 μl 10X DNase buffer) και επεξεργασία σε πάγο με γ'νερό. Γίνεται προσθήκη 40 U RNaseOut Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), 1 U/μg DNA από DNase I recombinant, RNase-free (Roche, Mannheim Germany) και επώαση στους 37°C για 35 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη EDTA 5 mm (0,5 μl EDTA 500 mm /50 μl) και επώαση στους 75°C για 10 λεπτά. Αφήνουμε τα δείγματα να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως προσθέτουμε 150 μl γ'νερό, 200 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 4 λεπτά στους 4°C. Γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs, προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιο, φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 4 λεπτά στους 4°C και ξανά μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs. Τα υπόλοιπα βήματα περιλαμβάνουν: προσθήκη 20 μl acetylated NA 3M και 400 μl αιθανόλης 100%, παραμονή των δειγμάτων για 20 λεπτά στους -20°C, φυγοκέντρηση 12.500 g (11.400 rpm) για 10 λεπτά στους 4°C, αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 200 μl αιθανόλης 75%, ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, αφαίρεση της αιθανόλης, στέγνωμα στο eppendorf concentrator 5301 308 ventilation, επαναδιάλυση σε 50 μl γ'νερό, φύλαξη στους -80°C, νέα eppendorfs 2 μl +198 μl γ'νερό και τελικά φωτομέτρηση RNA.

Ποσότητα 1 μg από το συνολικό νεφρικό και εντερικό RNA χρησιμοποιήθηκε για την ανάστροφη μεταγραφή, ενώ ανάστροφη τρανσκριπτάση MMLV χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA. Η mRNA ανάλυση των TLRs 2, 3, 4 και 7 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας Power SYBR Green Master Mix από την

εταιρεία Applied Biosystems (Ηνωμένο Βασίλειο) και διεξήχθη με τον κατάλληλο εξοπλισμό, δηλαδή θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 480 της εταιρείας Roche (Mannheim, Γερμανία). Η εταιρεία Integrated DNA Technologies (Leuven, Βέλγιο) παρείχε όλους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA (Πίνακας 3.3.9α), ενώ κάθε εκκινητής μετρήθηκε σε 200 nM και 10 μl της Kapa Sybr Fast qPCR master mix (KAPA BIO, MA, USA).

Αναλυτικά, ποσότητα RNA 1 μg/ml αναδεύεται και φυγοκεντρείται. Το μείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά, σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 δευτερόλεπτα στις 6000 rpm, σε πάγο. Προσθέτουμε master mix 10 μl, που περιλαμβάνει 5X first strand buffer 4 μl, 0,1 m DTT 2 μl και RNase out 1 μl. Αναμειγνύουμε ελαφρά, προσθέτουμε 1 μl (200 Units) MMLV και αναμειγνύουμε ελαφρά, με ανάδευση και φυγοκέντρηση. Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 10 λεπτά, στους 37°C για 50 λεπτά και προσθήκη σε κάθε φιαλίδιο 30 μl dH₂O. Ακολουθεί απενεργοποίηση της αντίδρασης με θέρμανσή της στους 70°C για 15 λεπτά.

Τελικά, κάθε 20 μl αντίδρασης περιελάμβαναν 2 μl cDNA (20 ng ολικού RNA), 1 μl εκκινητή, 7 μl dH₂O και 10 μl του κύριου μίγματος Power SYBR Green Master Mix της Αγγλικής εταιρείας Applied Biosystems (Πίνακας 3.3.9β) (Πίνακας 3.3.9γ). Την PCR χαρακτήρισε ένα στάδιο αρχικής μετουσίωσης στους 95°C για 10 λεπτά. Έπειτα, οι συνθήκες της PCR διαμορφώθηκαν ως εξής: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 60°C για 40 δευτερόλεπτα, 72°C για 40 δευτερόλεπτα, συνολικά πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν και η μέση τιμή Ct χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων. Οι σχετικές μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων εκτιμήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου ανάλυσης 2-ΔΔCT³⁷⁷. Όλα τα δεδομένα ομαλοποιήθηκαν στα επίπεδα GAPDH και εκφράστηκαν ως σχετικό ποσοστό επί τοις εκατό (%) προς τις τιμές ελέγχου, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Πίνακας 3.3.9α: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR της εταιρείας *Integrated DNA Technologies (Leuven, Βέλγιο)*

TLRs	TLR 2	TLR 3	TLR 4	TLR 7
Εκκινητής				
LEFT	5'- tgggctgacttctctca atg-3'	5'- ctgggtctgggaacatt tct-3'	5'- ggaacaacagcctgag aca-3'	5'- atacctggccactgatg tga-3'
TM	59,0	59,0	58,9	59,0
RIGHT	5'- ttcatcggtgagctgac ttc-3'	5'- ttgctgaactgcgtgat gta-3'	5'- ttgagactggtcaagcca ag-3'	5'- gactccatggattgcag atg-3'
TM	59,0	59,0	59,0	59,0
Μέγεθος προϊόντος	243	211	233	249
NCBI reference sequence	NM 011905	NM 126166	NM 021297.2	NM 133211.3

Πίνακας 3.3.9β: Συστατικά διαλύματος για qRT-PCR.

Προϊόντα αντίδρασης	Όγκος αντίδρασης/δείγμα σε μl
SYBR GREEN (2X)	10 μl
Αριστερός εκκινητής (μM)	0.5 μl
Δεξιός εκκινητής (μM)	0.5 μl
ddH₂O (Γ' ΝΕΡΟ)	7 μl
cDNA	2 μl
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20 μl

Πίνακας 3.3.9γ Συσκευές και υλικά κατά την qRT-PCR.

Είδος – Συσκευή	Περιγραφή	Παραγωγός
Trizol	Χημικά	Sigma aldrich
Χλωροφόρμιο	Χημικά	Sigma
Ισοπροπυλική αλκοόλη	Χημικά	Sigma
Αιθανόλη	Χημικά	VWR Radnor, PA, USA
RQ1	10x διάλυμα	Promega
RQ1 DNase	Ένζυμο	Promega
ddH ₂ O	Νερό	Invitrogen
RQ1 inhibitor	Διάλυμα	Promega
MMLV διάλυμα	5x διάλυμα	Promega
MMLV-RT	Ένζυμο	Fermentas
dNTPs	Τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών 10mM	Fermentas
Εκκινητές	0.5 μg/μl	Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgium)
RNase OUT	1 μl	Invitrogen
Σωληνάρια & Καπάκια	Αποστειρωμένα	Biorad
SYBR GREEN (2X)	Ένζυμο	Invitrogen
RNA/DNA free H ₂ O	Νερό	Invitrogen
Απομόνωση RNA	Ομογενοποιητής	Polytron
Φωτόμετρο	Έλεγχος RNA	Eppendorf , bioinformatics
Αποδιάταξη DNA & σύνθεση cDNA	Θερμικός κυκλοποιητής	LightCycler 480; Roche, Mannheim, Germany
qRT-PCR	Θερμικός κυκλοποιητής	Chromo 4 Biorad

3.3.10 Στατιστική ανάλυση

Η υπόθεση κανονικότητας για τα δεδομένα μας ελέγχθηκε με τη χρήση του Shapiro-Wilk test. Οι διαφορές μεταξύ των σηπτικών ομάδων και των ομάδων ελέγχου σχετικά με τα αποτελέσματα των εξετάσεων αίματος και την έκφραση των TLRs αξιολογήθηκαν με την μέθοδο Ανονα ως προς ένα παράγοντα (one-way Ανονα) και ακολούθησε ανάλυση με Tukey's test για τους μέσους όρους και τις τυπικές αποκλίσεις (mean values, Standard Deviation, Mean \pm SD). Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως θηκογράμματα, τα οποία έδειξαν το μεσαίο, το πρώτο και το τρίτο τεταρτημόριο καθώς και τους μύστακες. Κάθε διαφορά με $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Οι συσχετίσεις που αφορούσαν την qRT-PCR προσδιορίστηκαν με τον έλεγχο καλής προσαρμογής (r^2) και τα επίπεδα εμπιστοσύνης έως και 95% χρησιμοποιώντας μέθοδο Ανονα ως προς ένα παράγοντα. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο Graph Pad Prism Program έκδοση 4.03 για Windows της εταιρείας GraphPad Software Inc (Καλιφόρνια, ΗΠΑ).

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1 Βιοχημικά και ανοσολογικά αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα όλων των αιματολογικών, βιοχημικών και ανοσολογικών δεικτών από τα δείγματα αίματος των ομάδων ελέγχου και σηπτικών, που εξετάστηκαν στο πιλοτικό στάδιο της μελέτης μας, επεξεργάστηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη στατιστική τους σημαντικότητα.

Η νεφρική ανεπάρκεια είναι μια ευρέως διαδεδομένη επιπλοκή της σήψης που οφείλεται σε περιτονίτιδα. Για την εκτίμηση της νεφρικής δυσλειτουργίας, εξετάσαμε αρχικά τους βιοδείκτες ορού αίματος όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4.1. Η συγκριτική βιοχημική και ανοσολογική ανάλυση μεταξύ των διαφόρων υποομάδων, έδειξε ότι οι ακόλουθοι βιοχημικοί και ανοσολογικοί δείκτες: ουρία (urea), κρεατινίνη (cr), ολική χολερυθρίνη (tbil), άμεση χολερυθρίνη (dbil), ιντερλευκίνη 18 (IL-18) και σχετιζόμενη με λιποκαλίνη ζελατινάση ουδετεροφίλων (NGAL) παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση στις σηπτικές ομάδες κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Μια

σημαντική αύξηση σε κάθε δείκτη ορού επισημάνθηκε επίσης μεταξύ των σηπτικών ομάδων, καθώς ο χρόνος ευθανασίας διαρκεί περισσότερο, ενώ η ισχυρότερη σχέση αποδεικνύεται μεταξύ των ομάδων S24 και S72 ($p < 0,05$).

Πιο αναλυτικά, όλοι οι βιοχημικοί δείκτες παραμένουν στάσιμοι στις υποομάδες των ομάδων ελέγχου χωρίς ιδιαίτερη μεταβολή ή αύξηση. Στις υποομάδες των σηπτικών ομάδων αντιθέτως, παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση όσο παρατείνεται ο χρόνος ευθανασίας, όπου η τιμή του βιοδείκτη τριπλασιάζεται περίπου μεταξύ S24 και S72. Πρωτοπόρος είναι η ολική χολερυθρίνη που παρουσιάζει εξαπλάσια αύξηση της αρχικής μέτρησης στη σηπτική υποομάδα των 72 ωρών. Στη σύγκριση των ίδιων υποομάδων μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των σηπτικών προκύπτει ξεκάθαρη αύξηση των τιμών των βιοδεικτών, η οποία κυμαίνεται από διπλάσια έως και εντεκαπλάσια (Πίνακας 3.4.1).

Επιπλέον, για να διερευνηθεί ο ρόλος των NGAL και IL-18 ως δεικτών νεφρικής φλεγμονής, οι ανωτέρω βιοδείκτες μετρήθηκαν και τα επίπεδα του ορού παρακολούθηθηκαν μετά από την CLP και την πλασματική επέμβαση. Για τις ανωτέρω μετρήσεις και την επακόλουθη μελέτη των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε, όπως ήδη έχει αναφερθεί, η τεχνική ELISA. Η IL-18 και η NGAL αυξήθηκαν επίσης όπως και οι βιοδείκτες αίματος στο μέγιστο στις 72 ώρες μετά την CLP επέμβαση, ενισχύοντας την υπόθεση της χρήσης τους ως βιοδεικτών της νεφρικής αιτιολογίας σήψης. Πιο αναλυτικά, η IL-18 διπλασιάζεται στη σύγκριση S24-S72, ενώ η NGAL διπλασιάζεται στη σύγκριση S48-S72 και τριπλασιάζεται στη σύγκριση S24-S72. Τέλος, προκύπτει ξεκάθαρα από τις μετρήσεις μας, η στατιστικώς σημαντική διαφορά στη σύγκριση των ίδιων υποομάδων μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των σηπτικών (Πίνακας 3.4.1).

Πίνακας 3.4.1: Βιοχημικά και ανοσολογικά αποτελέσματα

Χρονική περίοδος	24h	48h	72h
Βιοχημικοί δείκτες			
Ουρία (mg/dL)			
Control	39.25 ± 10.26 ^a	48.50 ± 11.67 ^a	54.33 ± 9.921 ^a
Septic	77.58 ± 12.87	137.1 ± 23.92 ^b	237.8 ± 45.97 ^{c,d}
Κρεατινίνη (mg/dL)			
Control	0.372 ± 0.157 ^a	0.4783 ± 0.149 ^a	0.4508 ± 0.16 ^a
Septic	1.502 ± 0.24	2.473 ± 0.287 ^b	4.414 ± 0.825 ^{c,d}
Ολική χολερυθρίνη (U/L)			
Control	0.779 ± 0.15 ^a	0.729 ± 0.167 ^a	0.674 ± 0.21 ^a
Septic	1.846 ± 0.378	3.648 ± 0.273 ^b	6.82 ± 0.833 ^{c,d}
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)			
Control	0.676 ± 0.106 ^a	0.655 ± 0.104 ^a	0.64 ± 0.084 ^a
Septic	1.128 ± 0.1052	1.603 ± 0.167 ^b	3.142 ± 0.473 ^{c,d}
Ιντερλευκίνη 18 (pg/ml)			
Control	44.94 ± 9.769 ^a	47.62 ± 6.89 ^a	42.22 ± 14.18 ^a
Septic	167.9 ± 21.63	263.1 ± 25.99 ^b	354.9 ± 32.94 ^{c,d}
NGAL (pg/ml)			
Control	5.628 ± 1.173 ^a	6.145 ± 1.745 ^a	6.113 ± 0.815 ^a
Septic	173 ± 19.77	255.4 ± 21.36 ^b	570.1 ± 39.32 ^{c,d}

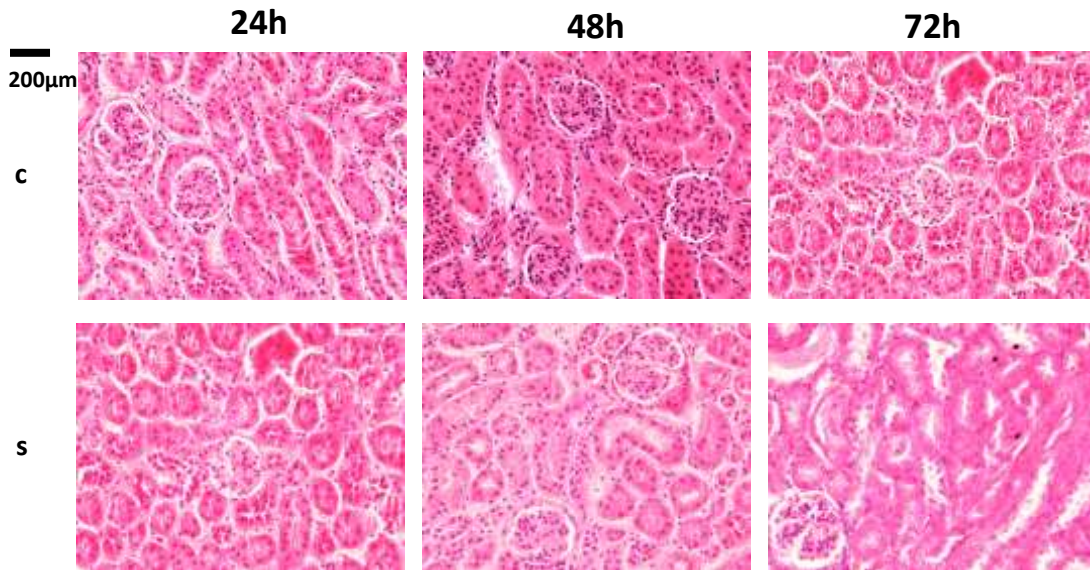
Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD για κάθε πειραματική ομάδα. Οι στατιστικές σημασίες ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων στο ίδιο χρονικό σημείο υποδεικνύονται ως εξής:

- a. Ελέγχου (C) έναντι Σηπτικών (S)
- b. S24 έναντι S48
- c. S48 έναντι S72
- d. S24 έναντι S72

3.4.2 Παθολογοανατομικές εξετάσεις

Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) ανήκουν στην πρώτη ευρέως διαδεδομένη οικογένεια αναγνώρισης υποδοχέων προτύπων. Έχουν μελετηθεί εκτενώς και γνωρίζουμε ήδη ότι εκφράζονται σε ανοσοκύτταρα, καθώς και ότι παρουσιάζουν ευρεία διανομή σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, συμβάλλουν σημαντικά σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις των νεφρών³⁷⁸. Αντιδρούν σε απομακρυσμένα σήματα και ενισχύουν την έκφρασή τους, στοιχεία που εμφανίζονται τόσο στην ιστοπαθολογία όσο και στον ανοσοφθορισμό.

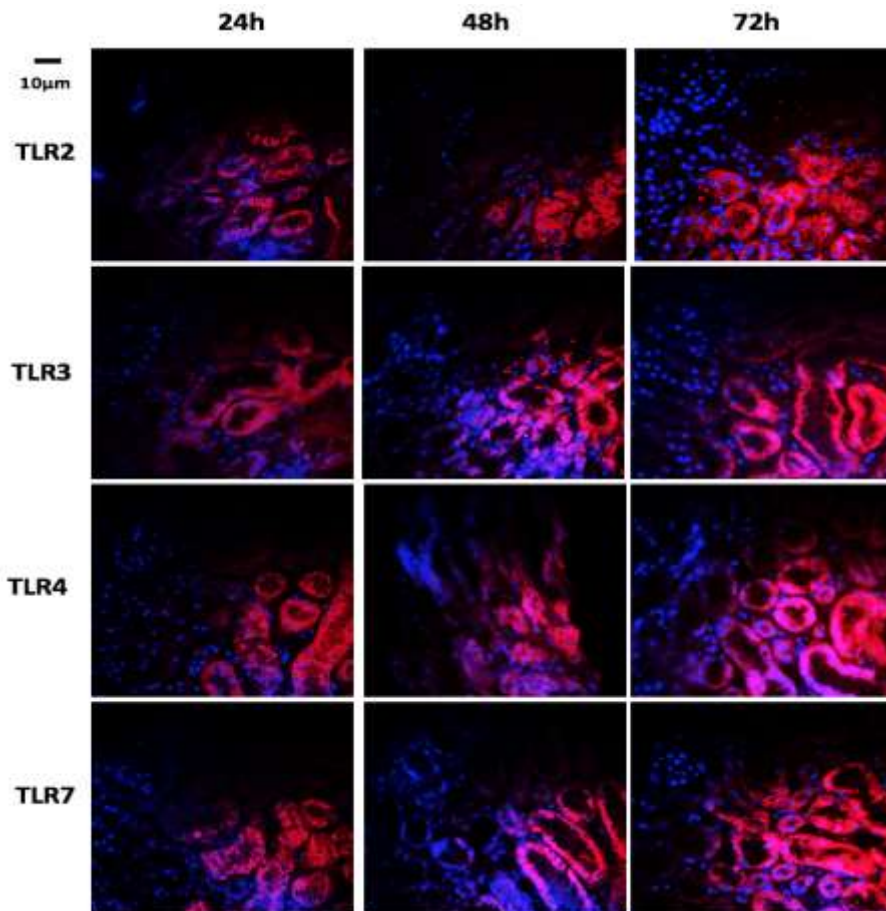
Για την παθολογοανατομική εξέταση στη δική μας μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η χρώση H+E για την καλύτερη παρατήρηση των αλλοιώσεων στο μικροσκόπιο. Η έρευνά μας αποκάλυψε προοδευτική αλλοίωση με σωληναριακή διαστολή στις σηπτικές ομάδες συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Επιπλέον, μεγαλύτερη νεφρική βλάβη παρατηρείται με την πάροδο του χρόνου στις σηπτικές ομάδες με κίνδυνο την οριστική εκφύλιση του οργάνου και την πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης. Εξετάζοντας συγκριτικά τα αποτελέσματά μας και τις αλλοιώσεις μεταξύ ομάδων ελέγχου, σηπτικών ομάδων καθώς και των υποομάδων τους, προκύπτει το συμπέρασμα ότι ακόμη και η πρώιμη σηπτική ομάδα εμφανίζει σημεία αλλοίωσης στο μικροσκόπιο. Με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη του μηχανισμού της σήψης, οι αλλοιώσεις στον ιστό καθίστανται πιο έκδηλες με αποτέλεσμα τη μετάβαση από το στάδιο της απλής φλεγμονής στη μη αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη. Χαρακτηριστικά, η σύγκριση μεταξύ C72 και S72 υποομάδας, μας παρέχει μια σαφή εκτίμηση της αλλοίωσης που υπεισέρχεται σε κυτταρικό επίπεδο με την επαγωγή του σηπτικού ερεθίσματος και την πυροδότηση του καταρράκτη αντιδράσεων για την καταπολέμησή του (Εικόνα 3.4.2α).



Εικόνα 3.4.2α Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τη σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης μετά από τη διαδικασία CLP στις διάφορες χρονικές στιγμές (24, 48 και 72 ωρών) μεταξύ σηπτικών (S) και ομάδων ελέγχου (C). Η σωληναριακή διαστολή αυξήθηκε με το χρόνο. Αρχική μεγέθυνση 40x 200µm.

Η ανάλυση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι τα κύτταρα γύρω από τα νεφρικά σωληνάκια εκδηλώνουν TLRs 2, 3, 4 και 7 στις σηπτικές ομάδες (Εικόνα 3.4.2β). Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες ελέγχου εκφράζουν ελάχιστα έως καθόλου τους ανωτέρω υποδοχείς, ενώ στις σηπτικές ομάδες παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση της εκδήλωσής τους ανάλογα με την παράταση της σηπτικής περιόδου. Η εντονότερη έκφραση παρατηρείται στις ομάδες S72 όλων των TLRs που εξετάζονται στη μελέτη μας, με αποτέλεσμα την εντονότερη ερυθρή χρώση λόγω έκφρασης αντισωμάτων και το εντονότερο εκμαγείο των νεφρικών σωληναρίων (Σχήμα 3.4.2).

Συνοψίζοντας, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των πειραματικών μας δεδομένων (Πίνακας 3.4.2), υπάρχει σημαντική αύξηση των TLRs 2, 3, 4 και 7 στους σηπτικούς μύες με την πάροδο του χρόνου ($p < 0,05$) (Εικόνα 3.4.2). Εντυπωσιακή είναι η διαφορά μεταξύ των υποομάδων S24-S72 για τους TLRs 2 και 3, όπου οι τιμές αυξάνονται ραγδαία και είναι πολλαπλάσιες της αρχικής κατά 24 και 100 αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι ομάδες ελέγχου έδειξαν απουσία των εν λόγω TLRs.



Εικόνα 3.4.26. Εικόνες ανοσοφθορισμού

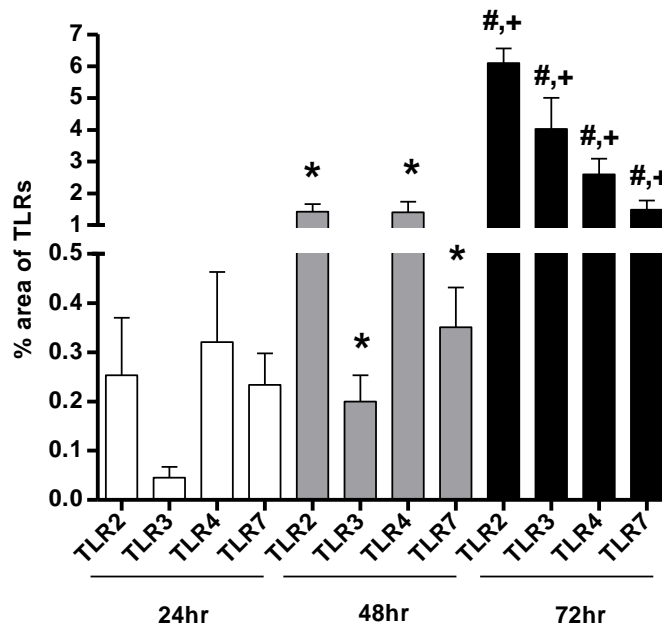
Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανάλυσης ανοσοφθορισμού στους ιστούς των σηπτικών υποομάδων των νεφρικών ιστών των TLRs 2, 3, 4 και 7 σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Το κόκκινο χρώμα δείχνει την έκφραση αντισωμάτων. Το μπλε χρώμα δείχνει τη χρώση DAPI για τον πυρήνα.

Πίνακας 3.4.2 Ανάλυση ανοσοφθορισμού σε νεφρικούς ιστούς

Χρονική περίοδος	24h	48h	72h
Area (%) of TLR expression			
TLR 2 Control	nd	nd	nd
Septic	0.253 ± 0.117	1.423 ± 0.247 ^a	6.1 ± 0.465 ^{b,c}
TLR 3 Control	nd	nd	nd ^a
Septic	0.045 ± 0.022	0.2 ± 0.053 ^a	4.026 ± 0.983 ^{b,c}
TLR 4 Control	nd	nd	nd
Septic	0.32 ± 0.143	1.407 ± 0.331 ^a	2.598 ± 0.492 ^{b,c}
TLR 7 Control	nd	nd	nd ^a
Septic	0.234 ± 0.064	0.351 ± 0.08 ^a	1.49 ± 0.29 ^{b,c}

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. N=12 για κάθε πειραματική ομάδα. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων στο ίδιο χρονικό σημείο υποδεικνύεται ως εξής:

- a. S24 έναντι S48
- b. S48 έναντι S72
- c. S24 έναντι S72
- Nd μη ανιχνεύσιμο



Σχήμα 3.4.2 Ανάλυση ανοσοφθορισμού σε νεφρικούς ιστούς.

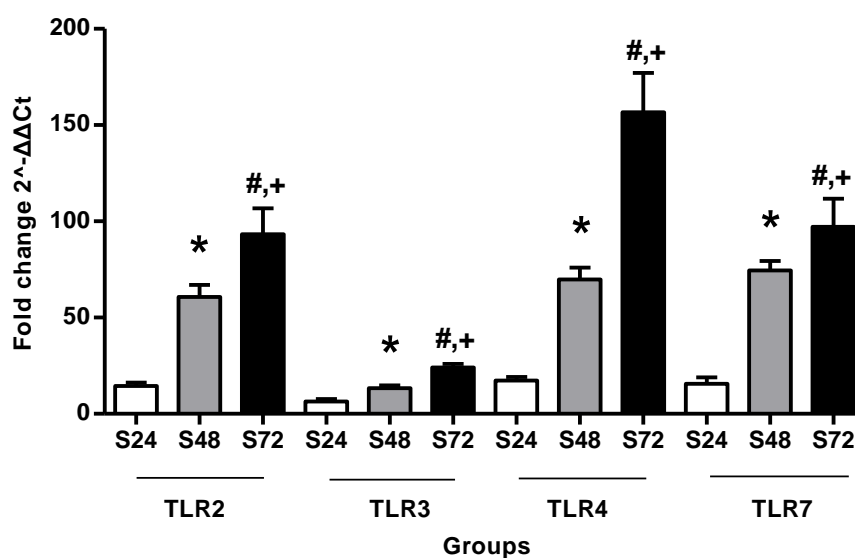
Η ανάλυση ανοσοφθορισμού έδειξε σταδιακή αύξηση της έκφρασης των TLRs 2, 3, 4 και 7 στους νεφρικούς ιστούς των σηπτικών μυών. Αυτή η παρατήρηση ήταν στατιστικά σημαντική όσον αφορά όλους τους TLRs σε όλες τις χρονικές περιόδους. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων σε διαφορετικά χρονικά σημεία υποδεικνύεται ως εξής: * S24 έναντι S48, + S48 έναντι S72, # S24 έναντι S72.

3.4.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός σε πραγματικό χρόνο με τη μέθοδο της αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης μεταγραφής της πολυμεράσης σε νεφρικούς και εντερικούς ιστούς

Η έκφραση των γονιδίων των υποδοχέων TLRs 2, 3, 4 και 7 ποσοτικοποιήθηκε με qRT-PCR μετά από 24, 48 και 72 ώρες επαγωγής CLP στους νεφρούς (Πίνακας 3.4.3α) και στο έντερο (Πίνακας 3.4.3β). Κάθε χρονική στιγμή στα γραφήματα (Σχήμα 3.4.3α και Σχήμα 3.4.3β) αντιπροσωπεύει την πτυχή της έκφρασης που προκαλείται από τη σηπτική ομάδα σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta CT$. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση μεταξύ των ομάδων ελέγχου όλων των χρονικών σημείων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Υψηλά επίπεδα έκφρασης TLRs παρατηρήθηκαν μετά από 72 ώρες επαγωγής CLP τόσο σε ιστούς νεφρών όσο και εντέρου. Τέλος,

παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές αυξήσεις για κάθε TLR κατά τη διάρκεια της σηπτικής διαδικασίας ($p < 0,05$).

Αναλυτικότερα, όταν πραγματοποιήθηκε η qRT-PCR στους νεφρικούς ιστούς, τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα σημαντικά. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση των TLRs μεταξύ των ομάδων ελέγχου. Αντιθέτως, υπήρξε σταθερή αύξηση στις σηπτικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν για κάθε TLR στις ακόλουθες συγκρίσεις: S24 έναντι S48, S48 έναντι S72 και S24 έναντι S72, όπου η τελευταία σύγκριση παρείχε τις ισχυρότερες σχέσεις ($p < 0,05$). Επιπλέον, όλοι οι TLRs που μελετήθηκαν εκφράστηκαν σε υψηλότερα επίπεδα σε όλες τις σηπτικές υποομάδες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες χρονικά ομάδες ελέγχου ($p < 0,05$) (Πίνακας 3.4.3α).



Σχήμα 3.4.3α Ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο νεφρικών ιστών. Ποσοτική ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο της mRNA έκφρασης των TLRs 2, 3, 4 και 7 σε νεφρικούς ιστούς μετά από CLP. Τα δεδομένα κανονικοποιούνται στην έκφραση του γονιδίου μάρτυρα GADPH. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD. Κάθε ομάδα αποτελείται από 12 ζώα. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων σε διαφορετικά χρονικά σημεία υποδεικνύεται ως εξής: * S24 έναντι S48, + S48 έναντι S72, # S24 έναντι S72.

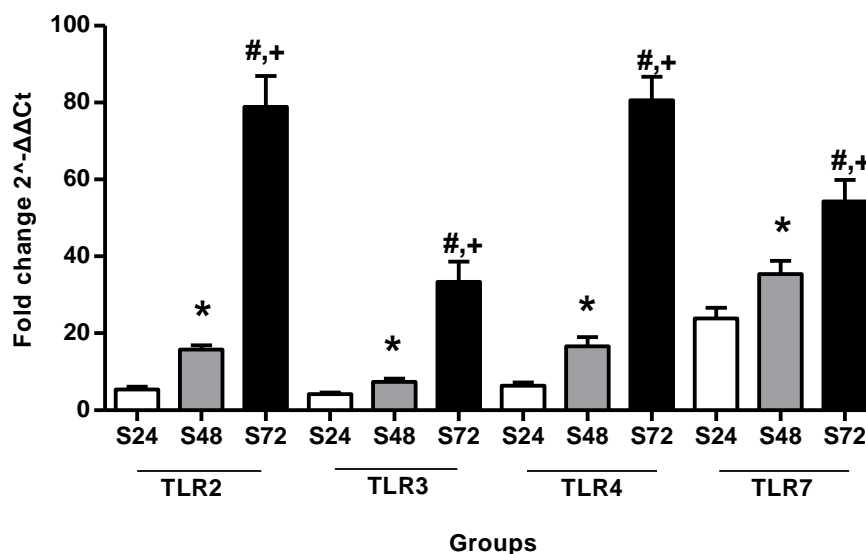
Πίνακας 3.4.3α Έκφραση mRNA των TLRs σε νεφρικούς ιστούς (Ανάλυση PCR)

Χρονική περίοδος	24h	48h	72h
Αναλογία TLRs Septic/Control			
TLR 2	14.48 ± 1.758 ^a	60.74 ± 6.097 ^{a,b}	93.21 ± 13.57 ^a ,c,d
TLR 3	6.476 ± 1.135 ^a	13.26 ± 1.497 ^{a,b}	24.00 ± 1.863 ^a ,c,d
TLR 4	17.25 ± 1.841 ^a	69.68 ± 6.154 ^{a,b}	156.5 ± 20.54 ^a ,c,d
TLR 7	15.57 ± 3.275 ^a	74.40 ± 5.000 ^{a,b}	97.10 ± 14.66 ^a ,c,d

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. N=12 για κάθε πειραματική ομάδα. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων στο ίδιο χρονικό σημείο υποδεικνύεται ως εξής:

- a. Ελέγχου (C) έναντι Σηπτικών (S)
- b. S24 έναντι S48
- c. S48 έναντι S72
- d. S24 έναντι S72

Εκτός από τον νεφρό, η qRT-PCR εφαρμόστηκε στους εντερικούς ιστούς που ελήφθησαν και τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης φαίνονται στο Σχήμα 3.4.3β και στον Πίνακα 3.4.3β. Το μοτίβο των μεταβολών έκφρασης των TLRs ήταν ίδιο με αυτό που αναλύσαμε στην ανωτέρω παράγραφο σχετικά με τους νεφρικούς ιστούς ($p < 0,05$). Στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση κάθε TLR παρατηρήθηκε όταν συγκρίθηκαν οι σηπτικές ομάδες με τις ομάδες ελέγχου ισοδύναμου χρονικού διαστήματος, καθώς και όταν συγκρίθηκαν οι σηπτικές υποομάδες μεταξύ τους.



Σχήμα 3.4.36 Ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο εντερικών ιστών. Σχετική έκφραση mRNA των TLRs 2, 3, 4 και 7 που εκτιμήθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε εντερικούς ιστούς μετά από CLP. Τα δεδομένα κανονικοποιούνται στην έκφραση του γονιδίου μάρτυρα GADPH. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. Κάθε ομάδα αποτελείται από 12 ζώα. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων σε διαφορετικά χρονικά σημεία υποδεικνύεται ως εξής: * S24 έναντι S48, + S48 έναντι S72, # S24 έναντι S72.

Πίνακας 3.4.36 Ανάλυση PCR εντερικών ιστών

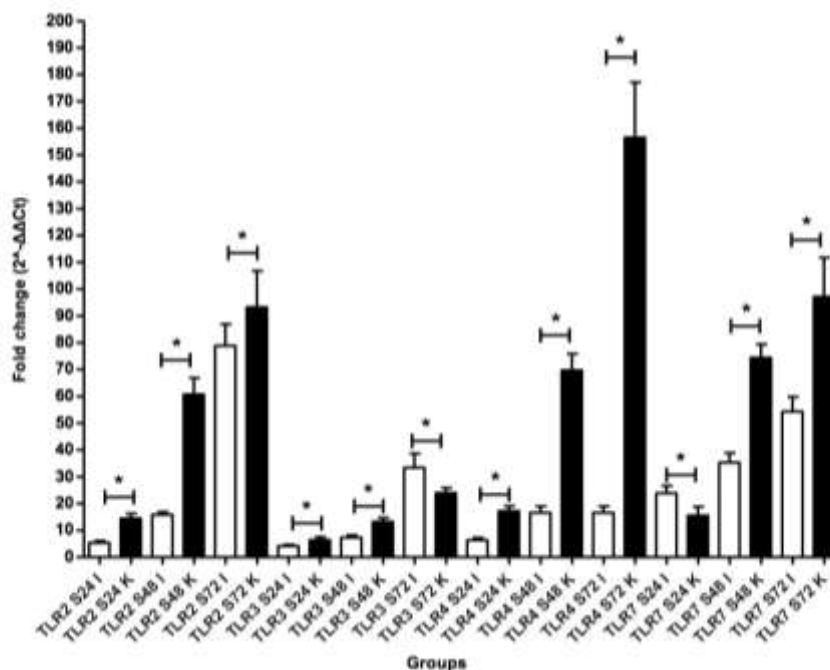
Χρονική περίοδος	24h	48h	72h
Αναλογία TLRs Septic/Control			
TLR 2	5.414 ± 0.705 ^a	15.83 ± 1.061 ^{a,b}	78.87 ± 8.051 ^a ,c,d
TLR 3	4.216 ± 0.439 ^a	7.364 ± 0.885 ^{a,b}	33.38 ± 5.239 ^a ,c,d
TLR 4	6.383 ± 0.862 ^a	16.62 ± 2.414 ^{a,b}	80.64 ± 6.059 ^a ,c,d
TLR 7	23.85 ± 2.8 ^a	35.33 ± 3.556 ^{a,b}	54.32 ± 5.515 ^a ,c,d

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των ομάδων στο ίδιο χρονικό σημείο υποδεικνύεται ως εξής:

- a. Ελέγχου (C) έναντι Σηπτικών (S)
- b. S24 έναντι S48
- c. S48 έναντι S72

d. S24 έναντι S72

Στο Σχήμα 3.4.3γ, απεικονίζεται η διαφορά της έκφρασης κάθε TLR μεταξύ νεφρικού και εντερικού ιστού των σηπτικών μυών. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ των σηπτικών υποομάδων του ίδιου χρόνου ευθανασίας. Η έκφραση των TLRs 2 και 4 ήταν υψηλότερη στους νεφρικούς ιστούς σε σύγκριση με τον εντερικό ιστό κατά τη διάρκεια της σηψαιμίας. Στις 72 ώρες, τα επίπεδα του TLR 3 ήταν σημαντικά υψηλότερα στο έντερο σε σύγκριση με τους νεφρικούς ιστούς. Αντιθέτως, στις 24 και 48 ώρες η έκφραση του TLR 3 ήταν υψηλότερη στους νεφρούς σε σύγκριση με τον ιστό του εντέρου. Επιπλέον, στις 24 ώρες σήψης, η έκφραση του υποδοχέα TLR 7 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο έντερο σε σύγκριση με τον νεφρό.



Σχήμα 3.4.3γ Διαφορά της έκφρασης των TLRs μεταξύ νεφρικών και εντερικών ιστών σηπτικών ομάδων με qRT-PCR ανάλυση.

Ο TLR 4 έδειξε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση στους νεφρικούς έναντι των εντερικών ιστών σε όλα τα χρονικά διαστήματα ευθανασίας, ενώ καμία στατιστικώς σημαντική σχέση δεν προέκυψε κατά την αξιολόγηση του TLR 3. Όσον αφορά τους TLRs 2 και 7, στις υποομάδες S48 και S72 η έκφραση ήταν σημαντικά υψηλότερη στους νεφρικούς ιστούς ($p < 0,05$). Στην υποομάδα S24, εν τούτοις, η έκφραση του TLR 7 στους εντερικούς ιστούς ήταν μεγαλύτερη αλλά δεν είχε στατιστική σημαντικότητα ($p > 0,05$).

*Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$) μεταξύ εντερικού και νεφρικού ιστού
συμβολίζεται με *.*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η σηψαιμία, μια συχνή επιπλοκή που εκδηλώνεται στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων και ο νεφρός είναι ένα από τα όργανα που προσβάλλονται πρώτα. Παρά την αξιοσημείωτη έρευνα κατά τις τελευταίες δεκαετίες η αποκωδικοποίηση της παθοφυσιολογίας, της επαγόμενης από σήψη οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ΟΝΑ) παραμένει ατελής. Στο παρόν μοντέλο επαγόμενης από σήψη ΟΝΑ (σηπτικό μοντέλο CLP), τα επίπεδα κρεατινίνης ορού, ουρίας, ολικής και άμεσης χολερυθρίνης, καθώς και οι ανοσολογικές μετρήσεις των NGAL και IL-18 αυξήθηκαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Αυτός ο φαινότυπος νεφρικής βλάβης δρα με τον ίδιο τρόπο στην ΟΝΑ ασθενών³⁷⁹.

Η μελέτη μας ακολούθησε την ίδια ιδέα, αρχή και πρωτόκολλο με δύο άλλα ήδη δημοσιευμένα άρθρα στη βιβλιογραφία. Ο Αραβανής και οι συνεργάτες του μελέτησαν την έκφραση τόσο των ηπατικών ενζύμων όσο και των TLRs σε ηπατικούς και εντερικούς ιστούς μετά από πρόκληση περιτονίτιδας λόγω απολίνωσης του τυφλού και τρώσης με βελόνη (CLP)³⁸⁰. Παρομοίως, ο Μπακόπουλος και οι συνεργάτες του επικεντρώθηκαν στην έκφραση τόσο των αιματολογικών και βιοχημικών δεικτών του συνδρόμου αναπνευστικής ανεπάρκειας (ARDS) όσο και των TLRs σε πνευμονικούς και εντερικούς ιστούς ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία³⁸¹. Εμείς με τη σειρά μας, μετρήσαμε τους βιοχημικούς και ειδικούς ανοσολογικούς βιοδείκτες της ΟΝΑ, καθώς και την έκφραση των TLRs σε νεφρικούς και εντερικούς ιστούς μετά την πρόκληση περιτονίτιδας με CLP. Τα ένζυμα της ηπατικής λειτουργίας, οι βιοχημικοί και ανοσολογικοί βιοδείκτες της ΟΝΑ καθώς και οι αναπνευστικοί βιοχημικοί δείκτες μαζί με τα μονοκύτταρα παρουσίασαν παρόμοια αύξηση στις σηπτικές ομάδες έναντι των ομάδων ελέγχου κατά τρόπο χρονικά εξαρτώμενο (24, 48 και 72 ώρες). Αντίθετα, οι αιματολογικοί δείκτες παρουσίασαν μείωση στις σηπτικές ομάδες της επαγόμενης από σήψη αναπνευστικής ανεπάρκειας σταδιακά με την

πάροδο του χρόνου. Όλοι οι TLRs εμφάνισαν αυξημένη έκφραση στις ομάδες των σηπτικών μοντέλων έναντι των ομάδων ελέγχου με την πάροδο του χρόνου σε όλα τα απομακρυσμένα όργανα (ήπαρ, πνεύμονα, νεφρούς) δευτερογενώς, σαν απάντηση στην επαγόμενη από CLP ενδοκοιλιακή περιτονίτιδα.

Οι TLRs έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με δυσλειτουργία διαφόρων οργάνων σηπτικής αιτιολογίας, όπως το έντερο, τον πνεύμονα, τους νεφρούς και το ήπαρ³⁸². Η ανάλυση της έκφρασης των TLRs 2, 3, 4 και 7 στους εντερικούς ιστούς σηπτικών υποομάδων μυών, σε αντίθεση με ό,τι βρέθηκε για τους μάρτυρες, έδειξε προοδευτικά στατιστικώς σημαντική αύξηση σε κάθε έκφραση TLR από το χρονικό διάστημα των 24 ωρών έως των 72 ωρών ευθανασίας. Η σύγκριση των ομάδων ελέγχου με εκείνες των σηπτικών μυών ισοδύναμων χρονικών διαστημάτων παρήγαγε στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τον κάθε TLR σε κάθε διαφορετικό χρόνο ευθανασίας. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η έκφραση των TLRs 2, 3, 4 και 7 επηρεάζεται από την εξέλιξη της σηψαιμίας. Ο μηχανισμός που διέπει τα υψηλά επίπεδα TLRs εξαρτάται από τη σοβαρότητα της σήψης.

Η έκφραση των TLRs 2, 3, 4 και 7 βρέθηκε επίσης αυξημένη στους νεφρούς των σηπτικών μυών, ενώ ήταν αμελητέα στο νεφρικό ιστό των ομάδων ελέγχου. Αυτά τα αποτελέσματα είχαν στατιστική σημαντικότητα για κάθε μεμονωμένο TLR υποδοχέα μεταξύ ομάδων ισοδύναμου χρονικού διαστήματος (S24 έναντι C24, S48 έναντι C48, S72 έναντι C72) σε ανάλυση qRT-PCR. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν επίσης ότι η επίδραση δυνητικών βακτηρίων, που απελευθερώνονται από ένα τραυματισμένο έντερο, μπορεί να πυροδοτήσει φλεγμονώδη απόκριση μέσω των TLRs 2, 3, 4 και 7 και σε απομακρυσμένα όργανα πέραν του εντέρου, όπως είναι οι νεφροί. Η καταστροφή Gram-αρνητικών βακτηριδίων έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση λιποπολυσακχαριτών (LPS) στην κυκλοφορία του αίματος, όπου συνδέεται με την LPS-δεσμευτική πρωτεΐνη (LBP). Το σύμπλεγμα LPS-LBP θα μπορούσε να συνδεθεί με μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα³⁸³ μέσω του συν-υποδοχέα CD 14 και να αλληλεπιδράσει με τη σειρά του με την κυτταρική επιφάνεια του συμπλέγματος TLR 4 / MD -2. Τελικά, το καινούριο σύμπλεγμα συνδέεται μεταξύ άλλων και με νεφρικά σωληνωτά επιθηλιακά κύτταρα³⁸⁴, τα οποία στη συνέχεια διεγείρονται ώστε να παράγουν κυτοκίνες μέσω ενός γονιδίου

εξαρτώμενου από τον πρωτογενή μυελοειδή παράγοντα διαφοροποίησης 88 (MyD88) και μίας MyD88 ανεξάρτητης οδού³⁸⁵. Η σηπτική ΟΝΑ έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται κυρίως από το MyD88b³⁸⁶.

Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα σηπτικό μοντέλο CLP για να εξεταστεί η εξέλιξη της σηψαιμίας, καθώς παραμένει το πιο αξιόπιστο ζωικό μοντέλο αναπαράστασης της ανθρώπινης σηψαιμίας³⁸⁷. Διάφοροι βιοδείκτες οργανικής ανεπάρκειας αναλύθηκαν για να εξετασθεί η επίδραση της ενεργοποίησης και της έκφρασης των TLRs στη σήψη και την προοδευτική επαγωγή του συνδρόμου πολυοργανικής ανεπάρκειας (MODS).

Ένα άλλο εύρημα είναι ότι η συγκέντρωση NGAL στον ορό ήταν παρόμοια με τους άλλους βιοδείκτες ορού, όπως επίσης και η IL-18 ως φλεγμονώδης βιοδείκτης. Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει το γεγονός ότι η συστηματική φλεγμονή ανταποκρίνεται στα υψηλά επίπεδα της NGAL. Προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν ότι η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με λιποκαλίνη ζελατινάσης ουδετεροφύλων (NGAL) είναι ένας πολύ ευαίσθητος δείκτης της ΟΝΑ και παράγεται από τραυματισμένα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα^{388, 389}. Μεταβολή των επιπέδων της NGAL στον ορό ασθενών με ΟΝΑ, προσδιορίζει την παθολογία οργάνων^{390,391}. Συνολικά από τη μελέτη μας, δείξαμε ότι η στόχευση των επιπέδων NGAL παρέχει πληροφορίες για τη νεφρική βλάβη κατά τη διάρκεια της σήψης και σχετίζεται με το φλεγμονώδες στρες που ενισχύεται από την παρουσία της IL-18, όντας ένας κρίσιμος μεσολαβητής της σηψαιμίας.

Υπάρχουν δύο φάσεις ανοσολογικών αποκρίσεων δευτερογενών στη λοίμωξη, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεση της σηψαιμίας^{392, 393}. Αμφότερες εμφανίζονται σε ένα μοντέλο CLP: η συστηματική φλεγμονώδης απόκριση (SIRS) και η αντισταθμιστική αντιφλεγμονώδης απάντηση (CARS). Πρωτεΐνες οξείας φάσης (CRP, προκαλσιτονίνη), καθώς και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18) είναι κοινοί βιοδείκτες για το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) και αυξάνουν σημαντικά κατά την πρώιμη έναρξη της σηψαιμίας^{394, 395}. Τα υψηλότερα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών είναι γνωστά ως «καταιγίδα κυτοκίνης» και οδηγούν σε δυσλειτουργία ενός ή πολλαπλών οργάνων. Η υπερέκφραση αυτών των δεικτών είναι το αρχικό παθοφυσιολογικό

φαινόμενο στη σηπτική απόκριση^{396,397}. Η δεύτερη φάση της ανοσοαπόκρισης διαμεσολαβείται από την έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-4, IL-10). Μια μέτρια αύξηση αυτών των κυτοκινών στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να διαδραματίσει προστατευτικό ρόλο κατά της οργανικής δυσλειτουργίας και συνεπώς να προωθήσει μια αντιμικροβιακή ανοσοαπόκριση³⁹⁸. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η μελέτη και η μέτρηση όλων των μεσολαβητών που συμμετέχουν σε αυτό τον καταρράκτη. Ένα προφίλ κυτοκίνης ορού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της σοβαρότητας της νόσου.

Επιπλέον, οι τρέχουσες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο πιθανός ρόλος της IL-18 είναι πολυπαραγοντικός, συμπεριλαμβανομένης της αύξησής της σε σηπτικούς μύες κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η ιντερλευκίνη 18 (IL-18) είναι μια σημαντική προφλεγμονώδης κυτοκίνη που βρίσκεται στα εντερικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος³⁹⁹. Η κυκλοφορούσα IL-18 αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σήψης και συσχετίζεται έντονα με τη σοβαρότητα της νόσου⁴⁰⁰. Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματά μας ενισχύουν τις προηγούμενες μελέτες. Παρατηρήθηκε αύξηση της κυκλοφορούσας IL-18 σε αυτό το CLP μοντέλο σε όλα τα πειραματικά χρονικά διαστήματα στις σηπτικές ομάδες, υποδεικνύοντας επίπτωση στην οργανική ανεπάρκεια και ενισχύοντας τη θεωρία ότι τα υψηλά επίπεδα IL-18 είναι επιβλαβή στη σηψαιμία. Ειδικότερα, η IL-18 αυξήθηκε δραματικά στις υποομάδες S24 και S48, που αντιπροσωπεύουν την εμφάνιση της καταιγίδας κυτοκίνης στο πρώιμο στάδιο της σήψης.

Επιπρόσθετα, βιοχημικοί δείκτες συσχετίζονται με τις μεταβολές στα επίπεδα της IL-18 κατά τη διάρκεια της σήψης. Η νεφρική λειτουργία παρακολουθείται κυρίως με την κρεατινίνη ορού (Cr) και δευτερευόντως την ουρία (Ur), τα επίπεδα των οποίων μαζί με την παραγωγή ούρων και άλλους δείκτες ορίζουν την ONA⁴⁰¹. Αναλύσαμε τις διαφορές στην έκφραση τόσο της κρεατινίνης όσο και της ουρίας σε σηπτικούς και μάρτυρες μύες σε όλα τα χρονικά διαστήματα ευθανασίας (24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες). Αυτοί οι δύο δείκτες ήταν σε φυσιολογικά και αμετάβλητα επίπεδα στις ομάδες ελέγχου. Από την άλλη πλευρά, υπήρξε μια σταθερή και σημαντική αύξηση μεταξύ των σηπτικών υποομάδων καθώς ο χρόνος ευθανασίας

ήταν μεγαλύτερος, γεγονός που οδήγησε επίσης σε σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρονικά αντιστοιχών υποομάδων ελέγχου και σηπτικών. Στα αποτελέσματά μας επισημάνθηκε ένα παρόμοιο μοτίβο μεταβολών έκφρασης τόσο για την ολική όσο και για την άμεση χολερυθρίνη, υποδεικνύοντας πιθανή δυσλειτουργία άλλων οργάνων όπως το ήπαρ ή ο πνεύμονας⁴⁰².

Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί έντεκα ανθρώπινοι και δεκατρείς TLRs μυών. Αυτές οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα και προκαλούν ανοσοαποκρίσεις και φλεγμονώδεις καταρράκτες αντιδράσεων⁴⁰³. Δεν αναγνωρίζουν όλοι οι TLRs τους ίδιους στόχους. Αναλυτικότερα, ο TLR 2 αναγνωρίζει τα gram(+) βακτήρια, ο TLR 4 αποκρίνεται στα gram(-) βακτήρια, ενώ οι TLRs 3 και 7 ανιχνεύουν τους ιούς⁴⁰⁴. Οι TLRs 1, 2, 4 και 6 εκφράζονται σε διάμεσα και σπειραματικά μακροφάγα. Τα σωληνωτά κύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα εκφράζουν τις ίδιες πρωτεΐνες με τις ανωτέρω αλλά με προσθήκη του TLR 3, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα εντός του νεφρού εκφράζουν TLR 4, 7, 8 και 9⁴⁰⁵. Η αύξηση ορισμένων TLRs στη σηπτική ONA, όπως φαίνεται και σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία, μπορεί να υποδηλώνει τη συμμετοχή τους σε αυτή την παθολογία^{406,407}.

Ένα από τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι η σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του TLR 7 στους νεφρικούς ιστούς όλων των σηπτικών υποομάδων σε σύγκριση με τους μάρτυρες και η στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των σηπτικών υποομάδων καθώς ο χρόνος ευθανασίας παρατείνεται, για κάθε σύγκριση σε PCR ανάλυση. Ο ρόλος του TLR 7 στην παθογένεση της σηψαιμίας δεν έχει τεκμηριωθεί, ωστόσο, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι περισσότερες μελέτες θα πρέπει να απευθύνονται προς αυτή την κατεύθυνση, με τον TLR 7 να είναι ένας από τους λιγότερο μελετημένους TLRs στη νεφρική βλάβη που προκαλείται από σηψαιμία.

Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι οι TLRs εμπλέκονται στην έναρξη του σηπτικού καταρράκτη και τα επίπεδά τους φαίνεται να σχετίζονται με τη σοβαρότητα της σηψαιμίας και την εξέλιξή της σε δυσλειτουργία οργάνου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παθοφυσιολογία της σήψης και οι μηχανισμοί/μονοπάτια αντίδρασης του οργανισμού στο σηπτικό ερέθισμα, τόσο στο πάσχον όργανο όσο και σε απομακρυσμένους ιστούς, αποτελεί ένα τεράστιο κεφάλαιο προς διερεύνηση. Οι δύο φάσεις ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στη λοίμωξη, συστηματική φλεγμονώδης απόκριση (SIRS) και αντισταθμιστική αντιφλεγμονώδης απάντηση (CARS), αποτέλεσαν καινοτομία στην κατανόηση της σήψης. Η μέτρηση βιοχημικών και ανοσολογικών βιοδεικτών, καθώς και η ταυτοποίηση και μελέτη της έκφρασης των TLRs συνέβαλλαν στη χαρτογράφηση της εξέλιξης της σήψης και της αντίδρασης/άμυνας του οργανισμού σε μοριακό επίπεδο.

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των βιοχημικών και ανοσολογικών δεικτών αυξάνεται σταδιακά στις σηπτικές υποομάδες μυών του πειραματικού μας μοντέλου με την πάροδο του χρόνου, πιστοποιώντας τα στάδια της σηπτικής αντίδρασης, πρώιμα με την αύξηση της IL-18 (καταιγίδα κυτοκίνης) και όψιμα με την αύξηση των NGAL, ουρίας και κρεατινίνης (προοδευτική νεφρική βλάβη). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι TLRs 2, 3, 4 και 7 έχουν ένα ρόλο στην παθογένεση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ONA) που προκαλείται από σηψαιμία. Μετά την πρόκληση περιτονίτιδας με απολίνωση του τυφλού και τρώσης με βελόνη (CLP πειραματικό μοντέλο σε μυσ) παρατηρήθηκε αύξηση των TLRs τόσο σε εντερικούς ιστούς (τοπικά) όσο και σε απομακρυσμένα όργανα, όπως είναι ο νεφρός. Συγκεκριμένα, ο TLR 3 αυξάνεται περισσότερο στους νεφρικούς ιστούς στις 24 και 48 ώρες από την εγκατάσταση της σήψης, ενώ στις 72 ώρες εκφράζεται περισσότερο στους εντερικούς ιστούς. Αντίθετα, οι TLR 2 και 4 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αύξηση στους νεφρικούς ιστούς σε όλα τα χρονικά διαστήματα του σηπτικού μοντέλου. Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του TLR 7 στους νεφρικούς ιστούς όλων των σηπτικών υποομάδων σε σύγκριση με τους μάρτυρες και στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των σηπτικών υποομάδων καθώς ο χρόνος ευθανασίας παρατείνεται.

Παρατηρήθηκε λοιπόν, η πρώιμη ενεργοποίηση των TLRs και η συμβολή τους στην παθογένεση της ONA καθώς και στην προοδευτική εγκατάσταση του

συνδρόμου πολυοργανικής ανεπάρκειας. Θα πρέπει ωστόσο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για να χαρτογραφηθούν οι ακριβείς οδοί ανάπτυξης σήψης και ο ρόλος των TLRs σε αυτές. Ειδικότερα, ο ρόλος του TLR 7 στην παθογένεση της σηψαιμίας δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη, ωστόσο, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι περισσότερες μελέτες θα πρέπει να απευθύνονται προς αυτή την κατεύθυνση, με τον TLR 7 να είναι ένας από τους λιγότερο μελετημένους TLRs στη νεφρική βλάβη που προκαλείται από σηψαιμία.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποτελέσουν ελπιδοφόρους στόχους στη θεραπεία της σήψης και εξέλιξής της. Η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών αναγνώρισης του παθογόνου μικροοργανισμού, του μηχανισμού μεταγωγής των ερεθισμάτων καθώς και των αντιδράσεων του οργανισμού σε μοριακό επίπεδο, και ειδικότερα της συμμετοχής και δράσης των TLRs στα ανωτέρω μονοπάτια, θα μπορούσε να συμβάλλει στην κατανόηση της παθογένειας της σήψης και να θέσει τα θεμέλια για την ανακάλυψη μελλοντικών θεραπευτικών μέσων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis”. *Intensive Care Med.* 2006; 32:2077.
- 2 Johnson GB, Brunn GJ, Samstein B, Platt JL. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. *Surgery.* 2005; 137:393–5.
- 3 Gul F, Arslantas MK, Cinel I, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. *Turk J Anaesthesiol Reanim.* 2017 Jun; 45(3):129-138.
- 4 Thomas L. *Germs.* *N Engl J Med.* 1972; 287:553–555.
- 5 Konrad Reinhart, Michael Bauer, Niels C. Riedemann and Christiane S. Hartoga. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct; 25(4): 609–634.
- 6 Bone RC, 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; 101:1644–1655.
- 7 Rittirsch D, Flierl M, Ward P. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008 Oct; 8(10):776-787.
- 8 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348:1546–54.
- 9 Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007) *Chest.* 2011; 140:1223–31
- 10 Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12:919–24.
- 11 Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. *JAMA.* 2014; 311:1308–16.
- 12 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303–1310.
- 13 Strehlow MC, Emond SD, Shapiro NI, Pelletier AJ, Camargo CA Jr. National study of emergency department visits for sepsis 1992 to 2001. *Ann Emerg Med.* 2006 Sep; 48(3):326-31, 331.
- 14 Sands KE, Bates DW, Lanke PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL Jr, Platt R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA.* 1997 Jul 16;278(3):234-40.
- 15 Jawad I, Lukšić I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health* 2012; 2:4.
- 16 Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: The Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2014; 2:380–6.
- 17 Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12:216–20.
- 18 Seymour CW, Rea TD, Kahn JM, et al. Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:1264–71.
- 19 Rol ML, Venet F, Rimmele T, Moucadel V, et al. REALISM study group. The REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) project: a protocol for broad characterisation and follow-up of injury induced immunosuppression in intensive care unit (ICU) critically ill patients. *BMJ Open.* 2017 Jun 21; 7(6):e015734.

-
- 20 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315:801.
- 21 Lin Zou, Yan Feng, Yan Li, Ming Zhang, Chan Chen, Jiayan Cai, Yu Gong, Larry Wang, Joshua M. Thurman, Xiaobo Wu, John P. Atkinson and Wei Chao. Complement Factor B is the Downstream Effector of Toll-Like Receptors and Plays an Important Role in a Mouse Model of Severe Sepsis, *J Immunol.* 2013 Dec 1;191(11):5625-35.
- 22 Angus DC, van der Poll T, et al. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369:840–51.
- 23 Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 2015; 15:581–614.
- 24 Bone RC, 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; 101:1644–1655.
- 25 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:862–74.
- 26 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348:1546–54.
- 27 Kent Doi, Asada Leelahavanichkul, Peter S.T. Yuen, Robert A. Star. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury, *The journal of clinical investigation*, volume 119, number 10, October 2009
- 28 Dellinger RP, Schorr CA, Levy MM. A users' guide to the 2016 Surviving Sepsis Guidelines. *Intensive Care Med.* 2017; 43:299–303.
- 29 Levy M.M., et al. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31:1250–1256.
- 30 Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010; 38:367–74.
- 31 Rhodes A, Evans L, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for the management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017; 43:304–77.
- 32 Hotchkiss RS, Guillaume M, Didier P. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13:260–8.
- 33 Angus DC, Opal S. Immunosuppression and Secondary Infection in Sepsis Part, Not All, of the Story. *JAMA.* 2016; 315:1457–9.
- 34 Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol Rev.* 2013; 93:1247–88.
- 35 Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101:1644–55.
- 36 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20:864–874.
- 37 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; 31:1250–6.
- 38 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. Septic Shock (Sepsis-3) *JAMA.* 2016; 315:801–10.

-
- 39 Remick D. G. Pathophysiology of sepsis. *American Journal of Pathology*. 2007;170(5):1435–1444.
- 40 Rittirsch D, Flierl M, Ward P. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008 October; 8(10): 776–787.
- 41 Angus DC, van der Poll T (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369: 2063.
- 42 Sood B. G., Shankaran S., Schelonka R. L., et al. Cytokine profiles of preterm neonates with fungal and bacterial sepsis. *Pediatric Research*. 2012; 72(2):212–220.
- 43 Polin R. A., Papile L.-A., Baley J. E., et al. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics*. 2012; 129(5):1006–1015.
- 44 Reinhart K., Bauer M., Riedemann N. C., Hartog C. S. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25(4):609–634.
- 45 Remick D. G. Pathophysiology of sepsis. *American Journal of Pathology*. 2007; 170(5):1435–1444.
- 46 Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013 Oct 8; 4:289.
- 47 Zhu L, Shi D. Early diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2016 Aug;28(8):718-22.
- 48 Eidt MV, Nunes FB, Pedrazza L, et al. Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: The predictive role of IL-18 in mortality. *Clin Chim Acta*. 2016 Jan 30; 453:100-6.
- 49 Hotchkiss R. S., Karl I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348(2):138–150.
- 50 Prashant A., Vishwanath P., Kulkarni P., et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. *PLoS ONE*. 2013;8(7).
- 51 Reis Machado J., Soave D. F., Da Silva M. V., et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators of Inflammation*. 2014; 2014:10.
- 52 Bhandari V. Effective biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis. *Journal of the Paediatric Infectious Diseases Society*. 2014; 3(3):234–245.
- 53 Washburn KK, Zappitelli M, et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(2):566-72.
- 54 Stoll B. J. The global impact of neonatal infection. *Clinics in Perinatology*. 1997; 24(1):1–21.
- 55 Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., 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. 1992. *Chest*. 2009; 136(5, supplement):p. e28.
- 56 Goldstein B., Giroir B., Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in paediatrics. *Paediatric Critical Care Medicine*. 2005; 6(1):2–8.
- 57 Astiz M. E., Rackow E. C. Septic shock. *The Lancet*. 1998;351(9114):1501–1505.
- 58 Rangel-Frausto M. S., Pittet D., Costigan M., Hwang T., Davis C. S., Wenzel R. P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *Journal of the American Medical Association*. 1995; 273(2):117–123.
- 59 Wenzel R. P. Treating sepsis. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 347(13):966–967.
- 60 Celes M. R. N., Prado C. M., Rossi M. A. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology*. 2012; 80(2):70–86.
- 61 Bayston K. F., Cohen J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *Journal of Medical Microbiology*. 1990; 31(2):73–83.

- 62 Bone R. C., Grodzin C. J., Balk R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997; 112(1):235–243.
- 63 Kumar A., Krieger A., Symeoneides S., Parrillo J. E. Myocardial dysfunction in septic shock: part II. Role of cytokines and nitric oxide. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2001; 15(4):485–511.
- 64 Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420(6917):885–891.
- 65 Gentile L. F., Nacionales D. C., Lopez M. C., et al. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. *The Journal of Immunology*. 2014; 192(7):3156–3165.
- 66 Balk R. Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. *Contributions to Microbiology*. 2011; 17:1–11.
- 67 Buck C., Bundschu J., Gallati H., Bartmann P., Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Paediatrics*. 1994; 93(1):54–58.
- 68 Meadow W., Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis: rarely has so little been known by so many about so much. *Clinics in Perinatology*. 1995; 22(2):519–536.
- 69 Panero A., Pacifico L., Rossi N., Mancuso G., Stegagno M., Chiesa C. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. *Paediatric Infectious Disease Journal*. 1997; 16(4):370–375.
- 70 Ng P. C., Lam H. S. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clinics in Perinatology*. 2010; 37(3):599–610.
- 71 de Jong H. K., van der Poll T., Wiersinga W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *Journal of Innate Immunity*. 2010; 2(5):422–430.
- 72 Aikawa N. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. *Nippon Geka Gakkai zasshi*. 1996; 97(9):771–777.
- 73 Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420(6917):885–891.
- 74 Junger W. G., Hoyt D. B., Liu F. C., Loomis W. H., Coimbra R. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *Journal of Trauma: Injury Infection & Critical Care*. 1996; 40(5):702–708.
- 75 Schulte W., Bernhagen J., Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013:16.
- 76 E.A. Miao, I.A. Leaf, P.M. Treuting, D.P. Mao, M. Dors, A. Sarkar, S.E. Warren, M.D. Wewers, A. Adere m. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11 (12) (December 2010), pp. 1136-1142.
- 77 S. Herold, S.T. Tannaz, J. Hermann, H. Katrin, C. Maciej, L.S. Peter, I. Jens, D. Frank, V.Z. Istvan, S. Werner, S. Mirko, L. Juergen. Exudate macrophages attenuate lung injury by release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 183 (2011), pp. 1380-1390.
- 78 V.B. Tom, D. Dieter, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 189 (3) (February 2014), pp. 282-291.
- 79 Eidt MV, Nunes FB, Pedrazza L, Caeran G, Pellegrin G, Melo DA, Possuelo L, Jost RT, Dias HB, Donadio MV, Oliveira JR. Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: The predictive role of IL-18 in mortality. *Clin Chim Acta*. 2016 Jan 30; 453:100-6.
- 80 Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* (1995) 63:3966–72.
- 81 Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw* (2006) 17(4):224–52.
- 82 Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol* (2007) 27(1):98–114.

-
- 83 Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy* (2012) 4(12):1883–94.
- 84 Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis and secretion of IL-1 β and IL-18 are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96:2256–61.
- 85 Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* (2001) 167(11):6568–75.
- 86 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Ann Rev Immunol* (2001) 19:423–74.
- 87 Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* (2010) 3(105).
- 88 Morel JC, Park CC, Woods JM, Koch AE. A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NFkappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem* (2001) 276(40):37069–75.
- 89 Lee JK, Kim SH, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. Differences in signaling pathways by IL-1 β and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(23):8815–20.
- 90 Charles A, Dinarello, Daniela Novick et al. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol*. 2013; 4: 289.
- 91 Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes AM, Anasagasti MJ, Martin J, et al. IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(2):734–9.
- 92 Mazodier K, Marin V, Novick D, Farnarier C, Robitail S, Schleinitz N, et al. Severe imbalance of IL-18/IL-18BP in patients with secondary hemophagocytic syndrome. *Blood* (2005) 106(10):3483–9.
- 93 Gatti S, Beck J, Fantuzzi G, Bartfai T, Dinarello CA. Effect of interleukin-18 on mouse core body temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2002) 282(3):R702–9.
- 94 Li S, Goorha S, Ballou LR, Blatteis CM. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1 β and IL-18: pyrogenic and PGE $_2$ -mediated? *Brain Res* (2003) 992(1):76–84.
- 95 Reznikov LL, Kim SH, Westcott JY, Frishman J, Fantuzzi G, Novick D, et al. IL-18 binding protein increases spontaneous and IL-1-induced prostaglandin production via inhibition of IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(5):2174–9.
- 96 Tak PP, Bacchi M, Bertolino M. Pharmacokinetics of IL-18 binding protein in healthy volunteers and subjects with rheumatoid arthritis or plaque psoriasis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetics* (2006) 31(2):109–16.
- 97 Joosten LA, van De Loo FA, Lubberts E, Helsen MM, Netea MG, van der Meer JW, et al. An IFN- γ -independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol* (2000) 165(11):6553–8.
- 98 Carrascal MT, Mendoza L, Valcarcel M, Salado C, Egilegor E, Telleria N, et al. Interleukin-18 binding protein reduces b16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium. *Cancer Res* (2003) 63(2):491–7.
- 99 Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov L, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* (1999) 10:127–36.
- 100 Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97:1190–5.

-
- 101 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* (2001) 12(1):53–72.
- 102 Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum il-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine* (2001) 14(6):334–42.
- 103 Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99(21):13723–8.
- 104 Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D, Blumberg H, O’Neill L, et al. IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol* (2010) 11(11):973.
- 105 McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(40):16711–6.
- 106 Banda NK, Vondracek A, Kraus D, Dinarello CA, Kim SH, Bendele A, et al. Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J Immunol* (2003) 170(4):2100–5.
- 107 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348:138–150.
- 108 Cohen J, Opal S, Calandra T. Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12:503–505.
- 109 Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA*. 2011; 306:2614–2615.
- 110 van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998; 351:950–953.
- 111 Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of pro-inflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995; 85:1341–1347.
- 112 Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991; 88:1747–1754.
- 113 Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*. 2003; 19:113–116.
- 114 Sinistro A, Almerighi C, Ciaprini C, et al. Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:1851–1858.
- 115 Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery*. 2000; 127:309–315.
- 116 Barochia AV, Cui X, Vitberg D, et al. Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. *Crit Care Med*. 2010; 38:668–678.
- 117 Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med*. 2008; 14:64–78.
- 118 Torgersen C, Moser P, Luckner G, et al. Macroscopic post-mortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*. 2009; 108:1841–1847.
- 119 Fink MP, Evans TW. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a round table conference held in Brussels. *Intensive Care Med*. 2002; 28:369–375.
- 120 Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007; 35:2408–2416.
- 121 Kethireddy S, Kumar A. Mortality due to septic shock following early, appropriate antibiotic therapy: can we do better? *Crit Care Med*. 2012; 40:2228–2229.

-
- 122 Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*. 2011; 15:R183.
- 123 Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34:15–21.
- 124 Reber AJ, Chirkova T, Kim JH, et al. Immunosenescence and challenges of vaccination against influenza in the aging population. *Aging Dis*. 2012; 3:68–90.
- 125 Reinharta K, Bauera M, Riedemanna NC, Hartoga CS. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev*. October 2012 vol. 25 no. 4 609-6341.
- 126 Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med*. 1996; 24:1125–1128.
- 127 Kollef KE, et al. Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Chest* 2008; 134:281–287.
- 128 Limaye AP, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 2008; 300:413–422.
- 129 Otto GP, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care* 2011; 15: R183.
- 130 Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to ‘immunoparalysis’. *Chem. Immunol*. 2000; 74:162–177.
- 131 Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000; 96:218–223.
- 132 Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med*. 2009; 15:496–497.
- 133 Boomer JS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306:2594–2605.
- 134 Hotchkiss RS, Opal. Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *N. Engl. J. Med*. 2010; 363:87–89.
- 135 Bone RC, 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; 101:1644–1655.
- 136 Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296:301–305.
- 137 Zhang Q, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464:104–107.
- 138 Dalton WS, Friend SH. Cancer biomarkers—an invitation to the table. *Science* 2006; 312:1165–1168.
- 139 Atkinson AJ, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2001; 69:89–95.
- 140 Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit. Care Med*. 2009; 37:2290–2298.
- 141 Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit. Care Med*. 2009; 37:2290–2298.
- 142 Kumar V, Cotran RS, Robbins SL(ed). *Robbins basic pathology*, 7th ed. Saunders, Philadelphia, PA. 2003.
- 143 Majno G, Joris I. *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY. 2004.
- 144 Karzai W, Meisner M, Reinhart K. New approaches to the diagnosis of sepsis. *Curr. Opin. Crit. Care* 1999; 5:357–362.
- 145 Marshall JC, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit. Care Med*. 2003; 31:1560–1567.

-
- 146 Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care* 2010; 14:R15.
- 147 Otto GP, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care* 2011; 15:R183.
- 148 Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 2003; 9:517–524.
- 149 Kent Doi, Asada Leelahavanichkul, Peter S.T. Yuen, and Robert A. Star, Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury, *The Journal of Clinical Investigation*, *J. Clin. Invest.* 2009; 119:2868–2878.
- 150 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29:189–201.
- 151 Kent Doi, Asada Leelahavanichkul, Peter S.T. Yuen, and Robert A. Star, Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury, *The Journal of Clinical Investigation*, *J. Clin. Invest.* 2009; 119:2868–2878.
- 152 Cainzos M., García García M., González Rodríguez F, Intra-abdominal infections, internet course on surgical research
- 153 Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005; 24(Suppl 1): 52–57.
- 154 Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin* 2009; 25: 703–719.
- 155 Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM, Efron PA. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? *ILAR J.* 2017:1–16.
- 156 Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci.* 2017; 24: 60.
- 157 Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 2011; 19:198–208.
- 158 Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005; 24(Suppl 1):52–57.
- 159 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189–201.
- 160 Ruiz S, Vardon-Bounes F, Merlet-Dupuy V, Conil J-M, Buleon M, Fourcade O, et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med Exp.* 2016; 4:22.
- 161 Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun.* 1999; 67:6603–6610.
- 162 Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci.* 2017; 24: 60.
- 163 Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E., and Nusslein-Volhard, C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 1991; 65:725–735.
- 164 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973–983.
- 165 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397.
- 166 Hansson GK, Edfeldt K. “Toll to be paid at the gateway to the vessel wall” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25 (6): 1085–7.
- 167 <http://www.aerzteblatt.de/archiv/55316/>
- 168 Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. “Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution”. *Eur. Cytokine Netw. Sep* 2000; 11 (3): 362–71.

-
- 169 Chuang TH, Ulevitch RJ. "Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR 7, hTLR 8 and hTLR 9". *Eur. Cytokine Netw.* Sep 2000; 11 (3): 372–8.
- 170 Tabeta K, Georgel P, Janssen E; Georgel; Janssen; Du; Hoebe; Crozat; Mudd; Shamel; Sovath; Goode; Alexopoulou; Flavell; Beutler et al. "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Mar 2004; 101 (10): 3516–21.
- 171 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol* 2010; 11(5), 373-384.
- 172 Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, and Osamu Takeuchi. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* Feb 2006; 124, 783–801.
- 173 Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:588–593.
- 174 Kobe B and Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 1995; 374:183–186.
- 175 Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L., and Tong, L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2000; 408: 111–115.
- 176 Carpenter S1, O'Neill LA. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol.* 2007 Aug; 9(8):1891-901.
- 177 Knapp S. Update on the role of Toll-like receptors during bacterial infections and sepsis. *Wien Med Wochenschr.* 2010 Mar; 160(5-6):107-11.
- 178 Janeway, C.A., Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13: 11–16.
- 179 Theodoros Eleftheriadis, Georgios Pissas, Vassilios Liakopoulos, Ioannis Stefanidis and Brian R. Lawson Toll-Like Receptors and their Role in Renal Pathologies Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2012, 11, 464-477.
- 180 Akira S and Takeda K., Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499–511, 2004.
- 181 Sang Hoon Rhee. Basic and Translational Understandings of Microbial Recognition by Toll-Like Receptors in the Intestine. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011; Vol. 17 No. 1.
- 182 Takeda K1, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015 Apr 1; 109:14.12.1-14.12.10.
- 183 Akira, S., and K. Takeda. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 499–511.
- 184 Alex G. Cuenca, Dallas N. Joiner et al. Gram-Negative Sepsis Is Critical for Survival to Neonatal TRIF-Dependent Innate Immune Activation. *J Immunol* 2015; 194:1169-1177.
- 185 Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007 Feb; 19 (1):24-32.
- 186 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling, *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(5):979-87.
- 187 Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17(4):338-44.
- 188 Theodoros Eleftheriadis, Georgios Pissas, Vassilios Liakopoulos, Ioannis Stefanidis and Brian R. Lawson Toll-Like Receptors and their Role in Renal Pathologies Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2012; 11, 464-477.
- 189 G. M. Barton and R. Medzhitov, "Toll-like receptor signaling pathways," *Science.* 2003; vol. 300, no. 5625, pp. 1524–1525.
- 190 Patricia G Valles, Andrea Gil Lorenzo, et al. Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play? *Int Nephrol Renovasc Dis.* 2014; 7: 241-251.
- 191 Akira, S., K. Takeda. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 499-511.
- 192 Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-122.

-
- 193 Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signalling. *J. Immunol.* 2002; 169: 6668-6672.
- 194 Covert, M. W., T. H. Leung, J. E. Gaston, D. Baltimore. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation. *Science* 2005; 309: 1854-1857.
- 195 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24; 124(4):783-801.
- 196 Chang M, Jin W, Sun SC. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol.* 2009 Oct; 10(10):1089-95.
- 197 Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol.* 2011 Dec 9; 12(1):35-48.
- 198 Takumi Kawasaki, Taro Kawai. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2014; 5:461.
- 199 Khor, C.C., Chapman, S.J., Vannberg, F.O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E.Y., et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007; 39: 523–528.
- 200 Yuji Motoi Takuma Shibata Koichiro Takahashi Atsuo Kanno Yusuke Murakami Xiaobing Li Tadashi Kasahara Kensuke Miyake. Lipopeptides are signaled by Toll-like receptor 1, 2 and 6 in endolysosomes. *International Immunology*, Oct 2014; Volume 26, Issue 10, Pages 563–573.
- 201 Jimenez-Dalmaroni M. J., Xiao N., Corper A. L., Verdino P., Ainge G. D., Larsen D. S., Painter G. F., Rudd P. M., Dwek R. A., Hoebe K., Beutler B., Wilson I. A. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS ONE* 2009; 4(10):e7411.
- 202 Triantafilou M, Gamper FG, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem.* Oct 2006;281(41):31002-11.
- 203 Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol.* 2012; 3: 79.
- 204 Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol.* 2007 Aug-Sep; 85(6):411-9.
- 205 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732–738.
- 206 Wang L, Smith D, Bot S, Dellamary L, Bloom A, Bot A: Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. *J Clin Invest* 2002; 110: 1175–1184.
- 207 Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not pro-inflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* 2007; 44:3100–3111.
- 208 Flandin, J.F., F. Chano, and A. Descoteaux. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:411–420.
- 209 Yaping Sun, Pavan Reddy. CH 18-Intracellular sensors of immunity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* 2013; p425-447.
- 210 Doughty, L.A., S. Carlton, B. Galen, I. Cooma-Ramberan, C.S. Chung, and A. Ayala. Activation of common antiviral pathways can potentiate inflammatory responses to septic shock. *Shock.* 2006; 26:187–194.

- 211 Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 554–561.
- 212 Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T: Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002; 169: 2026–2033.
- 213 Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling Danger: Toll-Like Receptors and their Potential Roles in Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 854–867.
- 214 Paulus P, Rupperecht K. The Early Activation of Toll-Like Receptor (TLR)-3 Initiates Kidney Injury after Ischaemia and Reperfusion. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94366.
- 215 Cavassani K, Ishii M, Wen H et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *JEM*, 2008; 205 (11):2609.
- 216 MacDowell KS, Munarriz-Cuevza E et al. Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2017; 116:196-207.
- 217 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397.
- 218 Shoham, S., Huang, C., Chen, J.M., Golenbock, D.T., and Levitz, S.M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166: 4620–4626.
- 219 Netea, M.G., Van der Graaf, C., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 672–676.
- 220 Perera, P.Y., Mayadas, T.N., Takeuchi, O., Akira, S., Zaks-Zilberman, M., Goyert, S.M., and Vogel, S.N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 2001; 166: 574–581.
- 221 Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1: 398–401.
- 222 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg St, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* 2004; Volume 118, Issue 2, pages 229-241.
- 223 Bell Elaine. TLR4 signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2008; Volume 8, page 241.
- 224 Xuefen Lin et al. Effect of TLR4/MyD88 Signaling Pathway on Expression of IL-1 and TNF- in Synovial Fibroblasts from Temporomandibular Joint Exposed to Lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation* 2015; ID 329405, 11 pages.
- 225 Strassheim, D. et al. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *J. Immunol*. 2004. 172, 5727–5733.
- 226 I. Zanoni, R. Ostuni, L. R. Marek et al., “CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4,” *Cell*. 2011; vol. 147, no. 4, pp. 868–880.
- 227 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol*. 2010. 11, 373–384.
- 228 Weishan Fang, Decheng Bi, Ruijin Zheng, et al. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Scientific Reports* 2017; volume 7, article number 1663.
- 229 R. Rajaiah, D. J. Perkins, D. D. C. Ireland, and S. N. Vogel, “CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin

- tolerance," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015; vol. 112, no. 27, pp. 8391–8396.
- 230 Monica Molteni, et al. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2016; ID 6978936, 9 pages.
- 231 Yesudhas D. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol* 2014; 5:334.
- 232 Niranjana B. Butchi, Min Du, Karin E. Peterson. Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia*. 2010; 58(6):650-664.
- 233 Lewis SD, Butchi NB, Khaleduzzaman M, Morgan TW, Du M, Pourciau S, Baker DG, Akira S, Peterson KE. Toll-like receptor 7 is not necessary for retroviral neuropathogenesis but does contribute to virus-induced neuroinflammation. *J Neurovirol*. 2008 Nov; 14(6):492-502.
- 234 Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3: 196–200.
- 235 Berghöfer B, Haley G, Frommer T, Bein G, Hackstein H. Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN- α production. *J Immunol*. 2007 Apr 1; 178(7):4072-9.
- 236 Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526–1529.
- 237 Honda K et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005; 434:772-777.
- 238 Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007; 13(11):460-9.
- 239 Takumi Kawasaki, Taro Kawai. Toll-like receptor signalling pathways. *Front Immunol*. 2014; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- 240 Uchino S., Kellum J.A., Bellomo R., Doig G.S., Morimatsu H., Morgera S., Schetz M., Tan I., Bouman C., Macedo E., et al. Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005; 294:813–818.
- 241 Joannidis M., Metnitz B., Bauer P., Schusterschitz N., Moreno R., Druml W., Metnitz P.G.H. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med*. 2009; 35:1692–1702.
- 242 Hoste E.A.J., Bagshaw S.M., Bellomo R., Cely C.M., Colman R., Cruz D.N., Edipidis K., Forni L.G., Gomersall C.D., Govil D., et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: The multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015; 41:1411–1423.
- 243 Uchino S., Kellum J.A., Bellomo R., Doig G.S., Morimatsu H., Morgera S., Schetz M., Tan I., Bouman C., Macedo E., et al. Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005; 294:813–818.
- 244 Wald R., McArthur E., Adhikari N.K.J., Bagshaw S.M., Burns K.E.A., Garg A.X., Harel Z., Kitchlu A., Mazer C.D., Nash D.M., et al. Changing incidence and outcomes following dialysis-requiring acute kidney injury among critically ill adults: A population-based cohort study. *Am. J. Kidney Dis*. 2015; 65:870–877.
- 245 Stads S., Fortrie G., van Bommel J., Zietse R., Betjes M.G.H. Impaired kidney function at hospital discharge and long-term renal and overall survival in patients who received CRRT. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2013; 8:1284–1291.
- 246 Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int*. 2004; 66:1613–1621.

-
- 247 Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, et al. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study. *Crit Care Med.* 2009; 37:2552–2558.
- 248 Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol.* 2011; 7:209–217.
- 249 Ishani A., Xue J.L., Himmelfarb J., Eggers P.W., Kimmel P.L., Molitoris B.A., Collins A.J. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20:223–228.
- 250 Christian Nussbag, Markus A. Weigand, Martin Zeier, Christian Morath and Thorsten Brenner. Issues of Acute Kidney Injury Staging and Management in Sepsis and Critical Illness: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): 1387.
- 251 Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.-D., Coopersmith C.M., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) *JAMA.* 2016; 315:801–810.
- 252 Kellum J.A., Lameire N. KDIGO AKI Guideline Work Group Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: A KDIGO summary (Part 1) *Crit. Care.* 2013; 17:204.
- 253 Kellum JA, Mehta RL, Angus DC, Palevsky P, Ronco C, Workgroup A. The first international consensus conference on continuous renal replacement therapy. *Kidney Int.* 2002; 62:1855–1863.
- 254 Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007; 11:R31.
- 255 Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2012;120:c179–c184.
- 256 Grootendorst DC, Michels WM, Richardson JD, Jager KJ, Boeschoten EW, Dekker FW, et al. The MDRD formula does not reflect GFR in ESRD patients. *Nephrol Dialysis Transplant.* 2011; 26:1932–1937.
- 257 Pickering JW, Ralib AM, Endre ZH. Combining creatinine and volume kinetics identifies missed cases of acute kidney injury following cardiac arrest. *Crit Care.* 2013; 17:R7.
- 258 Prowle JR, Kolic I, Purdell-Lewis J, Taylor R, Pearse RM, Kirwan CJ. Serum creatinine changes associated with critical illness and detection of persistent renal dysfunction after AKI. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014; 9:1015–1023.
- 259 Bosch JP, et al. Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *The American journal of medicine.* 1983; 75:943–950.
- 260 Lassnigg A, et al. Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2004; 15:1597–1605.
- 261 Christensen EI, Verroust PJ. Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis. *Kidney international.* 2008; 74:1233–1236.
- 262 Supavekin S, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney international.* 2003; 63:1714–1724.
- 263 Mori K, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005; 115:610–621.
- 264 Nickolas TL, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med.* 2008; 148:810–819.
- 265 Bennett M, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:665–673.
- 266 Mori K, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005; 115:610–621.

- 267 Mishra J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:2534–2543.
- 268 Mori K, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005; 115:610–621.
- 269 Mishra J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:2534–2543.
- 270 Barasch J, Mori K. Cell biology: iron thievery. *Nature*. 2004; 432:811–813.
- 271 Neal Paragas, Andong Qiu, Qingyin Zhang, Benjamin Samstein, Shi-Xian Deng, Kai M. Schmidt-Ott, Melanie Viltard, Wenqiang Yu, Catherine S. Forster, Gangli Gong, Yidong Liu, Ritwij Kulkarni, Kiyoshi Mori, Avtandil Kalandadze, Adam J. Ratner, Prasad Devarajan, Donald W. Landry, Vivette D’Agati, Chyuan-Sheng Lin and Jonathan Barasch. The Ngal Reporter Mouse Detects the Response of the Kidney to Injury in Real Time. *Nat Med*. 2011; 17(2):216-222.
- 272 de Geus HR, Betjes MG, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J*. 2012; 5:102–108.
- 273 Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993; 268:10425–10432.
- 274 Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:2534–2543.
- 275 Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005; 365:1231–1238.
- 276 Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, Syed H, Ali S, Barasch J, Devarajan P. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3:665–673.
- 277 Pickering JW, Endre ZH. Acute kidney injury urinary biomarker time-courses. *PLoS One*. 2014; 9:e101288.
- 278 Mohamud Egal, Hilde R.H. de Geus and A.B. Johan Groeneveld. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Diagnostic Marker for Acute Kidney Injury in Oliguric Critically Ill Patients: A Post-Hoc Analysis. *Nephron Clin Pract*. 2016 Oct; 134(2): 81–88.
- 279 Legrand M, Jacquemod A, Gayat E, Collet C, Giraudeau V, Launay JM, Payen D. Failure of renal biomarkers to predict worsening renal function in high-risk patients presenting with oliguria. *Intensive Care Med*. 2015; 41:68–76.
- 280 Pickering JW, Endre ZH. Acute kidney injury urinary biomarker time-courses. *PLoS One*. 2014; 9:e101288.
- 281 Egal M, de Geus HR, Groeneveld AB. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Diagnostic Marker for Acute Kidney Injury in Oliguric Critically Ill Patients: A Post-Hoc Analysis. *Nephron*. 2016;134(2):81-88.
- 282 Glassford NJ, Eastwood GM, Young H, Peck L, Schneider AG, Bellomo R. Rationalizing the use of NGAL in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184:142.
- 283 AM-Pharma. PPD: A Safety, Tolerability, Efficacy and QoL Study of Human recAP in the Treatment of Patients with SA-AKI (STOP-AKI) Bethesda: National Library of Medicine (US); 2015.
- 284 Waikar SS, Betensky RA, Emerson SC, Bonventre JV. Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23:13–21.

-
- 285 Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, Krawczeski CD, Koyner JL, Murray P, Zappitelli M, Goldstein SL, Makris K, Ronco C, Martensson J, Martling CR, Venge P, Siew E, Ware LB, Ikizler TA, Mertens PR. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57:1752–1761.
- 286 Waikar SS, Betensky RA, Emerson SC, Bonventre JV. Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23:13–21.
- 287 Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, Krawczeski CD, Koyner JL, Murray P, Zappitelli M, Goldstein SL, Makris K, Ronco C, Martensson J, Martling CR, Venge P, Siew E, Ware LB, Ikizler TA, Mertens PR. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57:1752–1761.
- 288 Egal M, de Geus HR, Groeneveld AB. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Diagnostic Marker for Acute Kidney Injury in Oliguric Critically Ill Patients: A Post-Hoc Analysis. *Nephron*. 2016;134(2):81-88.
- 289 Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Oct;16(10):3046-52.
- 290 Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2007 Jul;33(7):1285-1296.
- 291 Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):170-5.
- 292 Zhu L, Shi D. Early diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2016 Aug;28(8):718-22.
- 293 Chen LX, Koyner JL. Biomarkers in Acute Kidney Injury. *Crit Care Clin*. 2015 Oct;31(4):633-48.
- 294 Sun RQ, Zhang SL. The value of serum interleukin-18 and 10 in the evaluation of severity and prognosis in the early stage of sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2011 May; 23(5):299-301.
- 295 Chawla LS, Abell L, Mazhari R, Egan M, Kadambi N, Burke HB, et al. Identifying critically ill patients at high risk for developing acute renal failure: a pilot study. *Kidney Int*. 2005; 68:2274–2280.
- 296 Langenberg C, Wan L, Egi M, et al. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int*. 2006; 69:1996–2002.
- 297 Bezemer R, Legrand M, Klijn E, et al. Real-time assessment of renal cortical microvascular perfusion heterogeneities using near-infrared laser speckle imaging. *Opt Express*. 2010; 18:15054–15061.
- 298 Prowle JR, Ishikawa K, May CN, Bellomo R. Renal blood flow during acute renal failure in man. *Blood Purif*. 2009; 28:216–225.
- 299 Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al. Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Investigators Acute kidney injury in nonsevere pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010; 77:527–535.
- 300 Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999; 27:1230–1251.
- 301 Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187:509–517.
- 302 De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:98–104.

-
- 303 Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, et al. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet*. 2002; 360:1395–1396.
- 304 Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. *Am J Pathol*. 2012; 180:505–516.
- 305 Seely KA, Holthoff JH, Burns ST, et al. Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301:F209–F217.
- 306 Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004; 364:545–548.
- 307 Zafrani L, Payen D, Azoulay E, Ince C. The microcirculation of the septic kidney. *Semin Nephrol*. 2015; 35:75–84.
- 308 Bezemer R, Legrand M, Klijn E, et al. Real-time assessment of renal cortical microvascular perfusion heterogeneities using near-infrared laser speckle imaging. *Opt Express*. 2010; 18:15054–15061.
- 309 Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*. 2004; 351:159–169.
- 310 Ergin B., Kapucu A., Demirci-Tansel C., Ince C. The renal microcirculation in sepsis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2015; 30:169–177.
- 311 Bellomo R., Kellum J.A., Ronco C., Wald R., Mårtensson J., Maiden M., Bagshaw S.M., Glassford N.J., Lankadeva Y., Vaara S.T., et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*. 2017:1–13.
- 312 Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 462:210–219.
- 313 Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multiorgan failure. *Virulence*. 2014; 5:66–72.
- 314 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.
- 315 Vanhorebeek I, Gunst J, Derde S, et al. Mitochondrial fusion, fission, and biogenesis in prolonged critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97:E59–E64.
- 316 Waltz P, Carchman EH, Young AC, et al. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy*. 2011; 7:315–320.
- 317 Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823:2297–2310.
- 318 Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, et al. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy*. 2012; 8:1462–1476.
- 319 Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011; 333:1109–1112.
- 320 Gunst J, Derese I, Aertgeerts A, et al. Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Crit Care Med*. 2013; 41:182–194.
- 321 Howell GM, Gomez H, Collage RD, et al. Augmenting autophagy to treat acute kidney injury during endotoxemia in mice. *PLoS One*. 2013; 8:e69520.
- 322 Hsiao H-W, Tsai K-L, Wang L-F, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock*. 2012; 37:289–296.

-
- 323 MacGarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, et al. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185:851–861.
- 324 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008; 451:1069–1075.
- 325 Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005; 115:2679–2688.
- 326 Ciechomska IA, Goemans CG, Tolkovsky AM. Molecular links between autophagy and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2008; 445:175–193.
- 327 Carchman EH, Rao J, Loughran PA, et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology*. 2011; 53:2053–2062.
- 328 Hernando Gomez and John A. Kellum. Sepsis-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2016; 22(6):546-553.
- 329 Lameire N, Vanholder R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(Suppl 17): S20–S32.
- 330 Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):428–435.
- 331 Okusa MD. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* 2002; 90: 133–138.
- 332 Daha MR, van Kooten C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(Suppl 6):41–43.
- 333 Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*. 2002;169(4):2026–2033.
- 334 Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2007;178(10):6252–6258.
- 335 Shirali AC, Goldstein DR. Tracking the toll of kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(8):1444–1450.
- 336 Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS. Minireview: functions of the renal tract epithelium in coordinating the innate immune response to infection. *Kidney Int*. 2004; 66(4):1334–1344.
- 337 El-Achkar TM, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher PC. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290(5): F1034–F1043.
- 338 El-Achkar TM, Dagher PC. Renal Toll-like receptors: recent advances and implications for disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2(10):568–581.
- 339 Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2894–2903.
- 340 Good DW, George T, Watts BA., 3rd Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(4):F866–F874.
- 341 Good DW, George T, Watts BA., 3rd Toll-like receptor 2 mediates inhibition of HCO₃⁽⁻⁾ absorption by bacterial lipoprotein in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(3):F536–F544.
- 342 Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res*. 2005;84(7):584–595.

- 343 Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 5197–5203.
- 344 Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van't Veer C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002; 168: 1286–1293.
- 345 Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002; 169: 2026–2033.
- 346 Carlos G. Leon, Rita Tory, Jessica Jia, Olena Sivak and Kishor M. Discovery and Development of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists: A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases, Wasan Pharmaceutical Research. Aug 2008; Vol. 25, No. 8.
- 347 Theodoros Eleftheriadis, Georgios Pissas, Vassilios Liakopoulos¹, Ioannis Stefanidis¹ and Brian R. Lawson. Toll-Like Receptors and their Role in Renal Pathologies Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2012, 11, 464-477.
- 348 Singer, M., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): p. 801-10.
- 349 Angus, D.C. and T. van der Poll. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369(21): p. 2063.
- 350 Dellinger, R.P., et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*, 2008; 34(1): p. 17-60.
- 351 Gotts, J.E. and M.A. Matthay, Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016; 353: p.i1585.
- 352 Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(10): p. 776-87.
- 353 Zanotti-Cavazzoni, S.L. and R.D. Goldfarb. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin*. 2009; 25(4): p. 703-19, vii-viii.
- 354 Toscano, M.G., D. Ganea, and A.M. Gamero. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp*. 2011; (51).
- 355 Poli-de-Figueiredo, L.F., et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008; 30 Suppl 1: p. 53-9.
- 356 Takeda, K. and S. Akira. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*. 2015; 109: p. 14 12 1-10.
- 357 Kawai, T. and S. Akira. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5): p. 373-84.
- 358 Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4): p. 783-801.
- 359 Cook, D.N., D.S. Pisetsky, and D.A. Schwartz. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. 2004; 5(10): p. 975-9.
- 360 Zarbock, A., H. Gomez, and J.A. Kellum. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care*. 2014; 20(6): p. 588-95.
- 361 Stasi, A., et al. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2017; 32(1): p. 24-31.
- 362 Gomez, H., 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(1): p. 3-11.
- 363 Okusa, M.D. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron*. 2002; 90(2): p.133-8.

- 364 Tsuboi, N., et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol.* 2002; 169(4): p. 2026-33.
- 365 Zarbock, A., H. Gomez, and J.A. Kellum. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care.* 2014; 20(6): p. 588-95.
- 366 Wolfs, T.G., et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol.* 2002; 168(3): p. 1286-93.
- 367 Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan; 81(1):137-43
- 368 Aravanis CV, et al. Toll-Like Receptors -2, -3, -4 and -7 Expression Patterns in the Liver of a CLP-Induced Sepsis Mouse Model. *J Invest Surg.* 2018 May; 30:1-9
- 369 Daniel Rittirsch, Markus S Huber-Lang, Mickael A Flierl and Peter Ward. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009; 4(1): 31-36.
Doi:10.1038/nprot.2008.214
- 370 Rickesha L. Wilson, Vaithinathan Selvaraju et al. Thioredoxin-1 attenuates sepsis-induced cardiomyopathy after cecal ligation and puncture in mice. *J Surg Res* 2017 Dec; 220:68-78.
- 371 John E. Bulter. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Journal of Immunoassay.* 14 Apr 2008; Pages 165-209.
- 372 Aravanis CV, Kapelouzou A, et al. Toll-Like Receptors -2, -3, -4 and -7 Expression Patterns in the Liver of a CLP-Induced Sepsis Mouse Model. *J Invest Surg.* 2018 May; 30:1-9.
- 373 Aravanis CV, Kapelouzou A, et al. Toll-Like Receptors -2, -3, -4 and -7 Expression Patterns in the Liver of a CLP-Induced Sepsis Mouse Model. *J Invest Surg.* 2018 May; 30:1-9.
- 374 Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014; 1180:31-43.
- 375 Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):209-19.
- 376 Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993 Sep; 15(3):532-4,536-7.
- 377 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101-8.
- 378 Eleftheriadis T, Pissas G, et al. Toll-like receptors and their role in renal pathologies. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012; 11, 464-477.
- 379 Haase M., et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57, 1752-1761.
- 380 Aravanis CV, et al. Toll-Like Receptors -2, -3, -4 and -7 Expression Patterns in the Liver of a CLP-Induced Sepsis Mouse Model. *J Invest Surg.* 2018 May; 30:1-9.
- 381 Bakopoulos A, et al., Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the lungs of an experimental sepsis mouse model. *PLoS One*, 2017; 12(11): p. e0188050.
- 382 Williams D.L., et al. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med.* 2003; 31(6): p. 1808-18.
- 383 Triantafilou M. & Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23, 301-304.
- 384 Chowdhury P, Sacks SH & Sheerin NS. Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products. *Clin Exp Immunol.* 2006; 145, 346-356.
- 385 Lopez-Bojorquez LN, Dehesa AZ & Reyes-Teran G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch Med Res* 2004; 35, 465-479.

-
- 386 Dear JW, et al. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. *Kidney Int* 2006; 69, 832-836.
- 387 Zanotti-Cavazzoni SL, RD Goldfarb. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin.* 2009; 25(4): p. 703-19.
- 388 Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al. The NGAL reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med.* 2011 Feb; 17(2):216-22.
- 389 Karaolani G, et al. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker. Does It Apply in Abdominal Aortic Aneurysms? A Review of Literature. *The Indian journal of surgery* 2015; 77,1313-1317.
- 390 Liu Q, Nilsen-Hamilton M. Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem.* 1995 Sep 22; 270(38):22565-70.
- 391 Karaolani G, et al. Urine NGAL as a biomarker of kidney damage after on- and off pump coronary artery bypass graft surgery: a prospective pilot study. *Hellenic journal of cardiology: HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 2015; 56, 160-168.
- 392 Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007; 170(5): p.1435-44.
- 393 Hotchkiss RS, IE Karl. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348(2): p. 138-50.
- 394 Moris DN, et al. Concept of the aortic aneurysm repair-related surgical stress: a review of the literature. *International journal of clinical and experimental medicine* 2014; 7,2402-2412.
- 395 Moris D, Schizas D, Liakakos T. Regarding "Prospective evaluation of postimplantation syndrome evolution on patient outcomes after endovascular aneurysm repair for abdominal aortic aneurysm". *Journal of vascular surgery* 2016; 64,1193-1194.
- 396 Beutler B, A Poltorak. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med.* 2001; 29(7 Suppl): p. S2-6; discussion S6-7.
- 397 Chousterman BG, FK Swirski, GF Weber. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017; 39(5): p. 517-528.
- 398 Zhao HQ, et al. The growing spectrum of anti-inflammatory interleukins and their potential roles in the development of sepsis. *J Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(4): p. 242-51.
- 399 Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Dec; 70(24):4795-808.
- 400 Endo S, Inada K, Yamada Y, Wakabayashi G, Ishikura H, Tanaka T, Sato S. Interleukin 18 (IL-18) levels in patients with sepsis. *J Med.* 2000; 31(1-2):15-20.
- 401 Kashani K, W Cheungpasitporn, C Ronco. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med.* 2017; 55(8): p. 1074-1089.
- 402 Zhai R, et al. Serum bilirubin levels on ICU admission are associated with ARDS development and mortality in sepsis. *Thorax.* 2009; 64(9): p. 784-90.
- 403 Takeda K, S Akira. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015; 109: p. 14 12 1-10.
- 404 Ostuni R, I Zanoni, F Granucci. Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(24): p. 4109-34.
- 405 Anders HJ, B Banas, D Schlondorff. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(4): p. 854-67.
- 406 Zarbock A, H Gomez, JA Kellum. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care.* 2014; 20(6): p. 588-95.
- 407 Morrell ED, et al. Septic acute kidney injury: molecular mechanisms and the importance of stratification and targeting therapy. *Crit Care* 2014; 18(5): p.501. q