

Διαχρονικές μεταβολές φλεγμονώδους αντίδρασης ενδογενούς ανοσίας, βιοενέργειας και μεταβολισμού σε παιδιά με σοβαρή σήψη

Άννα-Μαρία Σπανάκη, Θεονύμφη Ταβλαδάκη, Ελένη Δημητρίου, Ενώγγελος Μπλευράκης, Α. V. Kozlov, J. C. Duvigneau, S. Dumitrescu, A. Weidinger, Γεώργιος Μπριασούλης

Περίληψη

Εισαγωγή: Το κυτταρικό στρες από σοβαρή σήψη (severe sepsis, SS) ή Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) εκδηλώνεται με οξείες φλεγμονώδεις ορμονικές ανοσολογικές και μεταβολικές διαταραχές. Η συσχέτισή τους με πιθανή δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων δεν έχει επαρκώς μελετηθεί. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση των διαχρονικών μεταβολών φλεγμονώδους-ορμονικής αντίδρασης ενδογενούς-ανοσίας, βιοενέργειας και μεταβολισμού σε παιδιά με σοβαρή σήψη και η σύγκριση με παιδιά με SIRS καθώς και υγιή παιδιά-controls (H).

Υλικά/Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 62 παιδιά (SS/15, SIRS/20, H/27) στην 1, 3 και 5 ημέρα της νοσηλείας τους. Υπολογίστηκαν τα scores δείκτη μάζας σώματος (Body mass index (BMI) z-scores) και βαρύτητας νόσου (PeLOD, APACHE, SOFA). **Μετρήθηκαν:** καρδιακή συσταλτικότητα (EF, SF), τροπονίνη (Tn), γαλακτικό και η κατανάλωση ενέργειας (Energy expenditure, EE) με Gas Module E-COVX, ATP στα λευκά αιμοσφαίρια με τη δοκιμασία λουσιφεράσης (luciferase luminescent assay). Επίσης μετρήθηκαν τα επίπεδα γλουταμίνης και NO₂/NO₃ με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), τα προϊόντα υπεροξειδωσής λιπιδίων (TBARS) με χρωματομετρική δοκιμασία, resistin, Antipropetctin ορού, οι εξωκυττάρια Heat Shock Proteins (HSP) με την ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), καθώς και οι ενδοκυττάρια HSP72, HSP90α με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry).

Αποτελέσματα: Οι ασθενείς με SS και αυξημένους δείκτες βαρύτητας νόσου είχαν χαμηλότερα SF, EF, EE, αλβουμίνη, γλουταμίνη, ATP, TBARS και υψηλότερα γαλακτικό, resistin, NO₂ σε σύγκριση με τους ασθενείς με SIRS και τα υγιή παιδιά. Οι μεταβολές διατηρήθηκαν την 3η και μετριάσθηκαν την 5η ημέρα (p<0.05), συνοδεύονταν από καταστολή της ενδοκυττάριας έκφρασης των HSP72, HSP90α με αύξηση της εξωκυττάριας HSP72 (p<0.05) και σχετίζονταν με τη θνητότητα (p<0.05).

Συμπέρασμα: Η SS χαρακτηρίζεται από διαχρονικά ισχυρότερη ενδοκυττάρια καταστολή ATP, HPS72, HSP90α μεταβολισμού (κατανάλωση ενέργειας αλβουμίνη, γλουταμίνη), εξωκυττάρια διέγερση φλεγμονωδών ορμονών (resistin) και πρωτεϊνών έμφυτης ανοσίας που σηματοδοτούν οξύ στρες και κίνδυνο (HSP72) σε σύγκριση με το SIRS.

Λέξεις κλειδιά: σήψη, SIRS, βιοενέργεια, μιτοχόνδρια, μεταβολισμός

Άλληλογραφία

Άννα-Μαρία Σπανάκη
Κυρά της Ρω 10, 71307
Κηπούπολη, Ηράκλειο
Κρήτης
Τ. 6944962133
e-mail: spanakam@yahoo.gr

Άννα-Μαρία Σπανάκη
Θεονύμφη Ταβλαδάκη
Ενώγγελος Μπλευράκης
Γεώργιος Μπριασούλης
Μονάδα Εντατικής
Θεραπείας Παιδών, Πανε-
πιστημιακό Νοσοκομείο,
Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο
Κρήτης

Ελένη Δημητρίου
Εργαστήριο Παιδιατρικής
Αιματολογίας Ογκολογίας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο
Κρήτης

A. V. Kozlov
S. Dumitrescu
A. Weidinger
Ludwig Boltzmann Institute
for Experimental and Clinical
Traumatology in the
AUVU, Vienna, Austria

J. C. Duvigneau
University of Veterinary
Medicine, Vienna, Austria

Correspondence

Anna-Maria Spanaki
 Kyra tis Ro 10, 71307
 Kipoupoli, Hraklio Crete
 T. +306944962133
 e-mail: spanakam@yahoo.
 gr

Longitudinal changes of inflammatory-hormonal response innate-immunity bioenergetics and metabolism in critically ill children with severe sepsis

A.M. Spanaki, T. Tavladaki, H. Dimitriou, E. Blevrakis, A.V. Kozlov, J.C. Duwigneau, S. Dumitrescu, A. Weidinger, G. Briassoulis

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

Objectives: To examine the longitudinal inflammatory, hormonal, immune, bioenergy and metabolic changes in children with SS; to compare with those of children with SIRS or healthy controls (H). Methods: Blood samples obtained from 62 children (SS/15; SIRS/20; H/27) on days 1, 3 and 5. Body mass index (BMI) z-scores, PeLOD, APACHE, SOFA scores were calculated. Lactate, Tn, EF and SF were measured. Energy expenditure (EE) was determined by the Gas Module E-COVX, ATP-levels in white blood cells by luciferase luminescent assay, plasma glutamine and NO₂/NO₃ by HPLC; lipid peroxidation products (TBARS) by a colorimetric test. Intracellular Heat Shock Proteins (HSP72, HSP90α) expressions by flow cytometry; serum HSP72, adiponectin and resistin by ELISA.

Results: SS patients with increased severity of illness had lower SF, EF, EE, albumin, glutamine, ATP, TBARS and higher levels of lactate, resistin, NO₂ compared to patients with SIRS, SIRS and H (p<0.05). Changes were persisted through day 3 and were ameliorated by day 5. Longitudinal changes were associated with intracellular repression of HSP72, HSP90α and increased levels of extracellular HSP72 (p<0.05) and were related to mortality (p<0.05). Non-survivors were hypometabolic, with lower EF, SF and higher PRISM, PeLOD, resistin, Tn (p<0.05). Plasma glutamine increased after trauma (p<0.04).

Conclusion: SS is characterized from longitudinally stronger intracellular repression of ATP, HSP72, HSP90α, metabolism (EE, albumin, glutamine) and extracellular induction of inflammatory hormones (resistin) and innate immunity proteins signaling acute stress danger (HSP72) compared to SIRS.

Key words: sepsis, SIRS, bioenergy, HSP, resistin, metabolism

Εισαγωγή

Η σήψη αποτελεί την κύρια αιτία παιδικής νοσηρότητας και θνητότητας παγκόσμια, αφορά περίπου στο 80% των παιδιών σε όλο τον κόσμο. Η ενδονοσοκομειακή θνητότητα σε παιδιά με σήψη υπολογίζεται >10% (1). Μόνο στις ΗΠΑ 72000 παιδιά νοσηλεύονται με σήψη ετησίως, με αναφερόμενη θνητότητα 25% και οικονομικό κόστος που υπολογίζεται στο \$4.8 Δις (2).

Στη σοβαρή σήψη (severe sepsis/septic shock, SS) η θνητότητα σχετίζεται με την κυτταρική βλάβη και την ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας (Multiple Organ System Failure, MOSF) (3). Το Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Απάντησης (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) που σχετίζεται με το τραύμα μπορεί επίσης να προκαλέσει σοβαρή κυτταρική βλάβη και MOSF οδηγώντας στον θάνατο (4). Μέχρι σήμερα, ο συνδυαστικός ρόλος της φλεγμονώδους ορμονικής και έμφυτης ανοσιακής απόκρισης με τις διαχρονικές μεταβολές της βιοενέργειας και τις μεταβολικές διαταραχές σε μιτοχονδριακό επίπεδο και στις δυο ομάδες υψηλού κινδύνου ασθενών δεν έχει συστηματικά μελετηθεί (5) (6).

A. M. Spanaki
 T. Tavladaki
 E. Blevrakis
 G. Briassoulis
 PICU, University of
 Crete/University Hospital,
 Heraklion, Greece

H. Dimitriou
 Paediatric Haematology
 Oncology, University of
 Crete, Medical School,
 Heraklion, Greece

A.V. Kozlov
 S. Dumitrescu
 A. Weidinger
 Ludwig Boltzmann
 Institute for Experimental
 and Clinical Traumatol-
 ogy in the AUVA, Vienna,
 Austria

J.C. Duwigneau
 University of Veterinary
 Medicine, Vienna, Austria

Μεταξύ των πρωτεϊνών του στρες (Heat Shock Proteins, HSPs) η τοσαπερόνη HSP72 έχει δειχθεί να ασκεί προστατευτική αντιφλεγμονώδη δράση μετά από έκθεση σε ενδοτοξίνη, υπερπυρεξία και σήψη σε κυτταρικούς πληθυσμούς και ζωικά μοντέλα σήψης (7). Η HSP90α, η αφθονότερη ενδοκυττάριος πρωτεΐνη, ασκεί μια παρόμοια δράση τοσαπερόνης εξασφαλίζοντας τη σωστή δομή των πρωτεϊνών και τη μεταφορά ενδοκυττάρων σημάτων (8). Οι HSP72, HSP90α, σε καταστάσεις στρες, εξέρχονται από τα κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο διεγείρουν την προ και αντι-φλεγμονώδη διαδικασία (9) και σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου, την οργανική ανεπάρκεια και τη θνητότητα (10).

Παράλληλα με την ενδογενή ανοσία που χαρακτηριστικά εκφράζεται με τις HSPs, το ενδοκρινικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απάντηση στο στρες. Εντούτοις, οι ορμόνες που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό, οι αντιποκίνες, με εξαίρεση τη λεπτίνη (11) δεν έχουν μελετηθεί στη σήψη. Οι αντιποκίνες ρυθμίζουν τον μεταβολισμό και έχουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό σύστημα (12). Συγκεκριμένες αντιποκίνες, όπως η resistin, προέρχονται από ανοσοκύτταρα και μεταβολές των επιπέδων που πιθανώς σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απάντηση (13). Έχει επίσης περιγραφεί ότι η adiponectin σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου και τον βαθμό φλεγμονώδους απάντησης, για καμία όμως από αυτές δεν υπάρχουν μελέτες με διαχρονικές μετρήσεις στη σοβαρή νόσο (14).

Στις μέρες μας υποστηρίζεται η άποψη ότι σε βαριά νόσο το οξειδωτικό στρες, μέσω κυτοκινών, οδηγεί σε καταστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, ενεργειακή δυσλειτουργία κυττάρων και οργάνων, διαταραχή μεταβολισμού, βιοενεργειακή ανεπάρκεια και τελικά επιφέρει την πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο (15) (6). Η μεταβολική απάντηση των βαρέως πασχόντων παιδιών χαρακτηρίζεται από οξεία διαταραχή του μεταβολισμού και της κατανάλωσης ενέργειας και πολυεπίπεδη διαταραχή του μεταβολισμού (16) (17). Από την American Society for Parenteral and Enteral Nutrition προτείνεται η ακριβής μέτρηση κατανάλωσης ενέργειας (Energy Expenditure, EE) με έμμεση θερμιδομετρία σε κάθε διασωληνωμένο ασθενή με ενδεχόμενη διαταραχή μεταβολισμού ή υποθρεψία (18).

Ο μεταβολισμός των αμινοξέων σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, κατά την τελευταία δεκαετία, αποτελεί θέμα εκτεταμένης έρευνας στους ενήλικες (19) (20), ενώ δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι ακριβείς απαιτήσεις αμινοξέων στις διάφορες φάσεις του στρες, στη σήψη στα παιδιά (15). Ιδιαίτερα η γλουταμίνη σε καταστάσεις στρες απελευθερώνεται από τους μυς σε μεγάλες ποσότητες ώστε να παράσχει ζωτική ενεργειακή πηγή σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα ανοσοκύτταρα και κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και να αποτελέσει την κύρια πηγή σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος, νιτρικού οξέος (nitric oxide, NO), και του αντιοξειδωτικού γλουταθειόνη (21). Οι ευεργετικές ανοσο-ενισχυτικές επιδράσεις της γλουταμίνης που έχουν δειχθεί και σε ζωικά μοντέλα σήψης, ασκούνται μέσω της διέγερσης των HSPs (22), δεν έχουν όμως μέχρι σήμερα επιβεβαιωθεί σε κλινικές μελέτες σε παιδιά και βρέφη με σήψη (23). Πρόσφατη παιδιατρική μελέτη της επίδρασης της γλουταμίνης στο οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονώδη απάντηση σε σοβαρά άρρωστα παιδιά, έδειξε ότι η προσθήκη της διεγείρει τα επίπεδα HSP72, χωρίς να επηρεάζει τις ιντερλευκίνες 6 και 10 (24) (10).

Σκοπός της προοπτικής αυτής εργασίας ήταν να μελετηθούν οι διαχρονικές μεταβολές της βιοενέργειας, της ενδογενούς ανοσίας μέσω των HSPs, μεταβολισμού, της φλεγμονώδους ορμονικής αντίδρασης, resistin και adiponectin, καθώς και της οργανικής δυσλειτουργίας στην οξεία φάση σοβαρής σήψης (SS) και SIRS σε παιδιά σε μηχανικό αερισμό και να συγκριθούν με ομάδα υγιών παιδιών.

Υλικό και μέθοδοι

Ασθενείς

Συνολικά, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν (12/2012-2014) 68 παιδιά (≤ 18 ετών), μετά από έγγραφη συναίνεση των γονιών τους (έγκριση Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου). Από αυτά 23 νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ Παίδων με διάγνωση SIRS, λόγω σοβαρής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης και 18 με SS (λοίμωξη, κριτήρια SIRS και υπόταση). Από τη μελέτη

αποκλείστηκαν ασθενείς με όψιμη σήψη ή SIRS (>48-hours), αυτοάνοσο νόσημα, κακοήθεια, ανοσοανεπάρκεια, μεταβολικό ή χρόνιο νόσημα. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν εντός των πρώτων 24 ωρών από την εισαγωγή τους. Η ομάδα ελέγχου ήταν 27 υγιή παιδιά, που προσήλθαν για προεγχειρητικό έλεγχο.

Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης HSP72 στο πλάσμα αίματος προσδιορίστηκαν με την ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), με συσκευασίες του εμπορίου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [Enzo Life Sciences-Lausen, Switzerland]. Ειδικότερα, ποσότητα γνωστής συγκέντρωσης (standards) της προς προσδιορισμό τσαπερόνης και ορός του κάθε δείγματος προστέθηκαν σε προαριθμημένα βοθρία και επώασαν υπό ανάδευση. Τα βοθρία ήταν προ-επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για HSP72 και τα δείγματα είχαν αραιωθεί 1:1. Μετά την έκπλυση για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων ουσιών προστέθηκε το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα και μετά από επώαση και πλύση, προστέθηκε το διάλυμα ραφανδικής υπεροξειδάσης. Ακολούθησε πάλι πλύση για την απομάκρυνση οποιουδήποτε μη ειδικά συνδεδεμένου αντιδραστήριου και προστέθηκε το διάλυμα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναλόγου χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της HSP72 σε κάθε δείγμα. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε στα 450nm σε φωτόμετρο ειδικό για μικροπλάκα. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν εις διπλούν. Οι ευαισθησίες των ανιχνεύσεων ήταν 90pg/mL για την Hsp72.

Τα επίπεδα ορού adiponectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και resistin (R&D Systems, Abingdon UK) επίσης αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα αραιώθηκαν 1:2000 για την adiponectin και 1:5 για resistin. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε στα 450nm. Οι ευαισθησίες των προσδιορισμών ήταν 100pg / mL για την adiponectin και 0,026ng/mL για την resistin.

Κυτταρομετρία ροής

Ολικό αίμα επωάστηκε με μονοκλωνικά αντισώματα CD33-PeCy5 (phycoerythrin-Cy5) και CD45-PeCy7 (phycoerythrin-Cy7). Τα κύτταρα στη συνέχεια σταθεροποιήθηκαν (Fixation Buffer, Biolegend) και επωάστηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα Hsp70/Hsp72-FITC (Fluorescein Isothiocyanate, Enzo), and Hsp90a-PE phycoerythrin (Enzo Life Sciences, NY, USA). IgG isotype controls χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ασθενή. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε EPICS Coulter (CYTOMICS FC500) κυτταρομετρητή. Τα κύτταρα αρχικά απομονώθηκαν σύμφωνα με την έκφραση CD45. Η MFI των Hsp70 και Hsp90 υπολογίστηκε σε μονοκύτταρα (m) και πολυμορφοπύρρηνα (n) κύτταρα σε διάγραμμα διασποράς του συνδυασμού CD33 με το αντίστοιχο αντίτοχο.

Μέτρηση NO_x, επιπέδων ATP (βιοενέργεια), δεικτών οξειδωτικού στρες (oxidative stress marker) (TBARS) και γλουταμίνης.

Τα δείγματα πλάσματος για τη μέτρηση βιοενέργειας αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι την ανάλυση και μεταφέρονταν σε υγρό άζωτο. Για τον προσδιορισμό των παραγώγων μονοξειδίου του αζώτου (NO_x) στον ορό (νιτρικά, νιτρώδη, S- Νιτροδοθειόλες (RSNOs) χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Sievers Nitric Oxide Analyzer. Για τον προσδιορισμό της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) τα κύτταρα του αίματος αναμιγνύονταν με αντιδραστήριο 100uL ATP assay (Promega-CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Austria) και μετά από επώαση μετρίονταν η φωταύγεια με φωτόμετρο. Τα Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) προσδιορίστηκαν σύμφωνα τους Kozlov et al (25). Για τον προσδιορισμό της γλουταμίνης χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναλυτής (Hitachi AminoacidanalyzerL 8900) όπου το δείγμα εξετάστηκε υπό συνεχή ροή σε στήλη ανταλλαγής κατιόντων υψηλής ανάλυσης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος και σε συνθήκες διαβάθμισης θερμοκρασίας. Στο έκπλυμά της προστέθηκε νινυδρίνη και διεξήχθη αντίδραση στους 135°C.

Μέτρηση κατανάλωσης ενέργειας (Energy Expenditure, EE)

Υπολογίστηκε με έμμεση θερμιδομετρία, χρησιμοποιώντας το μόνιτορ εκτίμησης μεταβολικού προφίλ E-COVX (GE Healthcare/Datex-Ohmeda 2000) (5). Η συσκευή διαθέτει ένα γρήγορο παραμαγνητικό αναλυτή O₂ και CO₂ και πνευμοταχογράφο συνδεδεμένο που μετρά εισπνεόμενους και εκπνεόμενους όγκους. Το μηχάνημα χρησιμοποιεί τον τύπο Weir για να μετατρέψει την κατανάλωση οξυγόνου (VO₂) και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (VCO₂) σε κατανάλωση ενέργειας (energy expenditure [kcal/d]). Η προβλεπόμενη ενεργειακή κατανάλωση και τα μεταβολικά πρότυπα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους τύπους που συνιστώνται (26).

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή±SE (standard error of mean) ή διάμεση τιμή (IQR, interquartile range) για παραμετρικές ή μη παραμετρικές τιμές. Αντίστοιχα, σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με την ανάλυση ANOVA με τη διόρθωση Welch και Games-Howell post hoc tests ή με το Kruskal Wallis με το Mann Whitney U-test για ανεξάρτητα δείγματα. Οι κατηγορικές μεταβλητές ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία χ² ενώ για τη συσχέτιση μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Spearman rank correlation. Τιμή p μικρότερη του 0,05 στα συγκρινόμενα αποτελέσματα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού SPSS v22.

Αποτελέσματα

Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Τα κύρια χαρακτηριστικά των ομάδων και οι βασικές διαφορές κατά την είσοδό τους στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Οι δύο ομάδες διέφεραν τόσο ως προς τη βαρύτητα της νόσου, όσο και ως προς τη φλεγμονώδη αντίδραση και τη διαταραγμένη μεταβολική ανταπόκριση.

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών κατά την είσοδό τους στη μελέτη

Sampling day (PICU day 1)	Healthy control	SIRS	Severe Sepsis/ Septic Shock	P value
	N=27	N=23	N=18	
Age, years, median (IQR)	11 (8-13)	10 (6-14.5)	6.3 (1.8-12.5)	0.06
Males/Females, n (%)	21/6 (78/22%)	21/2 (91/9%)	7/11 (39/61%)	0.001
APACHE II, median (IQR)		11 (9-15)	20 (15-29)	0.000
APACHE II, probability of death, (%), median (IQR)		13 (10-21)	36 (21-67)	0.000
PELOD, median (IQR)		2 (2-15)	18 (2-52)	0.011
SOFA, median (IQR)		6 (4-7)	8 (6-10)	0.002
Mortality, n (%)		1 (4%)	4 (22%)	0.016
LOS, days, median (IQR)		6 (4-13)	18 (6.5-66)	0.06
Temp. Maximum, °C, mean±SE		37.3±1.6	38.7±0.3	0.001
MAP, mmHg, mean±SE		80.8±2.6	67.9±3.2	0.003
SF, %, mean±SE		34±1.3	28.2±1.8	0.02
Troponin, ng/mL, median (IQR)		0.01 (0.0-0.6)	0.025 (0.1-0.25)	0.3
LDH, U/L, median (IQR)		313 (234-384)	357 (248-949)	0.2
CRP, mg/dL, mean±SE		4.9±1.3	13.7±2.1	0.001
resistin, ng/mL, mean±SE	10.7±1.2*, **	22.6±3.9*, #	54.5±11#, **	0.001
adiponectin, ng/mL, mean±SE	18±1.6	13.7±2.3	13.5±2.3	0.2

Lactate, mg/dL, mean±SE		8.8±1	9.9±0.9	0.5
SID, mean±SE		33.4±.9	32±1	0.4
Anion Gap, mean±SE		12.5±0.7	13.8±0.9	0.06
Glucose, mg/dL, mean±SE		112±10	113±5.4	0.9
Albumin, g/dL, mean±SE		3.5±0.6	3±0.2	0.02
EE, kCal/BMI/d, mean±SE		74±5	56.5±5	0.02
mHSP72, MFI, mean±SE	18.6±2.4	28.7±4 [#]	13±2 [#]	0.005
nHSP72, MFI, mean±SE	32±4.7	39.5±5.7	23±3.8	0.06
mHSP90α, MFI, mean±SE	25.3±4.6	29.6±4.5	30.5±5.2	0.72
nHSP90α, MFI, mean±SE	8.9±1.2 ^{**}	9.8±1.1	16±3.5 ^{**}	0.04
eHSP90α, ng/mL, mean±SE	0.35±0.32	0.68±0.35	0.88±0.32	0.2

Data are expressed as mean±SE (standard error of mean) or median (IQR, interquartile range) for normally distributed values and non-gaussian values, respectively and as n (%) of patients for categorical parameters. ANOVA with Welch correction, Games-Howell post hoc tests, $p < 0.05$: * SIRS vs. H, ** SS vs. H, # SS vs. SIRS

PICU, Pediatric Intensive Care Unit; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; APACHE II, Acute Physiologic Assessment and Chronic Health Evaluation II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; PELOD, Pediatric Logistic Organ Dysfunction; LOS, Length Of Stay; MAP, Mean Arterial Pressure; SF, Shortening Fraction; EE, energy expenditure; ATP, adenosine triphosphate; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; NOx, Total NO Nitrite; n, neutrophil; HSP, Heat-Shock Proteins; MFI, Mean Fluorescence Intensity; SID, Strong Anion Difference; LDH, Lactate Dehydrogenase; CRP, C-Reacting Protein;

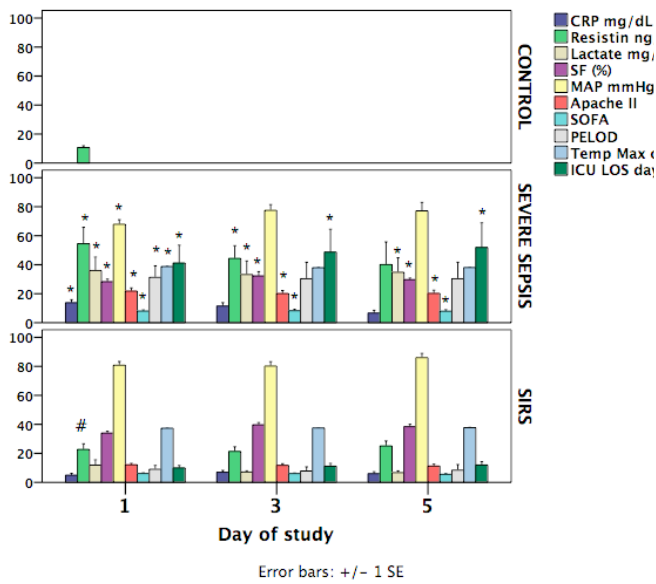
Διαχρονικές διαφορές μεταξύ ομάδων Φλεγμονώδης αντίδραση - Βαρύτητα νόσου

Οι ασθενείς με SS, στην 1η ημέρα της νόσου παρουσίαζαν σημαντική μείωση της συσταλτικότητας (SF%) του μυοκαρδίου ($p < 0.02$) και της μέσης αρτηριακής πίεσης ($p < 0.002$) παράλληλα με αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.002$), και resistin ($p < 0.002$) σε σύγκριση με τους ασθενείς με SIRS. Οι ασθενείς με SIRS είχαν επίσης αυξημένα επίπεδα resistin σε σύγκριση με τα υγιή παιδιά ($p < 0.02$). Οι μεταβολές αυτές συνδυάζονταν με αυξημένους δείκτες βαρύτητας της νόσου στην ομάδα SS όπως οι PELOD ($p < 0.03$), APACHE II ($p < 0.001$), SOFA ($p < 0.002$) scores, αλλά και μέγιστη θερμοκρασία σώματος ($p < 0.001$) και διάρκεια νοσηλείας ($p < 0.02$).

Αυξημένα επίπεδα γαλακτικού ($p < 0.001$), resistin ($p < 0.05$), SOFA ($p < 0.02$), APACHE II ($p < 0.002$) και μειωμένα SF ($p < 0.01$) καταγράφηκαν και την 3η ημέρα νοσηλείας. Αυξημένα παρέμειναν τα επίπεδα γαλακτικού ($p < 0.001$) και τα σκορ SOFA ($p < 0.001$), APACHE II ($p < 0.001$) και μειωμένη η SF ($p < 0.001$) και την 5η ημέρα νοσηλείας (Εικόνα 1).

Μεταβολισμός - Βιοενέργεια

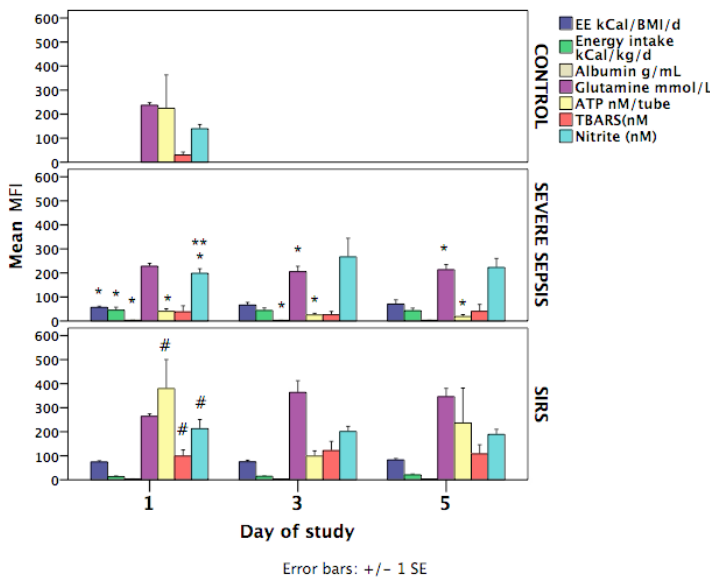
Οι ασθενείς με SS, στην 1η ημέρα της νόσου παρουσίαζαν σημαντική καταστολή της κατανάλωσης ενέργειας (EE) ($p < 0.02$), παρά τη συγκριτικά αυξημένη χορήγηση ενέργειας, σε σχέση με τους ασθενείς με SIRS ($p < 0.01$). Παρόμοια μειωμένα ήταν τα επίπεδα αλβουμίνης στην ομάδα SS σε σύγκριση με την SIRS ($p < 0.01$) με παράλληλη πτωτική τάση των επιπέδων της γλουταμίνης ($p < 0.06$). Μια τάση μεγαλύτερου ποσοστού υποθρεπτικών ασθενών ανίχνευσαν οι αρνητικές διάμεσες τιμές των z-scores για τις τιμές BMI στην ομάδα ασθενών με σήψη σε σύγκριση με SIRS ($p < 0.06$). Σε ό,τι αφορά στην επίδραση στους δείκτες βιοενέργειας τα επίπεδα ATP ήταν σημαντικά χαμηλότερα στη σήψη σε σύγκριση με το τραύμα ($p < 0.01$) ενώ αντίθετα υψηλότερα ήταν τα επίπεδα ATP στο SIRS σε σύγκριση με υγιή άτομα ($p < 0.02$). Αντίθετα, τα επίπεδα TBARS ήταν σημαντικά χαμηλότερα και στις δυο ομάδες βαριάς νόσου σε σύγκριση



Εικόνα 1: Διαχρονικές διαφορές δεικτών βαρότητας νόσου, οργανικής ανεπάρκειας και φλεγμονώδους αντίδρασης μεταξύ των ομάδων. Σημαντική στατιστική διαφορά υποσημαίνεται με * μεταξύ SS και SIRS, # μεταξύ SIRS και υγιών, ** μεταξύ SS και υγιών

με υγιείς, όμως μόνο στην ομάδα SIRS η διαφορά έφθασε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα ($p < 0.001$). Όπως αναμενόταν, τα επίπεδα NO₂ (nitrite) ήταν σημαντικά υψηλότερα τόσο σε ασθενείς με SS ($p < 0.01$) όσο και σε αυτούς με SIRS ($p < 0.02$) σε σχέση με τους υγιείς (Εικόνα 2).

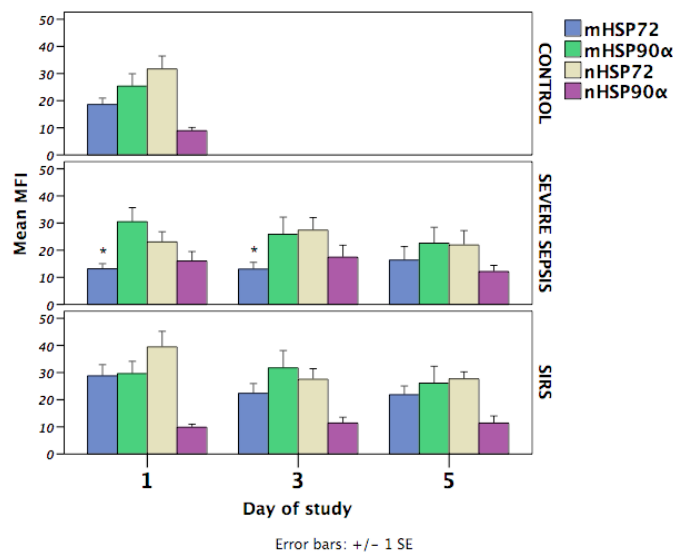
Την 3η ημέρα της νόσου, οι ασθενείς με SS, εξακολούθησαν να παρουσιάζουν σημαντική μείωση των επιπέδων ATP ($p < 0.02$), αλβουμίνης ($p < 0.02$), αλλά και γλουταμίνης (0.003) σε σύγκριση με ασθενείς με SIRS, μείωση που παρέμεινε και την 5η ημέρα νοσηλείας (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Διαχρονικές διαφορές δεικτών μεταβολισμού και βιοενέργειας μεταξύ των ομάδων. Σημαντική στατιστική διαφορά υποσημαίνεται με * μεταξύ SS και SIRS, # μεταξύ SIRS και υγιών, ** μεταξύ SS και υγιών

Ενδογενής ανοσιακή απόκριση - HSP72 - HSP90α

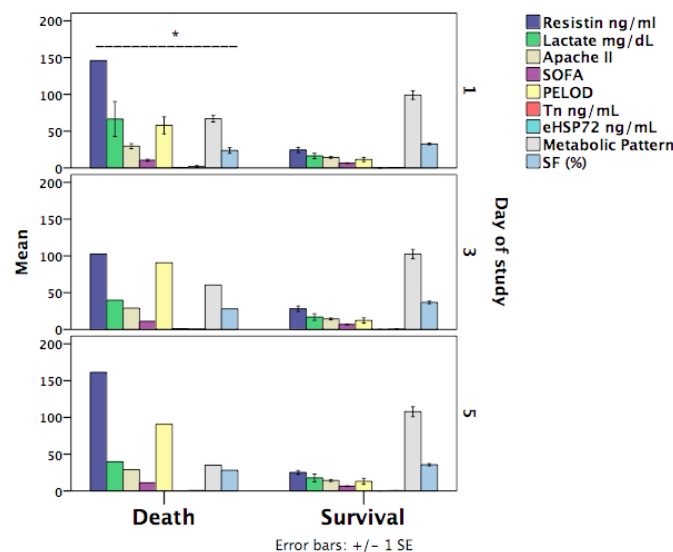
Οι ασθενείς με SS, στην 1η ημέρα της νόσου παρουσίαζαν σημαντική καταστολή των HSP72, ιδιαίτερα στα μονοκύτταρα ($p < 0.005$) σε αντίθεση με τους ασθενείς με SIRS που αντέδρασαν με διέγερση των HSP72. Η διαφορά αυτή παρέμεινε σημαντική την 3η ημέρα φθάνοντας σε μη σημαντικά επίπεδα την 5η ημέρα νοσηλείας (Εικόνα 3). Αντίθετες τάσεις παρουσίαζαν οι HPS90α την 1η ημέρα με την έκφρασή τους στα πολυμορφοπύρηνα να είναι σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με σήψη σε σύγκριση με του υγιείς ($p < 0.05$). Στο εξωκυττάριο περιβάλλον η eHSP72 παρουσίαζε αυξημένα επίπεδα όλες τις ημέρες ελέγχου στην ομάδα SS συγκριτικά με την SIRS, φθάνοντας σε σημαντική διαφορά το 3ο 24 νοσηλείας ($p < 0.02$).



Εικόνα 3: Διαχρονικές διαφορές της ενδοκυτταρικής έκφρασης των HSP72 και HSP90α σε μονοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα ασθενών των ομάδων. Σημαντική στατιστική διαφορά υποσημαίνεται με * μεταξύ SS και SIRS, # μεταξύ SIRS και υγιών, ** μεταξύ SS και υγιών

Διαχρονικές διαφορές σε σχέση με τη θνητότητα

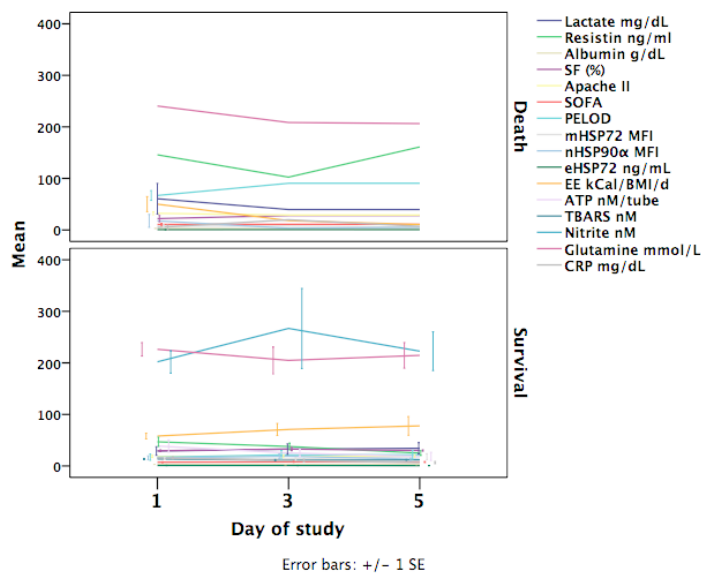
Οι ασθενείς που κατέληξαν είχαν στο πρώτο 24ωρο νοσηλείας σημαντικά ($p < 0.05$) αυξημένα επίπεδα γαλακτικού, resistin, eHSP72, τροπονίνης, PELOD, APACHE II, SOFA scores και χαμηλά επίπεδα μυοκαρδιακής συσταλτικότητας (SF) και μεταβολισμού. Οι τάσεις αυτές διατηρήθηκαν στο 3ο και 5ο 24ωρο χωρίς όμως να φθάσουν σε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Διαχρονικές διαφορές βιοπαθολογικών δεικτών που επιβίωσαν ή όχι. Σημαντική στατιστική διαφορά υποσημαίνεται με * $p < 0.05$ μεταξύ SS και SIRS. Τις ημέρες 3 και 5 οι διαφορές παρέμειναν όμως δεν έφθασαν σε στατιστική σημαντικότητα λόγω του μικρότερου αριθμού ασθενών

Διαχρονικές διακυμάνσεις βιοδεικτών

Οι διαφορές των βιοδεικτών μεταξύ των ομάδων στην 1η ημέρα νοσηλείας αλλά και μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν ή όχι διατηρήθηκαν στην 3η και 5η ημέρα νοσηλείας αναδεικνύοντας παρόμοιες τάσεις χωρίς όμως να φθάσουν σε στατιστικά σημαντική διαφορά. Επιπλέον, στη διαχρονική πορεία των τάσεων αυτών των βιοδεικτών, παρατηρήθηκε μια συνεχής ανοδική πορεία για τη resistin συνοδευόμενη από πτωτική τάση της EE και επιπέδων γλουταμίνης στους ασθενείς που δεν επιβίωσαν (Εικόνα 5). Αντίθετα, στους ασθενείς που επιβίωσαν η resistin παρουσίασε συνεχή πτωτική πορεία ακολουθούμενη από μείωση του NO_2 στην 5η ημέρα, με τάση αποκατάστασης των επιπέδων EE και γλουταμίνης στο ίδιο διάστημα.



Εικόνα 5: Διαχρονική διακύμανση των βιοδεικτών ασθενών με σήψη ή SIRS τις πρώτες 5 ημέρες από την εισαγωγή στη ΜΕΘ. Παρατηρείται μια ανξητική τάση της resistin και περαιτέρω καταστολή της κατανάλωσης ενέργειας σε ασθενείς που απεβίωσαν σε αντιδιαστολή με ασθενείς που επιβίωσαν και παρουσιάζουν αντίθετες τάσεις

Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα παιδιά με σοβαρή σήψη και αυξημένους δείκτες βαρύτητας νόσου παρουσιάζουν από την 1η ημέρα σημαντική καταστολή της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου και αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και resistin σε σύγκριση με τους ασθενείς με SIRS και τους υγιείς. Οι μεταβολές διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό στην 3η και μετριάζονται στην 5η ημέρα. Τις μεταβολές αυτές ακολουθεί παράλληλη μείωση της κατανάλωσης ενέργειας και των επιπέδων αλβουμίνης και γλουταμίνης που επιμένουν έως το 5ο 24ωρο. Για πρώτη φορά δείχθηκε ότι τις διαταραχές του μεταβολισμού συνοδεύουν σημαντικές μεταβολές της βιοενέργειας με πτώση των επιπέδων ATP στη σήψη και αύξηση στο SIRS, σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS και αύξηση του NO₂ στις δύο ομάδες σε σύγκριση με τα υγιή παιδιά. Μειωμένα επίπεδα ATP καταγράφονται έως το 5ο 24ωρο. Οι διαχρονικές αυτές μεταβολές, ενδεικτικές ενός έντονου ενδοκυττάριου στρες που αναδίδει ισχυρό σήμα κινδύνου στα κύτταρα των οργανικών συστημάτων στη σήψη, δείχθηκε να συνοδεύονται από καταστολή της ενδοκυττάριας έκφρασης των HSP72 με αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία. Οι διαχρονικές αυτές μεταβολές και συσχετίσεις αναδεικνύονται ιδιαίτερα έντονες μεταξύ των ασθενών που δεν επιβιώνουν.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύριο μέρος της δομής του κυττάρου, και της παραγωγής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορύλωσης και των καθοριστικών μεταβολικών λειτουργιών (4) στην πορεία και στην τελική έκβαση της σήψης (27). Η αύξηση του NO και η καταστολή του ATP σε παιδιά με σοβαρή σήψη ή με κακή έκβαση, που καταγράφηκαν στην παρούσα έρευνα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η επιβίωση στη σοβαρή νόσο συνδέεται με πρόωμη ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (28). Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι το NO μέσω της αλληλεπίδρασής του με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (27) (29) μπορεί να λειτουργήσει σαν φυσιολογικός ρυθμιστής της κυτταρικής αναπνοής (30) και να αυξήσει την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποιώντας έτσι μηχανισμούς επιβίωσης ή θανάτου των κυττάρων (31). Εξάλλου, η αύξηση των μεταβολιτών NO₂/NO₃ σε σηπτικούς ασθενείς, όπως καταγράφηκε και στην παρούσα μελέτη, η μείωση του τόνου των αγγείων μετά από τη χορήγηση ενδοτοξίνης ή προφλεγμονωδών κυτοκινών, με παράλληλη αύξηση παράγοντα προερχόμενου από το ενδοθήλιο, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το NO εμπλέκεται στις καρδιαγγειακές μεταβολές στη σηπτική καταπληξία (32). Στην παρούσα μελέτη, η μειωμένη μυοκαρδιακή συσταλτικότητα και η αύξηση της τροπονίνης και του γαλακτικού οξέος παράλληλα με την αύξηση NO₂ σε ασθενείς με SS υποστηρίζει μια τέτοια συσχέτιση. Τα αποτελέσματα επίσης υποστηρίζουν ότι είναι πιθανή και η συμμετοχή της φλεγμονώδους ορμόνης resistin και της εξωκυττάριας HSP72 στις μεταβολές αυτές, καθώς έχει δειχθεί ότι η ενδοτοξίνη, TNF, ιντερφερόνη, ιντερλευκίνη-1 οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής του NO (33).

Αν και η αποτυχία εξασφάλισης οξυγόνου σε καταστάσεις καταπληξίας είναι μία εμφανής αιτία, εξίσου σημαντικό ρόλο στη σήψη φαίνεται να παίζει η αδυναμία του κυττάρου να χρησιμοποιήσει το οξυγόνο μέσα στα μιτοχόνδρια (κυτοπαθολογική δυσοξία). Η καλή έκβαση επομένως θα μπορούσε να εξαρτάται από μια έγκαιρη διατήρηση ή αποκατάσταση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων ώστε να εξασφαλιστούν οι απαιτούμενες μεταβολικές ενεργειακές ανάγκες, όπως και η εξασφάλιση άλλων καταστάσεων ισορροπίας (34).

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στη σήψη και σχετίζεται με τη σοβαρότητά της (35). Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στη σοβαρή διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ριζών O_2 (ROS) και της αντιοξειδωτικής άμυνας ενός κυττάρου, ιστού ή οργάνου, υπέρ της πρώτης. Η οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων στη σήψη προκαλείται από μια υπερβολική αμυντική και φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού, που χαρακτηρίζεται από μαζική αύξηση ROS, NO και φλεγμονωδών κυτοκινών (48). Σε καταστάσεις ομοιοστασίας, τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα ελέγχουν το οξειδωτικό στρες μέσα στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, στη σήψη εξαντλούνται τα αντιοξειδωτικά συστήματα, μειώνεται η κατανάλωση O_2 και τα επίπεδα ATP, όπως δείχθηκε και στην παρούσα μελέτη, καταστέλλεται η κυτταρική αναπνοή σε μιτοχονδριακό επίπεδο οδηγώντας σε βλάβη του ενδοθηλίου, καταστροφή ιστών και πολυοργανική ανεπάρκεια (49). Κατ' επέκταση, μελέτες έχουν δείξει αύξηση των ευαίσθητων δεικτών οργανικής βλάβης, όπως τα επίπεδα προϊόντων υπεροξειδωσής λιπιδίων (thiobarbituric acid substances-TBARS) σε αντίστοιχους πάσχοντες ιστούς (36). Η μείωση των TBARS που παρατηρήθηκε στις ομάδες SS και SIRS της παρούσας έρευνας δεν επιβεβαιώνουν τα ευρήματα μελέτης σε ενήλικες όπου παρατηρήθηκε μια προοδευτική αυξητική τάση στις τιμές τους μετά από την εκδήλωση της σήψης συνδεδεμένη με τη βαρύτητα της νόσου (37). Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε μια παρόμοια αύξηση των TBARS στα παιδιά με SIRS ακολουθούμενη από μια διαχρονική τάση ανάκαμψης στην SS ομάδα.

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη διαχρονική μελέτη που συγκρίνει μεταβολές φλεγμονώδους-ορμονικής αντίδρασης, ενδογενούς-ανοσίας, βιοενέργειας και μεταβολισμού παιδιατρικών ασθενών με σοβαρή σήψη, χωρίς υποκείμενο νόσημα με τις αντίστοιχες παιδιών με SIRS (ημέρες 1-5) και ομάδα φυσιολογικών παιδιών. Η επίδραση του στρες της σοβαρής σήψης είναι πολύ ισχυρότερη εκείνης του τραύματος σε κυτταρικό βιοενεργειακό επίπεδο και διαφοροποιεί το πρότυπο μεταβολικής-φλεγμονώδους αντίδρασης και κλινικής έκφρασης τους στη βαρύτητα της νόσου και τα οργανικά συστήματα. Η σοβαρή σήψη χαρακτηρίζεται από έντονη ενδοκυττάρια καταστολή ATP, HSP72, HSP90α, ενέργειας και μεταβολικών δεικτών όπως η γλουταμίνη και υπέρμετρη εξωκυττάρια διέγερση φλεγμονωδών ορμονών (resistin) και πρωτεϊνών έμφυτης ανοσίας που σηματοδοτούν οξύ στρες και κίνδυνο (HSP72). Και στις δυο ομάδες παιδιών-ασθενών, η φλεγμονώδης αντίδραση, η αλλαγή μεταβολισμού, η σύνθεση πρωτεϊνών, η κινητοποίηση της ενδογενούς ανοσίας μέσω HSPs, η έξοδος αυτών από τα κύτταρα κι η αλληλεπίδραση ή μεταφορά μηνυμάτων σε άλλα κύτταρα (eHSPs), η έκκριση ορμονών, η τροποποίηση της βιοενέργειας και ενεργειακής παραγωγής, διαρκούν 3-5 ημέρες και καθορίζουν το μέγεθος της οργανικής δυσλειτουργίας, τη βαρύτητα και την έκβαση της νόσου. Η εξασφάλιση ενέργειας για τη λειτουργία των κυττάρων και των οργάνων, και η ανάκτηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας συνδέονται με την επιβίωση. Ασθενείς που δεν αποκαθιστούν τη βιοενέργεια και διατηρούν χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και χαμηλό μεταβολισμό με εμμένουσα φλεγμονώδη αντίδραση έως και την 5η ημέρα σοβαρής νόσου, έχουν κακή πρόγνωση.

Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη ώστε να διερευνηθεί και να αποσαφηνιστεί η διαδικασία της οξειδωτικής βλάβης, βιοενεργειακής ανεπάρκειας και ενεργειακής καταστολής και να εξετασθούν πιθανές συνδυαστικές παρεμβάσεις στοχεύοντας στην εξασφάλιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε ασθενείς με σοβαρή σήψη ή SIRS και ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση και ανοσοκαταστολή.

Χρηματοδότηση

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

Έγκριση

Η παρούσα κλινική μελέτη έχει γραπτή έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου.

Βιβλιογραφία

1. 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 Jul;29(7):1303–10.
2. Mathias B, Mira JC, Larson SD. Pediatric sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2016 Jun;28(3):380–7.
3. Proulx F, Joyal JS, Mariscalco MM, Leteurtre S, Leclerc F, Lacroix J. The pediatric multiple organ dysfunction syndrome. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2009 Jan;10(1):12–22.
4. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012 Oct 26;48(2):158–67.
5. Framson CMH, LeLeiko NS, Dallal GE, Roubenoff R, Snelling LK, Dwyer JT. Energy expenditure in critically ill children. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2007 May;8(3):264–7.
6. Briassoulis G, Venkataraman S, Thompson AE. Energy expenditure in critically ill children. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4):1166–72.
7. Briassoulis G, Briassouli E, Fitrolaki D-M, Plati I, Apostolou K, Tavladaki T, et al. Heat shock protein 72 expressing stress in sepsis: unbridgeable gap between animal and human studies--a hypothetical “comparative” study. *BioMed Res Int*. 2014;2014:101023.
8. Pratt WB, Morishima Y, Gestwicki JE, Lieberman AP, Osawa Y. A model in which heat shock protein 90 targets protein-folding clefts: rationale for a new approach to neuroprotective treatment of protein folding diseases. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2014 Nov;239(11):1405–13.
9. Vardas K, Apostolou K, Briassouli E, Goukos D, Psarra K, Botoula E, et al. Early response roles for prolactin cortisol and circulating and cellular levels of heat shock proteins 72 and 90α in severe sepsis and SIRS. *BioMed Res Int*. 2014;2014:803561.
10. Flom G, Weekes J, Johnson JL. Novel interaction of the Hsp90 chaperone machine with Ssl2, an essential DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2005 Jun;47(6):368–80.
11. Langouche L, Vander Perre S, Frystyk J, Flyvbjerg A, Hansen TK, Van den Berghe G. Adiponectin, retinol-binding protein 4, and leptin in protracted critical illness of pulmonary origin. *Crit Care Lond Engl*. 2009;13(4):R112.
12. Robinson K, Prins J, Venkatesh B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(2):221.
13. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2272–9.
14. Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, Orfanos SE, Nikitas N, Armaganidis A, et al. Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations with sepsis phase, severity, and circulating cytokine levels. *J Crit Care*. 2012 Aug;27(4):400–9.
15. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S, et al. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis - the relation to mortality. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2014 Feb;33(1):179–82.
16. Druml W, Heinzel G, Kleinberger G. Amino acid kinetics in patients with sepsis. *Am J Clin Nutr*. 2001 May;73(5):908–13.
17. Fitrolaki D-M, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G. CD64-Neutrophil expression and

- stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. *BMC Pediatr.* 2013;13:31.
18. Briassoulis G, Briassouli E, Tavladaiki T, Ilia S, Fitrolaki DM, Spanaki AM. Unpredictable combination of metabolic and feeding patterns in malnourished critically ill children: the malnutrition-energy assessment question. *Intensive Care Med.* 2014 Jan;40(1):120–2.
 19. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J Nutr.* 2000 Sep;130(9):2222–7.
 20. Heidegger CP, Berger MM, Graf S, Zingg W, Darmon P, Costanza MC, et al. Optimisation of energy provision with supplemental parenteral nutrition in critically ill patients: a randomised controlled clinical trial. *Lancet Lond Engl.* 2013 Feb 2;381(9864):385–93.
 21. Neu J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action. *J Nutr.* 2001 Sep;131(9 Suppl):2585S – 9S; discussion 2590S.
 22. Briassouli E, Goukos D, Daikos G, Apostolou K, Routsis C, Nanas S, et al. Glutamine suppresses Hsp72 not Hsp90 α and is not inducing Th1, Th2, or Th17 cytokine responses in human septic PBMCs. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2014 Oct;30(10):1185–94.
 23. Briassouli E, Briassoulis G. Glutamine randomized studies in early life: the unsolved riddle of experimental and clinical studies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:749189.
 24. Jordan I, Balaguer M, Esteban ME, Cambra FJ, Felipe A, Hernández L, et al. Glutamine effects on heat shock protein 70 and interleukines 6 and 10: Randomized trial of glutamine supplementation versus standard parenteral nutrition in critically ill children. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2016 Feb;35(1):34–40.
 25. Kozlov AV, Panasenkov OM, Yegorov DYu null, Vol'nova TV, Vladimirov YuA null, Azizova OA. Antioxidant properties of albumin during the oxidation of linolenic acid and low density lipoproteins in the presence of ferrous ions. *Biomed Sci.* 1991;2(5):530–5.
 26. Sion-Sarid R, Cohen J, Houry Z, Singer P. Indirect calorimetry: a guide for optimizing nutritional support in the critically ill child. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2013 Sep;29(9):1094–9.
 27. Kozlov AV, Bahrami S, Calzia E, Dungal P, Gille L, Kuznetsov AV, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Ann Intensive Care.* 2011;1(1):41.
 28. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):745–51.
 29. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Jun;161(6):1781–5.
 30. Galkin A, Higgs A, Moncada S. Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem.* 2007;43:29–42.
 31. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):214–20.
 32. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock Augusta Ga.* 2008 Oct;30 Suppl 1:3–9.
 33. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clin São Paulo Braz.* 2006 Feb;61(1):71–6.
 34. Ribeiro Nogueira C, Ramalho A, Lameu E, Da Silva Franca CA, David C, Accioly E. Serum concentrations of vitamin A and oxidative stress in critically ill patients with sepsis. *Nutr Hosp.* 2009 Jun;24(3):312–7.
 35. Biesalski HK, McGregor GP. Antioxidant therapy in critical care--is the microcirculation the primary target? *Crit Care Med.* 2007 Sep;35(9 Suppl):S577–83.
 36. Andrades M, Ritter C, de Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res.* 2011 May 15;167(2):e307–13.
 37. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, et al. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:168652.