



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

ΤΑΣΙ ΚΑΙ ΣΗΨΗ ΣΕ ΒΑΡΕΩΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΘ

ΜΑΡΙΑ Γ. ΚΟΜΠΟΤΗ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα 2014

© 2014 Μαρία Κομπότη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παρασκευά Ευφροσύνη**-Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ (Επιβλέπουσα)
2. **Γερμενής Αναστάσιος**-Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
3. **Σπελέτας Ματθαίος**-Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παρασκευά Ευφροσύνη**-Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ (Επιβλέπουσα)
2. **Γερμενής Αναστάσιος**-Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
3. **Σπελέτας Ματθαίος**-Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
4. **Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ**-Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
5. **Γουργουλιάνης Κων/νος**-Καθηγητής Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
6. **Ζακυνθινός Επαμεινώνδας**-Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
7. **Χατζόγλου Χρυσή**-Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Στους γονείς μου

Στον Στέλιο

***ΤΑΧΙ ΚΑΙ ΣΗΨΗ ΣΕ ΒΑΡΕΩΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΘ***

***Κλινική σημασία των πολυμορφισμών
των ανοσιακών γονιδίων***

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
Περίληψη-Abstract.....	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
Εισαγωγή.....	17
Μελέτες γενετικής συσχέτισης σε ασθενείς ΜΕΘ.....	18
Toll-like receptor 4 (TLR4).....	27
BAFF-R και TACI.....	30
C2.....	31
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
Σκοπός.....	34
Ασθενείς-Μέθοδος.....	34
Αποτελέσματα.....	42
Εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ.....	43
Θνητότητα στη ΜΕΘ.....	49
Δυσλειτουργία οργάνων.....	53
Διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ.....	54
Επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού.....	54
Συζήτηση.....	53
Συμπεράσματα.....	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Μαρία Κομπότη

Βιθυνίας 18
17123 ΝΕΑ ΣΜΥΡΝΗ
Τηλέφωνο 210-9318700
Email: mariakompoti@gmail.com

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη, μητέρα δύο ανήλικων τέκνων
- Εθνικότητα: Ελληνική
- Ημερομηνία γέννησης: 04-08-1968
- Τόπος γέννησης: Αθήνα

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 1986: Απολυτήριο από την Πρότυπο Ευαγγελική Σχολή Σμύρνης με βαθμό «20».
- 1992: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ
- 2002: Τίτλος ειδικότητας Παθολογίας
- 2004: Τίτλος εξειδίκευσης στην Εντατική Θεραπεία
- 2009: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Στατιστική (Master of Science) στο Οικονομικό Πανεπιστήμιο Αθηνών με βαθμό *Λίαν καλώς* (15 Ιανουαρίου 2009)

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 1993-1994 : Υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Πλωμαρίου Λέσβου (Διευθυντής: Αριστείδης Φρυδάς).
- 1994-1996: Ειδικότητα Παθολογίας στο Γ΄ Παθολογικό Τμήμα του Τζανείου Π. Γ. Ν. Πειραιά (Διευθυντής: Στέφανος Παπαγγελόπουλος).
- 1998-1999: Ειδικότητα Παθολογίας στο Ογκολογικό Τμήμα του Π. Γ. Ν. «Ο Ευαγγελισμός» (Διευθυντής: Κων/νος Αλεξόπουλος).
- 1999-2001: Ειδικότητα Παθολογίας στο Ε΄ Παθολογικό Τμήμα του Π. Γ. Ν. «Ο Ευαγγελισμός» (Διευθυντής: Εμμ. Βαϊδάκης).
- 2002-2004: Εξειδίκευση στην Εντατικολογία στη Μ.Ε.Θ. του Ν.Ν.Θ.Α «Σωτηρία» (Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής Α. Ρασιδάκης).
- 2005: Επικουρική επιμελήτρια Β΄ Παθολόγος στην Παθολογική Κλινική του Γ. Ν. Θήβας (Διευθυντής: Α. Παπαευσταθίου).
- 2006: Επικουρική επιμελήτρια Παθολόγος στο Α΄ Παθολογικό Τμήμα του Γ.Ν. «Ευαγγελισμός» (Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ε. Σιούλα).
- 2007-2008: Επιμελήτρια Β΄ ΕΣΥ στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Θριάσιου Γ. Ν. Ελευσίνας (Διευθύντρια: Φ. Κλούβα-Μολυβδά).
- 2008-2010: Επιμελήτρια Β΄ ΕΣΥ στη ΜΕΘ Εγκαυμάτων του Λάτσειου Κέντρου Εγκαυμάτων (Επιστημονικός Υπεύθυνος: Φ. Τσιδεμιάδου).

- 2010-2011: Επιμελήτρια Β' ΕΣΥ στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Θριάσιου Γ. Ν. Ελευσίνας (Διευθύντρια: Φ. Κλούβα-Μολυβδά).
- 2011--- Επιμελήτρια Α' στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Θριάσιου Γ. Ν. Ελευσίνας (Διευθύντρια: Φ. Κλούβα-Μολυβδά).
-

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Melidonis A, Tournis S, **Kompoti M**, Lentzas I, Roussou V, Iraklianos S, Michail I, Mariolis A. Increased prevalence of diabetes mellitus in a rural Greek population. *Rural Remote Health* 2006;6(1):534.
2. Matthew E. Falagas, **Maria Kompoti**. Obesity and infection (Review). *Lancet Infectious Diseases* 2006;6 (7):438-446
3. **Kompoti M**, Mariolis A, Alevizos A, Kyriazis I, Protosaltis I, Dimou E, Lentzas I, Levisianou D, Gova A, Melidonis A. Elevated serum triglycerides is the strongest single indicator for the presence of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2006;5(1):21
4. **M. Kompoti**, S. Drimis, A. Papadaki, K. Kotsomytis, C. Pouloupoulou, D. Gianneli, D. Voutsinas. Serum C-reactive protein at admission predicts in-hospital mortality in medical patients. *Eur J Intern Med* 2008;19:261–265
5. Michalia M, **Kompoti M**, Koutsikou A, Paridou A, Giannopoulou P, Trika-Graphakos E, Clouva-Molyvdas P-M. Diabetes mellitus is an independent risk factor for ICU-acquired bloodstream infections. *Intensive Care Med* 2009;35:448 – 454
6. Poulakou G, Kontopidou FV, Paramythiotou E, **Kompoti M**, Katsiari M, Mainas E, Nicolaou C, Yphantis D, Antoniadou A, Trika-Graphakos E, Roussou Z, Clouva P, Maguina N, Kanellakopoulou K, Armaganidis A, Giamarellou H. Tigecycline in the treatment of infections from multi-drug resistant gram-negative pathogens. *J Infect* 2009;58:273–284
7. **Kompoti M**, Michalia M, Clouva-Molyvdas P-M. Predictive ability of intra-abdominal pressure for ICU mortality. *Intensive Care Med* 2009;35:1650
8. **Kompoti M**, Michalia M. Critical care of the burn patient : The first 48 hours. *Crit Care Med* 2010;38:1391
9. **Kompoti M**, Michalia M, Kallitsi G, Giannopoulou P, Arabatzis M, Liapi G, Velegraki A, Trika-Graphakos E, Clouva-Molyvdas P-M. Fatal cutaneous *Saksenaeva vasiformis* infection in a critically ill patient. *Mycoses* 2011;54:e599-e601
10. Stefanatou E, **Kompoti M**, Paridou A, Koutsodimitropoulos I, Giannopoulou P, Markou N, Kalofonou M, Trika-Graphakos E, Tsidemiadou F. Probiotic sepsis due to *Saccharomyces fungaemia* in a critically ill burn patient. *Mycoses* 2011 ;54 :e643-e646
11. Michalia M, **Kompoti M**, Panagiotakopoulou A, Kallitsi G, Charitidi M, Trika-Graphakos E, Clouva-Molyvdas PM. Impact of red blood cells transfusion on ICU-acquired bloodstream infections : a case-control study. *J Crit Care* 2012 ;27 :655-661
12. Kouki P, Matsota P, Christodoulaki K, **Kompoti M**, Loizou M, Karamanis P, Pandazi A, Kostopanagiotou C. Greek surgical patients' satisfaction related to perioperative anesthetic services in an academic institute. *Patient Preference Adherence* 2012;6:569-578

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- 1) Ατσάλη Χ, **Κομπότη Μ**. Θεραπεία της αναιμίας Diamond-Blackfan με ανθρώπινη ιντερλευκίνη-3. *Ιατρ Βιβλ Ενημ* 1993;7(6):357–364
- 2) Ατσάλη ΧΕ, **Κομπότη ΜΓ**. Αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο στην πορεία της HIV λοίμωξης. *Ελληνικά Αρχεία AIDS* 2002;10: 218–224
- 3) **Κομπότη ΜΓ**. Εντακτική ινσουλινοθεραπεία σε βαρέως πάσχοντες. *Αρεταίος* 2003; ΣΤ(25): 426–429
- 4) Μ. Μ. Βασιλαματζής, Π. Στασινοπούλου, **Μ. Κομπότη**, Κ. Πετράκη, Ε. Βρυώνης, Ν. Αλεβιζόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Χ. Πέππας, Χ. Ζουμπλιός, Κ. Ντελάκη, Ε. Πατήλα, Ν. Αποστολοπούλου, Σ. Ξυνόγαλος, Κ. Γ. Αλεξόπουλος. Σπληνικές μεταστάσεις σε ασθενείς με μη αιματολογικά κακοήγη νοσήματα. *Ογκολογία Πεπτικού* 2003; 3: 152–159
- 5) **Μ. Γ. Κομπότη**, Σ. Ι. Δριμής. Η HIV λοίμωξη στην κύηση. *Ελληνικά Αρχεία AIDS* 2003; 11: 25–35
- 6) Α. Ν. Παρίδου, **Μ. Γ. Κομπότη**, Π. Α. Μπακάκος, Α. Ν. Ρασιδάκης. Παγίδευση καθετήρα πνευμονικής αρτηρίας. *Καρδιά & Αγγεία* 2004; IX: 65–66
- 7) **Μ. Γ. Κομπότη**. Η διατροφή των ασθενών στη ΜΕΘ. *Αρεταίος* 2004; Η(30): 646–654
- 8) Δριμής Σ, Ματαλιωτάκης Ι, **Κομπότη Μ**, Γιακουμής Π, Αδαμαντία Ζ, Ελεμένογλου Ι, Βουτσινάς Δ. Αμφίπλευρη οστεονέκρωση των μηριαίων κεφαλών σε ασθενή υπό αγωγή με HAART. *Ελληνικά Αρχεία AIDS* 2004;12: 225–228
- 9) **Κομπότη Μαρία**, Δριμής Στέλιος, Ζαρκωτού Ολυμπία, Παπαδάκη Άρτεμη, Κοτσομύτης Κωνσταντίνος, Τρυφινόπουλου Κυριακή, Γιαννέλη Δήμητρα, Βουτσινάς Διονύσιος. Επιπολασμός ρινικής φορέας *Staphylococcus aureus* σε ασθενείς της κοινότητας κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο. *Ιατρική* 2006;90:418–423

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΒΙΒΛΙΩΝ-ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΩΝ

1. Βασιλαματζής ΜΜ, **Κομπότη ΜΓ**. Επιδημιολογικά δεδομένα και πρόληψη του καρκίνου. Στο: Τόμος Πρακτικών 3^{ου} Ετήσιου Σεμιναρίου Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός». Αθήνα, Φεβρουάριος 1998. *Νοσοκ Χρονικά* 1998;60 (Suppl.):28 – 55
2. M.M. Vaslamatzis, **M. Kompoti**, N.D. Alevizopoulos, G. Stratakos, C. Delaki, C. Zoumbliou, C. Stathopoulos, D. Exarchos, I. Bellenis. Multiple primary malignant neoplasms in patients with small cell lung cancer. In: 11th Central European Lung Cancer Conference-CELCC, Medimond International Proceedings, Monduzzi Editore, Bologna, 2008

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1 προφορική ανακοίνωση σε διεθνές συνέδριο
- 12 προφορικές ανακοινώσεις σε εθνικά συνέδρια
- 35 αναρτημένες ανακοινώσεις (posters) σε εθνικά συνέδρια
- 47 αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English - Cambridge / 1984)
- Γαλλικά (Diplôme d' Études Supérieures / 1985)
- Γερμανικά (Kleines Deutsches Sprachdiplom / 1991)

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Χρήση Η/Υ (Windows, Microsoft Office)
- Στατιστική ανάλυση δεδομένων (SPSS, R)

ΜΕΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Εντατικής Θεραπείας
- Member of the European Society of Intensive Care Medicine
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Λοιμώξεων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πέτρα σώζεται αν τη σηκώσουμε από τη λάσπη και τη χτίσουμε σ' ένα σπίτι.

ΝΙΚΟΣ ΚΑΖΑΝΤΖΑΚΗΣ

Η συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με κλινικά φαινόμενα όπως η σήψη δίνει μια άλλη, σχεδόν υπερφυσική διάσταση στα προβλήματα που απαντώνται στην καθημερινότητα των ασθενών μια Μονάδας Εντατικής Θεραπείας. Τουλάχιστον εγώ έτσι ένιωσα όλα αυτά τα χρόνια, καθώς ασχολιόμουν αρχικά με τη συλλογή των δεδομένων και στη συνέχεια με τη μελέτη όλων αυτών των περιεργών πολυμορφισμών που εκτρέπουν τον καταρράκτη της σήψης προς απρόσμενες κατευθύνσεις.

Σε όλη αυτή την πορεία, είχα την τύχη να έχω εκλεκτούς συνοδοιπόρους που με συμβούλεψαν, με στήριξαν και με βοήθησαν ουσιαστικά μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης και τη συγγραφή τούτης της διατριβής. Θερμά ευχαριστώ τον καθηγητή Αναστάσιο Γερμενή και τον αναπληρωτή καθηγητή Ματθαίο Σπελέτα για την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα βήματα της μελέτης από τον αρχικό σχεδιασμό μέχρι τη συγγραφή, την επιβλέπουσα αναπληρώτρια καθηγήτρια Ευφροσύνη Παρασκευά για την ουσιαστική συνεισφορά στην οργάνωση και ολοκλήρωση της διατριβής, τον καθηγητή Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για τη σιβαρή καθοδήγηση σε στιγμές αβεβαιότητας, τη διευθύντριά μου Κλούβα-Μολυβδά Φυλ. για τη διαρκή ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και τις φίλες και συνεργάτιδες Αναστασία Κουτσίκου για τη συλλογή σημαντικού μέρους των κλινικών δειγμάτων και Μάρθα Μιχαλιά για την υποδειγματική καταγραφή των κλινικών δεδομένων και την αναντικατάστατη φιλία. Επίσης ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (κ.κ. Αλέξανδρο Μιχόπουλο, Ευαγγελία Γραμουσιάνου, Κυριακή Λιαδάκη, Ανδρέα Ζησιμάτο και Ευαγγελία Καραμούτη) για τη διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της μελέτης καθώς και όλους τους συνεργάτες μου στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Θριάσιου Γ. Ν. Ελευσίνας για την υπομονή και τη βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: ο προσδιορισμός των γενετικών πολυμορφισμών των μορίων TACI, BAFF και TLR4 και η διερεύνηση πιθανής συσχέτισής τους με την εμφάνιση σήψης και τη θνητότητα σε ασθενείς που εισάγονται στη ΜΕΘ.

Ασθενείς-Μέθοδος: Προοπτική μελέτη παρακολούθησης όλων των ασθενών που εισήχθησαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας μέχρι την έκβαση (έξοδος, θάνατος). Για τη φυσική ανοσία μελετήθηκαν δύο πολυμορφισμοί του toll-like receptor 4 (*TLR4-D299G* και *TLR4-T399I*) και ένας πολυμορφισμός του C2 που προκαλεί ανεπάρκεια συμπληρώματος (*C2del28bp*). Για την επίκτητη ανοσία μελετήθηκαν δύο πολυμορφισμοί του BAFF-R (*BAFF-R-H159Y* και *BAFF-R-P21R*) και ένας του TACI (*TACI-C104R*). Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού (PCR-RFLP).

Αποτελέσματα: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 215 ασθενείς (148 άνδρες και 67 γυναίκες). Η ηλικία (μέσος \pm SD) ήταν $54,1 \pm 19,7$ έτη, APACHE II score εισαγωγής στη ΜΕΘ $22,0 \pm 6,0$ και SOFA score εισαγωγής στη ΜΕΘ $9,7 \pm 3,5$. Σήψη στη ΜΕΘ βρέθηκε σε 108 ασθενείς (50,2%) και η θνητότητα στη ΜΕΘ ήταν 20,5% [95% διάστημα αξιοπιστίας 15,0–25,9]. Οι SNPs του TLR4 βρέθηκαν σε συζευγμένη κατάσταση. Οι φορείς κάποιου TLR4 SNP και οι φορείς του *BAFFR-P21R* συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με χαμηλότερη πιθανότητα σήψης στη ΜΕΘ συγκριτικά με τους wild-type ομοζυγώτες [διορθωμένα odds ratios 0,32, 95%CI 0,12–0,86, $p=0,024$ για τον *TLR4-T399I*, 0,34, 95%CI 0,13–0,94, $p=0,037$ για τον *TLR4-T399I* and 0,44, 95%CI 0,20–0,97, $p=0,044$ για τον *BAFFR-P21R*]. Από την ανάλυση υποομάδων, φάνηκε ότι η συσχέτιση αυτή αφορούσε στους παθολογικούς ασθενείς και οριακά στους τραυματίες, ενώ στους χειρουργικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση. Η φορεία του *TACI-C104R* SNP είχε καλή προβλεπτική αξία μετά από διόρθωση ως προς συγχυτικούς παράγοντες [hazard ratio 5,01 (1,14–22,03, $p=0,033$). Ο *BAFFR-H159Y* SNP δεν συσχετίστηκε με την εμφάνιση σήψης και τη θνητότητα, ενώ ο πολυμορφισμός *C2del28bp* δεν ανευρέθηκε στο δείγμα της μελέτης.

Συμπεράσματα: Η μελέτη μας έδειξε ότι σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ, οι πολυμορφισμοί *TLR4-D299G* (rs4986790), *TLR4-T399I* (rs4986791) και

TNFRSF13C/BAFFR-P21R (rs77874543) ασκούν προστατευτική επίδραση αναφορικά με την εμφάνιση σήψης, ενώ ο πολυμορφισμός *TNFRSF13B/TACI*-C104R (rs34557412) συσχετίζεται σημαντικά με αύξηση της θνητότητας στη ΜΕΘ. Ο πολυμορφισμός *TNFRSF13C/BAFFR*-H159Y (rs61756766) δεν συσχετίστηκε με την εμφάνιση σήψης ή τη θνητότητα στη ΜΕΘ. Διαπιστώθηκε ανισορροπία σύνδεσης για τους πολυμορφισμούς *TLR4*-D299G (rs4986790) και *TLR4*-T399I (rs4986791) και για τους πολυμορφισμούς *TNFRSF13C/BAFFR*-P21R (rs77874543) και *TNFRSF13C/BAFFR*-H159Y (rs61756766). Ο πολυμορφισμός *C2-c.841_849+19del28* (rs9332736) δεν ανιχνεύτηκε στο δείγμα των ασθενών της μελέτης.

ABSTRACT

Objective: Our study investigated potential associations of genetic polymorphisms of innate and adaptive immunity factors with development of sepsis and mortality of patients admitted in an intensive care unit (ICU).

Methods: All patients admitted in our 8-bed medical/surgical ICU were prospectively followed until the ICU outcome (discharge from the ICU, death in the ICU). For innate immunity, we studied two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of toll-like receptor 4 (*TLR4*-D299G and *TLR4*-T399I) and one SNP causing complement deficiency (*C2del28bp*). For adaptive immunity, we studied two SNPs of BAFF-R (*BAFF-R*-H159Y and *BAFF-R*-P21R) and one SNP of TACI (*TACI*-C104R). Polymorphisms were detected by allele-specific polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism.

Results: Two hundred fifteen patients (148 males, 67 females) were included in the study (94 medical, 46 surgical and 75 trauma patients). Age (mean±SD) was 54.1±19.7 years, APACHE II score at admission in the ICU 22.0±6.0 and SOFA score at admission in the ICU 9.7±3.5. ICU-acquired sepsis was recorded in 108 patients (50.2%) and ICU mortality was 20.5% [95% confidence interval (CI) 15.0–25.9]. TLR4 SNPs were detected in a co-segregated state. Carriage of either TLR4 SNP and carriage of *BAFFR*-P21R were independently associated with lower probability of ICU-acquired sepsis compared with wild-type homozygotes [adjusted odds ratios 0.32, 95%CI 0.12–0.86, p=0.024 for *TLR4*-T399I,

0.34, 95%CI 0.13–0.94, $p=0.037$ for *TLR4*-T399I and 0.44, 95%CI 0.20–0.97, $p=0.044$ for *BAFFR*-P21R]. This inverse association of TLR4 SNPs with sepsis applied to medical and trauma patients, while in surgical patients no association was recorded. Carriage of *TACI*-C104R SNP was an independent predictor of ICU mortality after adjustment for significant confounders [hazard ratio 5.01 (1.14–22.03, $p=0.033$). *BAFFR*-H159Y SNP displayed no significant associations with ICU-acquired sepsis or ICU mortality, while *C2del28bp* was not detected in our patient sample.

Conclusions: In our sample of critically ill patients TLR4 polymorphisms and *BAFFR*-P21R predicted a lower probability of ICU-acquired sepsis and *TACI*-C104R polymorphism was an independent predictor of ICU mortality. Innate and adaptive immunity genetic polymorphisms may influence the outcome of critically ill patients.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σήψη είναι η συχνότερη αιτία θανάτου σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Θεωρείται ως κλινική εκδήλωση μιας εκτεταμένης και δυσχερώς ελεγχόμενης ανοσολογικής απάντησης¹. Γενετικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκβαση των σηπτικών ασθενών επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το γενετικό τους υπόστρωμα. Η πρώτη παρατήρηση, προερχόμενη από την Danish Adoption Register, ήταν ότι αν ένας βιολογικός γονιός είχε πεθάνει από λοίμωξη πριν την ηλικία των 50 ετών, το παιδί του είχε περίπου εξαπλάσιο σχετικό κίνδυνο να πεθάνει από λοίμωξη². Αργότερα, μελέτες σε διδύμους έδειξαν ότι οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι εμφάνιζαν συχνότερα από τους διζυγωτικούς ταυτόχρονη προσβολή από φυματίωση, λέπτρα, πολιομυελίτιδα και ηπατίτιδα Β³, ενώ σε ασθενείς με ελονοσία βρέθηκε ότι ορισμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί, όπως οι θαλασσαιμίες α και β, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η έλλειψη G-6-PD κ.ά., συνοδεύονται από αντίσταση στη νόσο⁴.

Η διερεύνηση της συσχέτισης γενετικών πολυμορφισμών με την εμφάνιση και την κλινική βαρύτητα διαφόρων λοιμώξεων και της σήψης γενικότερα συνεχίζεται και αφορά σε διάφορα μόρια που συμμετέχουν στην εκδήλωση του σηπτικού συνδρόμου⁵. Η πρωτογενής απάντηση στη σήψη διενεργείται μέσω των *φλεγμονωδών (proinflammatory) κυτταροκινών*, όπως ο TNF (tumor necrosis factor) και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), που με τη σειρά τους επάγουν άλλες δευτερογενείς φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-6, IL-8) καθώς και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο ανταγωνιστής των υποδοχέων IL-1 (IL-1ra) και η IL-10. Ως τριτογενείς διαβιβαστές δρουν άλλοι παράγοντες, όχι μόνο κυτταροκίνες, αλλά και πρωτεάσες, παράγοντες πήξης, κινίνες, εικοσανοειδή, οξείδιο του αζώτου και άλλες ουσίες που συμμετέχουν σε διάφορα στάδια του καταρράκτη της σήψης. Οι *αντιφλεγμονώδεις διαβιβαστές* έχουν σημαντικές δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, προκαλώντας μια κατάσταση ανοσοκαταστολής στον σηπτικό ασθενή, που συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-10, IL-1ra) στο αίμα, ελαττωμένη έκφραση των μορίων HLA II στην επιφάνεια των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων/μακροφάγων και διαταραγμένη απάντηση των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος στο λιποπολυσακχαρίδιο (LPS). Η κατάσταση αυτή έχει ονομαστεί *ανοσοπαράλυση*.

Όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανοσιακή απόκριση είναι δυνάμει καθοριστικά της ιδιαίτερης για κάθε ασθενή απάντησης στη σήψη. Τα περισσότερα γονίδια που φέρονται να σχετίζονται με το *σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)* εδράζονται στην ιδιαίτερα πολυμορφική περιοχή του χρωμοσώματος 6, γνωστή ως *μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC)*. Τα μέλη της οικογένειας των κυτταροκινών έχουν διατηρηθεί στην πορεία της εξέλιξης. Υπάρχουν λίγοι γενετικοί πολυμορφισμοί και η σημασία τους στη σήψη δεν έχει πλήρως εξηγηθεί⁶. Τα μόρια που έχουν μελετηθεί είναι⁶:

- η ομάδα TNF (tumor necrosis factor). Ο TNF α και ο TNF β συνδέονται με τους ίδιους υποδοχείς και προκαλούν παρόμοιες αλλά και διαφορετικές βιολογικές απαντήσεις. Τα γονίδια που κωδικοποιούν και τους δύο παράγοντες βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, στην περιοχή MHC του χρωμοσώματος 6.
- οι *pattern recognition receptors (PPRs)*, που είναι οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τον κίνδυνο. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι *toll-like receptors (TLRs)*. Οι PPRs αναγνωρίζουν μικροβιακά προϊόντα με συγκεκριμένη δομή (pathogen-associated microbial patterns, PAMPs), όπως το λιποπολυσακχαρίδιο των gram-αρνητικών μικροβίων, το λιπoteichoϊκό οξύ και οι πεπτιδογλυκάνες των gram-θετικών μικροβίων και τα ζυμογόνα των μυκήτων.
- ο *NF- κ B* που ενεργοποιείται κατά τη σύνδεση των PAMPs με τους PPRs. Αποτελεί σημαντική ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που μετακομίζει στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών.
- ο *ιστικός παράγοντας (tissue factor)* που παράγεται μετά από άμεση κυτταρική βλάβη και προσκόλληση ουδετεροφίλων. Ο ιστικός παράγοντας ενεργοποιεί τον καταρράκτη της πήξης με αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβίνης και την εναπόθεση ινικής, φαινόμενα που ενεργοποιούν περαιτέρω τη φλεγμονώδη διαδικασία.

Μελέτες γενετικής συσχέτισης σε ασθενείς ΜΕΘ

Οι κυριότερες μελέτες γενετικής συσχέτισης που αφορούν σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ συνοψίζονται στον πίνακα 1α⁷⁻³⁶, ενώ στον πίνακα 1β συνοψίζονται οι μελέτες που αφορούν σε πολυτραυματίες που νοσηλεύονταν σε κέντρα τραύματος και σε ασθενείς με σοβαρό έγκαυμα που νοσηλεύονταν σε μονάδες εγκαυμάτων³⁷⁻⁴⁸. Στις μελέτες αυτές εξετάζονται συνήθως *μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs)*, που χαρακτηρίζονται από αλλαγή μίας μόνο βάσης, αλλά συχνά διερευνάται περαιτέρω και τυχόν συσχέτιση συγκεκριμένων απλοτύπων με την εμφάνιση και τη βαρύτητα του σηπτικού συνδρόμου και την έκβαση των ασθενών στη ΜΕΘ. Ο συνηθέστερος σχεδιασμός αυτών των μελετών είναι ο προσδιορισμός του επιπολασμού των μελετώμενων πολυμορφισμών στους ασθενείς ΜΕΘ και η σύγκριση με τον αντίστοιχο επιπολασμό σε δείγματα υγιών μαρτύρων προερχόμενων από τον ίδιο πληθυσμό. Στη συνέχεια, πολλές μελέτες παρακολουθούν προοπτικά (ή αναδρομικά) τους ασθενείς με καταληκτικά σημεία την έκβαση ή/και την εμφάνιση σηπτικού επεισοδίου, ενώ μπορεί να καταγράφουν ταυτόχρονα την ένταση της ανοσιακής απάντησης στο σηπτικό ερέθισμα με την ποσοτική μέτρηση κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσης κ.ά και τη βαρύτητα του σηπτικού επεισοδίου, όπως αυτή αντανακλάται στον βαθμό της συνοδού πολυοργανικής δυσλειτουργίας.

Πίνακας 1α. Μελέτες γενετικής συσχέτισης σε ασθενείς ΜΕΘ

Συγγραφέας	Παράγοντας	n	Αποτελέσματα
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕΘ			
Kothari 2013 ⁷	TNFα	278	Συσχέτιση με σήψη/σηπτικό shock
Watanabe 2012 ⁸	TNFα	1057	Συσχέτιση με θνητότητα
Kotsaki 2012 ⁹	TNFα	213	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Song 2012 ¹⁰	TNFα, TNFβ (LTa), TNFRSF1A, TNFRSF1B	1440	Συσχέτιση με σήψη
Song 2012 ¹¹	IRAK1, IRAK4, TRAF6, MyD88	548	Συσχέτιση με σήψη
Paskulin 2011 ¹²	TNFα	520	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Shimada 2011 ¹³	TNFα, LTA, IL-1β, IL-6, IL-10, MIF, CD14, PC	123	Συσχέτιση με θνητότητα
Surbatovic 2010 ¹⁴	TNFα, IL-10, CD14, IL-1ra	106	Αρνητική συσχέτιση με θνητότητα
Papachan 2009 ¹⁵	TLR4, MIF, TNFα, TNFβ (LTa)	233	Συσχέτιση με θνητότητα
Woehrle 2008 ¹⁶	TLR2	325	Δεν βρέθηκε συσχέτιση με σήψη
García-Segarra 2007 ¹⁷	PAI-1, TNF	224	Συσχέτιση με θνητότητα
Watanabe 2005 ¹⁸	IL-6, IL-1β, TNFα, TNFβ, IL-1ra	263	Συσχέτιση με σηπτικό shock
Nakada 2005 ¹⁹	TLR4, TNFα, IL-10, CD14	411	Συσχέτιση με θνητότητα
Gordon 2004 ²⁰	TNFRSF1a, TNFRSF1B	213	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Rauchschwalbe 2004 ²¹	TNFβ (LTa)	85	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Calvano 2003 ²²	TNFα	44	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Schröder 2000 ²³	TNFβ	181	Αρνητική συσχέτιση με θνητότητα
Tang 2000 ²⁴	TNFα	112	Συσχέτιση με σηπτικό shock
Mira 1999 ²⁵	TNFα	176	Συσχέτιση με σηπτικό shock
Fang 1999 ²⁶	TNFβ, IL-1b, IL-1ra	93	Συσχέτιση με θνητότητα
Schroeder 1999 ²⁷	HSP70, TNFβ	197	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Stuber 1996 ²⁸	TNFβ	40	Συσχέτιση με θνητότητα
Stuber 1996 ²⁹	TNFα, TNFβ	233	Αρνητική συσχέτιση με θνητότητα
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕΘ			
Azevedo 2012 ³⁰	TNFα, LTA	490	Αρνητική συσχέτιση για θάνατο από σήψη
Phumeetham 2012 ³¹	TNFα		Δεν βρέθηκε συσχέτιση
ΠΡΩΡΑ ΝΕΟΓΝΑ			
Abu-Maziad 2012 ³²	IL-6, IL-10, IL-1β, TNFα, IL-1RN, TLR2, TLR4, TLR5, CD14	535	Συσχέτιση με σήψη
Schueller 2006 ³³	TNFα, TNFβ	169	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Hedberg 2004 ³⁴	TNFα	173	Συσχέτιση με θάνατο από σήψη
Treszl 2003 ³⁵	TNFα, IL-1β, IL-4ra, IL-6, IL-10	103	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Weitkamp 2000 ³⁶	TNFβ	23	Δεν βρέθηκε συσχέτιση

Πίνακας 2β. Μελέτες γενετικής συσχέτισης σε ασθενείς με τραύμα/έγκαυμα

Συγγραφέας	Παράγοντας	n	Αποτελέσματα
ΤΡΑΥΜΑΤΙΕΣ			
Zhao 2013 ³⁷	HSP90	142	Δεν βρέθηκε συσχέτιση
Chen 2012 ³⁸	TLR9	557	Συσχέτιση με σήψη
Chen 2010 ³⁹	TLR4	682	Συσχέτιση με σήψη
Duan 2011 ⁴⁰	TNFα, TNFβ	36	Συσχέτιση με σήψη
Menges 2008 ⁴¹	TNFα	159	Συσχέτιση με σήψη
McDaniel 2007 ⁴²	IL6, IL-10, IL-18, TNFα	186	Συσχέτιση με σήψη
Majetshak 2002 ⁴³	TNFα, TNF β	70	Συσχέτιση με σοβαρή σήψη
Majetshak 1999 ⁴⁴	TNFβ	110	Συσχέτιση με σοβαρή σήψη
ΕΓΚΑΥΜΑΤΙΕΣ			
Shalhub 2009 ⁴⁵	TNFα, TLR4, IL-6 IL-1b , CD14	69	Συσχέτιση με θνητότητα
Lin 2006 ⁴⁶	CD14	26	Αρνητική συσχέτιση με σήψη/θνητότητα
Barber 2006 ⁴⁷	TNFα, IL-1β , IL-6, TLR4 , CD14	228	Συσχέτιση με σήψη
Barber 2004 ⁴⁸	TNFα, TLR4	159	Συσχέτιση με σοβαρή σήψη

TNFα

Ο TNFα κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια του σηπτικού συνδρόμου, παράγεται από τα μονοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και φαίνεται ότι τα επίπεδά του στον ορό συσχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου. Η γενετική ποικιλότητα των επιτόπων του TNFα μέσα στο χρωμόσωμα 6 έχει μελετηθεί περισσότερο από τις άλλες κυτταροκίνες σε ασθενείς με σήψη. Ο περισσότερο μελετημένος πολυμορφισμός σε ασθενείς ΜΕΘ είναι ο G-308A, που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση G από A στη θέση 308, όμως υπάρχουν μελέτες και για άλλους πολυμορφισμούς, όπως οι G-376A^{7,9}, G-238A^{7,9,10,24}, G+489⁷, C-863A¹⁰, T-1031C¹⁰ και G-857A¹⁰.

Οι Stuber et al²⁸ διερεύνησαν την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFα-G308A με την εμφάνιση σοβαρής μετεγχειρητικής σήψης σε ασθενείς που εισήχθησαν σε χειρουργική ΜΕΘ. Δεν βρήκαν διαφορά στη συχνότητα των αλληλίων μεταξύ υγιών αιμοδοτών και ασθενών με σοβαρή μετεγχειρητική σήψη. Επιπλέον, δεν βρήκαν διαφορά στη συχνότητα των αλληλίων μεταξύ των ασθενών με σοβαρή σήψη που επέζησαν και αυτών που απεβίωσαν. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μελέτης ήταν η ικανοποιητική εξομοίωση ασθενών και μαρτύρων ως προς τη βαρύτητα νόσου και η εθνολογική ομοιογένεια (όλοι οι ασθενείς ήταν λευκοί Γερμανοί από την ίδια περιοχή). Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι οι ομάδες των ασθενών με διαφορετικούς γονοτύπους δεν διέφεραν σημαντικά ως προς τα επίπεδα TNFα στον ορό *in vivo* ή μετά από *in vitro* διέγερση μονοκυττάρων με ενδοτοξίνη. Οι ίδιοι ερευνητές διενήργησαν μελέτη διαμόλυνσης (transfection), για να εξετάσουν την ποικιλότητα των αλληλίων στην επαγωγική περιοχή του TNFα-G308A. Η

αλλαγή G σε A δεν επηρέασε την προκαλούμενη από την ενδοτοξίνη επαγωγική δραστηριότητα.

Οι Mira et al²⁵ μελέτησαν τον πολυμορφισμό *TNFα*-G308A σε 87 ασθενείς που εισήχθησαν στη ΜΕΘ με διάγνωση σηπτικό shock και σε ισάριθμους μάρτυρες (υγείς αιμοδότες). Βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός εμφανίζει αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με σηπτικό shock συγκριτικά με τους μάρτυρες (39% vs. 18%, αντίστοιχα, $p=0,002$). Επιπλέον, μεταξύ των ασθενών με σηπτικό shock, η συχνότητα του πολυμορφισμού ήταν μεγαλύτερη σε αυτούς που κατέληξαν συγκριτικά με αυτούς που επιβίωσαν (52% vs. 24%, αντίστοιχα, $p=0,008$). Με διόρθωση ως προς την ηλικία και τη βαρύτητα νόσου οι ασθενείς με τον πολυμορφισμό *TNFα*-G308A είχαν 3,7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από αυτούς με το συνηθισμένο αλληλίο. Ένα μειονέκτημα αυτής της μελέτης ήταν ότι δεν έγινε διαστρωμάτωση ή εξομοίωση των ασθενών ως προς την εθνικότητα. Επιπρόσθετα, η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε το εύρημα των Stuber et al²⁹ σχετικά με την απουσία διαφοράς στα επίπεδα *TNFα* ορού μεταξύ των ομάδων με τα διαφορετικά αλληλία.

Οι Tang et al²⁴ μελέτησαν ασθενείς χειρουργικής ΜΕΘ με σηπτικό shock και δεν βρήκαν διαφορά στη συχνότητα του *TNFα*-G308A μεταξύ αυτών που επέζησαν και αυτών που απεβίωσαν. Όμως στην υποομάδα των ασθενών με σηπτικό shock, η θνητότητα στους ασθενείς που είχαν τον πολυμορφισμό ήταν σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς (92% vs. 62% αντίστοιχα, $p<0,05$). Επιπλέον, τα επίπεδα *TNF-α* στον ορό των ασθενών με τον πολυμορφισμό ήταν σημαντικά υψηλότερα. Βέβαια στη μελέτη αυτή δεν αναφερόταν η εθνικότητα των ασθενών, ούτε αν είχε γίνει διόρθωση ως προς τους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες.

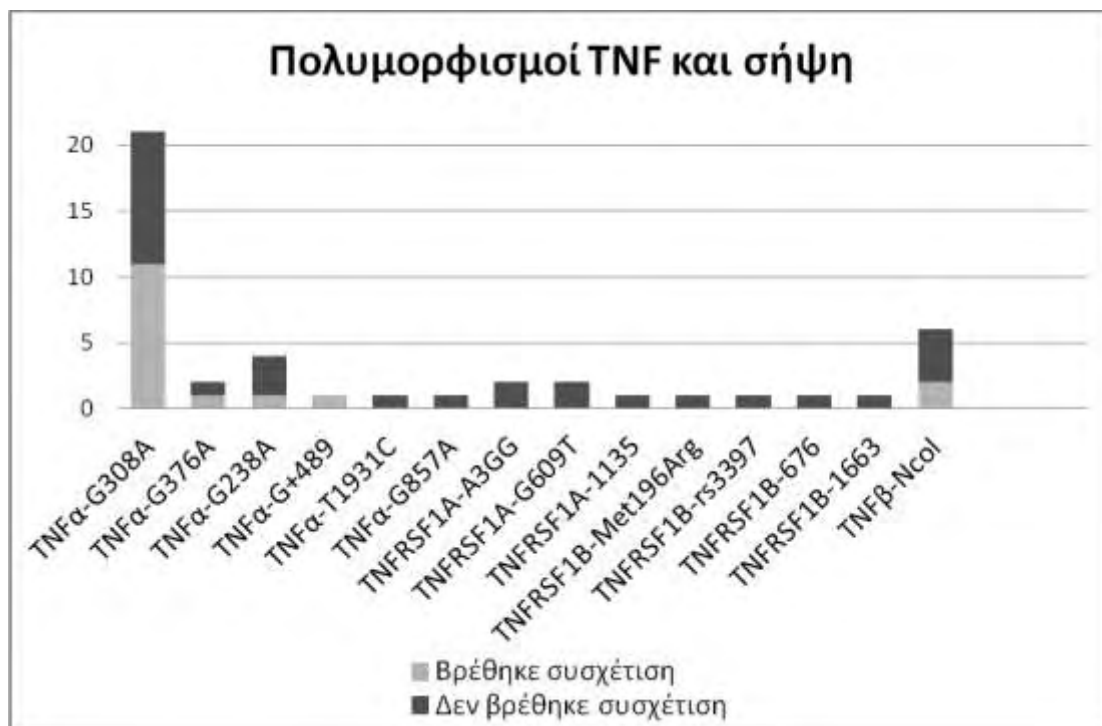
Για τον πολυμορφισμό *TNFα*-G308A υπάρχουν αρκετές μελέτες σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς που επιβεβαιώνουν ότι συσχετίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σήψης στη ΜΕΘ^{7,10,18,23,24,26,35-39} και άλλες που δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση^{9,11,16,21,32,37,42,43,45} (γράφημα 1). Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με την έκβαση των ασθενών στη ΜΕΘ (γράφημα 2). Αρκετές από τις μελέτες βρήκαν ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον θάνατο στη ΜΕΘ^{8,12,13, 23,24,26,35,37,41, 44} ενώ υπάρχουν και μελέτες που δεν βρήκαν συσχέτιση^{11,16,18,38,39}. Σε μία μόνο μελέτη βρέθηκε αρνητική συσχέτιση του ελάσσονος αλληλίου του πολυμορφισμού G-308A με τη θνητότητα¹⁴. Στη μελέτη αυτή, οι Surbatovic et al διερεύνησαν μεταξύ άλλων τη συσχέτιση του πολυμορφισμού *TNFα*-G308A με την έκβαση 106 ασθενών ΜΕΘ. Οι ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο A του πολυμορφισμού είχαν μηδενική θνητότητα στη ΜΕΘ, ενώ οι ομοζυγώτες για το κοινό αλληλίο και οι ετεροζυγώτες είχαν σχετικό κίνδυνο θανάτου 1,93 και 3,25 αντίστοιχα¹⁴. Δεν παρατίθεται πολυμεταβλητή ανάλυση με διόρθωση ως προς πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες (ηλικία, αιτία εισαγωγής, APACHE II score εισαγωγής κλπ.), έτσι το εύρημα θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με επιφύλαξη.

Μια πρόσφατη μελέτη από την Ινδία⁷ διερεύνησε τη συσχέτιση τεσσάρων πολυμορφισμών του *TNFα* (G-308A, G-376A, G-238A και G+489) σε 278 ασθενείς ΜΕΘ και

111 μάρτυρες. Παράλληλα μετρήθηκαν τα επίπεδα του TNFα στον ορό σε διαδοχικές μετρήσεις. Η συχνότητα των ελασσόνων αλληλίων και για τους τέσσερις πολυμορφισμούς ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που εμφάνισαν σήψη ή σηπτικό shock συγκριτικά με τους μάρτυρες, ενώ για τον πολυμορφισμό G-308A, αντίστοιχη διαφορά συγκριτικά με τους μάρτυρες σημειώθηκε και στην ομάδα των ασθενών με SIRS. Τα επίπεδα TNFα στον ορό στις υποομάδες του SIRS, της σήψης και του σηπτικού shock ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που απεβίωσαν συγκριτικά με αυτούς που επέζησαν.

TNFβ

Σε αντίθεση με τον TNFα που εκφράζεται στα μακροφάγα, ο TNFβ εκφράζεται και εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και στη βιβλιογραφία πλέον φαίνεται να επικρατεί η ονομασία *λεμφοτοξίνη-α* (*lymphotoxin-α*, *LTα*). Έχει περιγραφεί ένας πολυμορφισμός στη θέση 252 με γουανίνη (*TNFβ-252G*) στο ένα αλληλίο και αδενίνη (*TNFβ-252A*) στο άλλο⁴⁹. Ο πολυμορφισμός αυτός αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως *TNFβ-NcoI* ή *TNFα-promoter-NcoI*. Έχουν δημοσιευτεί μελέτες που διερευνούν την πιθανή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού TNFβ-NcoI και της έκβασης σοβαρού σηπτικού επεισοδίου.

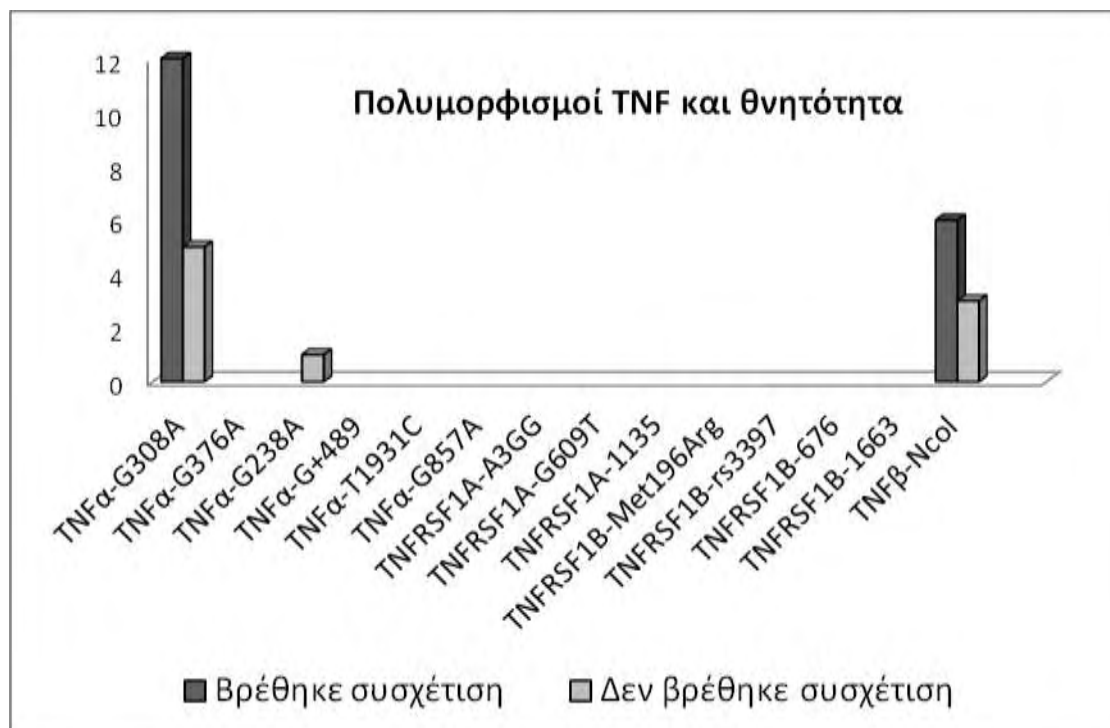


Γράφημα 1. Μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση πολυμορφισμών της ομάδας του TNF με την εμφάνιση σήψης σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο αριθμός των μελετών.

Οι Stuber et al σύγκριναν ασθενείς που κατέληξαν μετεγχειρητικά από σοβαρό σηπτικό επεισόδιο με ασθενείς που επιβίωσαν και βρήκαν ότι το 65% των ασθενών που κατέληξαν ήταν ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFβ-NcoI*, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους επιβιώσαντες ήταν 12% ($p < 0,005$)²⁹. Οι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό *TNFβ-NcoI*

είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις TNFα στον ορό και μεγαλύτερα σκορ ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων συγκριτικά με τους άλλους γονοτύπους. Οι ασθενείς είχαν εξομοιωθεί ως προς την ηλικία και τη βαρύτητα νόσου και προέρχονταν από την ίδια εθνότητα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μια άλλη μεγάλη μελέτη της ίδιας ομάδας²⁸.

Σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση της έκβασης ασθενών με κλειστό τραύμα με τον πολυμορφισμό *TNFβ-NcoI*⁴³. Η γονοτυπική συχνότητα διέφερε σημαντικά στους ασθενείς που είχαν μη επιπλεγμένη κλινική πορεία συγκριτικά με εκείνους που μετατραυματικά εμφάνισαν σοβαρή σήψη. Μετά από διόρθωση ως προς την ηλικία και τη βαρύτητα της κάκωσης, οι ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για τον *TNFβ-NcoI* είχαν 3,5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου συγκριτικά με τους ετεροζυγώτες, καθώς και υψηλότερα επίπεδα TNFα στον ορό. Οι συγγραφείς αυτής της μελέτης διατυπώνουν την υπόθεση ότι η ομόζυγη κατάσταση για το αλληλίο *TNFβ-252A* αποτελεί δείκτη υψηλής πιθανότητας σήψης σε ασθενείς με αμβλύ τραύμα, αν και τονίζουν ότι ο πολυμορφισμός μπορεί να μην συσχετίζεται άμεσα με την προδιάθεση για σήψη, αλλά να συνδέεται με κάποιο άλλο γονίδιο της περιοχής MHC⁴³.



Γράφημα 2. Μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών της ομάδας TNF με τη θνητότητα σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο αριθμός των μελετών.

Οι Watanabe et al¹⁸ μελέτησαν ασθενείς ΜΕΘ με SIRS και βρήκαν ότι η παρουσία του ελάσσονος αλληλίου του *TNFβ-NcoI* συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης σηπτικού shock, αλλά όχι με μεγαλύτερη θνητότητα.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση σχετικά με διαφορετική επίδραση του πολυμορφισμού *TNFβ-NcoI* στην έκβαση σηπτικών ασθενών ΜΕΘ ανάλογα με το φύλο έκαναν οι Schröder et al²³ σε μια μελέτη τους σε 201 ασθενείς ΜΕΘ (68 γυναίκες και 133

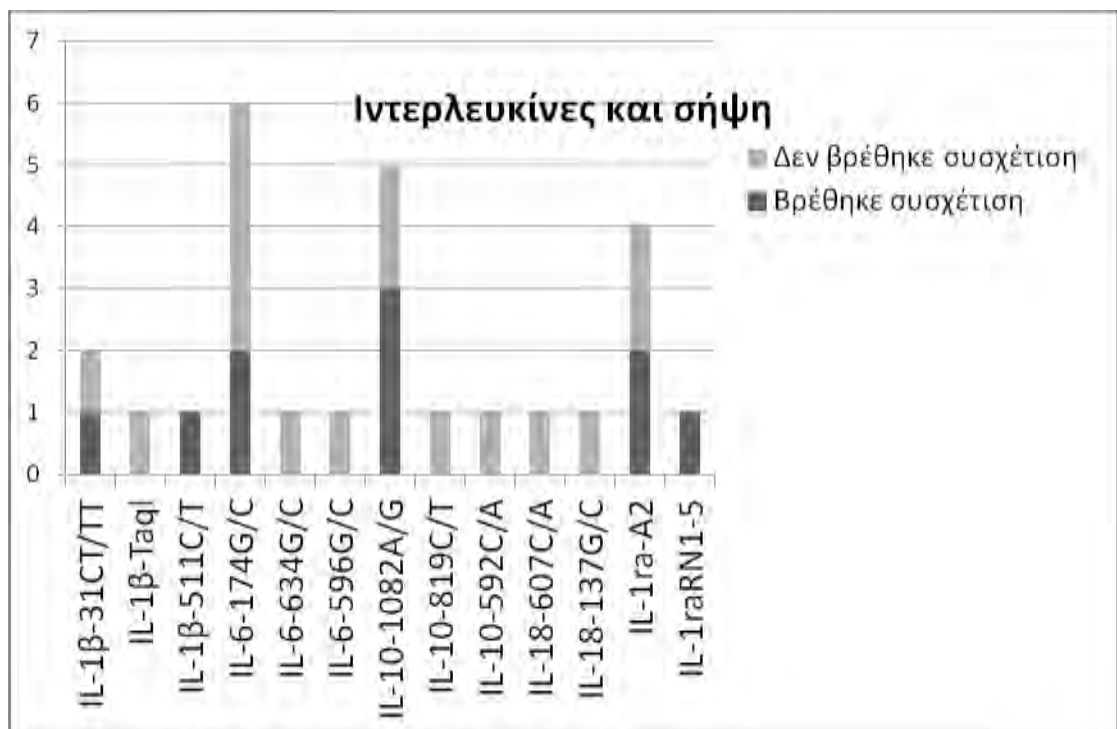
άνδρες). Στη μελέτη αυτή, οι ομοζυγώτες του ελάσσονος αλληλίου B2 είχαν και στα δύο φύλα τη μεγαλύτερη θνητότητα, όμως στους άνδρες υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας αυτής τόσο με τους ετεροζυγώτες B1/B2 όσο και με τους ομοζυγώτες, ενώ στις γυναίκες οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει την ύπαρξη κάποιου είδους φυλετικού διμορφισμού στην επίδραση του πολυμορφισμού στη σήψη, σίγουρα όμως απαιτούνται περισσότερα δεδομένα, για να αποδειχθεί μια τέτοια αλληλεπίδραση.

Ιντερλευκίνες

Αποτελούν ομάδα κυτταροκινών, οι περισσότερες εκ των οποίων παράγονται από τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και από μακροφάγα, μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι πολυμορφισμοί των ιντερλευκινών και ο ρόλος τους σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί ιντερλευκινών συσχετίζονται με την εμφάνιση σήψης (γράφημα 3), ενώ για τη θνητότητα τα δεδομένα είναι μάλλον φτωχά (γράφημα 4).

Ιντερλευκίνη-1 (IL-1)

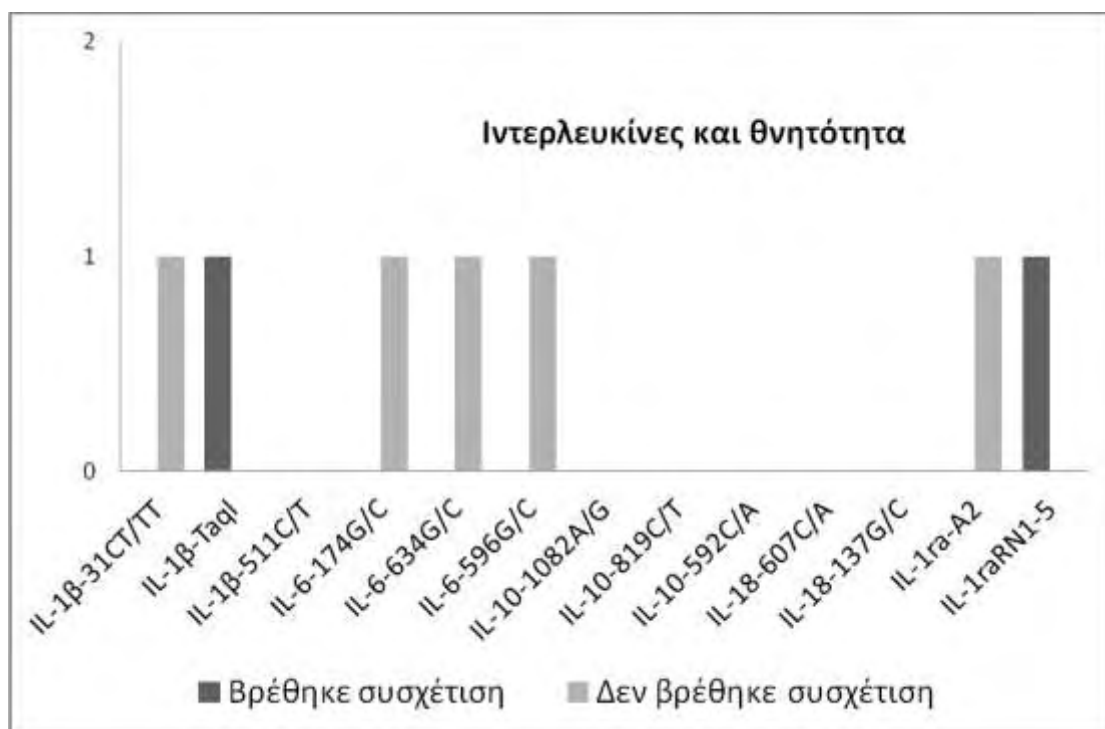
Η IL-1 συμμετέχει στη φλεγμονή αυξάνοντας στον ορό τις συγκεντρώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, των προσταγλανδινών και του NO, ουσιών με ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση που προκαλούν shock σε πειραματικά μοντέλα ζώων. Υπάρχει ένας φυσικός αναστολέας της IL-1, ο IL-1ra, που ανταγωνίζεται την IL-1 στη σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς επιφάνειας.



Γράφημα 3. Μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών των ιντερλευκινών με την εμφάνιση σήψης σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο αριθμός των μελετών.

Έχει ανιχνευτεί μια πολυμορφική περιοχή με έξι διαφορετικά αλληλία στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου IL-1ra. Το αλληλίο IL-1raA2 συνδέεται με αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης IL-1ra και μειωμένη παραγωγή IL-1α από τα μονοκύτταρα⁵⁰. Το αλληλίο IL-1raA2 ανιχνεύεται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με σοβαρή σήψη συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα. Γι' αυτό έχει μελετηθεί ως γενετικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση σήψης^{50, 51}, μολονότι δεν φαίνεται να συσχετίζεται με χειρότερη έκβαση⁵¹. Στη μελέτη των Fang et al, η συχνότητα των αλληλίων σε υγιείς μάρτυρες ήταν 54% για το IL-1raA1 και 34% για το IL-1raA2, ενώ τα υπόλοιπα αλληλία ήταν πολύ πιο σπάνια²⁶. Στη μελέτη αυτή, η συνύπαρξη των γονοτύπων TNF-β2 και IL-1raA2 συσχετίστηκε με 100% θνητότητα από σήψη, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή σημαντική αλληλεπίδραση του TNF-α με τον IL-1ra²⁶.

Οι πολυμορφισμοί της IL-1β που έχουν μελετηθεί σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς είναι ο IL-1β-511C/T, ο IL-1β-31CT/TT και ο IL-1β-TaqI. Στη μελέτη των Watanabe et al¹⁸ που αφορούσε σε ασθενείς MEΘ με SIRS, ο πολυμορφισμός 511C/T φαινόταν να κληρονομείται συνδεδεμένος (linkage disequilibrium) με τον πολυμορφισμό IL-1raRN-5. Στη μελέτη αυτή οι φορείς του ελάσσονος αλληλίου του πολυμορφισμού -511C/T είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σηπτικού shock συγκριτικά με τους ομοζυγώτες του κοινού αλληλίου.



Γράφημα 4. Μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών των ιντερλευκινών με τη θνητότητα σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο αριθμός των μελετών.

Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

Η IL-6 είναι μια σημαντική φλεγμονώδης κυτταροκίνη που συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης shock και αυξημένη θνητότητα σε σηπτικούς ασθενείς. Έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός με αντικατάσταση G με C στη θέση 174 της επαγωγικής περιοχής του γονιδίου IL-6 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7⁵². Σε μια μελέτη επί ασθενών με σοβαρό

έγκαυμα, ο πολυμορφισμός G-174C συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα σοβαρής σήψης⁴⁷, αλλά η συσχέτιση αυτή δεν ανευρίσκεται σταθερά σε άλλους πληθυσμούς βαρέως πασχόντων ασθενών^{18, 32, 35,42}.

Σε μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε έξι μελέτες σε πρόωρα νεογνά (n=1323), ο πολυμορφισμός G-174C δεν φάνηκε να αυξάνει τον κίνδυνο σήψης⁵³.

Άλλος λιγότερο μελετημένος πολυμορφισμός είναι ο -596G/C που δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση σήψης ή τη θνητότητα¹⁸.

Ιντερλευκίνη 10 (IL-10)

Η IL-10 είναι αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Παράγεται από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. Μειώνει την παραγωγή της ιντερφερόνης- γ , των ιντερλευκινών IL-1, IL-6 και του TNF- α . Η μεταβολή του λόγου IL-6:IL-10 σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς προδιαθέτει σε κακή έκβαση του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης⁵⁴. Οι πολυμορφισμοί της επαγωγικής περιοχής *IL-10-592C/A* και *IL-10-819C/T* που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 1 συσχετίζονται με μικρότερη παραγωγή IL-10 και καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με ηπατίτιδα C στη θεραπεία με ιντερφερόνη- α συγκριτικά με τους άλλους απλοτύπους⁵⁵.

Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να διερευνούν το ρόλο των πολυμορφισμών της IL-10 σε ασθενείς ΜΕΘ. Σε πρόωρα νεογνά φαίνεται να υπάρχει μια οριακή συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης σήψης από gram-αρνητικά βακτήρια³², όμως άλλες μελέτες σε νεογνά δεν έχουν αντίστοιχες συσχετίσεις³⁵. Σε ενήλικες ασθενείς ΜΕΘ, η ομόζυγη κατάσταση του ελάσσονος αλληλίου -1082G φάνηκε να συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο gram-αρνητικής σήψης, ενώ η ομόζυγη κατάσταση του κοινού αλληλίου -1082A με αυξημένο κίνδυνο gram-θετικής σήψης¹⁴.

Heat shock proteins (HSPs)

Οι HSPs εκφράζονται ως απάντηση στο θερμικό shock καθώς και σε άλλα ερεθίσματα, όπως η ενδοτοξίνη και άλλοι μεταβιβαστές της σήψης. Στην περιοχή III του MHC υπάρχουν τρία γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας HSP (HSP70). Οι φορείς του πολυμορφισμού HSP70-2G είχαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA *ex-vivo*. Οι Schroder et al²³ διερεύνησαν την υπόθεση της μεγαλύτερης θνητότητας από σήψη των φορέων του αλληλίου HSP70-2G σε ασθενείς που εισήχθησαν με σοβαρή σήψη σε χειρουργική ΜΕΘ, αλλά δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση. Βρήκαν μια σύνδεση μεταξύ HSP70-2G («προστατευτικό αλληλίο») και του ελάσσονος αλληλίου του πολυμορφισμού *TNF β 2-NcoI*. Η συνολική θνητότητα στην ομάδα των ομοζυγών για το αλληλίο HSP70-2G δεν ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των υπόλοιπων ασθενών. Φαίνεται ότι μεγαλύτερη σημασία έχει η κατανόηση των σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ όλων των πολυμορφισμών που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απάντηση, παρά η μεμονωμένη ερμηνεία του ρόλου κάθε πολυμορφισμού.

CD-14

Το μόριο CD-14 συμμετέχει στην αναγνώριση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) των gram-αρνητικών μικροβίων και στην απάντηση σε αυτά. Ο υποδοχέας CD-14 των μονοκυττάρων είναι σημαντικός μεταβιβαστής στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων από τις ενδοτοξίνες των gram-αρνητικών μικροβίων. Η ενζυμική απόσπαση του μεμβρανικού CD-14 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός διαλυτού CD-14 τμήματος, το οποίο δεσμεύει την κυκλοφορούσα ενδοτοξίνη, μειώνοντας τη βιολογική της δράση. Ο μεμβρανικός υποδοχέας CD-14 ενισχύει την επαγόμενη από την ενδοτοξίνη μετάδοση σήματος (signal transduction) που γίνεται μέσω του TLR4.

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου CD-14 (χρωμόσωμα 5) είναι δυνατό να μεταβάλουν τη φλεγμονώδη απάντηση. Πρόσφατα ανιχνεύτηκε ένας πολυμορφισμός του CD-14 που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση κυτοσίνης με θυμίνη στη θέση 159 της επαγωγικής περιοχής στο σημείο έναρξης της μεταγραφής. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα του διαλυτού CD-14⁵⁶. Οι ομοζυγώτες έχουν υψηλότερα επίπεδα διαλυτού CD-14 στο αίμα. Η διέγερση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος στους ομοζυγώτες συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης-γ.

Toll-like receptors (TLRs)

Οι TLRs αποτελούν ένα λειτουργικό σύστημα της φυσικής ανοσίας που έχει ως ρόλο την αναγνώριση ειδικών δομών (patterns) στο μόριο των μικροβίων, που είναι κοινές σε συγκεκριμένες κατηγορίες μικροβίων (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Οι διαφορετικοί TLRs αναγνωρίζουν διαφορετικές μικροβιακές δομές κι έτσι το σύστημα των TLRs αναγνωρίζει τα περισσότερα είδη μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα, μύκητες⁵⁷. Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί πάνω από 10 TLRs.

Οι πολυμορφισμοί των TLRs και ο ρόλος τους σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς δεν έχουν μελετηθεί αρκετά. Υπάρχουν μελέτες για πολυμορφισμούς του TLR2, του TLR9 και κυρίως του TLR4.

TLR2

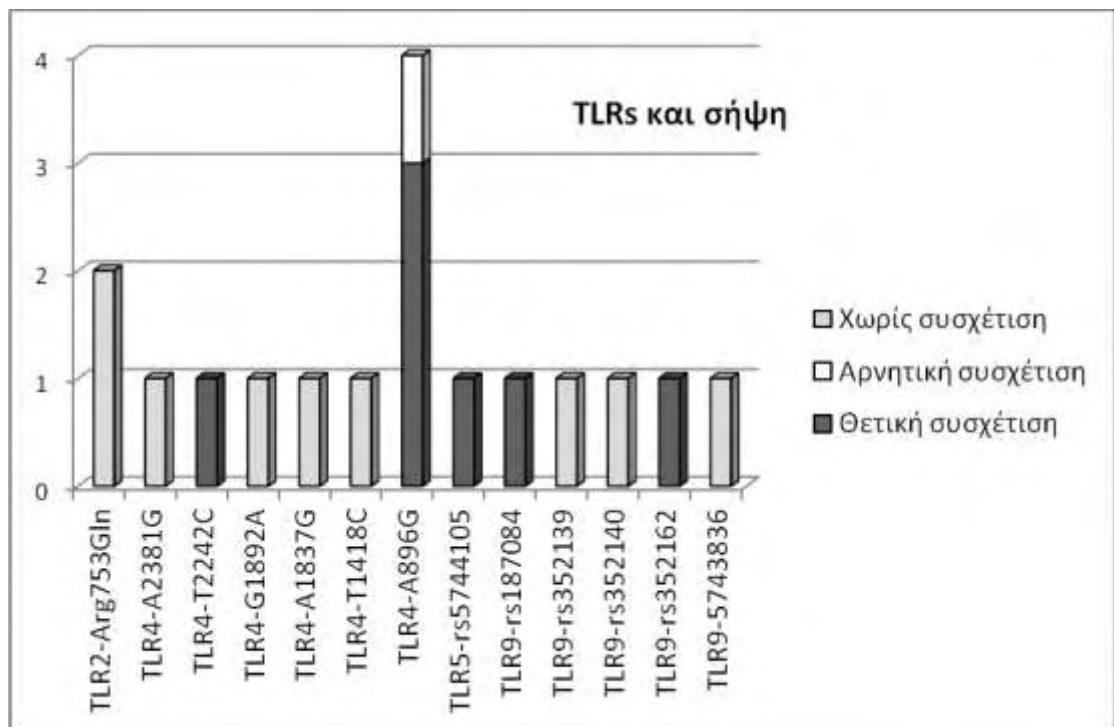
Ο TLR2 είναι ένας υποδοχέας σηματοδότησης που απαντά επίσης στην ενδοτοξίνη και ενεργοποιεί τον NF-κΒ⁵⁸. Συνδέεται με τον CD-14 και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα-υποδοχέα της ενδοτοξίνης. Στο σύμπλεγμα αυτό συνδέεται η κινάση του υποδοχέα της IL-1. Πολυμορφισμοί του TLR2 που χαρακτηρίζονται από ενδοκυττάρια διαγραφή, συνοδεύονται από διαταραγμένη σηματοδότηση στην ενδοτοξίνη⁵⁸.

Οι Mira et al επιχείρησαν να μελετήσουν πιθανές συσχετίσεις των πολυμορφισμών Arg753Gln και Arg677Trp με δείκτες ανοσιακής απάντησης (επίπεδα κυτταροκινών) σε λοιμώξεις από gram-θετικά παθογόνα και Candida. Στις gram-θετικές λοιμώξεις η ανοσιακή απάντηση δεν διέφερε μεταξύ των φορέων του πολυμορφισμού Arg753Gln, ενώ στη σήψη από Candida οι φορείς του ελάσσονος αλληλίου είχαν μεγαλύτερα επίπεδα TNFα και

χαμηλότερα επίπεδα IFN- γ και IL-8 συγκριτικά με τους ομοζυγώτες του κοινού αλληλίου, Δυστυχώς, ο πολυμορφισμός Arg677Trp δεν ανιχνεύτηκε στο δείγμα των ασθενών της μελέτης.

TLR9

Ο TLR9 αναγνωρίζει DNA από βακτήρια, ιούς και μύκητες και η έκφρασή του αυξάνει μετά από σοβαρό τραυματισμό και στη σήψη⁵⁹. Οι Chen et al μελέτησαν πέντε πολυμορφισμούς του TLR9 σε δείγμα αποτελούμενο από 557 πολυτραυματίες. Οι τέσσερις από τους πέντε μελετηθέντες πολυμορφισμούς βρίσκονταν σε linkage disequilibrium. Δύο από τους πολυμορφισμούς συσχετίστηκαν με την εμφάνιση σήψης (γράφημα 5).



Γράφημα 5. Μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών των toll-like receptors με την εμφάνιση σήψης σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο αριθμός των μελετών.

Για τον TLR4 παρατίθενται στη συνέχεια περισσότερα στοιχεία, αφού αποτελεί ένα από τα μόρια που μελετήθηκαν στο ειδικό μέρος της διατριβής.

Toll-like receptor 4 (TLR4)

Ο TLR4 ανακαλύφθηκε περί τα τέλη της δεκαετίας '90 στο εργαστήριο του Bruce Beutler και θεωρήθηκε ως υποδοχέας που αναγνωρίζει το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS)⁶⁰, ανακάλυψη που θεωρείται μέχρι σήμερα ακρογωνιαίος λίθος στην κατανόηση της σήψης. Ο TLR4 εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα, όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα και η έκφρασή του διεγείρεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και μικροβιακά προϊόντα και καταστέλλεται από αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Στον άνθρωπο, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TLR4 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9⁶¹.

Ο TLR4 είναι ο κύριος υποδοχέας που αναγνωρίζει το LPS των gram-αρνητικών μικροβίων, ενώ αναγνωρίζει επίσης μοριακές δομές μυκοβακτηριδίων, μυκήτων, ιών και πρωτοζώων, όπως του πλασμοδίου της ελονοσίας. Επίσης, συνδέεται με ενδογενή συνδετικά μόρια, όπως οι heat-shock πρωτεΐνες, που δρουν ως «μόρια κινδύνου» (danger-associated molecular patterns) δίνοντας έτσι το έναυσμα για την έναρξη άσηπτης φλεγμονώδους διαδικασίας⁶². Έτσι, φαίνεται ότι ο TLR4 εμπλέκεται σε ποικίλες φλεγμονώδεις ή αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως το βρογχικό άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αθηρωμάτωση κ.ά.

Ο TLR4 έχει συνδεθεί με την ανοσοπαράλυση που συνοδεύει συχνά τη σήψη, αφού συμμετέχει σε πολλούς από τους μηχανισμούς που οδηγούν σε αυτή. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η απόπτωση και διαταραγμένη λειτουργία των B- και T-κυττάρων, όπου ο TLR4 δίνει το σήμα για την έναρξη της απόπτωσης απευθείας ή μέσω παραγωγής διαμεσολαβητών της απόπτωσης, όπως τα γλυκοκορτικοειδή. Επίσης, τα κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με LPS, έχουν μειωμένη ικανότητα να αντιμετωπίσουν δεύτερη προσβολή. Αυτός ο μηχανισμός ανοχής φαίνεται ότι εμπλέκει και τον TLR4⁶³. Η μειωμένη διαβιβαστική ικανότητα του TLR4 μετά από επανέκθεση σε LPS μπορεί να επηρεάσει τόσο την αναγνώριση των μικροβίων όσο και την έναρξη των μηχανισμών ανάπτυξης επίκτητης ανοσίας, με αποτέλεσμα την ανοσοπαράλυση του ασθενούς με σήψη⁶⁴.

Έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 35 πολυμορφισμοί του TLR4, αλλά οι περισσότεροι εντοπίζονται σε ιντρόνια ή δεν προκαλούν δομικές μεταβολές στο μόριο του TLR4⁶⁵. Από αυτούς, δύο μονογονιδιακοί πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίζονται στην εξωκυτταρική πλούσια σε λευκίνη περιοχή επανάληψης του TLR4 μπορούν να μεταβάλουν τη σύνδεση με τον TLR4: μια αντικατάσταση A/G στον SNP rs4986790 (896A/G) που προκαλεί αλλαγή αμινοξέων Asp/Gly στη θέση 299 του μορίου και μια αντικατάσταση C/T στον SNP rs4986791 (1196C/T) που προκαλεί αλλαγή αμινοξέων Thr/Ile στη θέση 399 του μορίου. Στο μόριο του TLR4, η μετάλλαξη Asp299Gly επηρεάζει την περιοχή πρόσδεσης του συνδετικού μορίου και η μετάλλαξη Thr399Ile την περιοχή πρόσδεσης του συνυποδοχέα⁶⁵. Οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί έχουν σημαντικές λειτουργικές συνέπειες, που αφορούν κυρίως στην επαγωγή της παραγωγής φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και υπάρχει η υπόθεση ότι επηρεάζουν τη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση στο σηπτικό shock⁶⁶ και την

ευπάθεια σε λοιμώξεις από gram-αρνητικά μικρόβια⁶⁷. Το αλληλίο *TLR4-896G* συνδέεται με διαταραχή της εξαρτώμενης από τον TLR4 σηματοδότησης από την ενδοτοξίνη⁶⁸.

Η κατανομή των SNPs του TLR4 στους πληθυσμούς της Ευρώπης παρουσιάζει ιδιαίτερο προφίλ. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση από τις μέχρι τώρα μελέτες είναι ότι οι μεταλλάξεις Asp299Gly και Thr399Ile εμφανίζονται συνδεδεμένες, ενώ οι απλότυποι που περιλαμβάνουν μόνο τη μία ή την άλλη μετάλλαξη είναι πολύ σπάνιοι⁶⁹. Αυτή η συνύπαρξη των δύο μεταλλάξεων και η συχνότητα των απλότυπων θεωρείται ως αποτέλεσμα της εξελικτικής πίεσης επιλογής που καθοδηγήθηκε ανά τους αιώνες από τις εκάστοτε λοιμώξεις, καθώς και της μετακίνησης των πληθυσμών⁶¹.

Ο ρόλος των πολυμορφισμών του TLR4 στη σήψη αποτελεί αντικείμενο της επιστημονικής έρευνας κατά την προηγούμενη και την παρούσα δεκαετία. Φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις Asp299Gly και Thr399Ile συσχετίζονται με μειωμένη απάντηση στο LPS των gram-αρνητικών βακτηρίων⁷⁰. Οι φορείς των ανωτέρω πολυμορφισμών πιθανόν να έχουν μεγαλύτερη αντίσταση στην περιορισμένη αντίδραση που προκαλείται τοπικά από την ενδοτοξίνη, έχουν όμως μεγαλύτερη προδιάθεση στην εμφάνιση συστηματικής αντίδρασης⁷⁰. Πάντως, η φαινοτυπική ετερογένεια που αντανάκλαται στο γεγονός ότι η μειωμένη αντιδραστικότητα στο LPS δεν αφορά σε όλους τους φορείς των πολυμορφισμών, υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις αυτές δρουν μαζί με άλλες γενετικές βλάβες ή επίκτητους παράγοντες, επηρεάζοντας τη σύνθετη απάντηση του οργανισμού στο LPS⁷⁰.

BAFF-receptor (BAFF-R) και transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των B-κυττάρων της οικογένειας TNF (BAFF) συμμετέχει στην ανοσολογική απάντηση μέσω των τριών υποδοχέων του: του υποδοχέα BAFF (BAFF-R), του διαμεμβρανικού ενεργοποιητή, τροποποιητή ασβεστίου και μεσολαβητή σύνδεσης της κυκλοφιλίνης (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI) και του αντιγόνου ωρίμανσης των B-κυττάρων (B cell maturation antigen, BCMA). Δύο από αυτούς τους υποδοχείς, ο TACI και το BCMA, συνδέονται στενά με μια κυτταροκίνη, τον APRIL (a proliferation-inducing ligand), που ανήκει και αυτός στην οικογένεια TNF και παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα⁷¹.

Μελέτες δείχνουν ότι ο BAFF-R είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας των παρθένων B-κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ώριμων B-κυττάρων και στην ομοίωση των περιφερικών λεμφικών οργάνων. Εκφράζεται στα παίνα και στα μνημονικά B-κύτταρα καθώς και στα κυκλοφορούντα πλασματοκύτταρα, αλλά όχι στα πλασματοκύτταρα του μυελού και του σπληνός⁷². Η έκφραση του BAFF-R αρχικά είναι αυξημένη και στη συνέχεια μειώνεται με παράλληλη επαγωγή της έκφρασης του TACI και του BCMA κατά τη

διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Ο BAFF και ο APRIL αποτελούν συνδετικά μόρια (ligands) του TACI⁷³.

Μορφολογικά, ο TACI είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III. Το εξωκυτταρικό τμήμα της περιλαμβάνει δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες χαρακτηρίζουν την οικογένεια των TNF υποδοχέων^{72, 74}. Λειτουργικά, φαίνεται ότι ο TACI εμπλέκεται στην παραγωγή και στην ισοτυπική μεταστροφή ανοσοσφαιρινών, καθώς και στη ρύθμιση της ομοιόστασης των Β-κυττάρων⁷⁵. Ο TACI εκφράζεται κυρίως στα ενεργοποιημένα Β-κύτταρα, αλλά και σε μια υποομάδα των Τ-κυττάρων και μάλιστα η έκφρασή του εμφανίζεται αυξημένη στον σπλήνα και στον θύμο⁷⁶. Επιπλέον, στον άνθρωπο ο TACI εκφράζεται στα μακροφάγα, επηρεάζοντας την επιβίωσή τους⁷⁷.

Μια από τις συχνότερες μεταλλάξεις του TACI ανιχνεύεται συχνά σε ασθενείς με κοινή ποικίλλουσα ανοσοανεπάρκεια (common variable immunodeficiency, CVID). Η μετάλλαξη αυτή είναι η C104R, που εντοπίζεται στη δεύτερη πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή του TACI και καταργεί τη σύνδεση των BAFF και APRIL με τον TACI⁷⁸. Αναφέρεται ότι τα Β κύτταρα των ασθενών με αυτή τη μετάλλαξη εμφανίζουν αδυναμία παραγωγής ανοσοσφαιρινών σε απάντηση στον APRIL⁷⁹. Η κοινή ποικίλλουσα ανοσοανεπάρκεια (common variable immunodeficiency, CVID) είναι η πιο συχνή πρωτοπαθής ανοσοανεπάρκεια στους ενήλικες. Οι κλινικές εκδηλώσεις της περιλαμβάνουν συχνές λοιμώξεις του αναπνευστικού και άλλες λοιμώξεις. Δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο προκαλείται η σημαντική υπογαμμασφαιριναιμία που χαρακτηρίζει τη νόσο. Πιθανόν να μην επαρκεί το φυσιολογικό γονίδιο για την παραγωγή ανοσοσφαιρινών ή το μεταλλαγμένο γονίδιο να επηρεάζει τη λειτουργία του φυσιολογικού αλληλίου. Οι περισσότερες περιπτώσεις CVID είναι σποραδικές, ενώ σε 10-20% των περιπτώσεων υπάρχει τουλάχιστον άλλο ένα μέλος της οικογένειας με CVID ή εκλεκτική ανεπάρκεια IgA⁸⁰.

Η ρύθμιση της έκφρασης του TACI συνδέεται στενά με την ενεργοποίηση των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας στα Β-κύτταρα, όπως οι TLRs και αυτό εξηγεί τον κεντρικό ρόλο του TACI στην έναρξη και ολοκλήρωση της Τ-εξαρτώμενης ανοσιακής απάντησης⁸¹.

Η σημασία του συστήματος APRIL, BAFF και TACI σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με σήψη δεν έχει διερευνηθεί. Σε πρόσφατη μελέτη οι Roderburg et al⁸² έδειξαν ότι σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ, τα επίπεδα του APRIL στον ορό είναι σημαντικά αυξημένα συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες και μάλιστα η μεγαλύτερη αύξηση ανιχνεύεται στους σηπτικούς ασθενείς. Επιπλέον, ο APRIL φαίνεται ότι έχει προγνωστική αξία για τη θνητότητα στη ΜΕΘ⁸². Δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες για τον TACI ή τον BAFF-R, ενώ για τον BAFF οι Pongratz et al⁸³ έδειξαν ότι αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης και σε ασθενείς με οξεία παγκρεατίτιδα, τα επίπεδά του στον ορό την ημέρα εισαγωγής στο νοσοκομείο έχουν προγνωστική αξία για την ανάγκη νοσηλείας σε ΜΕΘ για περισσότερο από μία εβδομάδα και για την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών.

Ακόμα περισσότερο, δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία για τη σημασία των γενετικών πολυμορφισμών των ανωτέρω μορίων (BAFF, BAFF-R, APRIL, TACI, BCMA) σε ασθενείς με σήψη και ιδιαίτερα σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ.

Η διερεύνηση ανάλογων συσχετίσεων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί τα μόρια αυτά συνδέουν τη φυσική με την επίκτητη ανοσιακή απάντηση και η σήψη αποτελεί πεδίο συνάντησης και αλληλεπίδρασης ποικίλων ανοσιακών μηχανισμών.

C2

Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει περισσότερες από 30 πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μια αυστηρά ρυθμιζόμενη οδό, αποτελούμενη από παράγοντες του πλάσματος και μεμβρανικούς υποδοχείς και ρυθμιστές. Το συμπλήρωμα κατέχει σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία και σε μηχανισμούς προστασίας του ξενιστή από μικροοργανισμούς, ενώ ρυθμίζει πολλούς ανοσιακούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανόμενης και της απάντησης των Τ-κυττάρων⁸⁴.

Το C2 ανήκει στην κλασσική οδό του συμπληρώματος και τέμνεται από το ενεργοποιημένο C1 σε C2a και C2b. Το C2b ενεργοποιεί περαιτέρω το C3. Η πιο συχνή διαταραχή του συμπληρώματος είναι η ανεπάρκεια C2, που ανιχνεύεται σε 1:20000 Καυκάσιους. Στις περισσότερες περιπτώσεις (περίπου 90%) υπεύθυνη μετάλλαξη είναι η απώλεια ενός τμήματος αποτελούμενου από 28 ζεύγη βάσεων (*C2-c.841_849+19del28 (rs9332736)*) στο γονίδιο C2 του HLA-B*18, S042, HLA-DRB1*15 απλότυπου του MHC⁸⁵. Οι μισοί περίπου από τους ασθενείς με έλλειψη C2 εμφανίζουν σοβαρές ή/και συχνές λοιμώξεις ή αυτοάνοσες νόσους όπως συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο, πορφύρα Henoch-Schönlein ή πολυμυοσίτιδα⁸⁶, όμως ένα μεγάλο μέρος των ατόμων με έλλειψη C2 δεν έχουν κλινικές εκδηλώσεις⁸⁷. Φαίνεται ότι η συνύπαρξη της έλλειψης C2 με άλλες σπάνιες διαταραχές, όπως η έλλειψη προπερδίνης ή η κοινή ποικίλλουσα ανοσοανεπάρκεια, παίζουν ρόλο στην εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων σε ειδικές περιπτώσεις⁸⁸. Ο ρόλος της έλλειψης C2 σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ δεν έχει μελετηθεί.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των γενετικών πολυμορφισμών των μορίων TACI, BAFF και TLR4 και η διερεύνηση πιθανής συσχέτισής τους με την εμφάνιση σήψης και τη θνητότητα σε ασθενείς που εισάγονται στη ΜΕΘ. Οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν είναι αυτές που απαντώνται στον ελληνικό χώρο σε ασθενείς με κοινή ποικίλλουσα ανοσοανεπάρκεια.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Πρόκειται για προοπτική μελέτη παρατήρησης ασθενών που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ. Στη μελέτη συμμετείχαν όλοι οι ασθενείς που εισάγονται στη ΜΕΘ του Θριάσιου Γ. Ν. Ελευσίνας. Η μελέτη έχει εγκριθεί από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου.

Κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ, σε όλους τους ασθενείς ελήφθη πλήρες ιστορικό από τους πλησιέστερους συγγενείς και έγινε λεπτομερής φυσική εξέταση. Επίσης, υπολογίστηκε ο δείκτης συνοδού νοσηρότητας κατά Charlson (Charlson comorbidity index)⁸⁹ και σε περίπτωση πολυτραυματιών ο δείκτης βαρύτητας κάκωσης (injury severity score, ISS)⁹⁰. Σε όλους τους ασθενείς καταγράφηκαν: το score βαρύτητας νόσου (APACHE II)⁹¹, οι εργαστηριακές παράμετροι της εισαγωγής (γλυκόζη ορού, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ινωδογόνο ορού, αριθμός λευκών, γαλακτικό). Επίσης, ελήφθησαν 5 mL αίματος για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών.

Σε καθημερινή βάση, υπολογιζόταν το αντίστοιχο ημερήσιο SOFA score⁹² καθώς και οι επιμέρους βαθμολογίες κατά συστήματα και καταγράφονταν ο αριθμός των λευκών και των αιμοπεταλίων, η αιμοσφαιρίνη και η ανάγκη μεταγγίσεων, το γαλακτικό καθώς και οι λοιπές παράμετροι του SIRS (θερμοκρασία, αριθμός αναπνοών, καρδιακός ρυθμός).

Κατά την παρακολούθηση του ασθενούς, καταγράφονταν όλα τα επεισόδια σήψης, η ημέρα νοσηλείας στη ΜΕΘ στην οποία εμφανίστηκαν, η διάρκεια του κάθε επεισοδίου (ημέρα κλινικής ύφεσης του σηπτικού επεισοδίου), η συνύπαρξη σηπτικής καταπληξίας, η εμφάνιση πολυοργανικής ανεπάρκειας και η έκβαση του σηπτικού επεισοδίου (θάνατος/επιβίωση). Για να θεωρηθεί ότι ένας ασθενής είχε σήψη, απαιτούνταν:

α) η παρουσία τουλάχιστον δύο από τα κριτήρια του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)⁹³, δηλαδή:

- θερμοκρασία σώματος >38°C ή <36°C
- ταχυκαρδία >90/min
- ταχύπνοια >20 αναπνοές/min ή υπεραερισμός με $PCO_2 < 32$ mmHg
- $WBC > 12000/mm^3$ ή $< 4000/mm^3$ ή >10% άωρες μορφές, και

β) η παρουσία αποδεδειγμένης λοίμωξης. Η διάγνωση της λοίμωξης γινόταν με τα αντίστοιχα κριτήρια, ανάλογα με το αν επρόκειτο για λοίμωξη της κοινότητας⁹⁴ ή νοσοκομειακή⁹⁵.

Σε κάθε επεισόδιο λοίμωξης, καταγράφονταν ο μικροοργανισμός ή οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν, η προηγηθείσα χορήγηση κατάλληλης ή μη εμπειρικής αντιμικροβιακής αγωγής, η διάρκεια του σηπτικού επεισοδίου (ημέρα κλινικής ύφεσης). Η σήψη και το σηπτικό shock στοιχειοθετούνταν με βάση τους διεθνείς ορισμούς⁹³. Ως πολυοργανική ανεπάρκεια ορίστηκε η δυσλειτουργία περισσότερων από δύο όργανα με SOFA score τουλάχιστον ίσο με 6.

Οι ασθενείς παρακολουθούνταν προοπτικά και καταγράφονταν ο συνολικός αριθμός λοιμωδών επεισοδίων με όλα τα προαναφερθέντα δεδομένα σε κάθε επεισόδιο, η διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ και η έκβαση (έξοδος ή θάνατος του ασθενούς) στη ΜΕΘ.

Ανίχνευση μεταλλάξεων

Στα ληφθέντα δείγματα έγινε προσδιορισμός των μεταλλάξεων *TLR4-T399I* (rs4986791), *TLR4-D299G*(rs4986790), *TNFRSF13C/BAFFR-P21R* (rs77874543), *TNFRSF13C/BAFFR-H159Y* (rs61756766), *TNFRSF13B/TACI-C104R* (RS34557412) και *C2-DeI28bp*. Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων αναπτύχθηκε τεχνική PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (εικόνα 1).

Η εξαγωγή DNA από το περιφερικό αίμα έγινε με τη χρήση του QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών διενεργήθηκε με allele-specific PCR, την οποία ακολούθησε restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ή direct sequencing.

Για τις PCR, 100 έως 200 ng DNA ενισχύθηκε σε 30 μl μίγμα αντίδρασης μες τη χρήση 62,5 μM τριφωσφορικών δεσοξυνουκλεοσιδίων, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 1,5 mM MgCl₂ και 1,0 U Taq πολυμεράση (Invitrogen, United Kingdom) σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει ο κατασκευαστής. Όλες οι PCR και οι διαδικασίες πέψης έγιναν στη συσκευή PCR PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA) και τα προϊόντα PCR και πέψης αναλύθηκαν σε γέλη αгарόζης 2% TBE (trisborate EDTA), κεχρωσμένη με βρωμιούχο αιθίδιο και ακτινοβολήθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR και τα προϊόντα της RFLP φαίνονται στον πίνακα 3 και τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στον πίνακα 4.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης PCR-RFLP, επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο προϊόντα θετικά και αρνητικά για τους υπό διερεύνηση πολυμορφισμούς, καθαρίστηκαν με τη βοήθεια του συστήματος PCR Purification System (Qiagen) και υποβλήθηκαν σε direct sequencing με χρήση του αναλυτή ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) και του συστήματος BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems).

Πίνακας 3. Εκκινητές για την τεχνική PCR-RFLP

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος (bp)
<i>TLR4</i> -T399I(rs4986791)-forward	5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTC(G) <u>C</u> ATG-3'	375 bp, 32 bp
<i>TLR4</i> -T399I(rs4986791)-reverse	5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'	
<i>TLR4</i> -D299G(rs4986790)-forward	5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGA(C) <u>G</u> AA-3'	218 bp, 31 bp
<i>TLR4</i> -D299G(rs4986790)-reverse	5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'	
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -H159Y(rs61756766)-forward	5'-AGC CCC AGC TCC CCA ACT-3'	323 bp
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -H159Y(rs61756766)-reverse	5'-CTC ATA GTG CCC CAG CCT TTT GAA-3'	
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -P21R(rs77874543)-forward	5'-GAG GGG CTG AAT TGG GGA ACC-3'	168 bp, 60 bp
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -P21R(rs77874543)-reverse	5'-CCA AAG GCA AGC ACA CCA AAC TC-3'	
<i>TNFRSF13B/TACI</i> -C104R (rs34557412)-forward	5'-GCTCCTGAGCTTGTTCT(T)CCAC-3'	316 bp, 21 bp
<i>TNFRSF13B/TACI</i> -C104R (rs34557412)-reverse	5'-AAGCCCTTCTATAAACCACATT-3'	
C2-c.841_849+19del28 (rs9332736) (forward)	5'-AAAGCTTGGGCCGTAAAATCCAGCG-3'	152 bp
C2-c.841_849+19del28 (rs9332736) (reverse)	5'-GAGCACAGGAAGGCCTCTCTGCAGG-3'	

Πίνακας 4 Ένζυμα περιορισμού για την ανίχνευση των μεταλλάξεων

Μετάλλαξη	Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
<i>TLR4</i> -T399I(rs4986791)	HinfI	5'...G↓A N T C...3'
<i>TLR4</i> -D299G(rs4986790)	NcoI	5'...C↓C A T G G...3'
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -H159Y(rs61756766)	MscI	5'...T G G↓C C A...3'
<i>TNFRSF13C/BAFFR</i> -P21R(rs77874543)	EagI	5'..C↓G G C C G...3'
<i>TNFRSF13B/TACI</i> -C104R(rs34557412)	BtgI	5'...C C R ↓Y G G...3'
C2-c.841_849+19del28 (rs9332736)	BamH1	5'...A G G↓A T C...3'

TLR4

Η ανίχνευση των *TLR4*-D299G(rs4986790) και *TLR4*-T399I(rs4986791) SNPs έγινε με allele-specific PCR, ακολουθούμενη από ανάλυση PCR-RFLP analysis. Και στις δύο διαδικασίες, οι εκκινητές τροποποιήθηκαν στο 5' άκρο για τη δημιουργία περιοχών αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα (NcoI για τον *TLR4*-D299G(rs4986790) και HinfI για τον *TLR4*-T399I(rs4986791)), έτσι ώστε αν ανιχνευτεί ο πολυμορφισμός, η ανάλυση PCR-RFLP θα δημιουργήσει προϊόντα πέψης ορατά στη γέλη αгарόζης. Οι εκκινητές για την ανίχνευση του *TLR4*-D299G(rs4986790) SNP ήταν ο αριστερός (forward) 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTC(G)CATG-3' και ο αντίστροφος (reverse) 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'. Οι εκκινητές για την ανίχνευση του *TLR4*-T399I(rs4986791) SNP ήταν ο αριστερός 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGA(C)GAA-3' και ο αντίστροφος 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'. Τα νουκλεοτίδια στις παρενθέσεις αντικαταστάθηκαν από τα υπογραμμισμένα. Οι συνθήκες και για τις δύο PCR ήταν 2 min στους 94°C, ακολούθως 32 κύκλοι στους 94°C για 30 sec, στους 57°C για 30

sec, στους 72°C για 60 sec και 5 min στους 72°C μετά τον τελευταίο κύκλο. Για τον *TLR4-D299G(rs4986790)* SNP, ένα τμήμα 249-bp ενισχύθηκε με PCR και υποβλήθηκε σε πέψη με *NcoI* (Invitrogen, United Kingdom) για 4 h στους 37°C. Η ανεύρεση άπεπτων προϊόντων PCR υποδηλώνει ότι το δείγμα δεν περιέχει τον πολυμορφισμό (wild-type), ενώ η παρουσία του πολυμορφισμού οδηγεί στην πέψη των προϊόντων PCR σε τμήματα μήκους 218-bp και 31-bp. Για τον *TLR4-T399I (RS4986791)* SNP, ένα τμήμα 407-bp ενισχύθηκε με PCR και υποβλήθηκε σε πέψη με *HinfI* (New England BioLabs, United Kingdom) για 4 h στους 37°C. Η ανεύρεση άπεπτων προϊόντων PCR υποδηλώνει ότι το δείγμα είναι wild-type, ενώ η παρουσία του πολυμορφισμού οδηγεί στην πέψη των προϊόντων της PCR σε τμήματα μήκους 375 bp και 32 bp.

BAFF-R

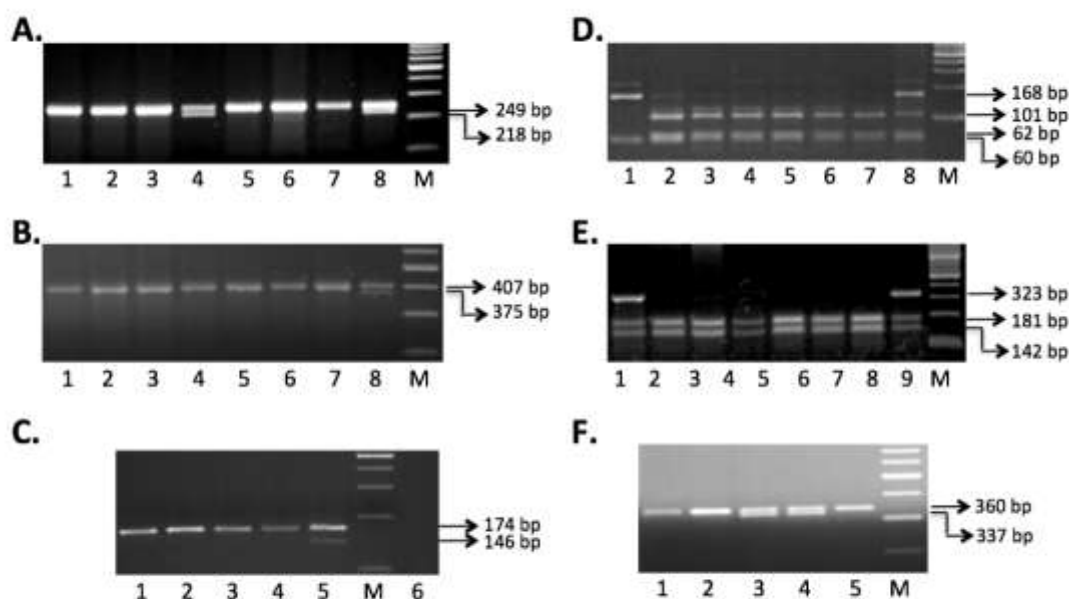
Το exon 1 του γονιδίου *TNFRSF13C* από το DNA ενισχύθηκε με PCR με τη χρήση των εκκινητών 5'-AGC CTC AGT CCC CGC AGC T-3' και 5'-CGG CAG CTG CGG GGA GAA C-3'. Για την ανάλυση RFLP του ελάσσονος αλληλίου του SNP c.62C>G (rs77874543) SNP c-62C>T transition, το προϊόν μήκους 223bp της PCR product υποβλήθηκε σε πέψη με *EagI* (NEB). Ο SNP *TNFRSF13C* rs61756766 που αντιστοιχεί στη μετάλλαξη *BAFF-R* H159Y ανιχνεύτηκε στην ανάλυση RFLP με πέψη από το ένζυμο *MscI* ενός τμήματος μήκους 658bp που περιέχει το exon 3. Το τμήμα αυτό ενισχύθηκε με PCR με τη χρήση των εκκινητών 5'-AGC CCC AGC TCC CCA ACT-3' και 5'-CTC ATA GTG CCC CAG CCT TTT GAA-3'. Για να επιβεβαιωθεί ότι οι πολυμορφισμοί P21R και H159Y κωδικοποιούνται από το ίδιο αλληλίο, γονομικό DNS που περιέχει τα exons 1 έως 3 του γονιδίου του *BAFF-R* ενισχύθηκε με PCR με τη χρήση των εκκινητών 5'-GAG GGG CTG AAT TGG GGA ACC-3' και 5'-CCA AAG GCA AGC ACA CCA AAC TC-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε *pCRTOP0II* (Invitrogen). Τα ένθετα (inserts) των συγκεκριμένων κλώνων στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε πλήρη ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων (sequencing).

TACI

Μετά την εξαγωγή του DNA από το γονιδίωμα του δείγματος, ενισχύθηκαν όλα τα exons του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*. Οι εκκινητές 5'-GCTCCTGAGCTTGTTTC(T)CCAC-3' και 5'-AAGCCCTTCTATAAACCACATT-3', που σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού *Oligo-6* (NBI, Plymouth, MN, USA), χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της μετάλλαξης C104R με PCR-RFLP. Οι συνθήκες της PCR ήταν 94°C για 2 min, ακολούθως 32 κύκλοι (94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec, 94°C για 2 min, μετά 32 κύκλοι (94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec, 72°C για 45 sec) με μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min και στους 94°C για 2 min και ακολούθως 31 κύκλοι (94°C για 30 sec, 62°C για 30 sec, 72°C για 30 sec) με μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min, αντίστοιχα.

Με βάση ειδικά για αλληλίου πρωτόκολλα PCR-RFLP, σχεδιασμένα για τη γρήγορη ανίχνευση της μετάλλαξης *TNFRSF13B/TNFRSF13B/TACI-C104R* (rs34557412) στο exon 3,

ο αντίστροφος εκκινήτης τροποποιήθηκε στο 3' άκρο, για τη δημιουργία μιας θέσης αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BtgI, έτσι ώστε αν υπάρχει ο πολυμορφισμός, η ανάλυση PCR-RFLP θα δώσει προϊόντα πέψης ορατά στη γέλη αгарόζης. Έτσι, ένα τμήμα μήκους 337-bp ενισχύθηκε με PCR και υποβλήθηκε σε πέψη με BtgI (New England Biolabs, UK) για 4 h στους 37°C. Η ανεύρεση άπεπτων προϊόντων PCR υποδηλώνει δείγμα wild-type, ενώ η παρουσία της μετάλλαξης οδηγεί σε πέψη των προϊόντων της PCR σε τμήματα μήκους 316 bp και 21bp.



Εικόνα 1. Ανίχνευση των πολυμορφισμών των ανοσιακών γονιδίων στους ασθενείς της μελέτης. **A.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση με PCR-RFLP που δείχνει τη μετάλλαξη *TLR4*-D299G. Περιοχές 1-3 και 5-6: δείγματα wild-type, περιοχές 4 και 8: ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη D299G. **B.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση με PCR-RFLP που δείχνει τη μετάλλαξη *TLR4*-T399I. Περιοχές 1-7: δείγματα wild-type, περιοχή 8: δείγμα ετεροζυγώτη για τη μετάλλαξη T399I. **C.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση PCR που δείχνει την ανίχνευση της μετάλλαξης C2-c.841_849+19del28. Περιοχές 1-4: δείγματα wild-type, περιοχή 5: δείγμα ετεροζυγώτη από την ομάδα των μαρτύρων της μελέτης. **D.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση με PCR-RFLP που δείχνει τη μετάλλαξη *TNFRSF13C/BAFFR*-P21R. Περιοχή 1: δείγμα ομοζυγώτη για τη μετάλλαξη P21R, περιοχές 2-7: δείγματα wild-type, περιοχή 8: δείγμα ετεροζυγώτη για τη μετάλλαξη P21R. **E.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση με PCR-RFLP που δείχνει τη μετάλλαξη *TNFRSF13C/BAFFR*-H159Y. Περιοχές 1 και 8: ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη H159Y, περιοχές 2-7: δείγματα wild-type. **F.** Αντιπροσωπευτική ανάλυση με PCR-RFLP που δείχνει τη μετάλλαξη *TNFRSF13B/TACI*-C104R. Περιοχές 1, 2 και 5: δείγματα wild-type, περιοχές 3 και 4: ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη C104R. M: 100 bp ladder δείκτης μοριακού βάρους (New England Biolabs, Hitchin, Herts, UK). Τα δείγματα «έτρεξαν» πάνω σε TBE γέλη αгарόζης 2-3%.

C2

Το cDNA ενισχύθηκε με PCR με τα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων που σχηματίστηκαν με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων BamH1 ή HindIII κοντά στο 5'-άκρο. Οι συνθήκες της PCR ήταν 95°C για 3 min με 1 μg για κάθε ολιγονουκλεοτίδιο σε 100 μl διάλυμα που περιείχε

10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% ζελατίνη, 200 μM dNTPs και 2,5 μονάδες Taq πολυμεράσης. Μετά την αρχική αποδιάταξη, το cDNA ενισχύθηκε με τήξη στους 95 °C για 2 min, επώαστηκε στους 60 °C για 2 min και πολυμερίστηκε στους 72 °C για 5 min. Ακολούθησαν 50 κύκλοι ενίσχυσης με μια τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7 min. Το ενισχυμένο cDNA υποβλήθηκε σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamH1 και HindIII.

Μέτρηση ανοσοσφαιρινών

Η μέτρηση ανοσοσφαιρινών έγινε με ανοσονεφελομετρική μέθοδο (Immulite-2000, Siemens Medical Solutions, Llanberis, Gwynedd, UK) με N αντιορό έναντι της ανθρώπινης IgG (κωδικός προϊόντος OSAS), N αντιορό έναντι της ανθρώπινης IgM (OSAS09) N αντιορό έναντι της ανθρώπινης IgA (OSAT09) και τη N πρωτεϊνική σταθερά SL (OQIM 13) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στατιστική ανάλυση

Αρχικά, έγινε έλεγχος στις ομάδες των υγιών μαρτύρων για το αν βρίσκονται σε ισοζύγιο κατά Hardy-Weinberg με δικατάληκτο Pearson's chi-square test. Ακολούθως επιθεωρήθηκαν επισταμένα τα περιγραφικά στατιστικά του δείγματος των ασθενών για την ανίχνευση αριθμητικών λαθών, την επιβεβαίωση των ακραίων τιμών και την επισκόπηση των κατανομών για τις συνεχείς μεταβλητές.

Οι κατηγορικές μεταβλητές αναλύθηκαν με Fisher's exact test. Οι αποκλίσεις από την κανονική κατανομή για τις συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν με τη μέθοδο Kolmogorov-Smirnov. Δεδομένα με κανονική κατανομή αναλύθηκαν με Student's t-test, ενώ επί μη ικανοποίησης της κανονικότητας, χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικοί έλεγχοι (Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis κατά περίπτωση). Η ανάλυση επιβίωσης έγινε με τη μέθοδο Kaplan-Meier και οι καμπύλες επιβίωσης συγκρίθηκαν με τον έλεγχο log-rank, ενώ κατά περίπτωση προσαρμόστηκαν και μοντέλα παλινδρόμησης αναλογικών κινδύνων κατά Cox (Cox proportional hazards regression).

Διερευνήθηκε η συσχέτιση των αλληλίων και των γονοτύπων με τη θνητότητα στη ΜΕΘ, την εμφάνιση σήψης και σηπτικού shock στη ΜΕΘ, τον βαθμό πολυοργανικής δυσλειτουργίας και τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ. Οι δίτιμες μεταβλητές που αντιστοιχούν σε καταληκτικά σημεία (θνητότητα, σήψη στη ΜΕΘ, σηπτικό shock στη ΜΕΘ) εισήχθησαν ως εξαρτημένες μεταβλητές σε μονομεταβλητά και πολυμεταβλητά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης. Οι συσχετίσεις των συνεχών μεταβλητών ελέγχθηκαν με γραμμική παλινδρόμηση, εφόσον ικανοποιούνταν οι περιορισμοί.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 17.0 (IBM Corporation, NY, 2008). Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $\alpha=0,05$ (δικατάληκτο), όμως επειδή η μελέτη αυτή είχε ως σκοπό, εκτός από τον έλεγχο υποθέσεων, και τη διατύπωση υποθέσεων, οι συσχετίσεις οριακής σημαντικότητας διερευνήθηκαν διεξοδικά.

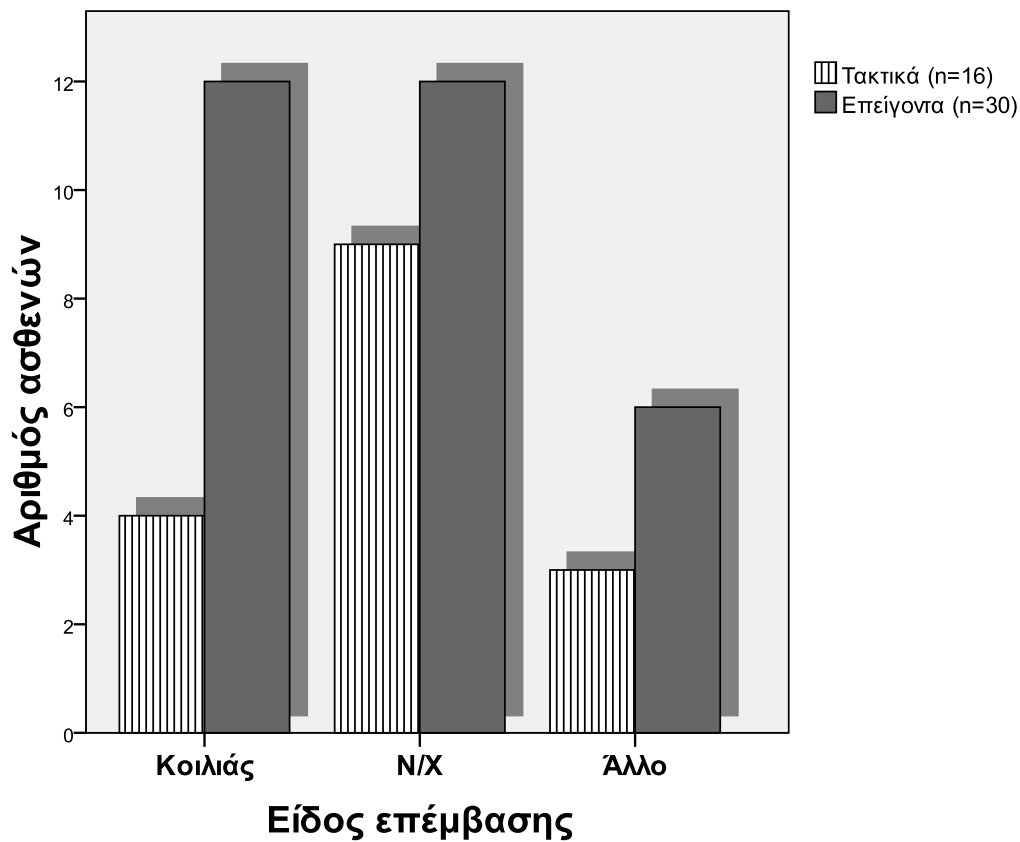
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 215 ασθενείς (148 άνδρες και 67 γυναίκες). Ο πίνακας 5 δείχνει τα κλινικά χαρακτηριστικά και την έκβαση των ασθενών.

Πίνακας 5. Κλινικά χαρακτηριστικά και έκβαση των ασθενών της μελέτης (n=215)

Μεταβλητή	Σύνολο (n=215)	Παθολογικοί (n=94)	Χειρουργικοί (n=46)	Πολυτραυματίες (n=75)	p value
Ηλικία (έτη)	54,1±19,7	57,4±17,4	63,8±15,7	44,0±20,4	<0,001
Άρρεν φύλο (%)	148 (68,8%)	62 (66,0%)	23 (50,0%)	64 (85,3%)	<0,001
Charlson's comorbidity index	1,1±1,4	1,6±1,4	1,5±1,7	0,3±0,7	<0,001
APACHE II score εισαγωγής	22,0±6,0	23,1±5,7	22,2±6,8	20,5±5,5	0,013
SOFA score εισαγωγής	9,7±3,5	10,2±3,6	9,9±4,1	8,8±2,7	0,051
ISS score εισαγωγής	NA	NA	NA	22,5±8,0	NA
Σήψη κατά την εισαγωγή (%)	109 (50,7%)	72 (76,6%)	17(37,0%)	20 (26,7%)	<0,001
Σήψη στη ΜΕΘ (%)	108 (50,2%)	43 (45,7%)	22 (47,8%)	43 (57,3%)	0,305
Σηπτικό shock στη ΜΕΘ (%)	29 (13,5%)	15 (16,0%)	6(13,0%)	8 (10,7%)	0,603
Εστία λοίμωξης (%)					
• Αναπνευστικό	69 (32,1%)	31 (33,0%)	11 (23,9%)	27 (36,0%)	0,373
• Αίμα	62 (28,8%)	29 (30,9%)	11 (23,9%)	22 (29,3%)	0,691
• ΚΝΣ	13 (6,0%)	0 (0%)	1 (2,2%)	12 (16,0%)	<0,001
• Μαλακά μόρια	10 (4,7%)	2 (2,1%)	4 (8,7%)	4 (5,3%)	0,210
• Ουροποιητικό	9 (4,2%)	5 (5,3%)	1 (2,2%)	3 (4,0%)	0,680
• Ενδοκοιλιακή	3 (1,4%)	2 (2,1%)	1 (2,2%)	0 (0%)	0,443
Μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ	12,1±4,0	12,5±4,2	12,1±4,1	11,2±2,7	0,349
Εφαρμογή CRRT (%)	34 (15,8%)	18 (19,1%)	9 (19,6%)	7 (9,3%)	0,162
Διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ (ημέρες)	25,0±21,4	23,9±25,0	20,5±15,6	29,2±19,0	0,006
Θάνατος στη ΜΕΘ (%)	44 (20,5%)	26 (27,7%)	8 (17,4%)	10 (13,3%)	0,061

Από τους χειρουργικούς ασθενείς, οι 16 υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένο και οι 30 σε επείγον χειρουργείο. Τα είδη των χειρουργικών επεμβάσεων απεικονίζονται στο γράφημα 6.



Γράφημα 6. Είδη χειρουργικών επεμβάσεων στους ασθενείς της μελέτης

Στο δείγμα των ασθενών δεν ανευρέθηκε κανένας φορέας του πολυμορφισμού C2-c.841_849+19del28 (rs9332736), για τον οποίο δεν θα γίνει περαιτέρω αναφορά. Οι συχνότητες των εξετασθέντων γονοτύπων στους ασθενείς της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 6 και οι συχνότητες των αλληλίων στον πίνακα 7.

Τα ελάχισσα αλληλία των πολυμορφισμών TLR4 Asp299Gly και Thr399Ile βρίσκονταν σε linkage disequilibrium. Μεταξύ των 21 φορέων του ελάχισσας αλληλίου TLR4 Thr399Ile, οι 19 (90,5%) ήταν ταυτόχρονα φορείς και του πολυμορφισμού TLR4 Asp299Gly ($p < 0,001$).

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλίων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, όμως παρατηρήθηκε μια τάση συχνότερης ανίχνευσης του πολυμορφισμού *TNFRSF13C/BAFFR*-H159Y (rs61756766) στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες.

Πίνακας 6. Συχνότητες (%) ανιχνευθέντων γονοτύπων (n=215)

Γονότυποι	Ασθενείς	Μάρτυρες*	p
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)			0,241
• Wild-type ομοζυγώτες	90,7	86,9	
• Ετεροζυγώτες	9,3	12,2	
• Ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο	0	0,8	
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)			0,314
• Wild-type ομοζυγώτες	90,2	87,3	
• Ετεροζυγώτες	9,8	11,8	
• Ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο	0	0,8	
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)			0,227
• Wild-type ομοζυγώτες	98,1	99,5	
• Ετεροζυγώτες	1,9	0,5	
• Ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο	0	0	
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)			0,284
• Wild-type ομοζυγώτες	85,6	88,6	
• Ετεροζυγώτες	13,0	11,1	
• Ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο	1,4	0,3	
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)			0,070
• Wild-type ομοζυγώτες	94,4	97,5	
• Ετεροζυγώτες	5,6	2,5	
• Ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίο	0	0	

*Χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες ομάδες υγιών μαρτύρων: α) για τον BAFF (n=316), β) για τον TLR4 (n=245) και γ) για τον TACI (n=189)

Πίνακας 7. Συχνότητες ανιχνευθέντων αλληλίων (%)

Αλληλίο	Ασθενείς	Μάρτυρες*	p
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)			0,141
• A	95,3	93,1	
• G	4,7	6,9	
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)			0,233
• C	95,1	93,3	
• T	4,9	6,7	
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)			0,229
• T	99,1	99,7	
• C	0,9	0,3	
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)			0,189
• C	92,1	94,1	
• G	7,9	5,9	
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)			0,073
• C	97,2	98,7	
• T	2,8	1,3	

*Χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες ομάδες υγιών μαρτύρων: α) για τον BAFF (n=316), β) για τον TLR4 (n=245) και γ) για τον TACI (n=189).

I. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΗΨΗΣ ΣΤΗ ΜΕΘ

Κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ, 109 ασθενείς (50,7%) είχαν σήψη, εκ των οποίων 47 ασθενείς (21,9%) σοβαρή σήψη και 62 (28,8%) σηπτικό shock. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μελετηθέντων γονοτύπων και της παρουσίας σήψης ή σηπτικού shock κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ. Κατά τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ, 108 ασθενείς (50,2%) ανέπτυξαν σήψη αποκτηθείσα στη ΜΕΘ, ενώ σε 29 από αυτούς πληρούνταν τα κριτήρια του σηπτικού shock. Οι εστίες της λοίμωξης φαίνονται στον πίνακα 3.

Οι φορείς των ελασσόνων αλληλίων πολυμορφισμών του *TLR4* και του *TNFRSF13C/BAFFR-P21R* (rs77874543) εμφάνιζαν τάση χαμηλότερης επίπτωσης σήψης συγκριτικά με τους ομοζυγώτες για τα κοινά αλληλία (πίνακας 8), όμως δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ανάπτυξη σηπτικού shock.

Πίνακας 8. Συχνότητες των εξετασθέντων πολυμορφισμών και εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ (n=215)

Πολυμορφισμός (SNP)	Χωρίς σήψη (n=107)	Σήψη (n=108)	p value
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)			
• Κοινό αλληλίο	87 (81,3%)	97 (89,8%)	0,084
• Φορείς ελάσσονος αλληλίου*	23 (17,3%)	8 (9,8%)	
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)			0,252
• Κοινό αλληλίο	99 (92,5%)	104 (96,3%)	
• Έλασσον αλληλίο (ετεροζυγώτες)	8 (7,5%)	4 (3,7%)	
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)			0,064
• Κοινό αλληλίο	93 (86,9%)	102 (94,4%)	
• Έλασσον αλληλίο (ετεροζυγώτες)	14 (13,1%)	6 (5,6%)	
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)			0,041
• Κοινό αλληλίο	92 (86,0%)	102 (94,4%)	
• Έλασσον αλληλίο (ετεροζυγώτες)	15 (14,0%)	6 (5,6%)	
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)			1,000
• Κοινό αλληλίο	105 (98,1%)	106 (98,1%)	
• Έλασσον αλληλίο (ετεροζυγώτες)	2 (1,9%)	2 (1,9%)	

Οι φορείς του πολυμορφισμού *TLR4-T399I* (rs4986791) εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα σήψης στη ΜΕΘ συγκριτικά με τους ομοζυγώτες του κοινού αλληλίου (adjusted OR = 0,32, 95% CI 0,12–0,86, p=0,024). Επίσης, οι φορείς του ελάσσονος αλληλίου *TLR4-299G* εμφάνισαν χαμηλότερη επίπτωση σήψης στη ΜΕΘ συγκριτικά με τους ομοζυγώτες του κοινού αλληλίου (adjusted OR = 0,34, 95% CI 0,13–0,94, p=0,041). Και τα δύο προαναφερθέντα μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης είναι διορθωμένα ως προς το φύλο,

την ηλικία, την αιτία εισαγωγής στη ΜΕΘ και το APACHE II score εισαγωγής στη ΜΕΘ. Η μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση των παραγόντων που πιθανόν συσχετίζονται με την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ φαίνονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Λογιστική παλινδρόμηση για την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ (n=215)

Μεταβλητή	Μονομεταβλητή ανάλυση [OR (95% CI)]	p	Πολυμεταβλητή ανάλυση [OR (95% CI)]	p
Ηλικία (έτη)	1,01 (0,99 – 1,02)	0,292		
Άρρεν φύλο	1,21 (0,68 – 2,16)	0,524		
Αιτία εισαγωγής		0,307		
Παθολογική	0,63 (0,34 – 1,16)			
Χειρουργική	0,68 (0,33 – 1,43)			
Τραύμα	1,00			
Charlson's comorbidity index	1,00 (0,82 – 1,20)	0,956		
APACHE II score εισαγωγής	1,03 (0,98 – 1,08)	0,208		
SOFA score εισαγωγής	1,05 (0,97 – 1,13)	0,226		
ISS score εισαγωγής*	1,05 (0,99 – 1,11)	0,137		
Σήψη κατά την εισαγωγή (%)	0,88 (0,51 – 1,50)	0,632		
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)	0,39 (0,14 – 1,06)	0,065	***	
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)	0,36 (0,13 – 0,97)	0,043	0,32 (0,12 – 0,86)	0,024
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)	0,99 (0,14 – 7,16)	0,993		
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)	0,49 (0,22 – 1,09)	0,080	0,44 (0,20 – 0,97)	0,041
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)	0,48 (0,14 – 1,63)	0,237		

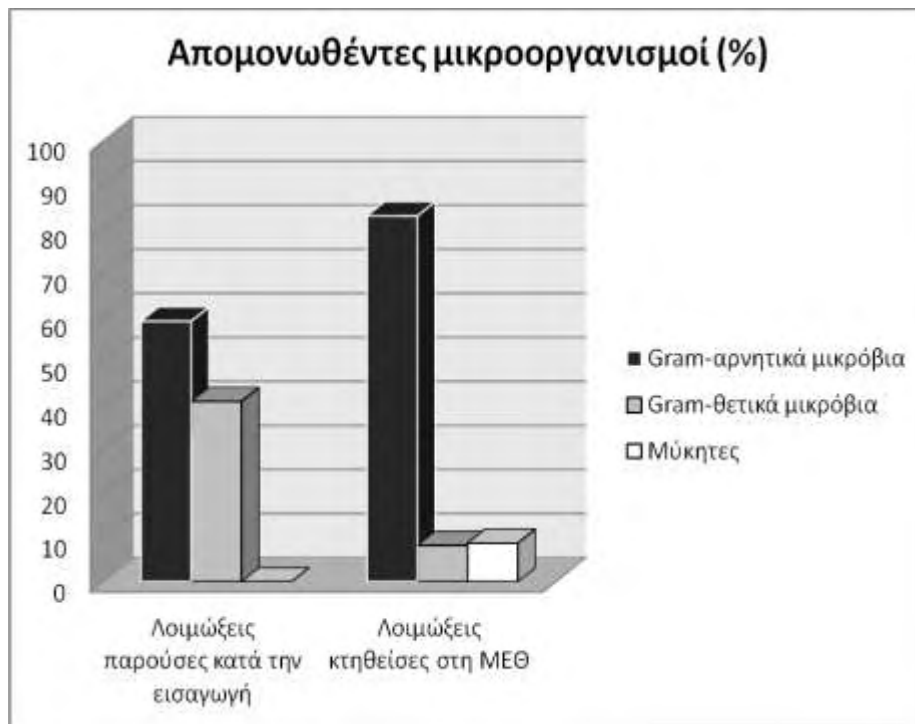
ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας; OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ISS: injury severity score.

*Μόνο για τους πολυτραυματίες (n=75).

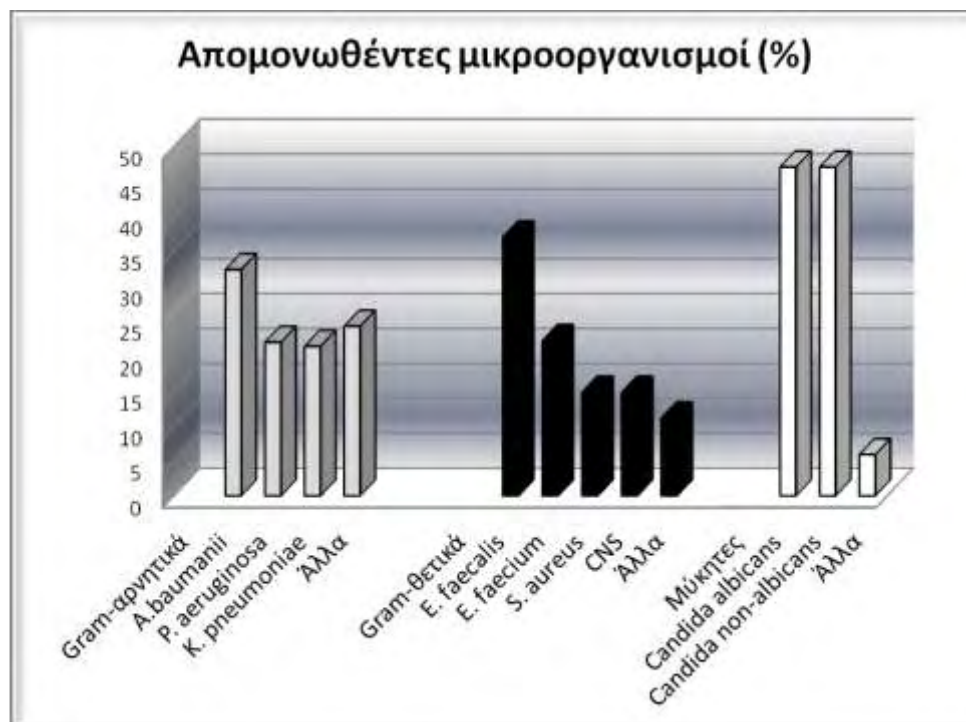
**Κατηγορία αναφοράς: ομοζυγώτες για το κοινό (wild-type) αλληλίο.

***Δεδομένης της συνύπαρξης των πολυμορφισμών του *TLR4*, για λόγους πολυσυγγραμμικότητας, μόνο ο πολυμορφισμός με την ισχυρότερη συσχέτιση από τη μονομεταβλητή ανάλυση περιελήφθη στην πολυμεταβλητή ανάλυση. Η αντίστοιχη εκτιμώμενη παράμετρος για τον *TLR4-D299G* (rs4986790) είναι: odds ratio 0,34 (95% confidence interval 0,13 – 0,94, p=0,037).

Τόσο οι λοιμώξεις που ήταν παρούσες κατά την εισαγωγή των ασθενών στη ΜΕΘ όσο και εκείνες που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ οφείλονταν κατά κύριο λόγο σε gram-αρνητικά παθογόνα (γράφημα 7), όμως η υπεροχή των gram-αρνητικών



Γράφημα 7. Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από ασθενείς με λοίμωξη

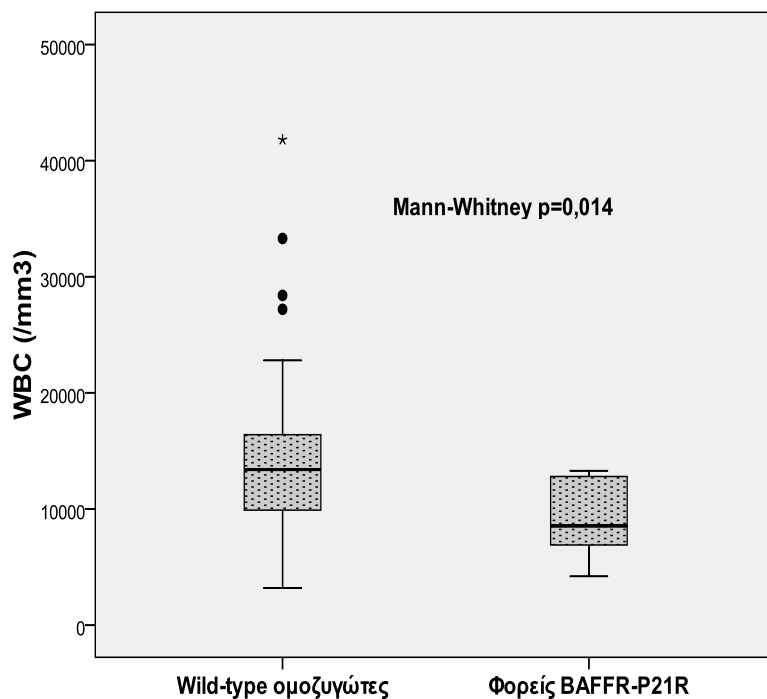


Γράφημα 8. Μικροβιακά στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με σήψη που αναπτύχθηκε στη ΜΕΘ

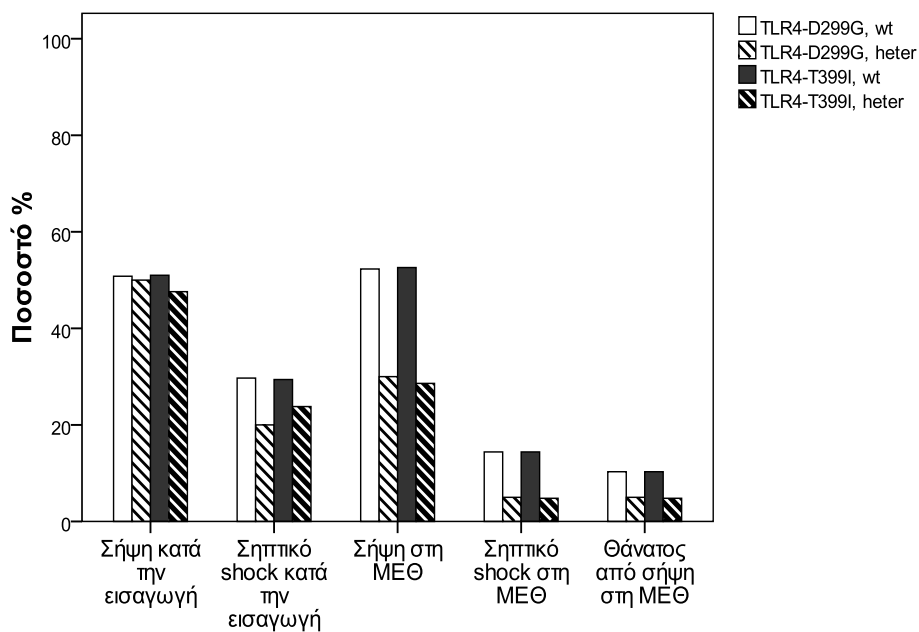
ήταν πιο εμφανής στις λοιμώξεις που αναπτύχθηκαν στη ΜΕΘ, συγκριτικά με αυτές που ήταν παρούσες κατά την εισαγωγή του ασθενούς στη ΜΕΘ.

Αναφορικά με τις παραμέτρους της σήψης, από τους ασθενείς που ανέπτυξαν σηπτικό επεισόδιο στη ΜΕΘ, οι φορείς του πολυμορφισμού *TNFRSF13C/BAFFR-P21R* (rs77874543) είχαν σημαντικά χαμηλότερο αριθμό λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά

την έναρξη του σηπτικού επεισοδίου συγκριτικά με τους wild-type ομοζυγώτες ($9250 \pm 3375/\text{mm}^3$ vs. $14237 \pm 6573/\text{mm}^3$, $p=0,014$), όπως φαίνεται στο γράφημα 9.



Γράφημα 9. Αριθμός λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά την έναρξη του πρώτου σηπτικού επεισοδίου στη ΜΕΘ

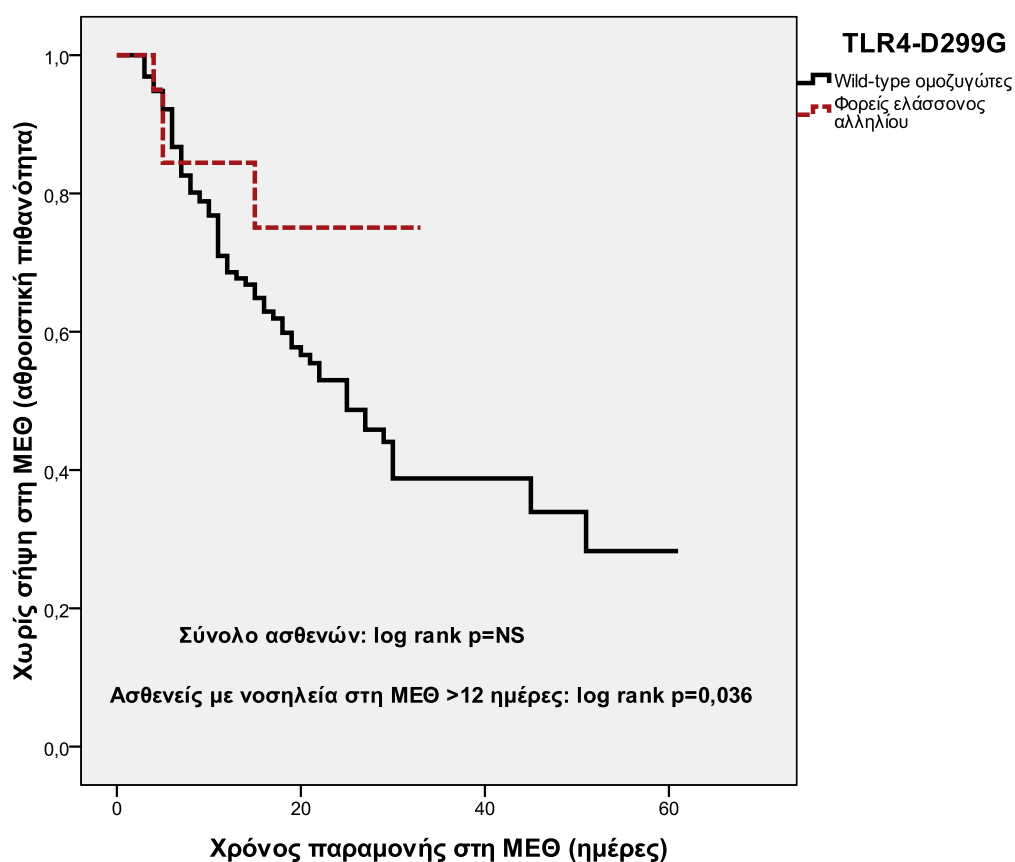


Γράφημα 10. Συχνότητα εμφάνισης σηπτικών γεγονότων και TLR4-SNPs

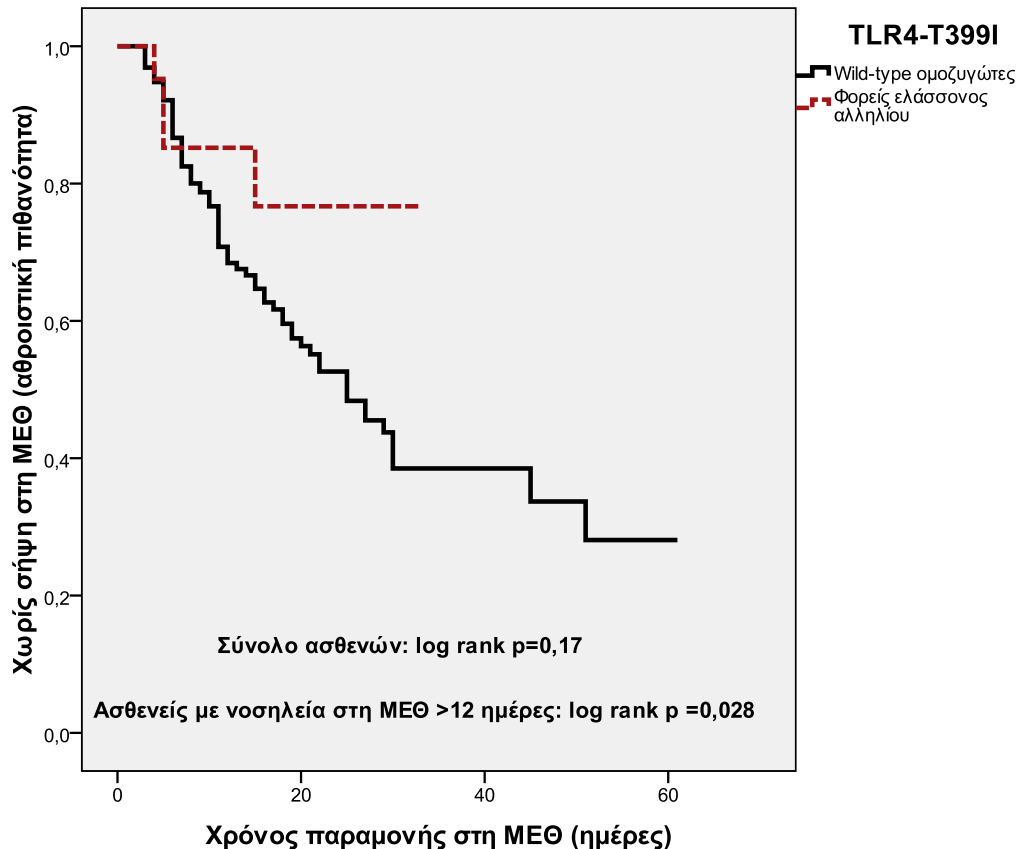
Οι άλλοι δείκτες της σήψης (CRP, γαλακτικό) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων που συγκρίθηκαν.

Το σημαντικότερο εύρημα από την ανάλυση των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ ήταν ο προστατευτικός ρόλος των πολυμορφισμών του TLR4. Στο γράφημα 10 φαίνεται η συχνότητα σηπτικών γεγονότων ανάλογα με τη φορεία των πολυμορφισμών του TLR4. Παρατηρούμε ότι οι φορείς των ελασσόνων αλληλίων *TLR4-299G* και *TLR4-399T* (στήλες με υφές) είχαν μια τάση σπανιότερης εμφάνισης σηπτικού γεγονότος (σήψη κατά την εισαγωγή-σηπτικό shock κατά την εισαγωγή-σήψη στη ΜΕΘ-σηπτικό shock στη ΜΕΘ-θάνατος από σήψη στη ΜΕΘ).

Οι καμπύλες Kaplan-Meier για το ενδεχόμενο εμφάνισης σήψης με διαστρωμάτωση των ασθενών ανάλογα με τη φορεία των πολυμορφισμών του TLR4 (γραφήματα 11 και 12) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (log rank $p=NS$ και στις δύο περιπτώσεις), όμως φαίνεται ότι διαχωρίζονται σαφώς μετά τη 12^η ημέρα νοσηλείας. Πράγματι, αν εξετάσει κανείς ξεχωριστά την υποομάδα των ασθενών με διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ >12 ημέρες, φαίνεται ότι οι φορείς των ελασσόνων αλληλίων *TLR4-299G* και *TLR4-399I* παραμένουν ελεύθεροι σήψης σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τους wild-type ομοζυγώτες [log rank $p=0,042$ για τον *TLR4-D299G* (rs4986790) και log rank $p=0,036$ για τον *TLR4-T399I* (rs4986791)].



Γράφημα 11. Καμπύλες Kaplan-Meier για το ενδεχόμενο εμφάνισης σήψης στη ΜΕΘ και με διαστρωμάτωση των ασθενών ανάλογα με την παρουσία του πολυμορφισμού *TLR4-D299G* (rs4986790)



Γράφημα 12. Καμπύλες Kaplan-Meier για το ενδεχόμενο εμφάνισης σήψης στη ΜΕΘ και με διαστρωμάτωση των ασθενών ανάλογα με την παρουσία του πολυμορφισμού TLR4-T3991 (rs4986791)

Δεδομένου ότι οι χειρουργικοί ασθενείς είχαν μικρότερη διάρκεια νοσηλείας συγκριτικά με τους παθολογικούς ασθενείς και τους τραυματίες ($p=0,006$, πίνακας 5), αναλύθηκαν ξεχωριστά οι υποομάδες των ασθενών ανάλογα με την αιτία εισαγωγής (πίνακας 10). Από τους παθολογικούς ασθενείς που είχαν τουλάχιστον έναν από τους δύο πολυμορφισμούς του TLR4 ($n=9$), μόνο ένας ασθενής εμφάνισε σήψη στη ΜΕΘ, ενώ από εκείνους που δεν είχαν κανέναν από τους πολυμορφισμούς, το 37,6% εμφάνισε σήψη στη ΜΕΘ ($p=0,028$). Ομοίως, στην υποομάδα των τραυματιών, οι φορείς κάποιου από

Πίνακας 10. Εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ ανάλογα με την παρουσία πολυμορφισμών του TLR4 και την αιτία εισαγωγής στη ΜΕΘ

Κατηγορία ασθενών	Απουσία TLR4-SNP		Παρουσία τουλάχιστον ενός TLR4-SNP		p value
	Σήψη	Χωρίς σήψη	Σήψη	Χωρίς σήψη	
Παθολογικοί (n=94)	42 (49,4%)	43 (50,6%)	1 (11,2%)	8 (89,8%)	0,028
Χειρουργικοί (n=46)	19 (47,5%)	21 (52,5%)	3 (50%)	3 (50%)	0,909
Τραυματίες (n=75)	27 (39,7%)	41 (60,3%)	2 (28,6%)	5(71,4%)	0,106

τους πολυμορφισμούς του TLR4 είχαν την τάση να εμφανίζουν σπανιότερα σήψη στη ΜΕΘ συγκριτικά με εκείνους που δεν είχαν κανένα πολυμορφισμό. Στις δύο αυτές υποομάδες οι πολυμορφισμοί φαίνεται να εξασκούν προστατευτική επίδραση όσον αφορά στην εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ. Αντίθετα, στους χειρουργικούς ασθενείς η παρουσία των πολυμορφισμών του TLR4 έχει αντίστροφη συσχέτιση, δηλαδή έχει την τάση να αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης σήψης στη ΜΕΘ, συγκριτικά με τις άλλες δύο υποομάδες ασθενών.

II. ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΜΕΘ

Η αδρή θνητότητα (crude mortality) στη ΜΕΘ ήταν 20,5% (95% CI 15,0–25,9). Στις γυναίκες η θνητότητα έτεινε να είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τους άνδρες (26,9% vs. 17,6%, respectively, $p=0,144$).

Η μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση πιθανών παραγόντων κινδύνου για τη θνητότητα στη ΜΕΘ φαίνεται στον πίνακα 5. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση φαίνεται ότι η παρουσία του πολυμορφισμού του TAC1 αυξάνει κατά 19,7 φορές την πιθανότητα θανάτου στη ΜΕΘ. Επειδή το δείγμα των φορέων του πολυμορφισμού είναι μικρό (4 ασθενείς) και το 95% διάστημα αξιοπιστίας της εκτίμησης πολύ μεγάλο (1,96–200,62), το εύρημα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Δεν φαίνεται να υποκρύπτονται προβλήματα πολυσυγγραμμικότητας. Σε μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης με τους δυνατούς συνδυασμούς των μεταβλητών οι variance inflation factors ήταν μικρότεροι από 2, εκτός από την περίπτωση του SOFA score εισαγωγής που εμφάνιζε πολυσυγγραμμικότητα με το μέγιστο SOFA score, όπως ήταν αναμενόμενο. Όμως στο τελικό πολυμεταβλητό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης που προέκυψε με backward elimination των μεταβλητών (πίνακας 11), έχει παραμείνει μόνο το μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ.

Πίνακας 11. Λογιστική παλινδρόμηση για τη θνητότητα στη ΜΕΘ (n=215)

Μεταβλητή	Μονομεταβλητή ανάλυση [OR (95% CI)]	p	Πολυμεταβλητή ανάλυση [OR (95% CI)]	p
Ηλικία (ανά έτος αύξηση)	1,04 (1,02–1,06)	<0,001	1,04 (1,01–1,07)	0,011
Άρρεν φύλο	0,58 (0,29–1,15)	0,120		
Αιτία εισαγωγής		0,066		
Παθολογική	2,49 (1,11–5,56)			
Χειρουργική	1,37 (0,50–3,77)			
Τραύμα	1,00			
Charlson's comorbidity index	1,40 (1,12–1,75)	0,003		
APACHE II score εισαγωγής	1,17 (1,09–1,26)	<0,001		
SOFA score εισαγωγής	1,36 (1,21–1,52)	<0,001		
ISS score εισαγωγής*	0,96 (0,88–1,05)	0,357		
Σήψη στην εισαγωγή	2,20 (1,10–4,39)	0,026		
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)	0,41 (0,09–1,81)**	0,237**		
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)	0,62 (0,18–2,22)**	0,464**		
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)	4,02 (0,55–29,04)**	0,170**	19,67 (1,93–200,62)**	0,012
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)	0,92 (0,35–2,41)**	0,868**		
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)	1,32 (0,34–5,09)**	0,689**		
Σήψη στη ΜΕΘ	0,91 (0,46–1,81)	0,786		
Σηπτικό shock στη ΜΕΘ	1,94 (0,82–4,63)	0,134		
Μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ	1,63 (1,41–1,90)	<0,001	2,11 (1,58–2,83)	<0,001

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας; OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ISS: injury severity score.

*Μόνο για τους πολυτραυματίες (n=75).

**Κατηγορία αναφοράς: ομοζυγώτες για το κοινό (wild-type) αλληλίο.

Για την επιβεβαίωση του ευρήματος, έγινε ανάλυση επιβίωσης με Cox proportional hazards regression, με καταληκτικό γεγονός τον θάνατο στη ΜΕΘ, χρόνο τη διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ και επεξηγηματικές μεταβλητές όλες τις baseline μεταβλητές συμπεριλαμβανομένων και των γενετικών πολυμορφισμών (πίνακας 12).

Πίνακας 12. Cox proportional hazards regression για τη θνητότητα στη ΜΕΘ (n=215)

Μεταβλητή	Μονομεταβλητή ανάλυση [HR (95% CI)]	p	Πολυμεταβλητή ανάλυση [HR (95% CI)]	p
Ηλικία (ανά έτος αύξησης)	1,04 (1,01 – 1,05)	0,003	1,02 (1,00 – 1,04)	0,023
Άρρεν φύλο	0,75 (0,41 – 1,37)	0,346		
Αιτία εισαγωγής		0,031		
Παθολογική	2,68 (1,29 – 5,57)			
Χειρουργική	2,03 (0,80 – 5,18)			
Τραύμα	1,00			
Charlson's comorbidity index	1,31 (1,10 – 1,55)	0,003		
APACHE II score εισαγωγής	1,12 (1,06 – 1,19)	<0,001		
SOFA score εισαγωγής	1,22 (1,13 – 1,32)	<0,001	1,21 (1,12 – 1,32)	<0,001
ISS score εισαγωγής*	1,01 (0,99 – 1,02)	0,295		
Σήψη κατά την εισαγωγή	1,99 (1,05 – 3,78)	0,035		
Σηπτικό shock κατά την εισαγωγή	2,42 (1,33 – 4,42)	0,004		
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)	0,79 (0,19 – 3,31)	0,790		
<i>TLR4-T399I</i> (rs4986791)	1,16 (0,35 – 3,81)	0,808		
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)	2,81 (0,68 – 11,68)	0,155	5,01 (1,14 – 22,03)	0,033
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)	1,03 (0,43 – 2,44)	0,953		
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)	1,48 (0,46 – 4,81)	0,515		

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας; HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ISS: injury severity score.

*Μόνο για τους πολυτραυματίες (n=75).

**Κατηγορία αναφοράς: ομοζυγώτες για το κοινό (wild-type) αλληλίο.

Και στην ανάλυση αυτή, φαίνεται ότι η παρουσία του πολυμορφισμού *TNFRSF13B/TACI-C104R* (rs34557412) μεταβάλλει την καμπύλη επιβίωσης του ασθενούς και περίπου πενταπλασιάζει τον κίνδυνο θανάτου σε κάθε χρονική στιγμή νοσηλείας στη ΜΕΘ. Καμία από τις δύο περιπτώσεις θανάτου των φορέων του πολυμορφισμού *TNFRSF13B/TACI-C104R* (rs34557412) που απεβίωσαν στη ΜΕΘ δεν οφειλόταν σε σηπτικό επεισόδιο.

Από τους 41 ασθενείς που απεβίωσαν στη ΜΕΘ, οι 21 κατέληξαν εξαιτίας σοβαρού σηπτικού επεισοδίου. Στον πίνακα 13 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά που συσχετιζόνταν με τον θάνατο από σήψη στη ΜΕΘ.

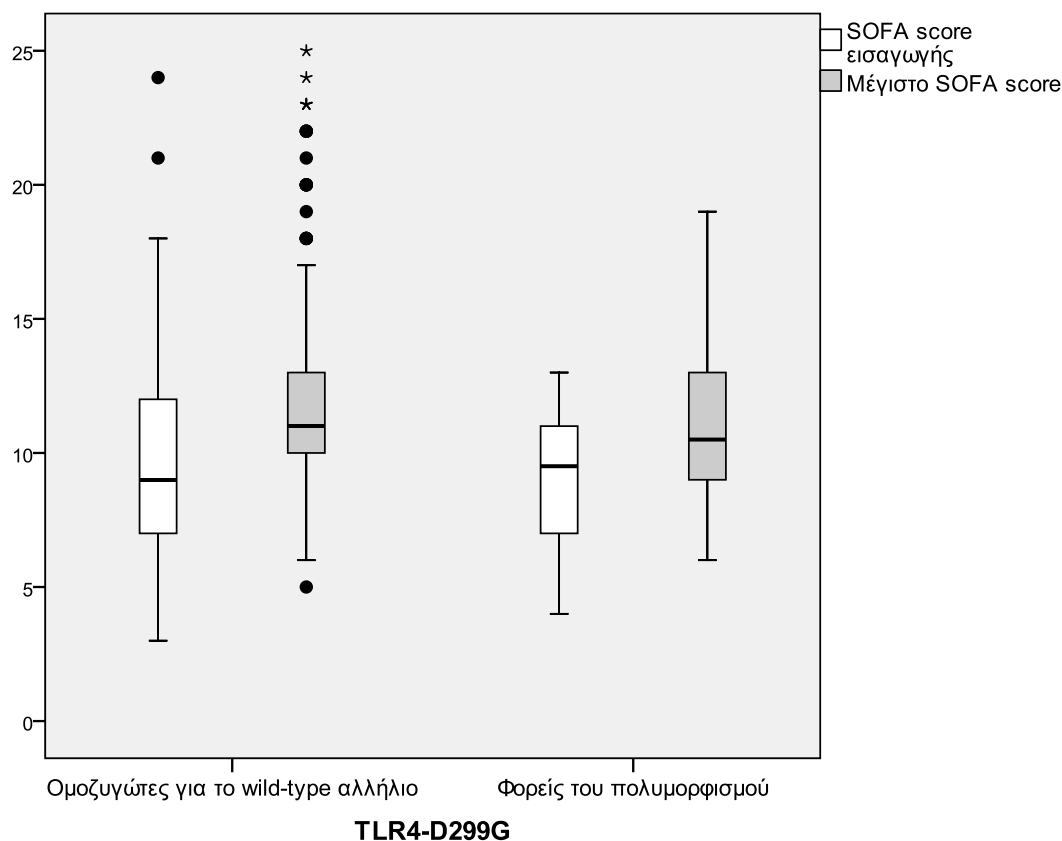
Πίνακας 13. Σύγκριση κλινικών χαρακτηριστικών επί θανάτων από σήψη και από άλλα αίτια

Μεταβλητή	Θάνατος από σήψη (n=21)	Θάνατος από άλλα αίτια (n=20)	p
Ηλικία (έτη)	69,7±14,1	58,3±21,2	0,087
Άρρεν φύλο (%)	12 (57,1%)	13 (65%)	0,606
Αιτία εισαγωγής			0,291
• Παθολογική	13 (61,9%)	10 (50%)	
• Χειρουργική	5 (23,8%)	3 (15%)	
• Τραύμα	3 (14,3%)	7 (35%)	
Charlson's comorbidity index	2,1±1,5	1,3±1,4	0,114
APACHE II score εισαγωγής	27,6±4,7	23,9±6,9	0,097
SOFA score εισαγωγής	14,1±4,2	10,7±3,8	0,011
Μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ	18,4±3,6	14,7±4,4	0,003
CRRT (%)	13 (61,9%)	7 (35%)	0,121
<i>TNFRSF13C/BAFFR-H159Y</i> (rs61756766)	1 (4,8%)	1 (5%)	0,999
<i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i> (rs77874543)	3 (14,3%)	1 (5%)	0,606
<i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i> (rs34557412)	0 (0%)	2 (10%)	0,232
<i>TLR4-D299G</i> (rs4986790)	1 (4,8%)	1 (5%)	0,999
<i>TLR4-T399I</i> (RS4986791)	1 (4,8%)	2 (10%)	0,606

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας; HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

III. ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΟΡΓΑΝΩΝ

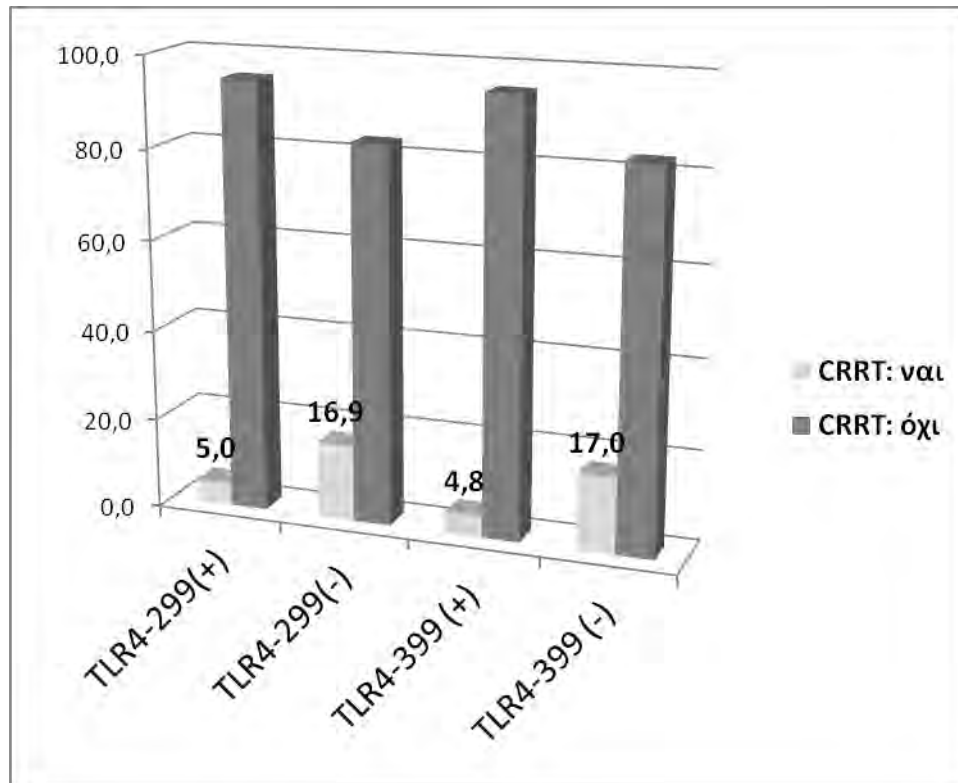
Η δυσλειτουργία οργάνων είναι μια από τις σοβαρές συνέπειες της σήψης. Ο υψηλότερος βαθμός πολυοργανικής δυσλειτουργίας μέσα στη ΜΕΘ, όπως αυτός εκφράζεται με το μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ, εμφάνιζε την τάση να είναι μικρότερος στους ασθενείς που έφεραν τον πολυμορφισμό *TLR4-D299G* (rs4986790). Στο γράφημα 14, φαίνεται ότι οι ασθενείς που έφεραν το πολυμορφικό αλληλίο, έτειναν να εμφανίζουν χαμηλότερα σκορ και μικρότερη διακύμανση των τιμών ιδίως στο υψηλό εύρος αυτών.



Γράφημα 10. Βoxplots για το SOFA score εισαγωγής στη ΜΕΘ και το μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ ανάλογα με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού *TLR4-D299G* (rs4986790)

Σε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή το μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ, οι μεταβλητές που συσχετιζόνταν ανεξάρτητα με το μέγιστο SOFA score ήταν το Charlson's comorbidity index, το APACHE II score και η παρουσία του πολυμορφισμού *TLR4-D299G* (rs4986790). Στο μοντέλο δεν μπήκε το SOFA score εισαγωγής, λόγω πολυσυγγραμμικότητας με το APACHE II score. Ο συντελεστής συσχέτισης β για τον πολυμορφισμό *TLR4-D299G* (rs4986790) ήταν -1,56 ($p=0,33$), δηλαδή από δύο ασθενείς με τα ίδια κλινικά χαρακτηριστικά, ο ασθενής με το πολυμορφικό αλληλίο *TLR4-D299G* θα εμφάνιζε μέγιστο SOFA score χαμηλότερο κατά 1,5 μονάδα συγκριτικά με τον ομοζυγώτη του wild-type αλληλίου.

Οι φορείς των πολυμορφισμών του TLR4 χρειάζονταν σπανιότερα την εφαρμογή συνεχούς νεφρικής υποκατάστασης (CRRT), όμως η τάση αυτή δεν έφτασε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (γράφημα 15).



Γράφημα 11. Συχνότητα εφαρμογής συνεχούς νεφρικής υποκατάστασης ανάλογα με την παρουσία των πολυμορφισμών του TLR4.

TLR4-299(+): φορείς του ελάσσονος αλληλίου TLR4-299G

TLR4-299(-): ομοζυγώτες για το wild-type αλληλίο TLR4-299A

TLR4-399(+): φορείς του ελάσσονος αλληλίου TLR4-399T

TLR4-399(-): ομοζυγώτες για το wild-type αλληλίο TLR4-399C

CRRT: συνεχής νεφρική υποκατάσταση (Continuous Renal Replacement Therapy)

IV. ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΘ

Η διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ συσχετιζόταν ανεξάρτητα με την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ (beta coefficient=20,7, $p<0,001$) και με το μέγιστο SOFA score στη ΜΕΘ (beta coefficient=0,81, $p=0,02$).

V. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΟΡΟΥ

Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού στους ετεροζυγώτες ασθενείς με τη μετάλλαξη *TACI-C104R* και στους ομοζυγώτες με τη μετάλλαξη *BAFFR-P21R*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 14. Φαίνεται ότι οι ασθενείς με τις ανωτέρω μεταλλάξεις είχαν ήπια έως μέτρια υπογαμμασφαιριναιμία. Επίσης, οι τρεις από τους επτά ασθενείς είχαν χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, νόσημα που συνδέεται με την ανοσιακή απάντηση και τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών.

Πίνακας 14. Κλινικά χαρακτηριστικά και επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού στους ασθενείς με τους πολυμορφισμούς *TNFRSF13B/TACI-C104R* και

TNFRSF13C/BAFFR-P21R

Φύλο	Ηλικία	Ιατρικό ιστορικό	Αιτία εισαγωγής στη ΜΕΘ	APACHE II score εισαγωγής	SOFA εισαγωγής	Σήψη/σηπτικό shock στην εισαγωγή	Σήψη/σηπτικό shock στη ΜΕΘ	Έκβαση	Ανοσοσφαιρίνες ορού (mg/dl)			
									IgG *	IgM *	IgA *	
Α. Ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη <i>TNFRSF13B/TACI-C104R</i>												
1	♂	29	Ελεύθερο Τραύμα	25	5	Ναι/Όχι	Όχι/Όχι	Έξοδος	641	53	195	
2	♂	39	Αρτηριακή υπέρταση αιμορραγία χερροουληθία	22	7	Όχι/Όχι	No/No	Θάνατος	479	37	44	
3	F	76	ΧΑΠ, HCV(+)	19	10	Ναι/Όχι	Yes/Yes	Θάνατος	507	67	130	
4	F	72	ΧΑΠ	22	4	Ναι/Όχι	Yes/No	Έξοδος	NA	NA	NA	
Β. Ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη <i>TNFRSF13C/BAFFR-P21R</i>												
1	♂	78	ΧΑΠ	32	14	Ναι/Όχι	Όχι/Όχι	Θάνατος	1210	77	578	
2	♂	32	Ελεύθερο Τραύμα	13	4	Όχι/Όχι	Ναι/Όχι	Έξοδος	742	141	103	
3	♂	55	Κατάχρηση αλκοόλ	17	11	Ναι/Όχι	Όχι/Όχι	Έξοδος	-	-	-	

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; ARDS, acute respiratory distress syndrome; HCV, hepatitis C virus; ICU, intensive care unit; SOFA, Sequential Organ Failure

Assessment; ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική ανεπάρκεια. * Φυσιολογικά επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού: IgG: 700-1600 mg/dl, IgM: 40-230 mg/dl, IgA: 70-400 mg/dl

[<http://medicine.medscape.com/article/2157901-overview>]

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος γενετικών πολυμορφισμών της φυσικής (TLR4, C2) και της επίκτητης ανοσίας (BAFF-R, TAC1) σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ.

Στους ασθενείς της μελέτης μας, οι πολυμορφισμοί *TLR4-D299G* (rs4986790) και *TLR4-T399I* (rs4986791) φαίνονται να συνυπάρχουν (cosegregated state) και αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία^{69, 96}. Οι συνέπειες αυτής της συνδεδεμένης μεταβίβασης δεν είναι διευκρινισμένες. Οι φορείς των δύο πολυμορφισμών ανιχνεύονται στον πληθυσμό με τέσσερις πιθανούς απλοτύπους: wild type/wild type, Asp299Gly/wild type, Thr399Ile/wild type, Asp299Gly/Thr399Ile. Στο δείγμα των ασθενών της μελέτης μας υπήρχαν 19 ασθενείς με τον απλότυπο Asp299Gly/Thr399Ile, ένας με τον απλότυπο Asp299Gly/wild type, δύο με τον απλότυπο Thr399Ile/wild type, ενώ οι υπόλοιποι 193 ασθενείς είχαν τον απλότυπο wild type/wild type. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι μόνο ο απλότυπος Asp299Gly/wild type διαφέρει φαινοτυπικά από τους υπόλοιπους, συνοδευόμενος από αυξημένη απάντηση του TNF μετά από in vitro διέγερση ολικού αίματος με LPS, ενώ η αντίστοιχη απάντηση του απλότυπου Asp299Gly/Thr399Ile δεν διαφέρει από εκείνη του wild type/wild type⁹⁷. Ο απλότυπος Thr399Ile/wild type είναι σπάνιος, γι' αυτό η φαινοτυπική του έκφραση δεν είναι διευκρινισμένη.

Η συσχέτιση των πολυμορφισμών *TLR4-D299G* (rs4986790) και *TLR4-T399I* (rs4986791) με την εμφάνιση λοιμώξεων και σήψης έχει διερευνηθεί στη βιβλιογραφία με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα. Σε μια συστηματική ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας μέχρι το 2007, οι Ferwerda et al⁶⁹ εντόπισαν 157 ερευνητικές μελέτες, εκ των οποίων το 62% δεν έβρισκε κάποια συσχέτιση. Όμως, όπως σχολιάζουν οι συγγραφείς, οι περισσότερες μελέτες γενετικής συσχέτισης και ιδίως οι προερχόμενες από την Ευρώπη, δεν εξέταζαν ξεχωριστά τους διαφορετικούς απλοτύπους, ενώ οι προερχόμενες από την Αφρική μελέτες, παρόλο που διακρίνουν τον απλότυπο Asp299Gly/wild type, εστιάζουν κυρίως σε ειδικές λοιμώξεις, όπως η ελονοσία, η φυματίωση⁶⁹. Σε μια μελέτη σε ασθενείς με σήψη και υγιείς μάρτυρες, οι Lorenz et al⁶⁶ ανίχνευαν τον απλότυπο Asp299Gly/wild type μόνο σε ασθενείς με σηπτικό shock, ενώ ο απλότυπος Asp299Gly/Thr399Ile ανιχνεύτηκε με παρόμοια συχνότητα και στους ασθενείς και στους μάρτυρες. Στη δική μας μελέτη, υπήρχε μόνο ένας ασθενής με τον απλότυπο Asp299Gly/wild type, ο οποίος εισήχθη στη ΜΕΘ με διάγνωση μηνιγγοεγκεφαλίτιδας πιθανόν ιογενούς αιτιολογίας, νοσηλεύτηκε για 13 ημέρες χωρίς να εμφανίσει σηπτικό επεισόδιο και εξήλθε βελτιωμένος.

Ο TLR4 σηματοδοτεί την έναρξη των αμυντικών αντιδράσεων έναντι των gram-αρνητικών βακτηρίων και ακολουθεί η έκφραση του TNFα και της IL-6, που ενεργοποιούν τη φυσική ανοσιακή απάντηση για την αναγνώριση και εξάλειψη πολυμικροβιακών λοιμώξεων⁹⁸, ιδίως των προκαλούμενων από gram-αρνητικά βακτήρια⁹⁹. Οι Arbour et al⁷⁰ αρχικά έδειξαν ότι στον άνθρωπο, η συνύπαρξη των SNPs D299G και T399I, που επηρεάζουν το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TLR4, συσχετίζεται με μειωμένη απάντηση στο εισπνεόμενο LPS. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί του TLR4

συσχετίζονται με προδιάθεση για gram-αρνητικές λοιμώξεις⁶⁷ και διάχυτη καντιντίαση¹⁰⁰, ενώ είχαν προστατευτική δράση έναντι της αθηρωματογένεσης και των αγγειακών συμβαμάτων από την καρδιά και τον εγκέφαλο¹⁰¹⁻¹⁰³.

Τα ευρήματα της δικής μας μελέτης συνηγορούν μάλλον υπέρ μιας προστατευτικής δράσης των πολυμορφισμών *TLR4-D299G* (rs4986790) και *TLR4-T399I* (rs4986791) αναφορικά με την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ. Οι φορείς των πολυμορφισμών, που βέβαια είχαν στην πλειοψηφία τους τον απλότυπο Asp299Gly/Thr399Ile, είχαν σημαντικά μικρότερη συχνότητα εμφάνισης σήψης συγκριτικά με τους wild-type ομοζυγώτες. Οι λοιμώξεις που σημειώθηκαν στους φορείς των πολυμορφισμών οφείλονταν σε gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, ενώ σε ένα επεισόδιο λοίμωξης μαλακών μορίων, δεν ανιχνεύθηκε παθογόνο. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια μελέτη σε παιδιά που αναφέρει προστατευτική δράση των πολυμορφισμών *TLR4-D299G* (rs4986790) και *TLR4-T399I* (rs4986791) αναφορικά με την ανάπτυξη σοβαρών λοιμώξεων από *S. pneumoniae*¹⁰⁴. Επίσης, οι Liadaki et al¹⁰⁵ έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός *TLR4-T399I* (rs4986791) μειώνει τον κίνδυνο αμυγδαλίτιδας από *H. influenzae*, ενώ οι Hawn et al¹⁰⁶ ανέδειξαν προστατευτική επίδραση του *TLR4-D299G* (rs4986790) στην εμφάνιση υποτροπών κυστίτιδας σε γυναίκες.

Από την ανάλυση υποομάδων στη μελέτη μας, φάνηκε ότι αυτή η προστατευτική δράση αφορά κυρίως στις ομάδες των παθολογικών ασθενών και των τραυματιών, ενώ στους χειρουργικούς ασθενείς η φορά της συσχέτισης είναι αντίστροφη, επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Το εύρημα αυτής της διαφορετικής συμπεριφοράς των πολυμορφισμών στους χειρουργικούς ασθενείς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι μετεγχειρητικά η έκφραση του TLR4 είναι μειωμένη και αυτό αφορά τόσο σε ανοικτές επεμβάσεις όσο και σε λαπαροσκοπικές¹⁰⁷, γεγονός που αποδίδεται σε νευροορμονικές μεταβολές που συμβαίνουν πρώιμα μετεγχειρητικά, όπως η έκκριση κατεχολαμινών και κορτιζόλης, ενώ έχει παρατηρηθεί και μειωμένη έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα CD14, μορίου της φυσικής ανοσίας, που συμμετέχει μαζί με τον TLR4 στην αναγνώριση του LPS¹⁰⁸. Πιθανόν η αλληλεπίδραση των μετεγχειρητικών μεταβολών στην έκφραση του TLR με την παρουσία των πολυμορφισμών του να ευθύνονται για τη διαφορετική επίδραση των πολυμορφισμών στους χειρουργικούς ασθενείς συγκριτικά με τις άλλες ομάδες ασθενών.

Δεδομένου ότι η σήψη εμφανίζεται όταν η αρχική απάντηση του ξενιστή σε ένα λοιμώδες ερέθισμα ενισχύεται («καταρράκτης κυτταροκινών»), είναι δυνατόν οι φορείς των πολυμορφισμών του TLR4 να εμφανίζουν προδιάθεση για εντοπισμένες λοιμώξεις (εξαιτίας ακατάλληλης σηματοδότησης υποδοχέων), αλλά να μην μπορούν να εμφανίσουν τη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζει τη σήψη. Αυτό το υποθετικό μοντέλο έρχεται εμφανώς σε αντίθεση με την αρχική άποψη των Arbour et al⁷⁰ σχετικά με τη συνεισφορά των πολυμορφισμών του TLR4 στην προδιάθεση για λοιμώξεις και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία που εξετάζει τον ρόλο των πολυμορφισμών του TAC1 και του BAFFR στην εμφάνιση σήψης και στη θνητότητα ασθενών ΜΕΘ. Πρόσφατα, οι Pieper et al¹⁰⁹ έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός BAFFR rs77874543 που αλλάζει στη θέση 21 την προλίνη με αργινίνη (P21R), διαταράσσει την ανεξάρτητη συγκέντρωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων του BAFFR σε πολυμερή. Έτσι, ο P21R παραβιάζει την εξαρτώμενη από τον BAFFR ενεργοποίηση του NFκB2, την επιβίωση και την έκκριση IgM από τα Β κύτταρα, προδιαθέτοντας έτσι σε πρωτογενείς αντισωματικές ανεπάρκειες¹⁰⁹. Όπως αναφέρθηκε ήδη, παρατηρήσαμε μια αρνητική συσχέτιση του πολυμορφισμού BAFFR-P21R με την εμφάνιση σήψης στη ΜΕΘ. Υποθέσαμε ότι οι φορείς του πολυμορφισμού BAFFR-P21R πιθανόν δεν έχουν την ικανότητα εμφάνισης συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης, όπως και οι φορείς των πολυμορφισμών του TLR4. Όμως, επειδή ο αριθμός των φορέων του BAFFR-P21R στο δείγμα της μελέτης μας ήταν μικρός, χρειάζονται μεγαλύτερες μελέτες για την διερεύνηση του ρόλου του πολυμορφισμού BAFFR-P21R στην προδιάθεση για σήψη.

Ο πολυμορφισμός TNFRSF13C/BAFFR-H159Y (rs61756766) δεν συσχετίστηκε με την εμφάνιση σήψης ή τη θνητότητα στη ΜΕΘ.

Στους ασθενείς της μελέτης μας διαπιστώθηκε συνδεδεμένη μεταβίβαση των δύο πολυμορφισμών του BAFF-R, TNFRSF13C/BAFFR-P21R (rs77874543) και TNFRSF13C/BAFFR-H159Y (rs61756766), εύρημα που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία¹⁰³.

Επιπλέον, διερευνήσαμε τον ρόλο του πολυμορφισμού TAC1-C104R που απαντάται σε ασθενείς με COVID^{110, 111} στην εμφάνιση σήψης και στη θνητότητα ασθενών ΜΕΘ. Η σύγχρονη θεώρηση για τον πολυμορφισμό αυτό καθώς και για τον πολυμορφισμό TAC1-A181E (rs72553883) είναι ότι πρόκειται για μεταλλάξεις που προδιαθέτουν στη νόσο παρά που την προκαλούν. Μετά από λεπτομερή αναζήτηση στη βιβλιογραφία, δεν βρέθηκαν μελέτες που να διερευνούν τον ρόλο πολυμορφισμών του TAC1 σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ. Στη μελέτη μας ο πολυμορφισμός TNFRSF13B/TAC1-C104R (rs34557412) φάνηκε να συσχετίζεται ισχυρά με τη θνητότητα στη ΜΕΘ, συσχέτιση σταθερή, παρά το μικρό δείγμα των φορέων του πολυμορφισμού. Συγκεκριμένα, οι φορείς του πολυμορφισμού είχαν 20-πλάσια θνητότητα στη ΜΕΘ συγκρινόμενοι με τους wild-type ομοζυγώτες. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση, η μεταβλητή του πολυμορφισμού φάνηκε να εξασκεί επίδραση διαμεσολαβητή (mediation effect) στο APACHE II score, που παραδοσιακά έχει ισχυρή συσχέτιση με τη θνητότητα στη ΜΕΘ¹⁰⁴. Πράγματι, στο πολυμεταβλητό μοντέλο θνητότητας, από τις baseline μεταβλητές, οι μόνοι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου ήταν ο πολυμορφισμός TNFRSF13B/TAC1-C104R (rs34557412) και το SOFA score εισαγωγής. Όλοι οι φορείς του πολυμορφισμού TAC1-C104R εμφάνιζαν μικρή έως μέτρια υπογαμμασφαιριναιμία και οι μισοί από αυτούς είχαν στο ιστορικό τους χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, δηλ. νόσο εξαρτώμενη από την ανοσιακή απάντηση. Εντύπωση προξενεί το γεγονός ότι ο θάνατος των φορέων του πολυμορφισμού δεν οφειλόταν σε σήψη. Η συσχέτιση του TAC1 με τη θνητότητα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τέλος, δεν ήταν δυνατή η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμορφισμών του TLR4 και των πολυμορφισμών του BAFF-R και του TACI, καθώς δεν υπήρχαν ασθενείς που να έχουν απλότυπο με περισσότερους πολυμορφισμούς. Επίσης δεν κατέστη δυνατή η διερεύνηση του ρόλου του πολυμορφισμού *C2-c.841_849+19del28* (*rs9332736*) του συμπληρώματος, αφού δεν βρέθηκαν φορείς του πολυμορφισμού στο δείγμα των μελετηθέντων ασθενών.

Συμπεράσματα

Η μελέτη μας έδειξε ότι σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ, οι πολυμορφισμοί *TLR4-D299G* (*rs4986790*), *TLR4-T399I* (*rs4986791*) και *TNFRSF13C/BAFFR-P21R* (*rs77874543*) ασκούν προστατευτική επίδραση αναφορικά με την εμφάνιση σήψης, ενώ ο πολυμορφισμός *TNFRSF13B/TACI-C104R* (*rs34557412*) συσχετίζεται σημαντικά με αύξηση της θνητότητας στη ΜΕΘ. Ο πολυμορφισμός *TNFRSF13C/BAFFR-H159Y* (*rs61756766*) δεν συσχετίστηκε με την εμφάνιση σήψης ή τη θνητότητα στη ΜΕΘ. Η αρνητική συσχέτιση των πολυμορφισμών του TLR4 παρατηρήθηκε στην ομάδα των παθολογικών ασθενών και οριακά στην ομάδα των τραυματιών, ενώ στους χειρουργικούς ασθενείς δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση. Διαπιστώθηκε ανισορροπία σύνδεσης για τους πολυμορφισμούς *TLR4-D299G* (*rs4986790*) και *TLR4-T399I* (*rs4986791*) και για τους πολυμορφισμούς *TNFRSF13C/BAFFR-P21R* (*rs77874543*) και *TNFRSF13C/BAFFR-H159Y* (*rs61756766*). Ο πολυμορφισμός *C2-c.841_849+19del28* (*rs9332736*) δεν ανιχνεύτηκε στο δείγμα των ασθενών της μελέτης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-214
2. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988;318:727-732
3. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001;2:967-977
4. Kwiatowski D. Genetic susceptibility to malaria getting complex. *Curr Opin Genetic Dev* 2000;10:320-324
5. Villar J, Maca-Meyer N, Pérez-Méndez L, Flores C. Bench-to-bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care* 2004;8:180-189
6. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115
7. Kothari N, Bogra J, Abbas H, Kohli M, Malik A, Kothari D, Srivastava S, Singh PK. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine* 2013;61:676-681
8. Watanabe E, Zehnbauer BA, Oda S, Sato Y, Hirasawa H, Buchman TG. Tumor necrosis factor-308 polymorphism (rs1800629) is associated with mortality and ventilator duration in 1057 Caucasian patients. *Cytokine* 2012;60:249-256
9. Kotsaki A, Raftogiannis M, Routsis C, Baziaka F, Kotanidou A, Antonopoulou A, Orfanos SE, Katsenos C, Koutoukas P, Plachouras D, Mandragos K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Genetic polymorphisms within tumor necrosis factor gene promoter region: a role for susceptibility to ventilator-associated pneumonia. *Cytokine* 2012;59:358-363
10. Song Z, Song Y, Yin J, Shen Y, Yao C, Sun Z, Jiang J, Zhu D, Zhang Y, Shen Q, Gao L, Tong C, Bai C. Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality. *PLoS One* 2012;7:e46113
11. Song Z, Yao C, Yin J, Tong C, Zhu D, Sun Z, Jiang J, Shao M, Zhang Y, Deng Z, Tao Z, Sun S, Bai C. Genetic variation in the TNF receptor-associated factor 6 gene is associated with susceptibility to sepsis-induced acute lung injury. *J Transl Med* 2012;10:166
12. Paskulin DD, Fallavena PR, Paludo FJ, Borges TJ, Picanço JB, Dias FS, Alho CS. TNF -308G>A a promoter polymorphism (rs1800629) and outcome from critical illness. *Braz J Infect Dis* 2011;15:231-238
13. Shimada T, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, Abe R, Nakada TA, Tateishi Y, Otani S, Hirasawa H, Tokuhisa T, Uno H. Outcome prediction in sepsis combined use of genetic polymorphisms - A study in Japanese population. *Cytokine* 2011;54:79-84

14. Surbatovic M, Grujic K, Cikota B, Jevtic M, Filipovic N, Romcic P, Strelcic N, Magic Z. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. *J Crit Care* 2010;25:542.e1-8
15. Pappachan JV, Coulson TG, Child NJ, Markham DJ, Nour SM, Pulletz MC, Rose-Zerilli MJ, de Courcey-Golder K, Barton SJ, Yang IA, Holloway JW. Mortality in adult intensive care patients with severe systemic inflammatory response syndromes is strongly associated with the hypo-immune TNF -238A polymorphism. *Immunogenetics* 2009;61:657-62
16. Woehrle T, Du W, Goetz A, Hsu HY, Joos TO, Weiss M, Bauer U, Brueckner UB, Marion Schneider E. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during Candida sepsis in humans. *Cytokine* 2008;41:322-329
17. García-Segarra G, Espinosa G, Tassies D, Oriola J, Aibar J, Bové A, Castro P, Reverter JC, Nicolás JM. Increased mortality in septic shock with the 4G/4G genotype of plasminogen activator inhibitor 1 in patients of white descent. *Intensive Care Med* 2007;33:1354-1362
18. Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Abe R, Nakada T. Cytokine-related genotypic differences in peak interleukin-6 blood levels of patients with SIRS and septic complications. *J Trauma* 2005;59:1181-1189
19. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Watanabe E, Abe R, Hatano M, Tokuhisa T. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* 2005;129:322-328
20. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, Millo JL, Welsh KI, Holloway P, Hitman GA, Piper RD, Garrard CS, Hinds CJ. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun* 2004;5:631-640
21. Rauchschalbe SK, Maseizik T, Mittelkötter U, Schlüter B, Patzig C, Thiede A, Reith HB. Effect of the LT-alpha (+250 G/A) polymorphism on markers of inflammation and clinical outcome in critically ill patients. *J Trauma* 2004;56:815-822
22. Calvano JE, Um JY, Agnese DM, Hahm SJ, Kumar A, Coyle SM, Calvano SE, Lowry SF. Influence of the TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms upon infectious risk and outcome in surgical intensive care patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003;4:163-169
23. Schröder J, Kahlke V, Book M, Stüber F. Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock* 2000;14:307-310
24. Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, Lui WY, Chiu JH, Lee TY. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. *Crit Care Med* 2000;28:2733-2736
25. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF.

- Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282:561-568
26. Fang XM, Schröder S, Hoeft A, Stüber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1330-1334
 27. Schroeder S, Reck M, Hoeft A, Stüber F. Analysis of two human leukocyte antigen-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1265-1270
 28. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384
 29. Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, Nedospasov SA. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1995-1996;46:42-50
 30. Azevedo ZM, Moore DB, Lima FC, Cardoso CC, Bougleux R, Matos GI, Luz RA, Xavier-Elsas P, Sampaio EP, Gaspar-Elsas MI, Moraes MO. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA) single nucleotide polymorphisms: importance in ARDS in septic pediatric critically ill patients. *Hum Immunol* 2012;73:661-667
 31. Phumeetham S, Chat-Uthai N, Manavathongchai M, Viprakasit V. Genetic association study of tumor necrosis factor-alpha with sepsis and septic shock in Thai pediatric patients. *J Pediatr (Rio J)* 2012;88:417-422
 32. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML, Murray JC. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2010;68:323-329
 33. Schueller AC, Heep A, Kattner E, Kroll M, Wisbauer M, Sander J, Bartmann P, Stuber F. Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis. *Biol Neonate* 2006;90:229-232
 34. Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor alpha-308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:424-428
 35. Treszl A, Kocsis I, Szathmári M, Schuler A, Héninger E, Tulassay T, Vászrhelyi B. Genetic variants of TNF-[FC12]a, IL-1beta, IL-4 receptor [FC12]a-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. *Biol Neonate* 2003;83:241-245
 36. Weitkamp JH, Stüber F, Bartmann P. Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis. *Infection* 2000;28:92-96

37. Zhao Y, Tao L, Jiang D, Chen X, Li P, Ning Y, Xiong R, Liu P, Peng Y, Zhou YG. The -144C/A polymorphism in the promoter of HSP90beta is associated with multiple organ dysfunction scores. *PLoS One* 2013;8:e58646
38. Chen KH, Zeng L, Gu W, Zhou J, Du DY, Jiang JX. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *Br J Surg* 2011;98:1252-1259
39. Chen KH, Wang Y, Gu W, Zeng L, Jiang D, Du D, Hu P, Duan Z, Liu Q, Huang SL, Jiang J. Functional significance of the Toll-like receptor 4 promoter gene polymorphismw in the Chinese Han population. *Crit Care Med* 2010;38:1292-1299
40. Duan ZX, Gu W, Zhang LY, Jiang DP, Zhou J, Du DY, Zen L, Chen KH, Liu Q, Jiang JX. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism is associated with the outcome of trauma patients in Chinese Han population. *J Trauma* 2011;70:954-958
41. Menges T, König IR, Hossain H, Little S, Tchatalbachev S, Thierer F, Hackstein H, Franjkovic I, Colaris T, Martens F, Weismüller K, Langefeld T, Stricker J, Hempelmann G, Vos PE, Ziegler A, Jacobs B, Chakraborty T, Bein G. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 2008;36:1456-62, e1-6
42. McDaniel DO, Hamilton J, Brock M, May W, Calcote L, Tee LY, Vick L, Newman DB, Vick K, Harrison S, Timberlake G, Toevs C. Molecular analysis of inflammatory markers in trauma patients at risk of postinjury complications. *J Trauma* 2007;63:147-57
43. Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B, Heesen M. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1205-11
44. Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade FU, Stüber F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999;230:207-214
45. Shalhub S, Pham TN, Gibran NS, O'Keefe GE. Tumor necrosis factor gene variation and the risk of mortality after burn injury: a cohort study. *J Burn Care Res* 2009;30:105-111
46. Lin J, Yao YM, Yu Y, Chai JK, Huang ZH, Dong N, Sheng ZY. Effects of CD14-159 C/T polymorphism on CD14 expression and the balance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in whole blood culture. *Shock* 2007;28:148-153
47. Barber RC, Chang LY, Arnoldo BD, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW, Aragaki CC. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res* 2006;4:250-255
48. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 2004;41:808-813

49. Messer G, Sprengler U, Jung MG, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173:209-219
50. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303-310
51. Granowitz EV, Santos AA, Poutsika DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM, Dinarello CA. Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 1991;338:1423-1424
52. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376
53. Chauhan M, McGuire W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very low birth weight infants: meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F427-F429
54. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin-6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138–18144
55. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526–530
56. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism in the 5' flanking region of the CD-14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976–983
57. Gao H, Leaver S, Burke-Gaffney A, Finney SJ. Severe sepsis and toll-like receptors. *Semin Immunopathol* 2008;30:29–40
58. Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999;163:639–643
59. Baiyee EE, Flohe S, Lendemans S, Bauer S, Mueller N, Kreutzfelder E, Grosse-Wilde H. Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin Exp Immunol* 2006;145:456-462
60. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 2004;430:257-263
61. Plantiga T, Ioana M, Alonso S, Izagirre N, Hervella M, Joosten L, van den Meer J, de la Rúa C, Netea M. The evolutionary history of TLR4 polymorphisms in Europe. *J Innate Immun* 2012;4:168-175

62. Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009;227:248-263
63. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000;165:7096-7101
64. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 2005;41:S403-407
65. Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di RA. Excess of rare amino-acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001;158:1657-664
66. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with Gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-1032
67. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522-1525
68. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TRR-4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-191
69. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van d, V, Van Der Meer JW, Netea MG. Functional consequences of Toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 2008;14:346-352
70. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-191
71. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure and signaling. *Semin Immunol* 2006;18:263-275
72. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B-cell differentiation. *J Immunol* 2007;179:7276-7286
73. Kalled SL, Ambrose C, Hsu YM. The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors. *Curr Dir Autoimmun* 2005;8:206-242
74. Hymowitz SG. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cystein-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 2005;280:7218-7227
75. von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001;14:573-582
76. McKay F, Schneider P. TACI: an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biological and biochemical properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:263-276
77. Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BlyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006;108:2687-2694

78. Salzer U et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37:820-828
79. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency. *J Clin Invest* 2007;117:1660-1667
80. Vořechovský I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster ADB, Björkander J, Smith CI, Hammarstrom L. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunopathol* 1995;77:185-192
81. McKay F, Leung H. The role of BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 2006;18:284-289
82. Roderburg C, Koch A, Tacke F, Nieuwenhuijsen L, Bruensing J, Vargas Cardenas D, Kreggenwinkel K, Vucur M, Koppe C, Jungebluth P, Seikrit C, Luedde M, Trautwein C, Luedde T. Serum concentrations of A Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *J Crit Care* 2013;28:882.e1-11
83. Pongratz G, Hochrinner H, Straub RH, Lang S, Brännler T. B cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family (BAFF) behaves as an acute phase reactant in acute pancreatitis. *PLOS One* 2013;8:e54297
84. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 2007;171:715-727
85. Johnson CA, Densen P, Hurford Jr RK, Colten HR, Wetsel RA. Type I human complement C2 deficiency. A 28-base pair gene deletion causes skipping of exon 6 during RNA splicing. *J Biol Chem* 1992;267:9347-9353
86. Jönsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius VA, Braconier JH, Sjöholm AG. Hereditary C2 deficiency in Sweden: frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:23-34
87. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359-395
88. Jönsson G, Oxelius VA, Truedsson L, Braconier JH, Sturfelt G, Sjöholm AG. Homozygosity for the IgG2 subclass allotype G2M(n) protects against severe infection in hereditary C2 deficiency. *J Immunol* 2006;177:722-728
89. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie RC. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis* 1987;40:373-383
90. Abbreviated Injury Scale 2005. Association for the Advancement of Automotive Medicine, IL 60011, USA
91. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
92. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to

- describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22:707-10
93. Bone RC, Balk RA, Cerra FB. 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
 94. Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.). Κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάγνωση και την εμπειρική θεραπεία των λοιμώξεων. Ελληνική Εταιρεία Λοιμώξεων, Αθήνα, 2007
 95. Horan TC, Gaynes RP. Surveillance of nosocomial infections. In: Hospital Epidemiology and Infection Control, 3rd ed. Mayhall CC, editor. Philadelphia: Lippincott, Williams & Williams, 2004:1659-1702
 96. Iliadi A, Makrythanasis P, Tzetis M, Tsipi M, Traeger-Synodinos J, Ioannou PC, Rapti A, Kanavakis E, Christopoulos TK. Association of TLR4 single-nucleotide polymorphisms and sarcoidosis in Greek patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009;13:849-853
 97. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S. TLR4 polymorphisms, infectious diseases and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16645-16650
 98. Hochino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo M, Ogawa T, Takeda Y, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-3752
 99. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:36-46
 100. Van der Graaf SA, Netea MG, Morré SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:29-34
 101. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonara E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-192
 102. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumart MC, Seknadji P, Lamotte M, Lebreton D, Olivier V, de Prost D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e61-e64
 103. Boekholdt SM, Agema WRP, Peters RJG, Zwinderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, Kastelein JJ, Jukema JW; REgression GRowth Evaluation Statin Study Group. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003;107:2416-2421

104. Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de Leon E, McIntyre PB, Sullivan JS. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FCγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 2008;86:268-270
105. Liadaki K, Petinaki E, Skoulakis C, Tsirevelou P, Klapsa D, Germeis AE, Speletas M. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Immunol* 2011;18:217-222
106. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, Stapleton AE, Janer M, Aderem A, Stamm WE, Zhao LP, Hooton TM. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One* 2009;4:e5990
107. Ikushima H, Nishida T, Takeda K, Ito T, Yasuda T, Yano M, Akira S, Matsuda H. Expression of toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation. *Surgery* 2004;135:376-385
108. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001;92:1322-1326
109. Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, Kraus H, Salzer U, Fiala GJ, Schamel WW, Lougaris V, Plebani A, Hammarstrom L, Recher M, Germeis AE, Grimbacher B, Warnatz K, Rolink AG, Schneider P, Notarangelo LD, Eibel H. A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization contributing to common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; (Epub ahead of print); doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.021
110. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, Kanariou M, Germeis AE. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol* 2011;31:550-559
111. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarström Q, Jennings S, Lougaris V, Bergbreiter A, Hagen T, Birmelin J, Plebani A, Webster AD, Peter HH, Suez D, Chapel H, McLean-Tooke A, Spickett GP, Anover-Sombke S, Ochs HD, Urschel S, Belohradsky BH, Ugrinovic S, Kumararatne DS, Lawrence TC, Holm AM, Franco JL, Schulze I, Schneider P, Gertz EM, Schäffer AA, Hammarström L, Thrasher AJ, GasparHB, Grimbacher B. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009;113:1967-1976
112. Kutukculer N, Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Berdeli A. Three different classifications, B lymphocyte subpopulations, *TNFRSF13B* (TACI), *TNFRSF13C* (BAFF-R), *TNFSF13* (APRIL) gene mutations, *CTLA-4* and *ICOS* gene polymorphisms in Turkish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012;32:1165-1179

113. Campbell NN, Tooley MA, Willatts SM. APACHE II scoring system on a general intensive care unit: audit of daily APACHE II scores and 6-month survival of 691 patients admitted to a general intensive care unit between May 1990 and December 1991. *J Royal Soc Med* 1994;87:73-77

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)

II score

The APACHE II Severity of Disease Classification System

Physiologic Variable	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperature - rectal (°C)	≥41	39-40.9		38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≤29.9
Mean Arterial Pressure (mm Hg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Heart Rate	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Respiratory Rate (nonventilated or ventilated)	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
Oxygenation (mmHg) a. FiO ₂ > 0,5 use A-aDO ₂ b. FiO ₂ < 0,5 use PaO ₂	a ≥500 b	350-499	200-349		<200				
Arterial pH	≥7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
Serum Sodium (mmol/l)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Serum Potassium (mmol/l)	≥7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5
Serum Creatinine (mg/dl, Double point score for acute renal failure)	≥3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hematocrit (%)	≥60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		<20
White Blood Count (in 1000/mm ³)	≥40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		<1
Glasgow-Coma-Scale (GCS)	Score = 15 minus actual GCS								
Serum HCO ₃ (venous, mmol/l, use if no ABGs)	≥52	41-51.9		32-40.9	22-31.9		18-21.9	15-17.9	<15
A = Total Acute Physiology Score APS	Sum of the 12 individual variable points								
B = Age Points	C = Chronic Health Points								
≤44 years 0 points 45-54 years 2 points 55-64 years 3 points 65-74 years 5 points ≥75 years 6 points	If the patient has a history of severe organ system insufficiency or is immunocompromised assign points as follows: a. For nonoperative or emergency postoperative patients – 5 points b. For elective postoperative patients – 2 points								
APACHE II Score = Sum of A (APS points) + B (Age points) + C (Chronic Health points)									

(From: Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 1985;13(10):818-29)

2. Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score

SOFA score	0	1	2	3	4
Respiratory PaO ₂ /FIO ₂ (mm Hg) SaO ₂ /FIO ₂	>400	<400 221–301	<300 142–220	<200 67–141	<100 <67
Coagulation Platelets 10 ³ /mm ³	>150	<150	<100	<50	<20
Liver Bilirubin (mg/dL)	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12.0
Cardiovascular^b Hypotension	No hypotension	MAP <70	Dopamine <=5 or dobutamine (any)	Dopamine >5 or norepinephrine <=0.1	Dopamine >15 or norepinephrine >0.1
CNS Glasgow Coma Score	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal Creatinine (mg/dL) or urine output (mL/d)	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9 or <500	>5.0 or <200

3. Charlson's comorbidity index

Έμφραγμα μυοκαρδίου	1	Έλκος στομάχου / 12/δακτύλου	1	Λευκαμία	2
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	1	Ήπια ηπατοπάθεια	1	Λέμφωμα	2
Περιφερική αγγειοπάθεια	1	ΣΔ	1	Μέτρια / βαριά ηπατική νόσος	3
ΑΕΕ (παροδικό)	1	Ημιπληγία	2	Μεταστατικός συμπαγής καρκίνος	6
Άνοια	1	Μέτρια / βαριά νεφρική νόσος	2	AIDS	6
Χρόνια πνευμονική νόσος	1	ΣΔ με συμμετοχή οργάνου-στόχου	2		
Νόσος συνδετικού ιστού	1	Κακοήθης όγκος	2		

(Πηγή: Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie RC. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis* 1987;40:373–383

Injury Severity Score (ISS)

Regions	AIS*	AIS Meaning
Head, Neck, C-spine	1	Minor
Face including nose, mouth, eyes, ears	2	Moderate
Thorax, thoracic spine, diaphragm	3	Serious
Abdomen and Lumbar spine	4	Severe
Extremities including pelvis	5	Critical
External soft tissue injury	6	Maximal (Currently untreatable)

*Abbreviated Injury Score

Calculate AIS for most severely injured body part in each region

Injury Severity Score is calculated as sum of square of AIS for each body region

Maximum Score is 75

If any body region is assigned a 6, the overall ISS is automatically 75

(Πηγή: Abbreviated Injury Scale 2005. Association for the Advancement of Automotive Medicine, IL 60011, USA)