



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ:
Καθηγητής Ε. Ι. Γιαμαρέλλης - Μπουρμπούλης

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»

2020-22

«Μικροβιακή αλλόθρεση στη σήψη»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS



ΣΤΕΛΙΟΣ ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ
ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΟΣ
ΠΑΘ/ΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ & ΤΜ. ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ
Π.Γ.Ν.Π.

Σύγκρουση συμφερόντων

- Honoraria για ομιλίες: *Pfizer, Gilead Sciences, MSD, Angelini*
- Honoraria για συμβουλευτικές υπηρεσίες: *Pfizer, GSK, Angelini*
- Research Grants: *Pfizer, Gilead*

Ορολογία

Βακτηριακή μετατόπιση

Bacterial translocation

Βακτηριακή αλλόθυση

Microbial translocation

Βακτηριακή μετακίνηση

PAMPs' translocation

Βακτηριακή διαμετάθεση

Endotoxin translocation

Ενδοτοξιναιμία

Ιστορική αναδρομή - ορισμός

INFECTION AND IMMUNITY, **FEB. 1979**, P.403-411

Vol. 23, No. 2

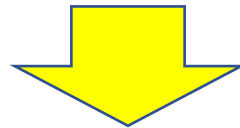
Translocation of Certain Indigenous Bacteria from the Gastrointestinal Tract to the Mesenteric Lymph Nodes and Other Organs in a Gnotobiotic Mouse Model

RODNEY D. BERG* AND ALVA W. GARLINGTON†

Department of Microbiology and Immunology, Louisiana State University Medical Center, School of Medicine in Shreveport, Shreveport, Louisiana 71130

Received for publication 22 November 1978

Bacterial translocation: the passage of viable bacteria from the gastrointestinal tract through the epithelial mucosa into the lamina propria and then to the mesenteric lymph nodes and possibly other organs



Bacterial translocation: the phenomenon by which viable or non-viable bacteria or their products (PAMPs / endotoxin) cross the intestinal barrier and invade normally sterile extraintestinal tissues

Εντερικός φραγμός

Ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί το μεγαλύτερο σε επιφάνεια όριο μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Επιτελεί μια **διττή και αντικρουόμενη λειτουργία**:

Απορρόφηση
θρεπτικών
συστατικών



Αποτροπή διείσδυσης βλαπτικών
παραγόντων (μικροοργανισμοί,
ενδοτοξίνη, αντιγόνα)

Η ικανότητα αυτή του εντερικού βλεννογόνου να **διαχωρίζει επιλεκτικά τα βλαπτικά συστατικά** του εξωτερικού (ενδοαυλικού) περιβάλλοντος (→ **διαμερισματοποίηση**), είναι μια **υψηλής εξειδίκευσης λειτουργία** που περιγράφεται υπό τον όρο «**εντερικός φραγμός**», η επάρκεια ή οι μεταβολές του οποίου αποτελούν ζωτικής σημασίας παράγοντα σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις

Εντερικός φραγμός:
Δομή και λειτουργία

Εντερικός φραγμός

Παράγοντες

Ενδοαυλικό

Επιθηλιακό

Υποβλεννογόνιο

Μη ειδική άμυνα

- Εντερική χλωρίδα
- Κινητικότητα
- Πρωτεολυτικά ένζυμα
- Όξινο pH

- Ακίνητο υδάτινο στρώμα
- Στρώμα βλέννης
- Μικρολάχνες
- Επιθηλιακά κύτταρα
- Αποφρακτικές ενώσεις

- Συνδετικός ιστός
- Ενδοθήλιο τριχοειδών
- Αιματική ροή

Ανοσολογική άμυνα

- Εκκριτική IgA
- Αντιμικροβιακά πεπτίδια
 - ντεφενσίνες
 - καθελικιδίνη
 - λυσοζύμη

- Κύτταρα M (Payer)
- Λεμφοκύτταρα

- Λεμφοκύτταρα
- Σιτευτικά κύτταρα
- Μακροφάγα
- Ουδετερόφιλα
- Ηωσινόφιλα

Εντερικός φραγμός

Βιολογικό Φραγμό

- ✓ Φυσιολογική εντερική χλωρίδα

Μηχανικό Φραγμό

- ✓ Επιθηλιακά κύτταρα
- ✓ Αποφρακτικές ενώσεις (Tight Junctions)
- ✓ Ενδοθήλιο τριχοειδών

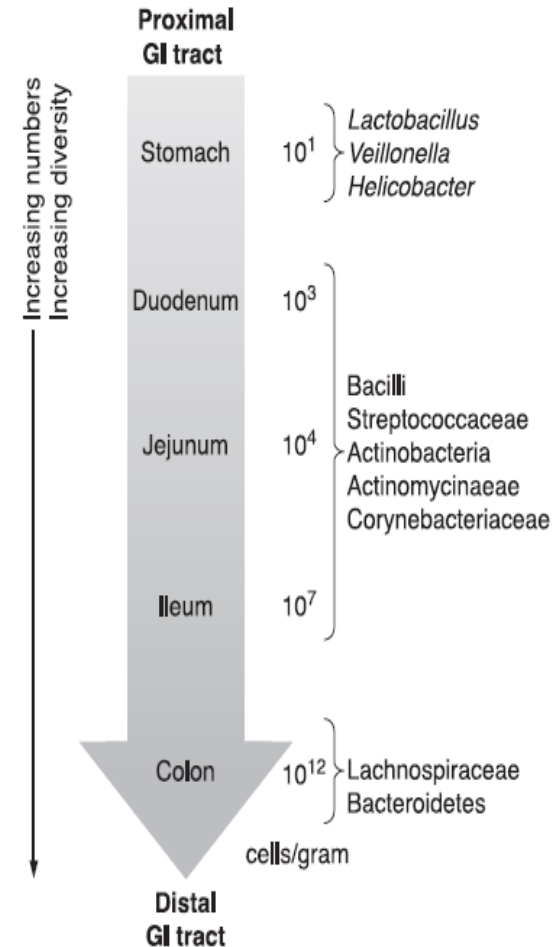
Ανοσολογικό Φραγμό

- ✓ Εκκριτική ανοσοσφαιρίνη A
- ✓ Αντιμικροβιακά πεπτίδια (ντεφενσίνη, καθελικιδίνη, λυσοζύμη)
- ✓ Ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα
- ✓ Peyer πλάκες
- ✓ Μεσεντέριοι λεμφαδένες
- ✓ Δ.Ε.Σ.

I. Βιολογικός φραγμός: εντερική χλωρίδα (*microbiota*)

- ✓ Έως 10^{14} μικροβιακά κύτταρα (*microbiota*)
- ✓ 10 X των κυττάρων του ξενιστή
- ✓ 100 X των γονιδίων του ξενιστή
- ✓ Metagenomic technology (r RNS sequence analysis)
→ 15.000-36.000 species

- ✓ Αναερόβια >> αερόβια (100 έως 1000 φορές)
- ✓ Τα αναερόβια δημιουργούν μια επίστρωση (*carpet*) παρεμποδίζοντας την επαφή των παθογόνων με το επιθήλιο
- ✓ Συνεχές “cross talk” με επιθήλιο και ανοσολογικό σύστημα του εντέρου



I. Βιολογικός φραγμός: εντερική χλωρίδα (*microbiota*)

Μεταβολικός Ρόλος microbiota

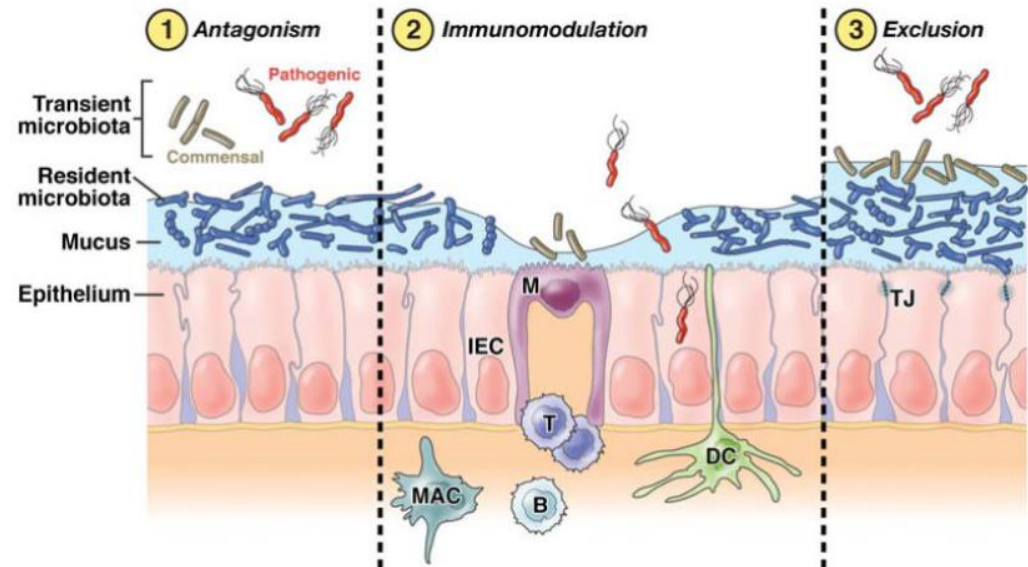
- ✓ Παραγωγή βιταμινών B, K
- ✓ Διάσπαση τροφών
- ✓ Παραγωγή βραχείας αλύσου Λ.Ο.
- ✓ Ολοκλήρωση του εντεροηπατικού κύκλου χολικών αλάτων



Ενεργειακή τροφοδοσία επιθηλίου
Φυσιολογική ιστολογική δομή του εντέρου

Ανοσολογικός Ρόλος

- ✓ Ανταγωνισμός
- ✓ Αντίσταση στον αποικισμό
- ✓ Φυσιολογική ανοσολογική λειτουργία του εντέρου
 - ανοσολογική ανοχή
 - αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση



I. Βιολογικός φραγμός: εντερική χλωρίδα (*microbiota*)

Παράγοντες που διαταράσσουν εντερική χλωρίδα

- ✓ Μείωση κινητικότητας του γαστρεντερικού σωλήνα
- ✓ Μειωμένη γαστρική οξύτητα
- ✓ Απουσία ή μειωμένη έκκριση χολικών αλάτων
- ✓ Αντιβιοτικά

I. Βιολογικός φραγμός: εντερική χλωρίδα (*microbiota*)

Microbiota και βακτηριακή διαμετάθεση

- ✓ Βακτηριακή διαμετάθεση: Αερόβια Gram (-) >> Αναερόβια
- ✓ Τα αερόβια Gram (-) μετακινούνται διαμέσω άθικτου επιθηλίου
- ✓ Η διαμετάθεση των αναεροβίων προϋποθέτει βλάβη του επιθηλίου

II. Μηχανικός φραγμός: ο ρόλος της απόπτωσης

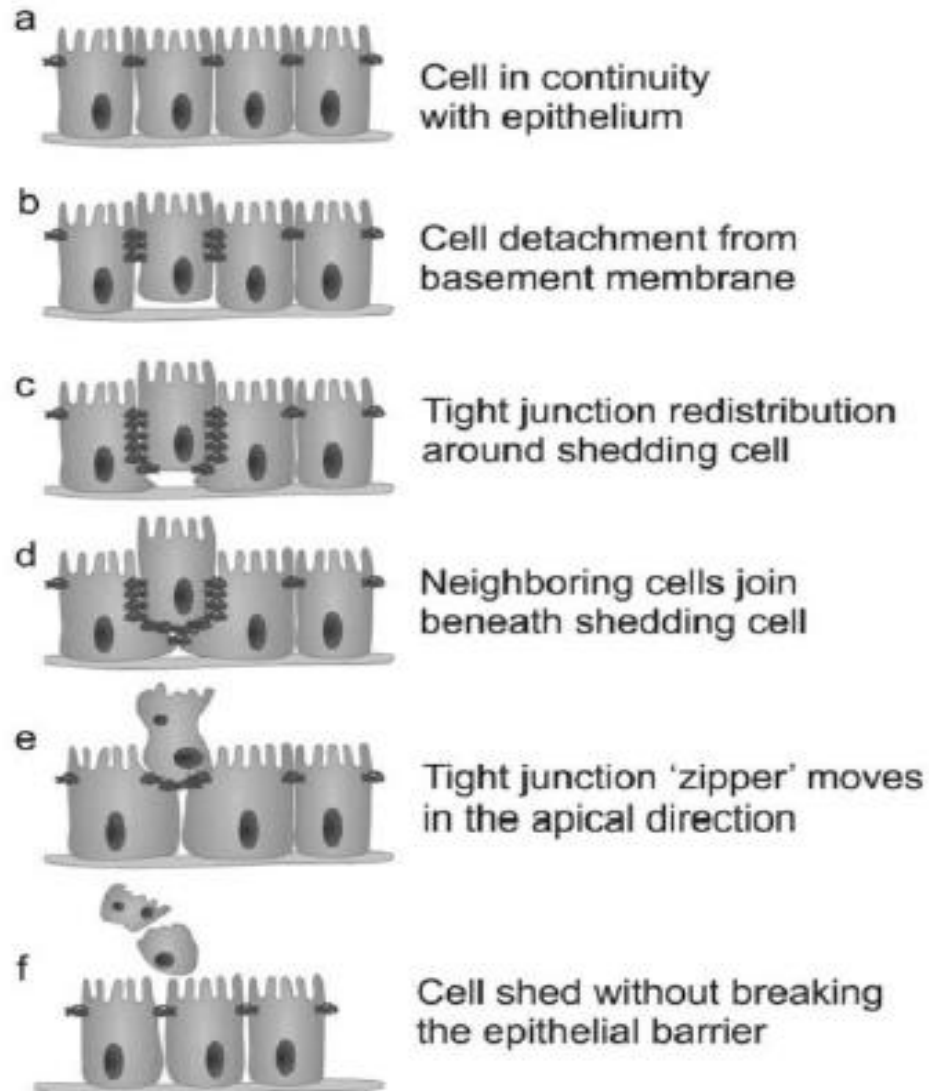
Epithelial “shedding” from villous tip

- Specialized process, apoptosis-like
- Neighboring cells join beneath shedding cell
- TJs’ redistribution
- Shed into the lumen
- Preserved barrier function

Crypt epithelial apoptosis

- Typical apoptosis
- Cell completely separates from its neighbors
- Disruption of TJs
- Removed by phagocytosis
- Disrupted barrier function

II. Μηχανικός φραγμός: ο ρόλος της απόπτωσης



Epithelial shedding
at villous tip
“Zipper mechanism”

II. Μηχανικός φραγμός: ο ρόλος της απόπτωσης

Πειστικά στοιχεία για το ρόλο της απόπτωσης υπάρχουν για την περιοχή της κρύπτης

Ομοιοστασία επιθηλίου:

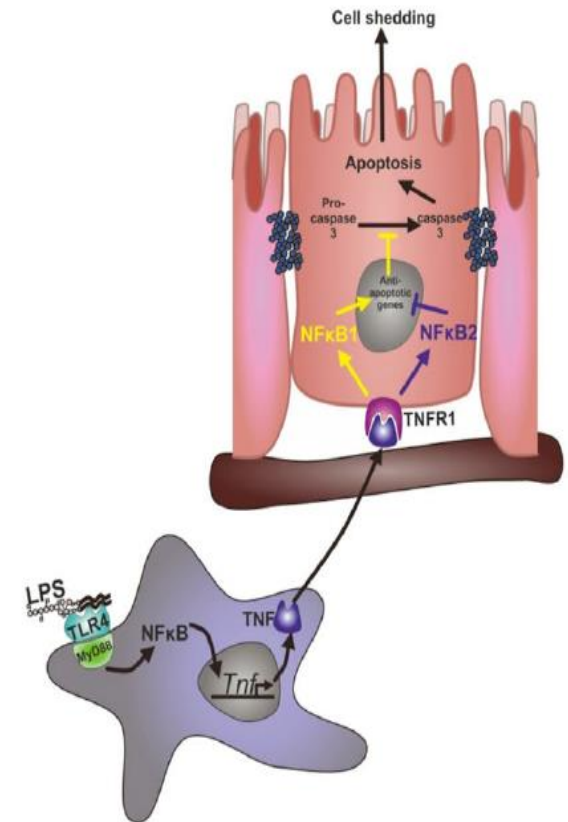
- «Αυθόρμητη» απόπτωση στη θέση των stem cells: ~10% stem cells υφίστανται απόπτωση κάθε στιγμή
- «Epithelial shedding» στην κορυφή λάχνης

Αυξημένη απόπτωση στο κρυπτικό επιθήλιο → μειωμένη αναγεννητική ικανότητα σε βλαπτικά ερεθίσματα, βράχυνση ύψους λαχνών

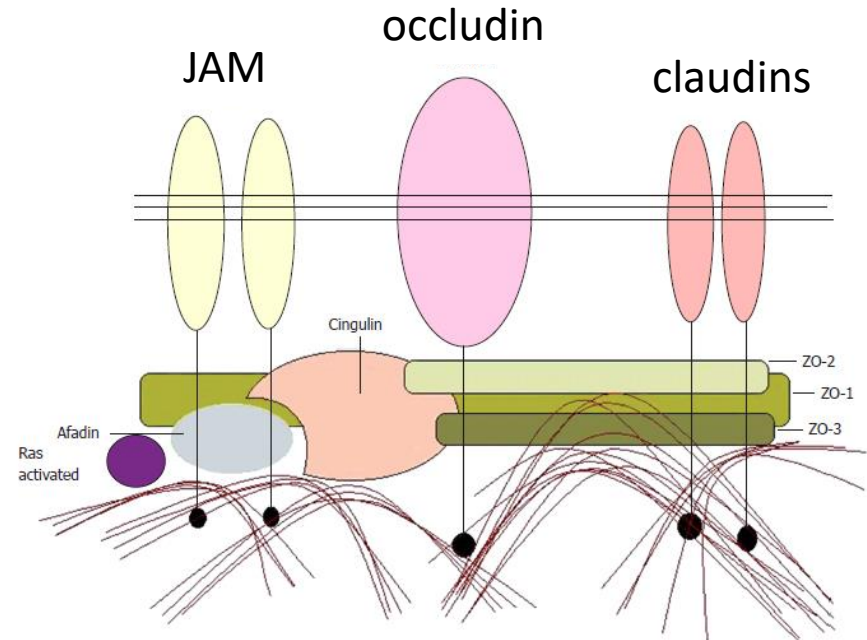
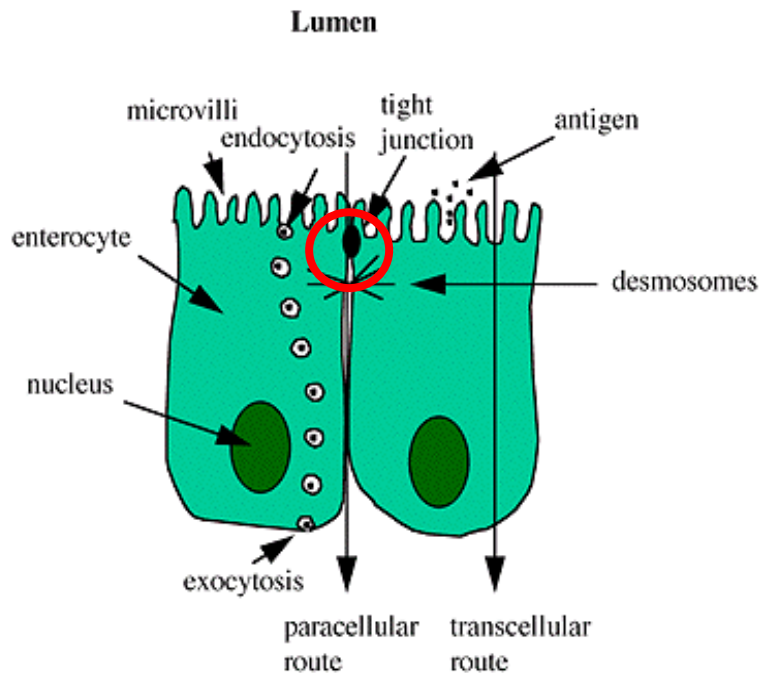
Αυξημένη απόπτωση → **δυσλειτουργία του ΒΕΦ**



Δημιουργία φαύλου κύκλου ανατροφοδότησης της απόπτωσης

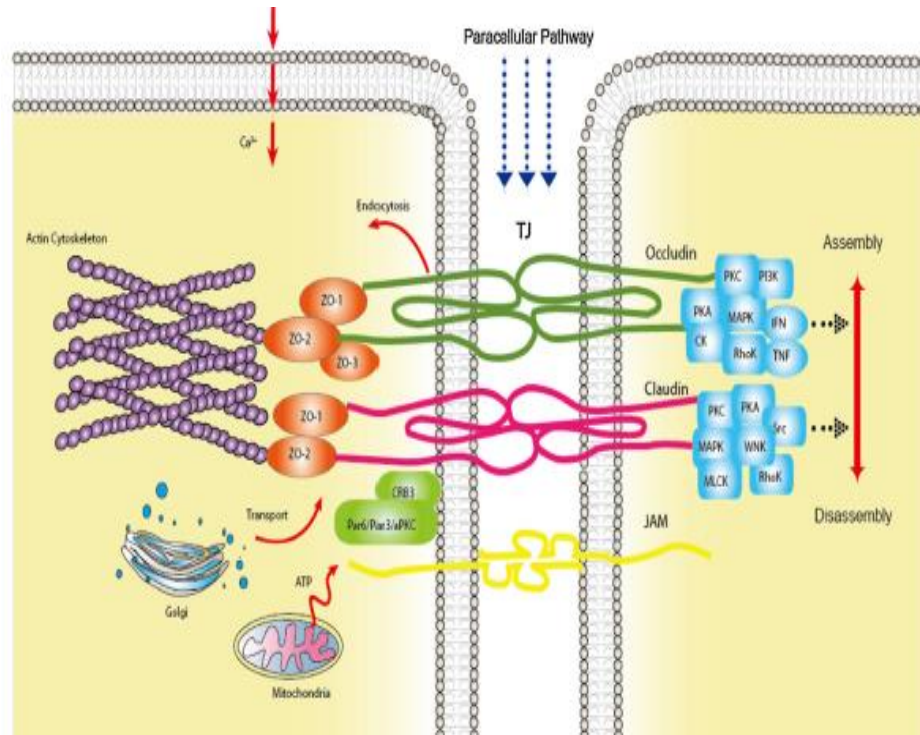


II. Μηχανικός φραγμός: αποφρακτικές ενώσεις



II. Μηχανικός φραγμός: αποφρακτικές ενώσεις

- ✓ Μικροί πόροι με εκλεκτικότητα φορτίου $\delta < 4\text{\AA}$ (ιόντα, διαλύτες, νερό)
- ✓ Μονοπάτι διαρροής (μακρομόρια, λίγες πρωτεΐνες ή βακτηριακά πολυσακχαρίδια)



II. Μηχανικός φραγμός: αποφρακτικές ενώσεις

Παράγοντες μείωσης της ανατομικής και λειτουργικής επάρκειας των TJs

Ενδοκυττάρια

- ✓ Ενεργειακή εξάντληση (μείωση cAMP)
- ✓ Απόπτωση
- ✓ Χαμηλό ενδοκυττάριο Ca

Εξωκυττάρια

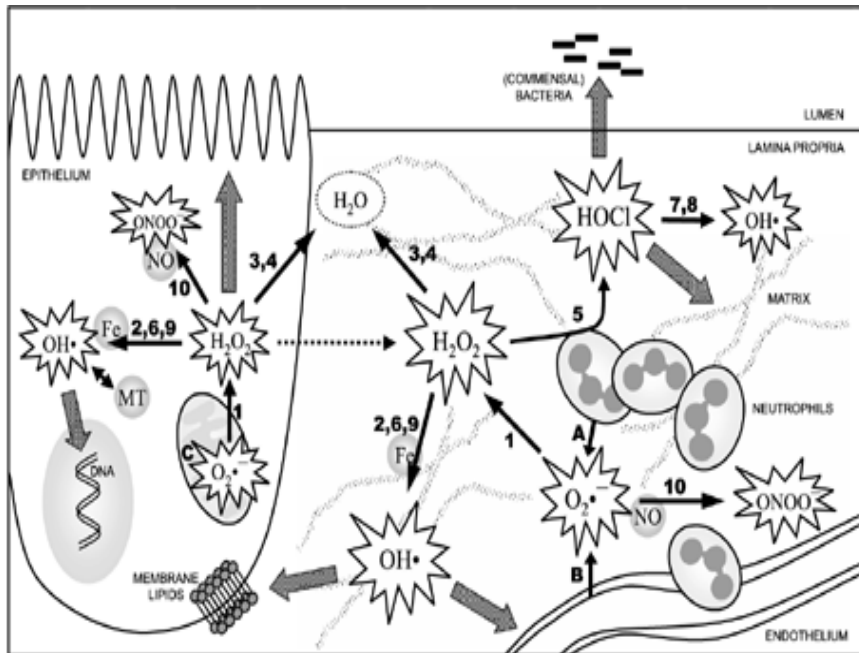
- ✓ Έκθεση σε βακτηριακά αντιγόνα
- ✓ Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες
- ✓ Οξειδωτικό stress

II. Μηχανικός φραγμός: οξειδωτικό stress

Οξειδωτικό stress
οξειδοαναγωγική
ισορροπία

➔ μεταβίβαση μηνύματος

- Ενεργειακό μεταβολισμό
- Μεταγραφική διαδικασία
- Κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- Απόπτωση



Λιπίδια

- Ρευστότητα
- Διαπερατότητα
- Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Πρωτεΐνες

- Λειτουργικότητα
- Ρυθμό ανακύκλωσης
- Αποδόμηση

DNA

- Εξάντληση ATP
- Μεταλλάξεις
- Απόπτωση

Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

➔ τραυματισμός
επιθηλίου

➔ **Δυσλειτουργία**
Εντερικού φραγμού

III. Ανοσολογικός φραγμός

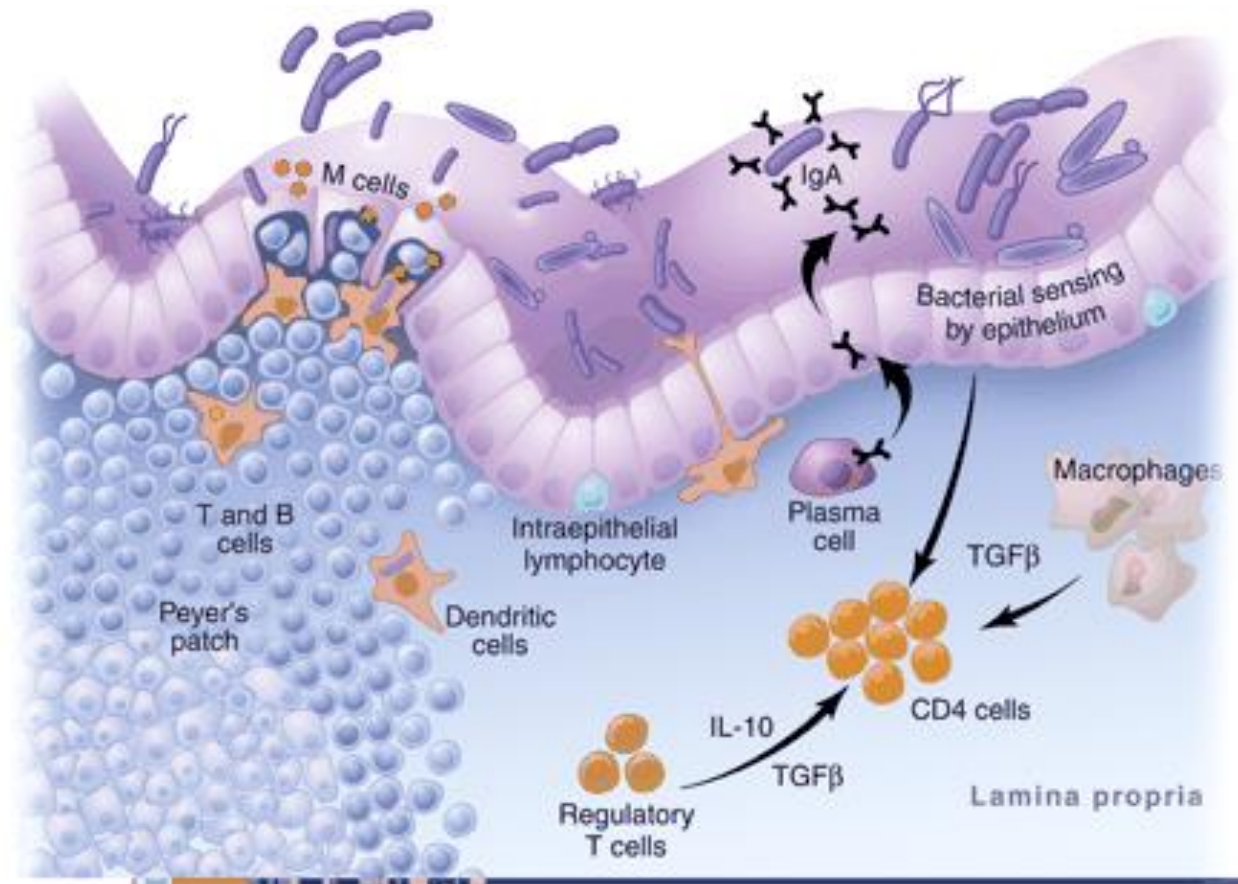
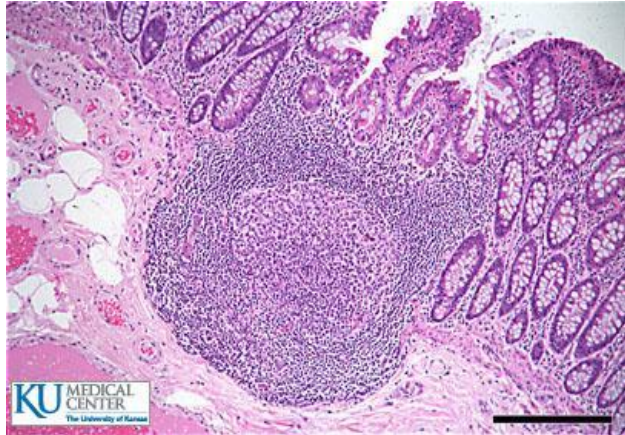
■ Φυσική (εγγενής) ανοσία

- Αντιγονοπαρουσιαστικά (APCs) και μακροφάγα
 - APCs CD103+/CD11c+ **επάγουν την ανοσοανοχή μέσω υπερέκφρασης Tregs FOXP3+**
 - Ιστικά μακροφάγα εκφράζουν αποφρακτικές ενώσεις, σχηματίζουν διεπιθηλιακούς δενδρίτες οι οποίοι φθάνουν μέχρι τον αυλό και δειγματίζουν τα εξωγενή αντιγόνα
- Λεμφοκύτταρα φυσικής ανοσίας (ILCs)

■ Επίκτητη (προσαρμοστική) ανοσία

- T-λεμφοκύτταρα (CD4+): Th1, Th2, Th17, Treg
- Ενδοεπιθηλιακά T-λεμφοκύτταρα (IELs, μνημονικά, συνομιλία με τα IECs, αλλαγή του φαινότυπο από CD4+RM σε CD8+RM
 - Rapidly responsive effectors
- B-λεμφοκύτταρα: IgA εκκριτικά πλασματοκύτταρα

III. Ανοσολογικός φραγμός



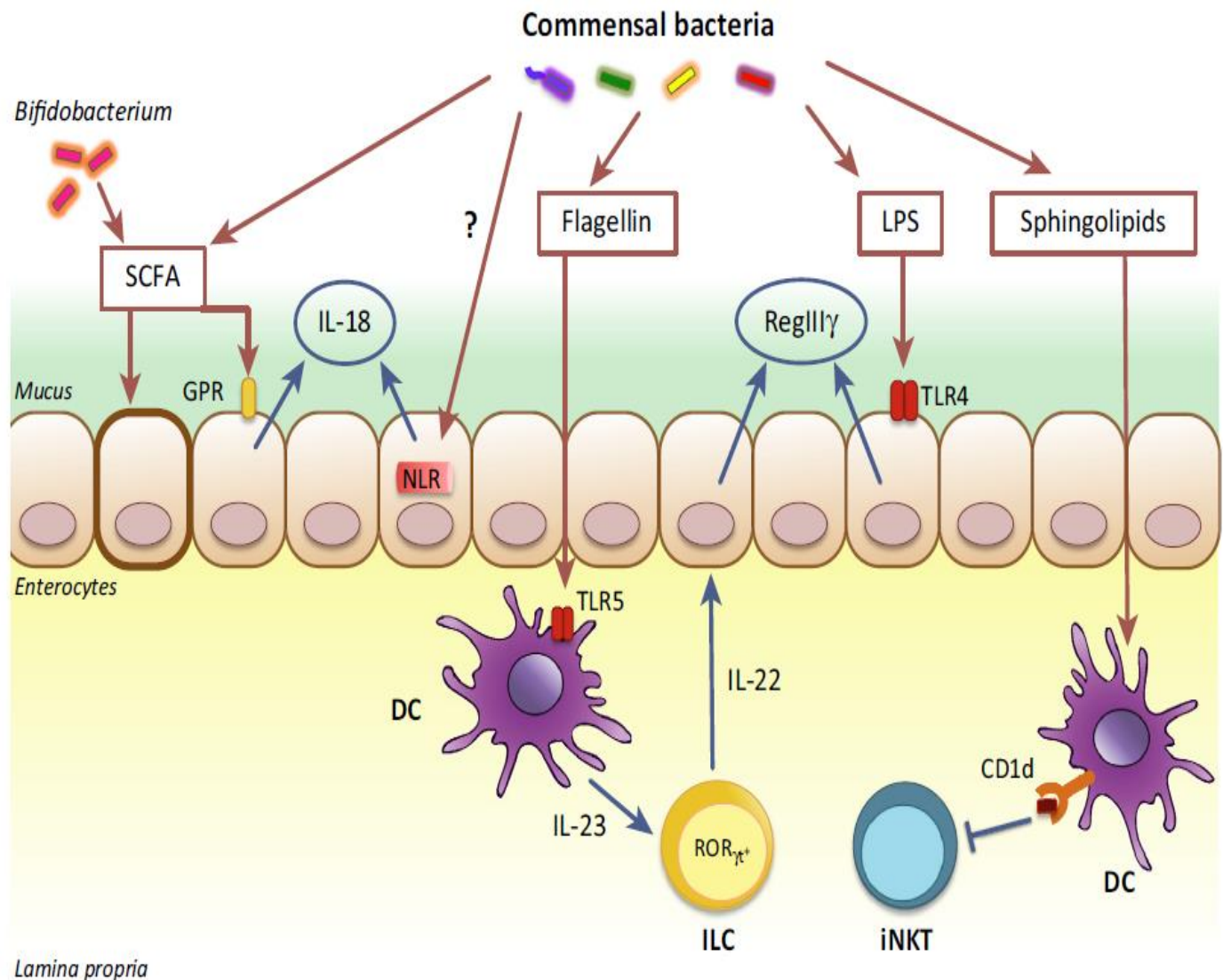
III. Ανοσολογικός φραγμός: εντερική μικροχλωρίδα και εγγενής ανοσία

- Produce pathogen associated molecular patterns (**PAMPs**) and **metabolic byproducts**

And regulate intestinal immune responses

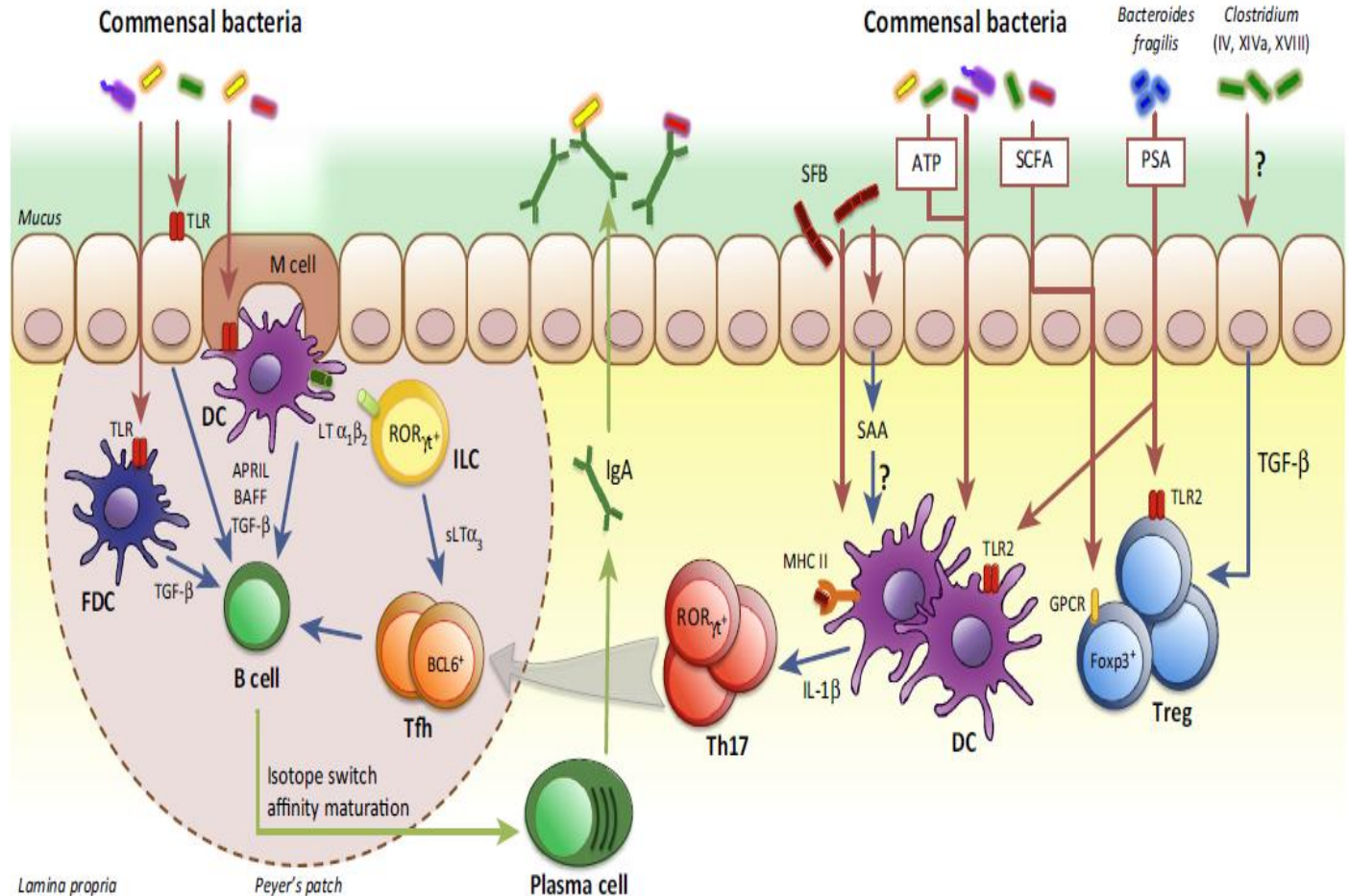
- PAMPs are recognized by **pattern recognition receptor** (PRR)-bearing cells (TLR and NOD receptors) of the **innate immune system** and many **epithelial cells**

- production of RegIIIγ in IECs and Paneth cells through a dendritic cell (DC)–innate lymphoid cell (ILC) axis




III. Ανοσολογικός φραγμός: εντερική μικροχλωρίδα και επίκτητη ανοσία

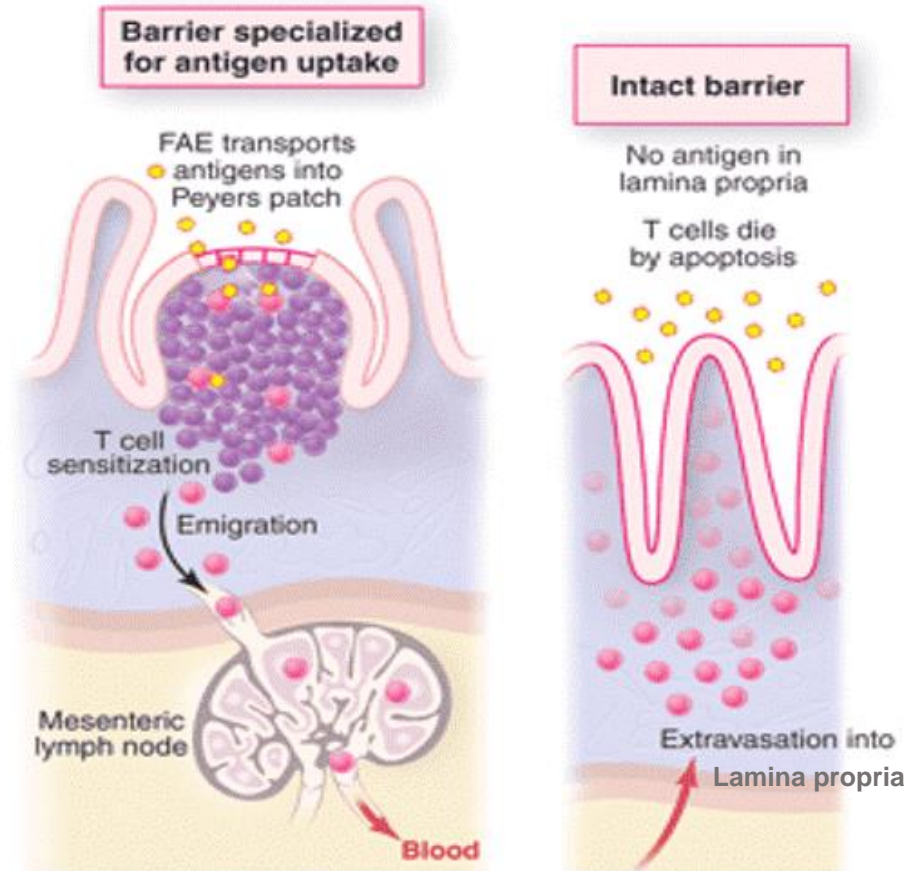
- Microbiota stimulation leads to **B cell switch to IgA**, **regulatory T cell induction**, **T cell differentiation to Th17**
- **Short-chain fatty acids (SCFA)** → **Treg differentiation** (directly on T cells and indirectly on DCs)
- Macrophages in the LP → **IL-10** and **retinoic acid (RA)** → **expansion of Tregs**



Μικροβιακή αλλόθεση

Μικροβιακή αλλόθεση σε υγιείς

- ✓ Μ.Α. συμβαίνει σε 5-10% υγιών ανθρώπων (“innocent bystander”)
 - ✓ Συχνότερη σε πειραματόζωα (20%)
 - ✓ Παθοφυσιολογικός ρόλος: αντιγονικός ερεθισμός και δημιουργία ανοσοϊκανών κυττάρων
- 
- ✓ Ρύθμιση αποτελεσματικής τοπικής και συστηματικής ανοσίας
 - ✓ Ανάπτυξη «ανοχής - tolerance» σε πλήθος μικροβιακών αντιγόνων της ενδογενούς χλωρίδας



Μικροβιακή αλλόθεση σε παθολογικές καταστάσεις

α. Πειραματικές μελέτες

Model	Animal
Burn injury	Mouse, pig
Haemorrhagic shock	Rat
Intestinal ischaemia	Rat
Intestinal obstruction	Rat
Small bowel bacterial overgrowth	Rat
Acute liver injury	Rat
Liver cirrhosis	Rat
Pre-hepatic portal hypertension	Rat
Jaundice	Rat
Hepatopulmonary syndrome	Rat
Acute pancreatitis	Rat
Total parenteral nutrition	Rat
Protein malnutrition	Mouse
Small-bowel transplantation	Rat
Graft-versus-Host-disease	Rat
Chemotherapeutic agents	Mouse
Oral antibiotics	Mouse
<i>Clostridium difficile</i>	Mouse
Small bowel syndrome	Rat
Lectin-induced diarrhoea	Rat
Sleep deprivation	Rat
Low-dose endotoxin	Mouse

Μικροβιακή αλλόθεση σε παθολογικές καταστάσεις

β. Κλινικά δεδομένα

Clinical condition	Method for testing BT
Burn injury	BC, L/M ratio
Trauma/haemorrhagic shock	BC, MLN, endotoxin, L/M ratio
Endotoxin	L/M ratio
Obstructive jaundice	MLN
Acute pancreatitis	MLN, BC, L/R ratio
Bowel transplant	BC, stool, liver culture
Liver cirrhosis	MLN
Intestinal obstruction	MLN, serosa
Crohn's disease	MLN, serosa
Organ donors	MLN, BC, endotoxin
Elective surgery	MLN, serosa
Aortic aneurysm repair	MLN, serosa
Cardiopulmonary bypass	Endotoxin, L/M ratio
Heart failure	Serum endotoxin
Colchicine overdose	BC
Neutropenia	BC
Malignancy	BC

Παθογένεια μικροβιακής αλλόθεσης

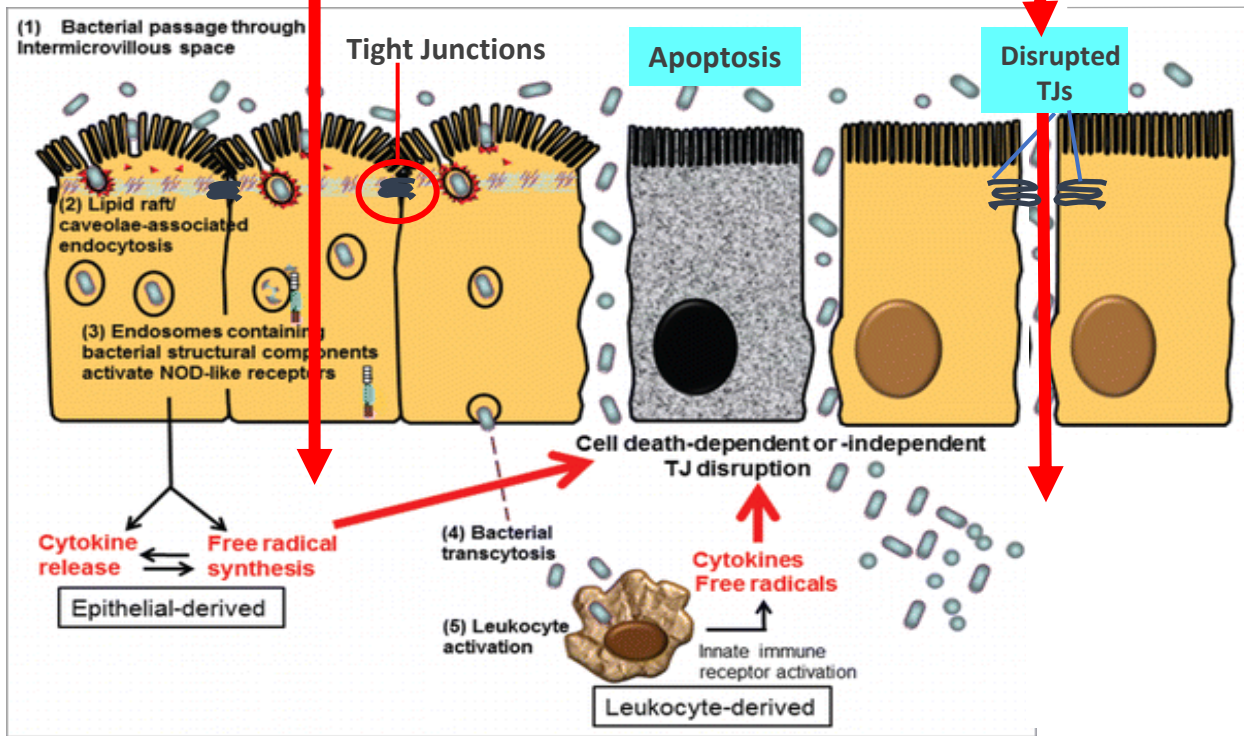
- Διαταραχή της εντερικής χλωρίδας
- Αύξηση διαπερατότητας εντερικού φραγμού
- Διαταραχή της ανοσολογικής άμυνας

Site and route of translocation

Route of translocation

Transcellular route of BT

Paracellular route of BT



Site of translocation

Small intestine

- ✓ Παρότι το παχύ έντερο είναι το reservoir των μικροβίων η BT συμβαίνει κυρίως στο λεπτό έντερο
 - ✓ Ίδιος αριθμός ραδιοσημασμένων E.coli σε isolated loops λεπτού και παχέος εντέρου → υψηλή BT σε λεπτό
 - ✓ Το λεπτό έντερο πιο «ευαίσθητο» σε βλαπτικούς παράγοντες (τελικός ειλεός)
- ↓
- ✓ Υψηλότερη διεπιθηλιακή αντίσταση παχέος εντέρου
 - ✓ Υψηλότερο μικροβιακό φορτίο → πιο αποτελεσματική τοπική εκκαθαριστική ικανότητα

Εκτίμηση μικροβιακής αλλόθησης

<u>Άμεσες μέθοδοι</u>	<u>Εργαστηριακές τεχνικές</u>	<u>Περιορισμοί</u>
Καλλιέργειες MLN	Αερόβιες/αναερόβιες κ/ες	Μόνο ζώντα βακτήρια σε αρκετό αριθμό Δεν απομονώνει ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια
Διαμετάθεση ραδιοσημασμένων βακτηρίων		Πειραματικά μόνο
<u>Έμμεσες μέθοδοι</u>		
Μέτρηση LPS (πυλαία, συστηματική)	LAL test	Επιμόλυνση αντιδραστηρίου Αναστολείς πλάσματος Μόνο για Gram (-)
Μέτρηση βακτηριακού DNA	PCR 16S r-RNA gene	Επιμόλυνση αντιδραστ./δείγματος Ποσό κυκλοφορούντος βακτ. RNA
LBP	ELISA	Παράγεται από ηπατοκύτταρα, επηρεάζεται από ηπατ λειτουργία
EndoCab	ELISA (IgM, IgG, IgA)	Μειωμένοι τίτλοι σε οξεία ενδοτοξαιμία (σύνδεση) και αυξημένοι σε χρόνια ή περιοδική

Εκτίμηση επάρκειας εντερικού φραγμού

Λειτουργικές μέθοδοι

Μέτρηση παρακυττάριας διαπερατότητας

Μέτρηση διεπιθηλιακής αντίστασης

Εργαστηριακές τεχνικές

In vivo (Dual Sugar test L/M, Cr –EDTA, PEG)
Experimentally: permeability of radiotracers in isolated loops
Ex vivo (Ussing chamber in biopsies)

Ex vivo (Ussing chamber)

Βιοχημικές μέθοδοι

a. Δείκτες ακεραιότητας επιθηλιακών κυττάρων

Intestinal-Fatty Acid Binding Proteins (I-FABP)

Citrulline

Μέτρηση σε πλάσμα και ούρα (ELISA) (enterocyte damage)

Μέτρηση σε πλάσμα (functional enterocyte mass)

b. Δείκτες ακεραιότητας Tight Junctions

Zonulin

Claudin-3

Μέτρηση σε πλάσμα

Ούρα (ELISA)

Μορφολογικές μέθοδοι

Εκτίμηση στο οπτικό μικροσκόπιο (H&E)

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

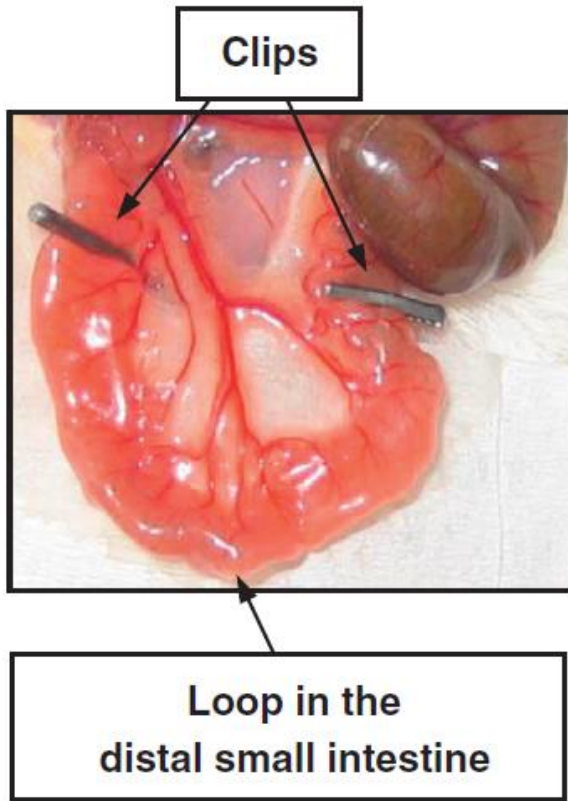
Ιστοχημικές τεχνικές

Μορφομετρία (ύψος λαχνών, λάχνες/cm, πάχος βλεννογόνου)
Αποπτωτικά σωμάτια / Μιτώσεις / Φλεγμονώδης διήθηση

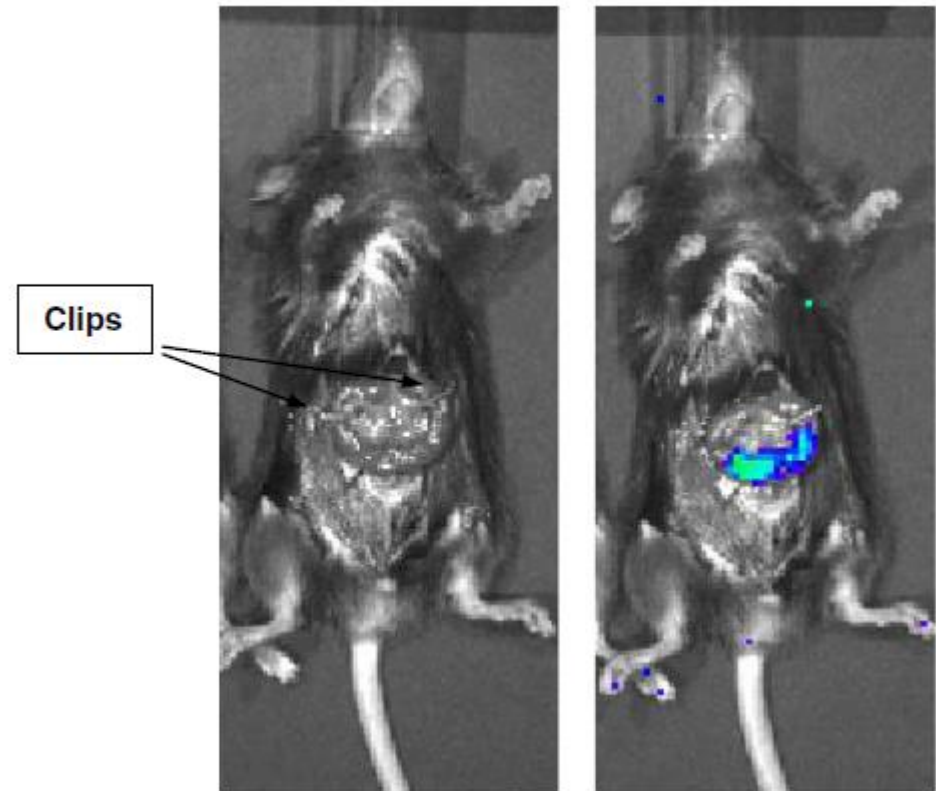
Ακεραιότητα μικρολαχνών / κυττ. μεμβράνης
Αποπτωτικά σωμάτια, Διεύρυνση παρακυττάριας οδού

Πρωτεΐνες των TJs
TUNEL (απόπτωση)

Μέθοδοι: isolated loops (bacterial translocation)

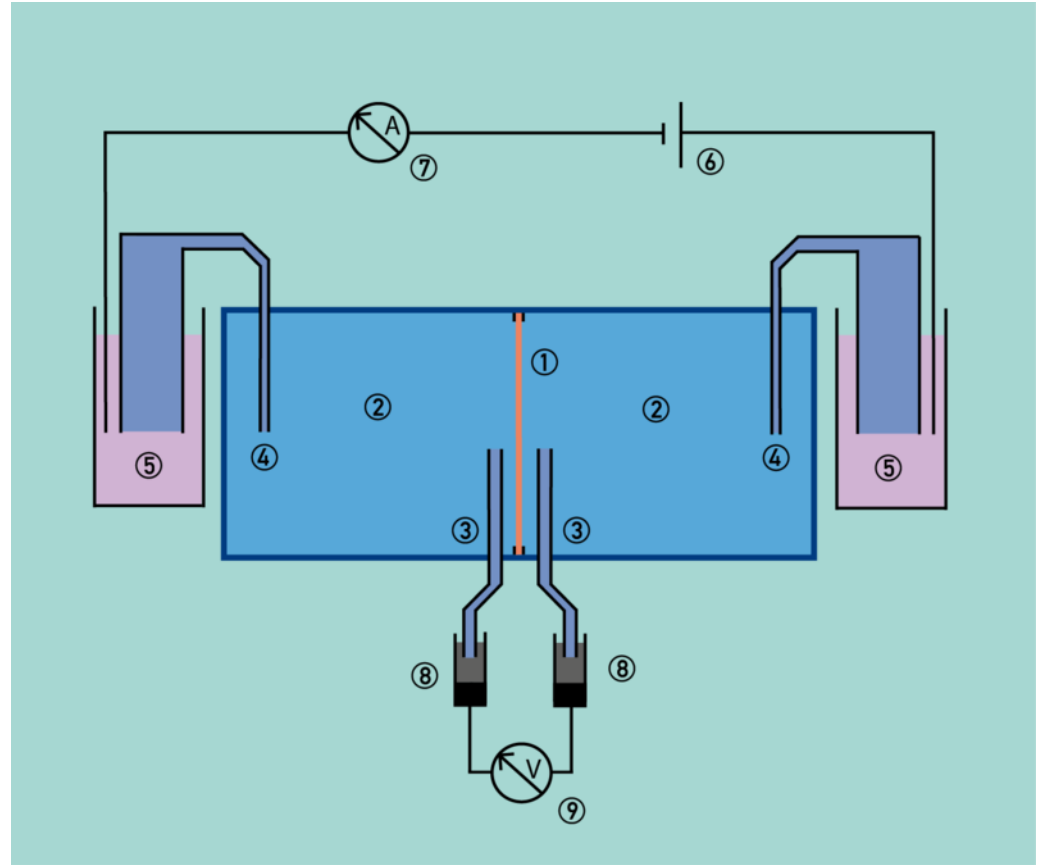


Μέτρηση διαπερατότητας/ΒΔ σε συγκεκριμένα τμήματα
Δεν εξαρτάται από κινητικότητα



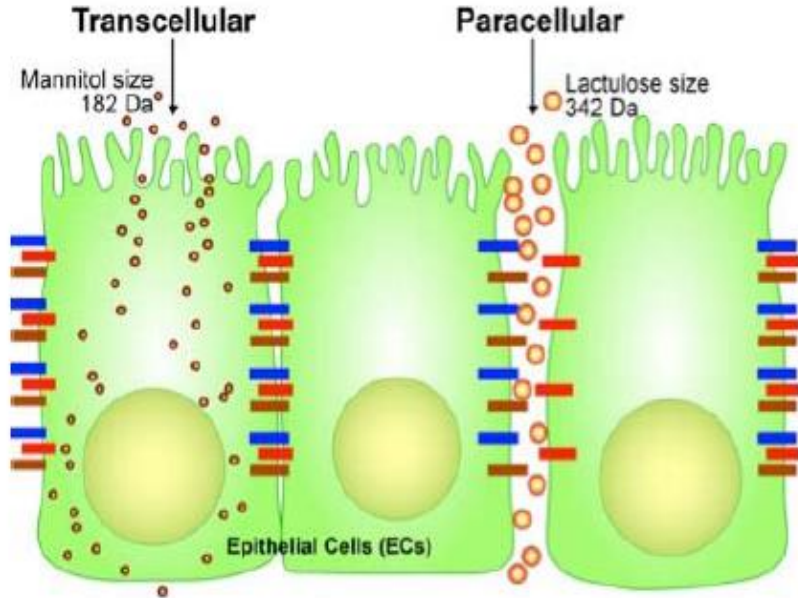
Απεικόνιση βιοφωταύγειας μετά από ένεση E. Coli που εκφράζει λουσιφεράση

Μέθοδοι: Ussing chambers (transepithelial resistance)



* Danish zoologist and physiologist Hans Henriksen Ussing in 1946

Μέθοδοι: dual sugar test (L/M) (gut permeability)



Χαρακτηριστικά

- ✓ Συνδυασμένη χορήγηση μακρο/μικρομοριακών ουσιών
- ✓ Παθητική απορρόφηση από έντερο
- ✓ Δεν μεταβολίζονται
- ✓ Απεκκρίνονται αναλλοίωτα στα ούρα
- ✓ Η απέκκριση ευθέως ανάλογη της απορρόφησης
- ✓ Η μικρομοριακή ουσία διαχέεται ελεύθερα και είναι εσωτ. control για συγχυτικούς παράγοντες ανεξάρτητους διαπερατότητας (εκκρίσεις, κινητικότητα)

Διαδικασία

Ταυτόχρονη λήψη των σακχάρων διαλυμένων σε νερό

Νηστεία 2 ώρες → συλλογή ούρων

Ο λόγος lactulose/mannitol στη συλλογή ούρων των πρώτων 6 ωρών → διαπερατότητα λεπτού εντέρου

Μικροβιακή αλλόθεση: παθοφυσιολογικός ρόλος

- ✓ Πειραματικές μελέτες (1940) σε σκύλους με αιμορραγικό shock έδειξαν την παρουσία ζώντων βακτηρίων εντερικής προέλευσης στο περιτοναϊκό υγρό (→ το έντερο μπορεί να αποτελέσει το “reservoir” **συστηματικών λοιμώξεων**)



- ✓ Το 1954 πειραματική μελέτη δείχνει ότι εντερικά βακτήρια μπορούν να διαπεράσουν ένα μακροσκοπικά άθικτο εντερικό επιθήλιο σε αιμορραγία, χημική περιτονίτιδα και τραύμα

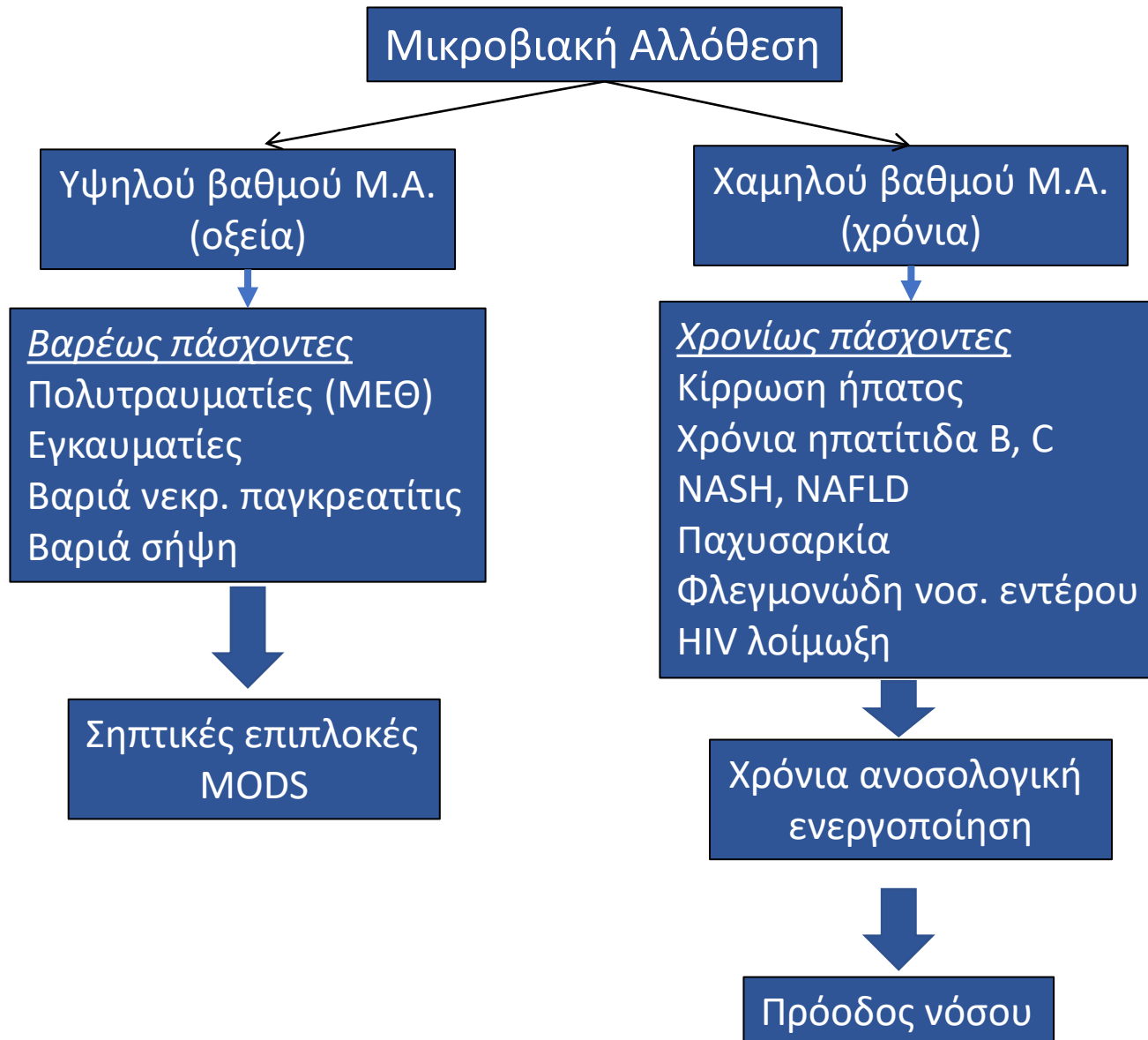


- ✓ Τη δεκαετία 1980 το φαινόμενο της «μικροβιακής αλλόθεσης» κερδίζει ενδιαφέρον ως πιθανή παθοφυσιολογική ερμηνεία της **πολυοργανικής ανεπάρκειας** που αναπτύσσουν **βαρέως πάσχοντες ασθενείς σε ΜΕΘ**, χωρίς ανιχνεύσιμη εστία λοίμωξης (ούτε κατά τη νεκροψία)



- ✓ Νεότερες μελέτες (μετά το 2000) συσχετίζουν τη μικροβιακή αλλόθεση με μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων οι οποίες σχετίζονται με χαμηλού βαθμού χρόνια συστηματική φλεγμονή στα πλαίσια ενδοτοξιναιμίας

Μικροβιακή αλλόθεση: παθοφυσιολογικός ρόλος

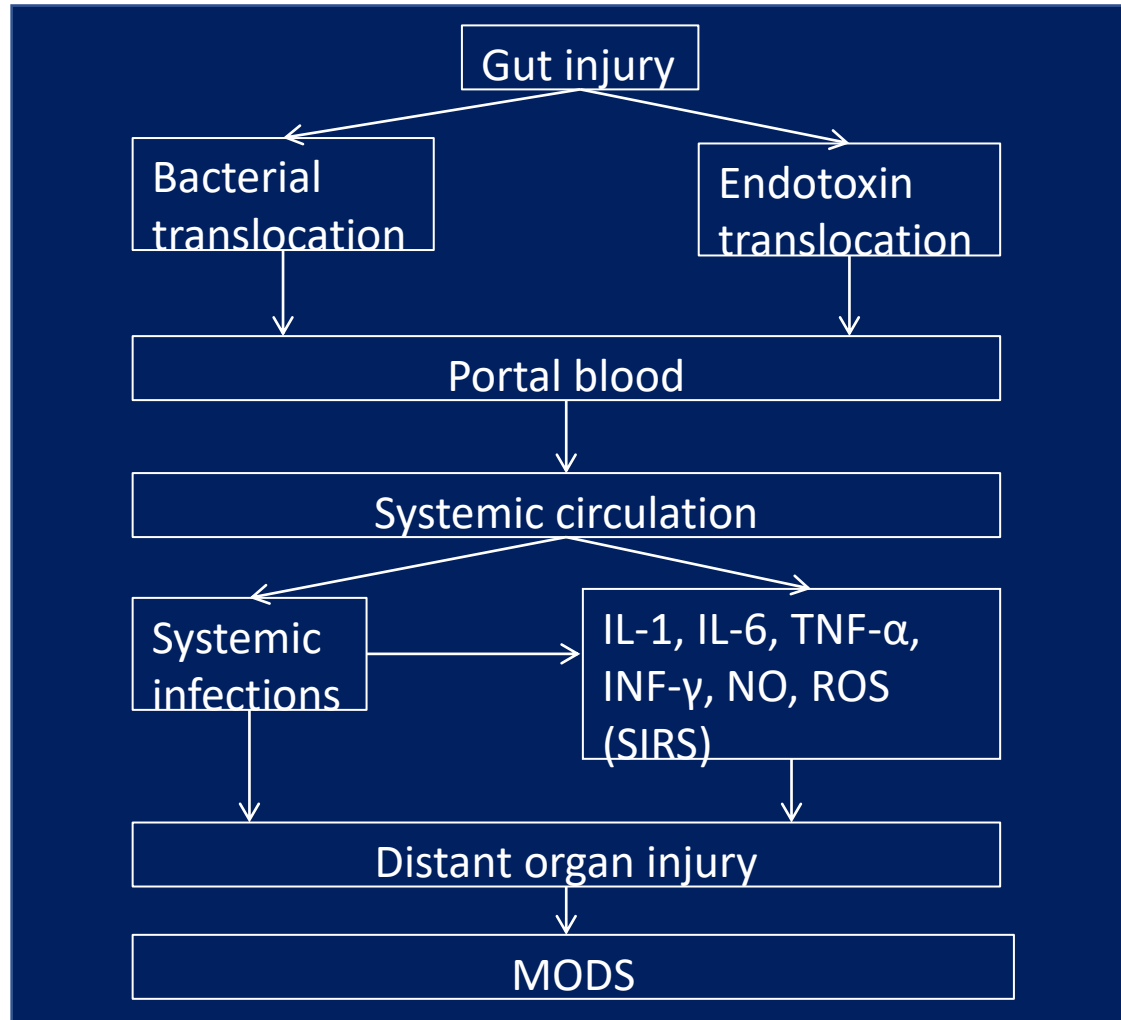


Μικροβιακή αλλόθεση
σε βαρέως πάσχοντες

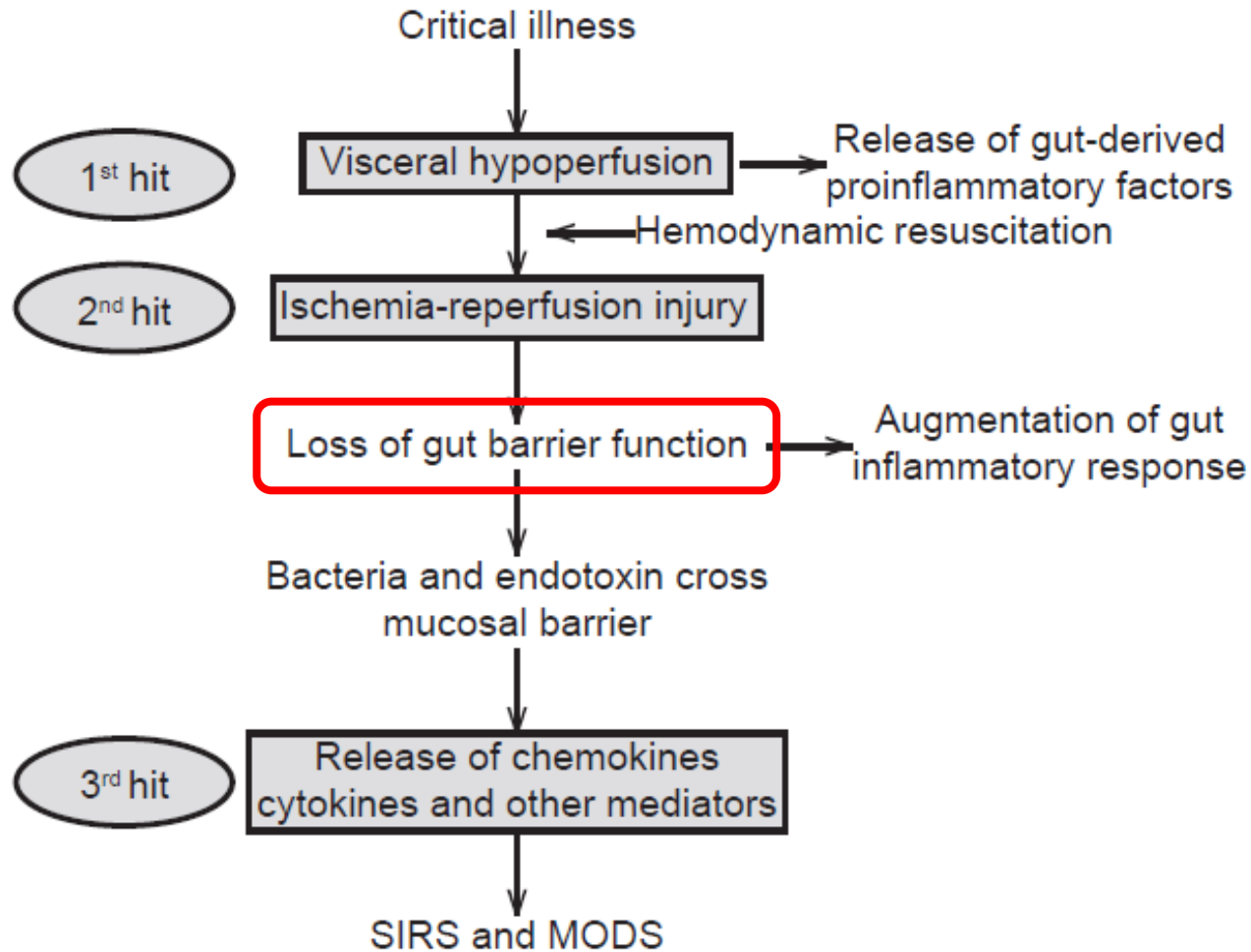


«Σήψη εντερικής προέλευσης»
Παθοφυσιολογική θεώρηση

The “*gut hypothesis*” of sepsis and M.O.D.S.



The “*three hit*” model of SIRS and MODS



The “*gut-origin sepsis*” hypothesis: clinical data (I)

Μελέτες σε χειρουργικούς ασθενείς (Proof-of-Principle studies)

- ✓ Άμεση εκτίμηση του Bacterial Translocation με δειγματοληψία μεσεντέρων λεμφαδένων και κ/α
- ✓ Έξι κλινικές μελέτες με 2125 ασθενείς υποβαλλόμενους σε λαπαροτομία
- ✓ BT σε 5-21% των ασθενών
- ✓ Σχέση BT με μετεγχειρητικές σηπτικές επιπλοκές
 - BT (+) 45% μετεγχειρητικές λοιμώξεις
 - BT (-) 19% μετεγχειρητικές λοιμώξεις
- ✓ Ίδιο παθογόνο στους MLNs και σε εστία λοίμωξης
- ✓ Εντερικής προέλευσης παθογόνα (genomic analysis)

Bacterial translocation



**μετεγχειρητικές λοιμώξεις
σε χειρουργικούς ασθενείς**

Οι χειρουργικοί ασθενείς δεν είναι ο ιδανικός πληθυσμός για τη μελέτη της σχέσης του BT με την ανάπτυξη «σήψης εντερικής προέλευσης» και M.O.D.S. που αναπτύσσεται σε πολυτραυματίες και βαρέως πάσχοντες ασθενείς σε ΜΕΘ

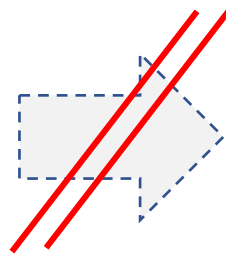
The “*gut-origin sepsis*” hypothesis: clinical data (II)

Βαρέως πάσχοντες ασθενείς (τραύμα) με πολυοργανική ανεπάρκεια: άμεση εκτίμηση του BT

- ✓ Κλασσική μελέτη των Moore et al (1991) με άμεση εκτίμηση του BT
- ✓ Προοπτική μελέτη: 20 σοβαρά τραυματισμένοι ασθενείς → επείγουσα λαπαροτομία
- ✓ 60% των ασθενών σε shock κατά την προσέλευση
- ✓ Καθετηριασμός πυλαίας → σειριακές λήψεις αίματος για 5 ημέρες

BACTERIAL TRANSLOCATION

- ✓ 2% των κ/ων πυλαίας (+)
- ✓ 0% ενδοτοξιναιμία πυλαία/συστηματική



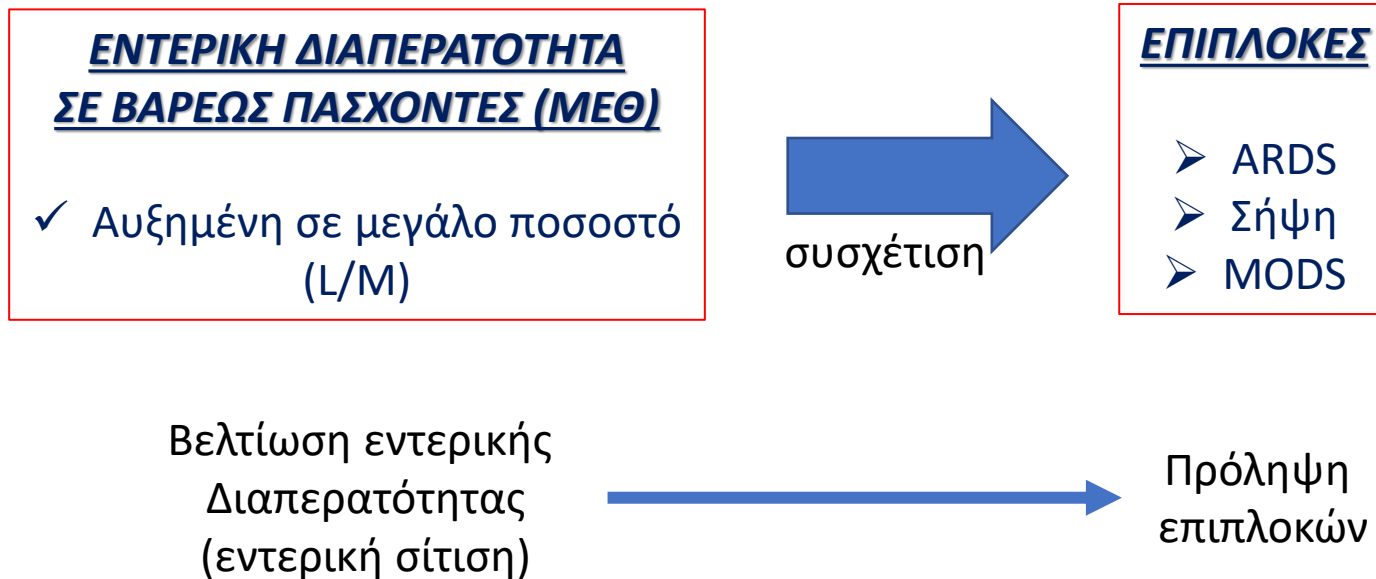
ΕΚΒΑΣΗ

30% των ασθενών
↓
πολυοργανική ανεπάρκεια

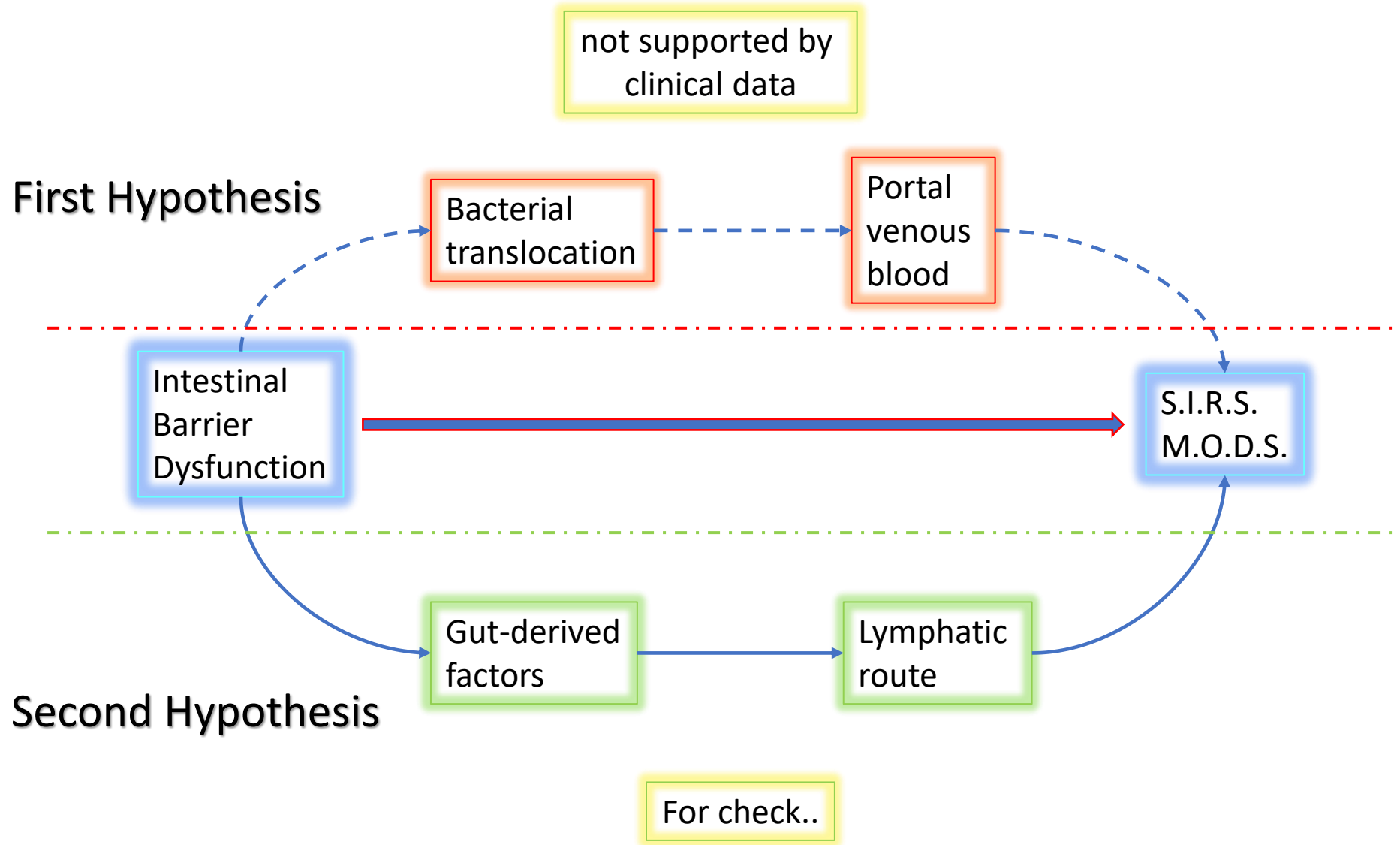
The “*gut-origin sepsis*” hypothesis: clinical data (III)

Περαιτέρω μελέτες με βαρέως πάσχοντες ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια:

- ✓ Δύσκολη η άμεση εκτίμηση του ΒΤ (λήψη MLNs)
- ✓ Μελέτες κυρίως της επάρκειας του εντερικού φραγμού
- ✓ Μέτρηση εντερικής διαπερατότητας και συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης



Αναθεώρηση της παθογένειας της “gut-origin sepsis”: Νέα υπόθεση



Νεότερες απόψεις: ο ρόλος της μεσεντερικής λέμφου

- ❑ Πιθανή εξήγηση της μελέτης του Moore (απουσία μικροβίων – ενδοτοξίνης στην πυλαία) – εναλλακτική οδός translocation “intestinal lymphatics”
- ❑ Ο πνεύμονας είναι το πρώτο όργανο και το πιο συχνά προσβαλλόμενο όργανο που δυσλειτουργεί στο βαριά πολυτραυματία (ARDS)
- ❑ Ο πνεύμονας είναι το πρώτο όργανο που εκτείθεται στη μεσεντερική λέμφο (λέμφος μεσεντερίου → θωρακικός πόρος → αρ. υποκλείδια φλέβα → δεξιά καρδιά → πνευμονική κυκλοφορία)



Διατύπωση νέας υπόθεσης

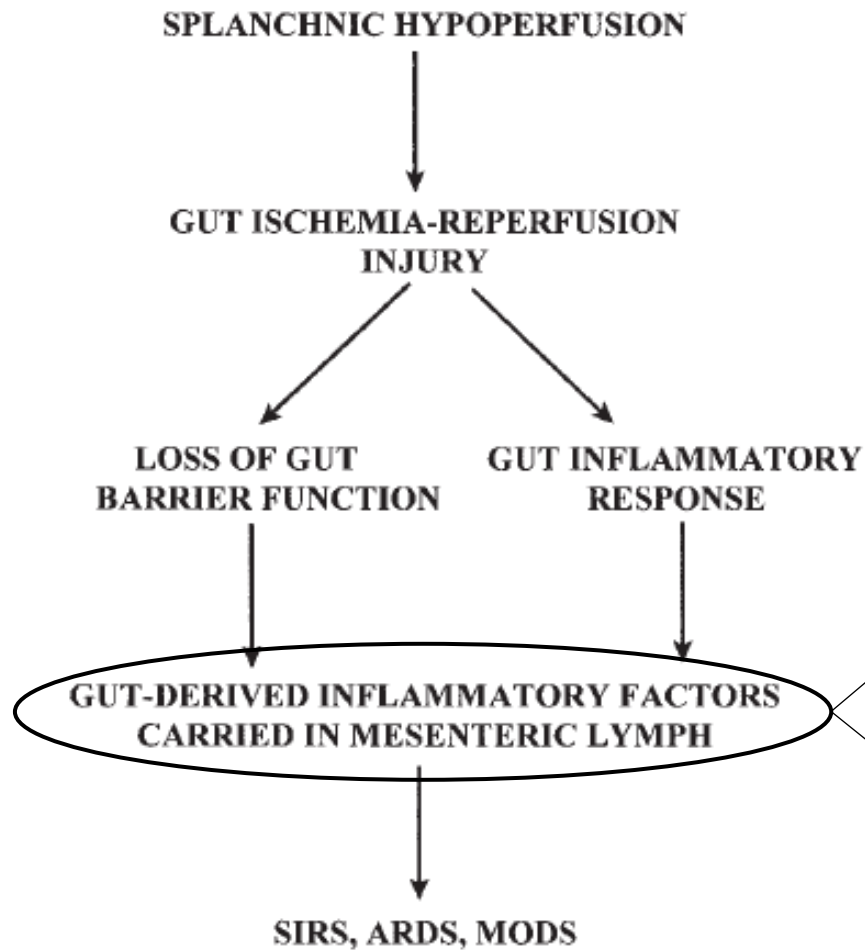
Η σήψη εντερικής προέλευσης και η συνακόλουθη πολυοργανική ανεπάρκεια μεσολαβούνται από εντερικής προελεύσεως προφλεγμονώδεις παράγοντες που μεταφέρονται με τη μεσεντερική λέμφο

Πειραματικός έλεγχος της θεωρίας της μεσεντερικής λέμφου

Πειραματικό μοντέλο τραύματος/αιμορραγικού shock:

- ✓ Η απολίνωση του απαγωγού μεσεντέριου λεμφαγγείου προστάτευσε τα πειραματόζωα από την ανάπτυξη πρώιμης βλάβης των πνευμόνων (ARDS) και MODS
- ✓ Σε κυτταροκαλλιέργειες η μεσεντερική λέμφος από πειραματόζωα που είχαν υποστεί τραύμα/αιμορραγικό shock προκαλεί:
 - Βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων
 - Ενεργοποίηση ουδετεροφίλων
 - Βλάβη μυοκαρδιακών κυττάρων
 - Δυσλειτουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων
- ✓ Τα δείγματα λέμφου των πειραματοζώων δεν περιείχαν ενδοτοξίνη ή βακτήρια
- ✓ Το αίμα της πυλαίας από το ίδιο πειραματικό μοντέλο δεν είχε βλαπτικές επιδράσεις

The “mesenteric lymph” hypothesis of sepsis/MODS

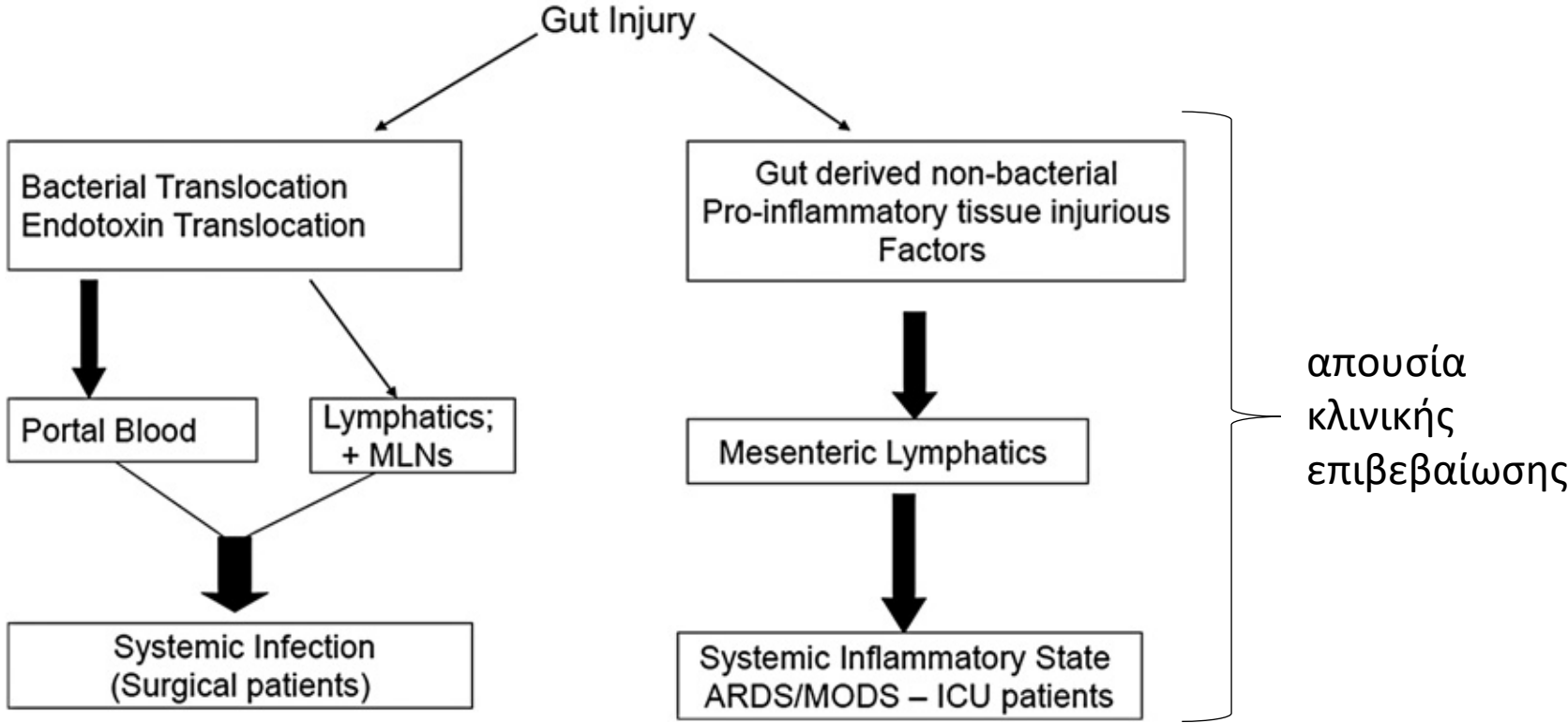


New evidence on mesenteric lymph

- Does not contain bacteria/endotoxin
- Effect non-cytokine-mediated
- Contains DAMPS
- Action through TLR4

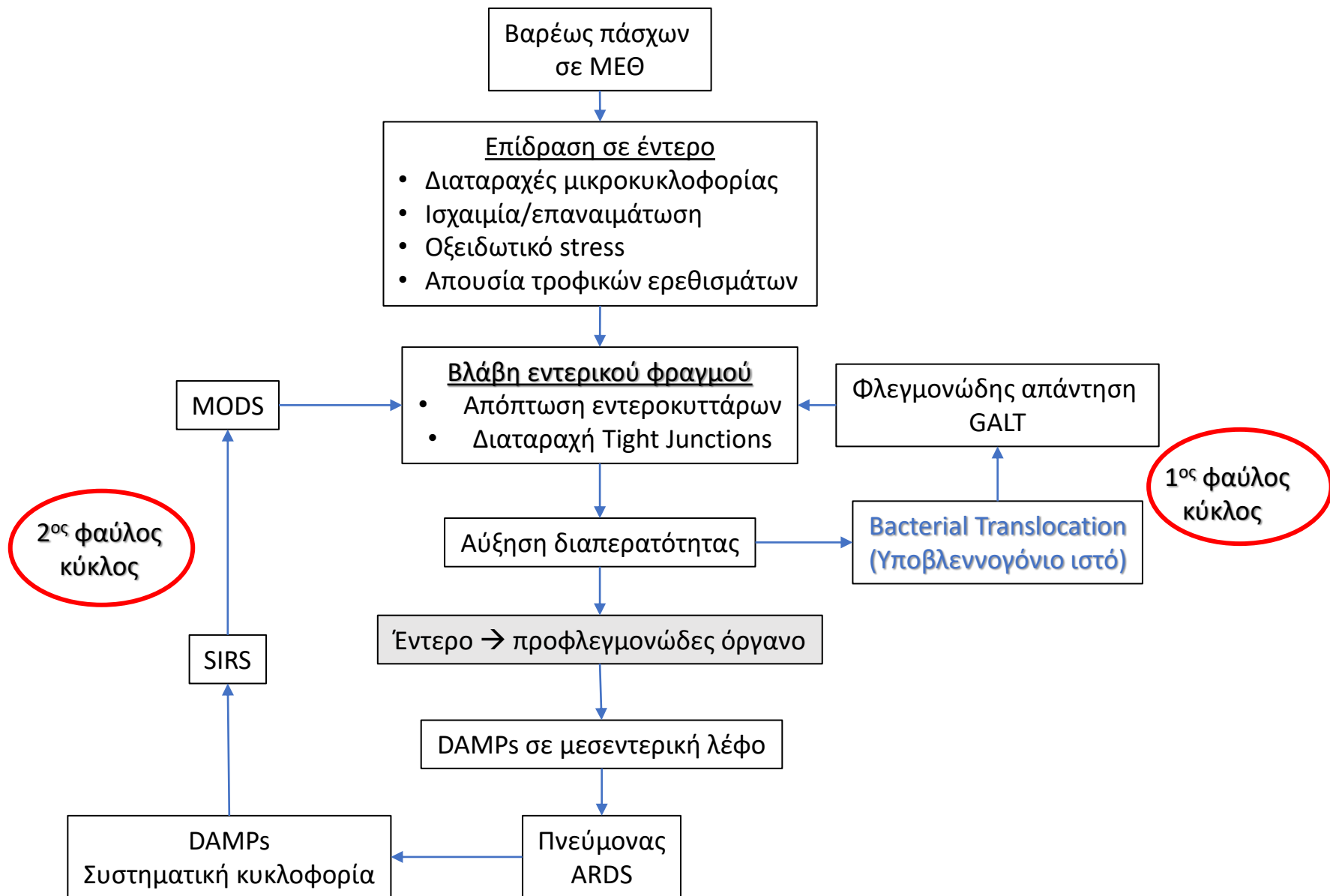
Σύγχρονες παθογενετικές απόψεις για τη «σήψη εντερικής προέλευσης»: ο ρόλος της μικροβιακής αλλόθεσης (I)

Integrated models of gut-origin sepsis



Bacterial translocation ≠ gut derived sepsis

Σύγχρονες παθογενετικές απόψεις για τη «σήψη εντερικής προέλευσης»: ο ρόλος της μικροβιακής αλλόθεσης (II)



Συμπεράσματα

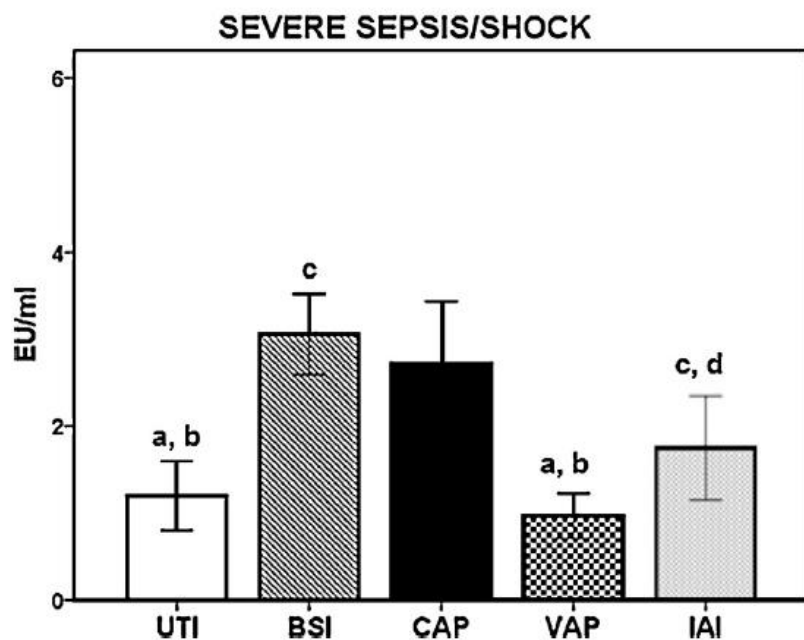
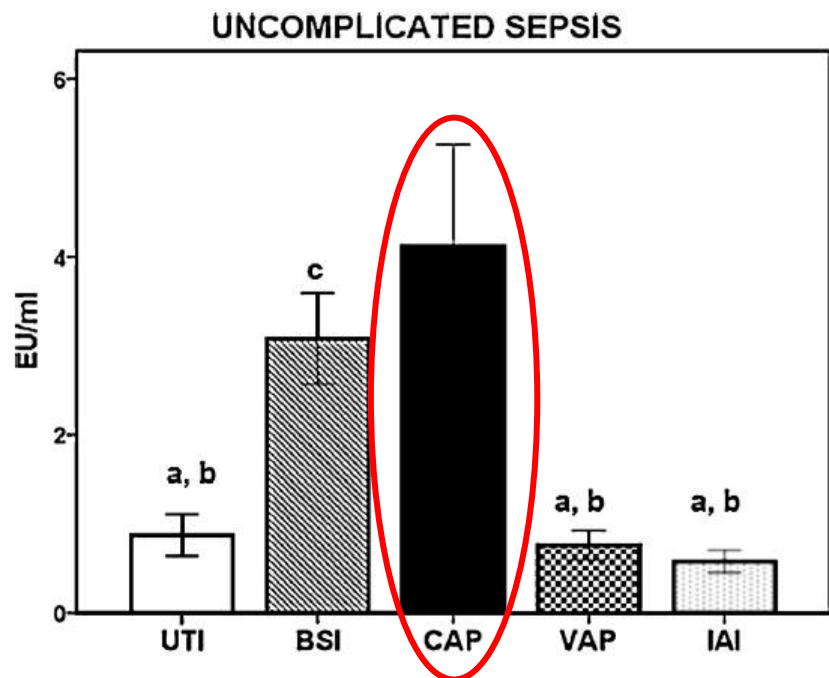
- ✓ Η Μ.Α. δεν είναι ένα «όλον ή ουδέν» φαινόμενο
- ✓ Μ.Α. συμβαίνει σε 5-10% υγιών ανθρώπων (“innocent bystander”)
- ✓ Παθοφυσιολογικός ρόλος: αντιγονικός ερεθισμός και δημιουργία ανοσοϊκανών κυττάρων
- ✓ Η αυξημένη εντερική διαπερατότητα και η Μ.Α. ενέχεται στις σηπτικές επιπλοκές και στην πολυοργανική ανεπάρκεια βαρέως πασχόντων ασθενών στη ΜΕΘ
- ✓ Το έντερο ως «προφλεγμονώδες όργανο» και η «μεσεντερική λέμφος» ως μεταφορέας DAMPs διαδραματίζει κεντρικό παθοφυσιολογικό ρόλο στους ασθενείς αυτούς (κλινική επιβεβαίωση?)

Μικροβιακή αλλόθρεση
σε μικροβιακές λοιμώξεις
(σήψη εκτός ΜΕΘ)

The level of endotoxemia in sepsis varies in relation to the underlying infection: Impact on final outcome

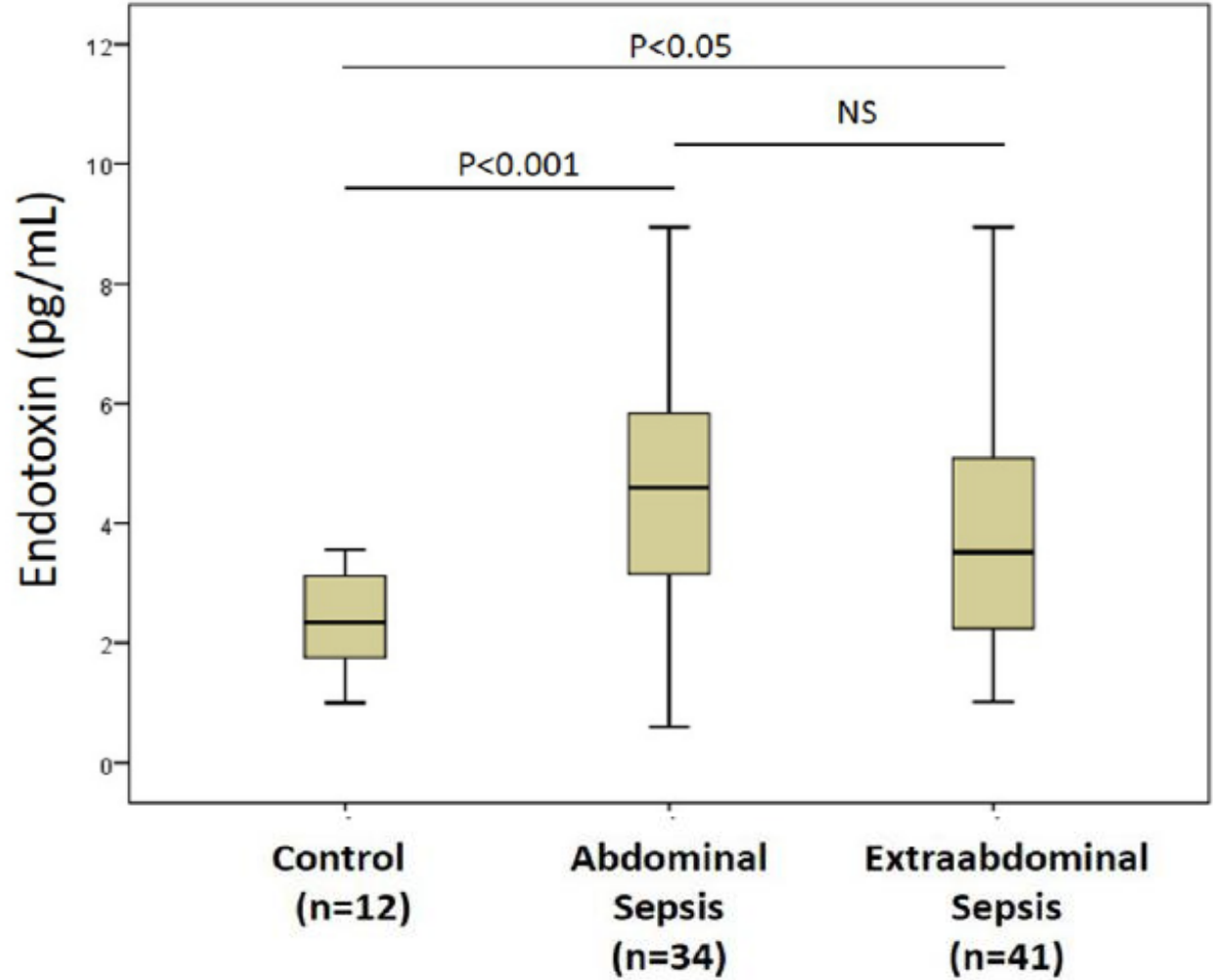
Ioannis Kritselis^{a,1}, Vassiliki Tzanetakou^{b,1}, Georgios Adamis^{c,1}, George Anthopoulos^{d,1}, Eleni Antoniadou^{e,1}, Magdalini Bristianou^{f,1}, Anastasia Kotanidou^{g,1}, Michail Lignos^{h,1}, Kostantinos Polyzos^{i,1}, Theodoros Retsas^{j,1}, Panagiota Sassopoulou^{k,1}, Andrianna I. Papaioannou^{l,1}, Dimitrios Sinapidis^{i,1}, Kalliopi Sereti^{m,1}, Vasileios Vittoros^{n,1}, Panagiotis Ghanas^{a,1}, Charalambos Gogos^{o,1}, Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis^{b,*,1}

Immunology Letters 152 (2013) 167–172



Μικροβιακή αλλόθεση (ενδοτοξιναιμία) σε ασθενείς με CAP, δηλαδή με gram (+) λοίμωξη, επιβεβαιώνει την «εντερική προέλευση» της ενδοτοξίνης στο σηπτικό ασθενή (→ δυσλειτουργία εντ. φραγμού)

Σε ενδοκοιλιακή λοίμωξη η διάσπαση του εντερικού φραγμού είναι μεγαλύτερη? → υψηλότερη ΒΤ?



Πως εκτιμάται η ακεραιότητα του εντερικού φραγμού?

Methods to assess intestinal permeability.

Methods	Assay	Advantage and disadvantage	References
Morphology analysis	H&E staining of intestinal sections	Histology is easy to perform and to interpret No functional analysis	Szabo et al. (1985)
	Assessing intestinal tight junctions (electron microscopy, gene and protein expression)	No functional analysis	Hartmann et al. (2012); Chen et al. (2014)
Functional analysis			
Methods to assess flow from lumen to blood	Enteral administration of non-digestible markers such as sugars, radioisotopes (e.g. ⁵¹ Cr-EDTA) and polyethylene glycols (PEG)	Performed under in vivo conditions, but affected by factors such as gastrointestinal motility, mucosal blood flow and the distribution of the markers in the body Inert markers are being used	Sun et al. (1998); Bjarnason et al. (1984a); Bjarnason et al. (1984b); Peeters et al. (1994)
	Creating isolated intestinal loops and injection of labeled bacterial products, markers or live bacteria	Serves with modifications a wide variety of purposes and are independent from intestinal motility Able to determine the site of increased leakiness Surgery required	Chen et al. (2014); Hartmann et al. (2012); Hartmann et al. (2013)
Methods to assess flow from blood to lumen	Fecal albumin measurement	Non-invasive, does not require any manipulation of the animal. Requires normal blood albumin levels	Hartmann et al. (2013)
	In vivo perfusion system	Can be used to test the effects of drugs on intestinal permeability Surgery required	Clayburgh et al. (2006); Marchiando et al. (2010b)
Microbiology tests	Measurement of translocated microbial PAMPs	Direct assessment of gut-derived and translocated PAMPs in extraintestinal space Levels are dependent on the immune system	Hartmann et al. (2012); Chen et al. (2014); Chen et al. (2015); Cuenca et al. (2014)
	Culturing translocated live bacteria	Direct assessment of gut-derived and translocated bacteria Numbers are dependent on the immune system Not able to detect non-culturable translocated bacteria	Fouts et al. (2012)

Πως μπορεί να εκτιμηθεί μη επεμβατικά η ακεραιότητα του εντ. φραγμού στο σηπτικό ασθενή?

Table 1 Methods for the assessment of intestinal barrier integrity status and intestinal barrier function loss

Test	Measured in	Indicative for	Tissue specificity
I-FABP	Blood or urine Single sample	Intestinal epithelial integrity	Yes (predominantly proximal small gut)
I-BABP	Blood or urine Single sample	Intestinal epithelial integrity	Yes (predominantly ileum)
L-FABP	Blood or urine Single sample	Intestinal epithelial integrity	No
GST- α	Blood Single sample	Intestinal epithelial integrity	No
Claudin 3	Urine Single sample	Paracellular integrity	No
Dual Sugar Test	Urine 5 h collection	Functional intestinal barrier function	Yes
PEG	Urine 6 h collection	Functional intestinal barrier function	Yes
⁵¹ Cr-EDTA	Urine 24 h collection	Functional intestinal barrier function	Yes
LAL-assay	Blood Single sample	Intestinal barrier function	N/A
EndoCAb	Blood Single sample	Intestinal barrier function	N/A
D-Lactate	Blood Single sample	Intestinal barrier function	Yes

Παράμετροι της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου μετρούμενες στον ορό (βιοδείκτες)

➤ Εντερική πρωτεΐνη που δεσμεύει τα λιπαρά οξέα (I-FABP):

- κυτταροπλασματική πρωτεΐνη των επιθηλιακών κυττάρων
- αύξηση των επιπέδων της στο ορό αντανακλά την καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων δείκτης της ακεραιότητας των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου

➤ Ζονουλίνη (zonulin):

- σύνδεση των πρωτεϊνών των αποφρακτικών ενώσεων με τον κυτταροσκελετό
- ρύθμιση παρακυττάριας διαπερατότητας
- αυξημένα επίπεδα στον ορό σχετίζονται με δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού
- δείκτης της ακεραιότητας των διακυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου

➤ D-lactate:

- παράγεται από την εντερική μικροχλωρίδα ενώ ο άνθρωπος δεν διαθέτει τα αναγκαία ενζυμικά συστήματα για το γρήγορο μεταβολισμό του
- αυξημένα επίπεδα του D(-)-lactate στον ορό αποτελεί δείκτη διαφυγής βακτηριακών προϊόντων στην κυκλοφορία
- δείκτης της δυσλειτουργίας του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού)



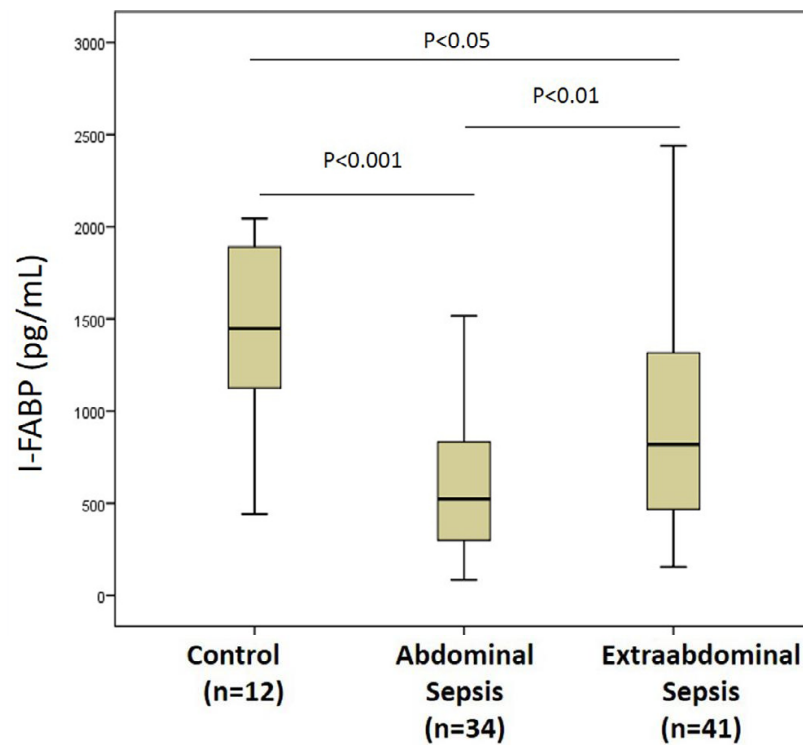
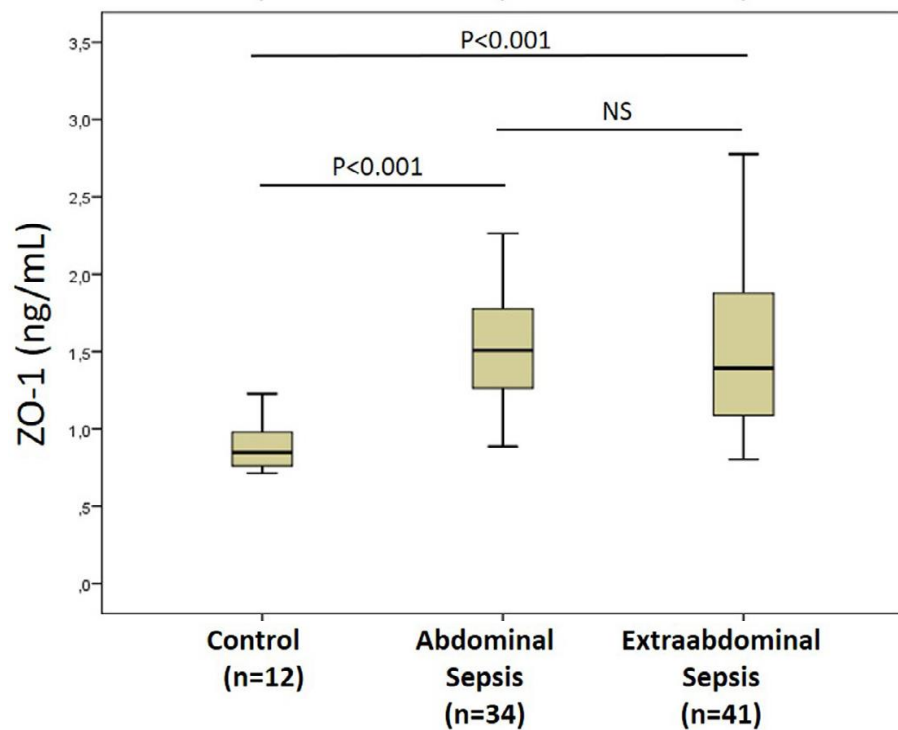
The Prognostic Value of Endotoxemia and Intestinal Barrier Biomarker ZO-1 in Bacteremic Sepsis

Am J Med Sci 2020;359(2):100–107

Stelios F. Assimakopoulos, MD, PhD¹, Karolina Akinosoglou, MD, PhD¹,
Anne-Lise de Lastic, MD, PhD², Aikaterini Skintzi, MSc¹,
Athanasia Mouzaki, MD, PhD² and Charalambos A. Gogos, MD, PhD¹

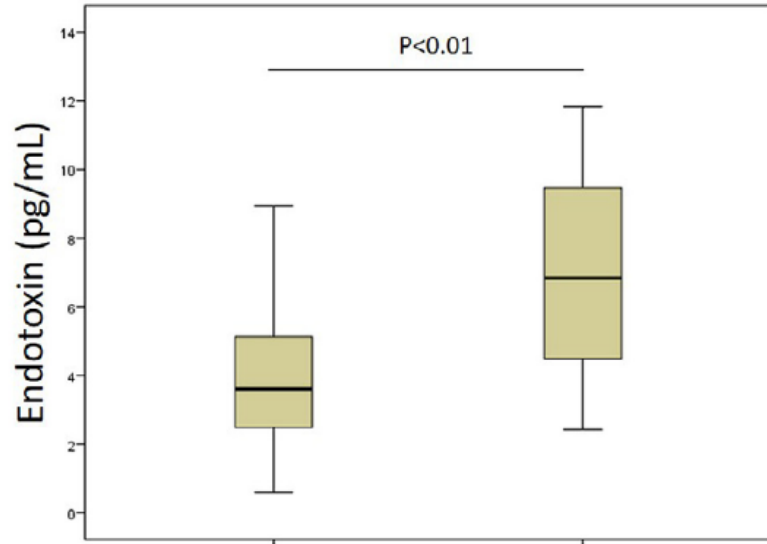
- Seventy-five patients with bacteremic sepsis of **abdominal origin** (n = 34) or **non-abdominal origin** (n = 41) and 12 healthy controls
- Blood samples upon sepsis diagnosis analyzed for serum ZO-1, I-FABP and endotoxin
- Prognostic scores SOFA, qSOFA and APACHE-II were determined over the first 24 hours after sepsis diagnosis
- Outcome in terms of 28-day mortality was recorded.

Αξιολόγηση βιοδεικτών επάρκειας του εντ. φραγμού σε σηπτικούς ασθενείς

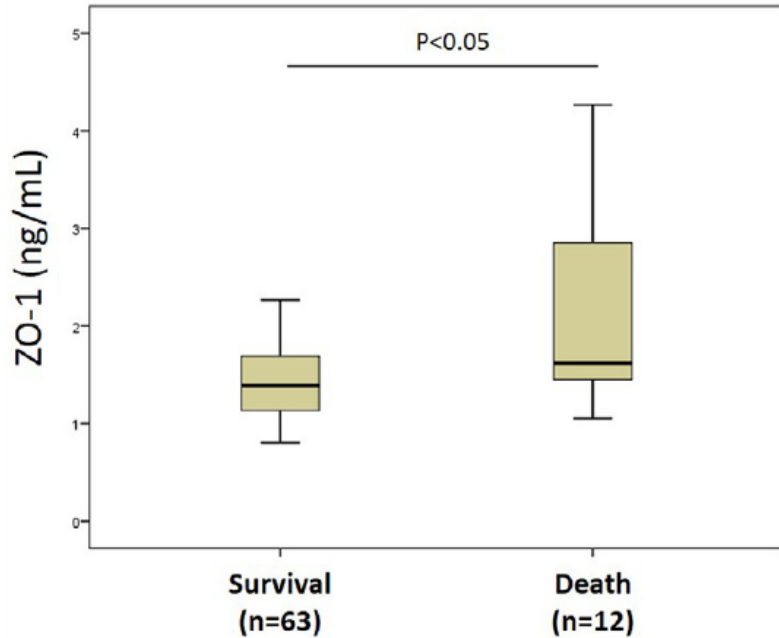
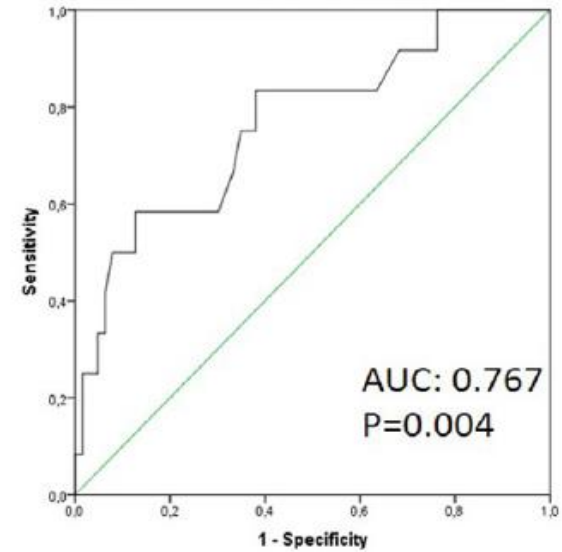


- Τα επίπεδα I-FABP επηρεάζονται από την ενδοκοιλιακή εντόπιση της λοίμωξης (όχι κατάλληλος δείκτης)
- Τα επίπεδα ZO-1 αυξάνονται στους σηπτικούς ασθενείς ανεξάρτητα από την ενδοκοιλιακή εντόπιση της λοίμωξης

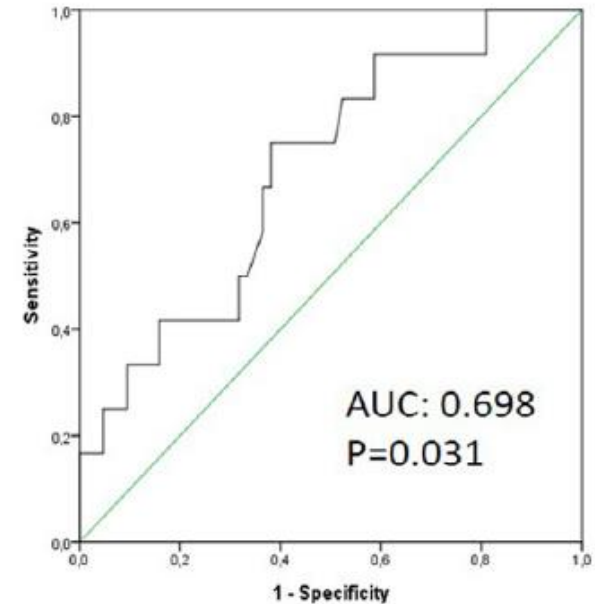
Προγνωστική αξία βιοδεικτών επάρκειας του εντ φραγμού



ROC Curve: Endotoxin

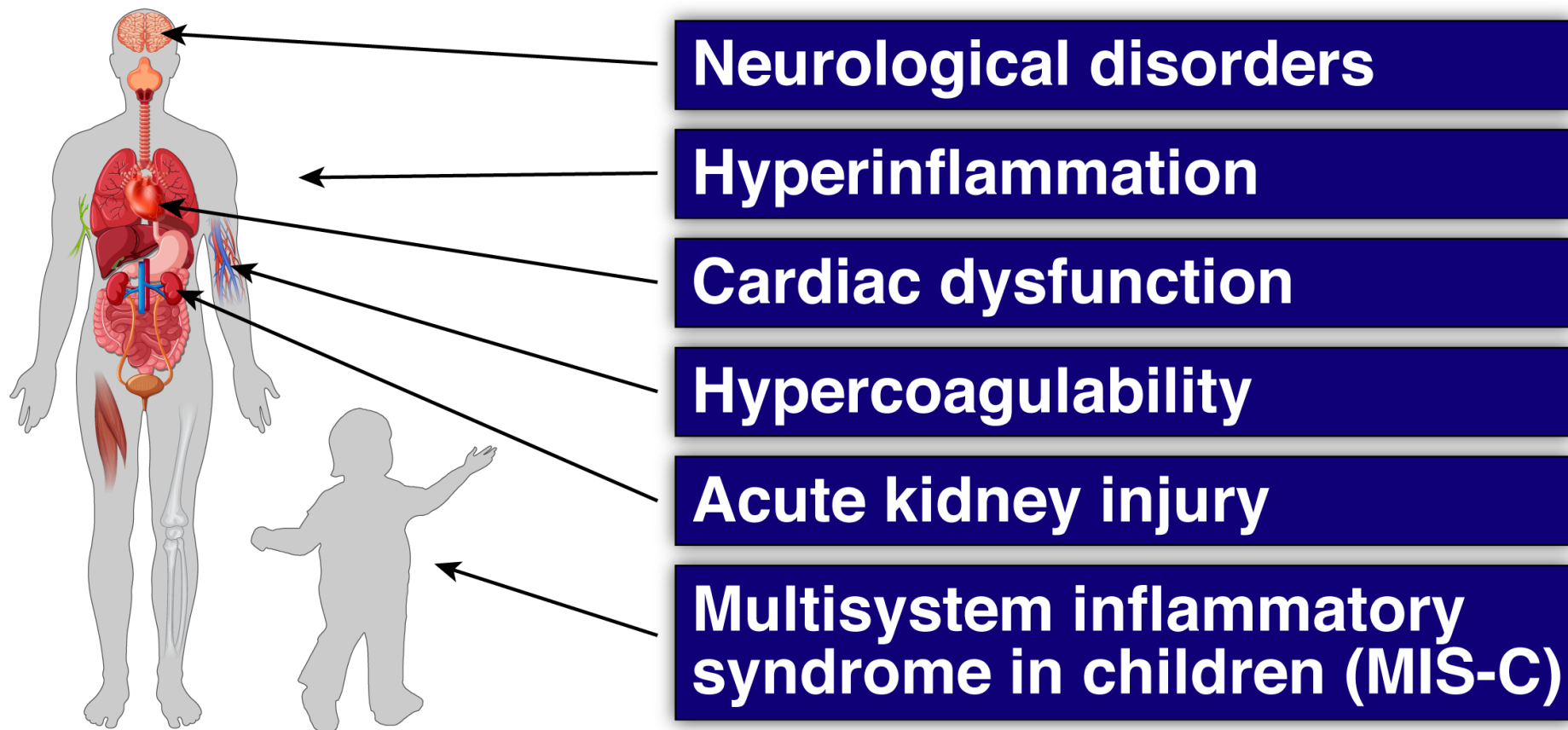


ROC Curve: ZO-1



Μικροβιακή αλλόθρεση
στην «ιογενή σήψη»
Το παράδειγμα της COVID-19

Severe COVID-19 and hyperinflammation



Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza

Silan Gu,^{1,a} Yanfei Chen,^{1,a} Zhengjie Wu,^{1,a} Yunbo Chen,^{1,a} Hainv Gao,² Longxian Lv,¹ Feifei Guo,² Xuewu Zhang,³ Rui Luo,¹ Chenjie Huang,¹ Haifeng Lu,¹ Beiwen Zheng,¹ Jiaying Zhang,¹ Ren Yan,¹ Hua Zhang,¹ Huiyong Jiang,¹ Qiaomai Xu,¹ Jing Guo,¹ Yiwen Gong,¹ Lingling Tang,^{2,b} and Lanjuan Li^{1,b}

- In this cross-sectional study in a Chinese population
 - 30 COVID-19 patients,
 - 24 influenza A (H1N1) patients
 - 30 matched healthy controls (HC)

- specific signatures of the fecal microbiota

- high-throughput 16S rRNA gene sequencing

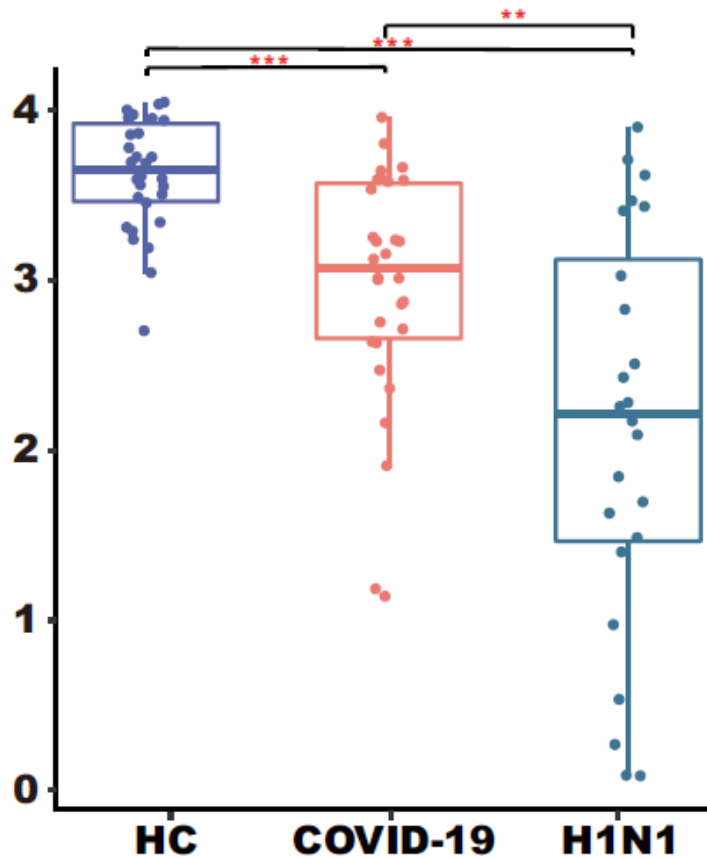
Changes in fecal microbial diversity

a. α -diversity

How many different species

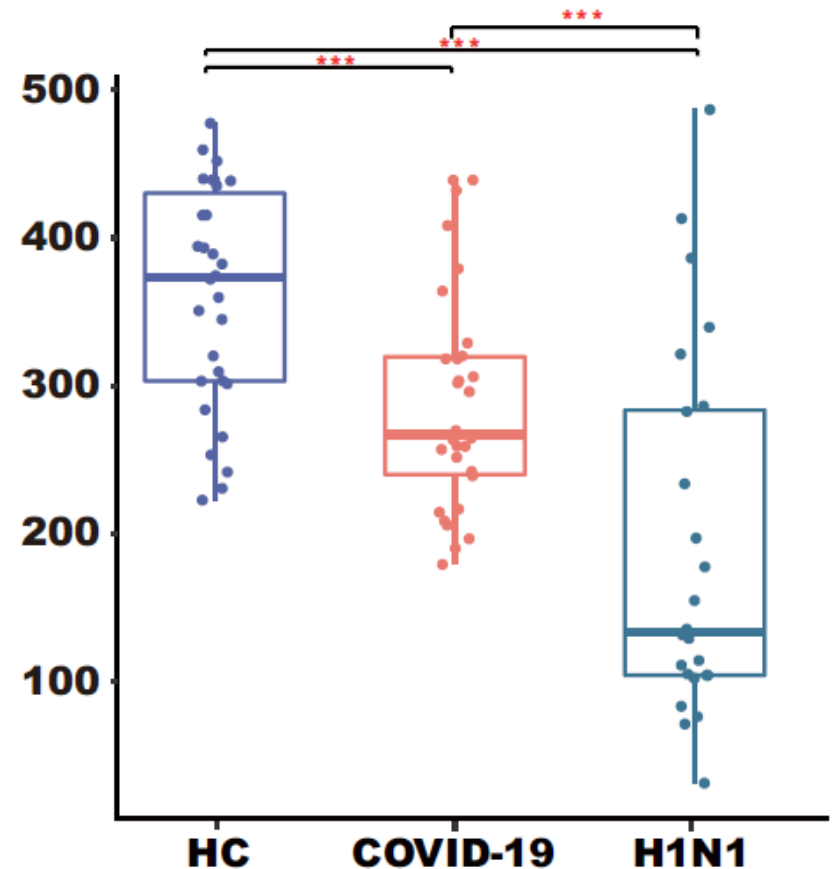
A

Shannon index



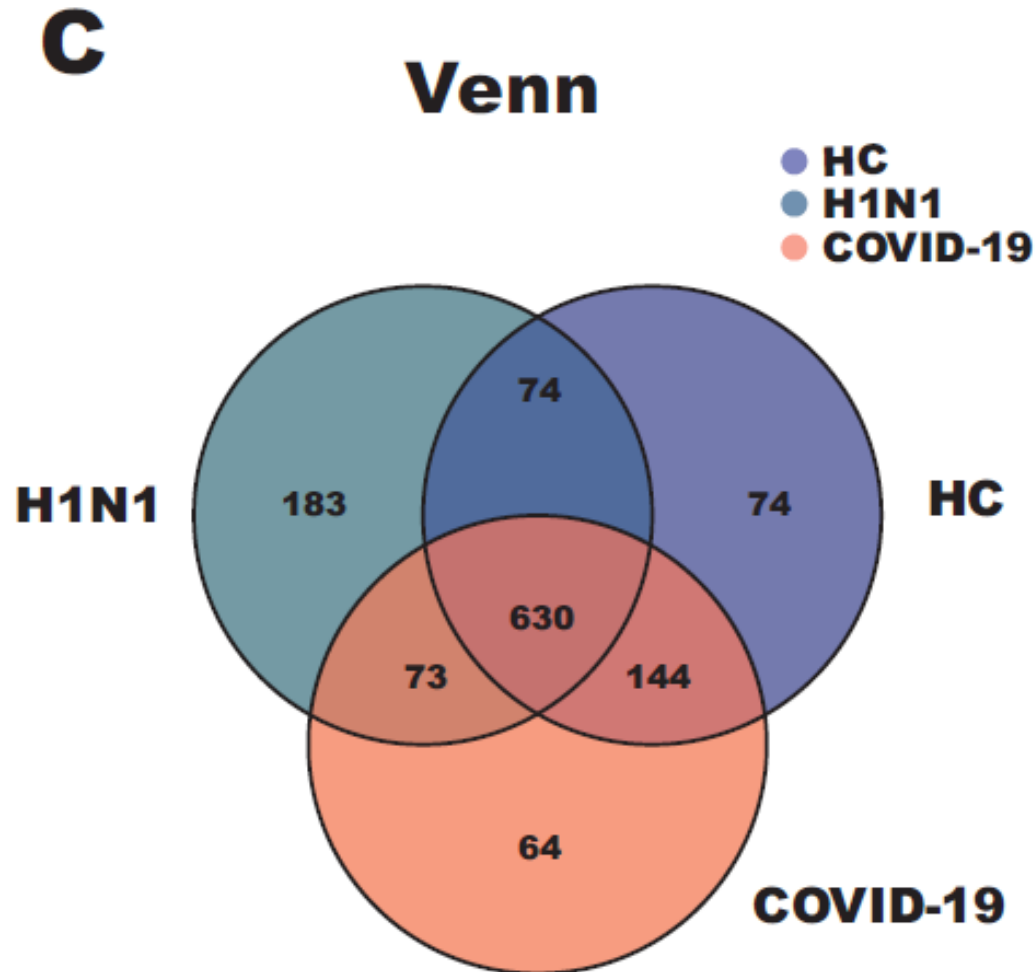
B

Chao index



Changes in fecal microbial taxonomy

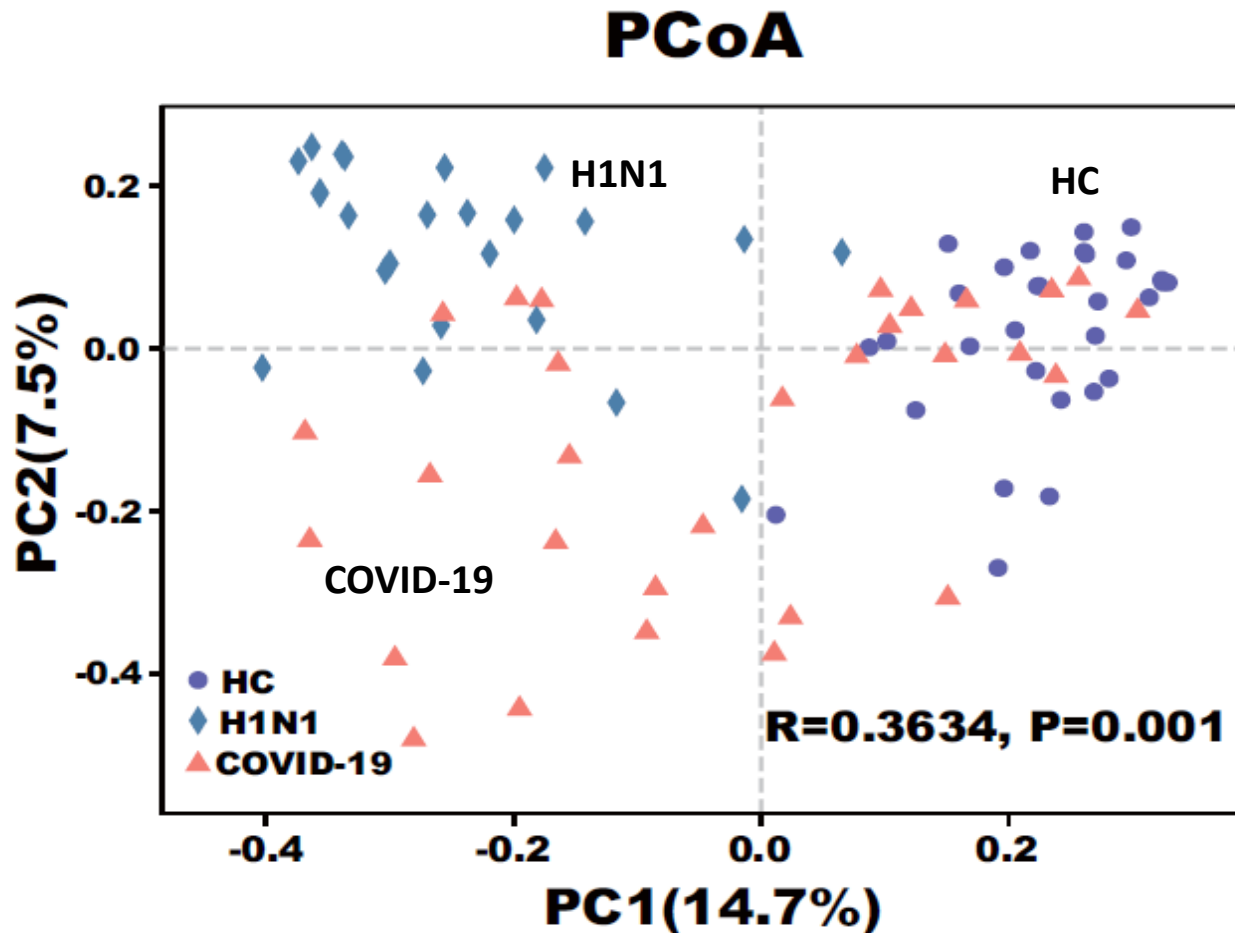
b. Venn diagram showing the overlap of open taxonomic units



Changes in fecal microbial composition

c. β -diversity

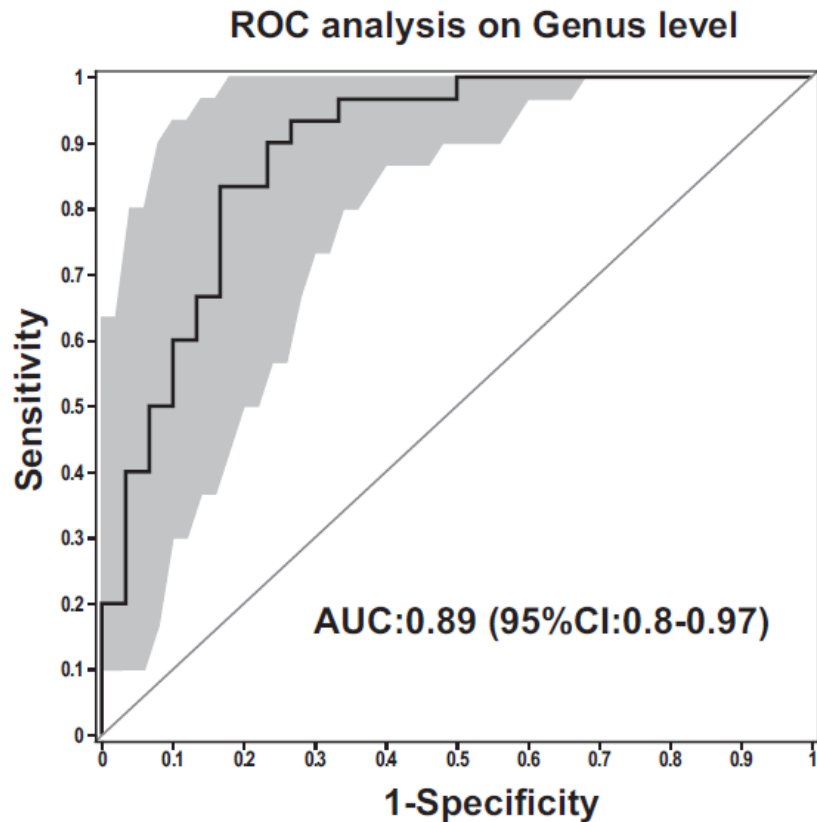
How different is the microbial composition (Main focus is on the difference in taxonomic abundance)



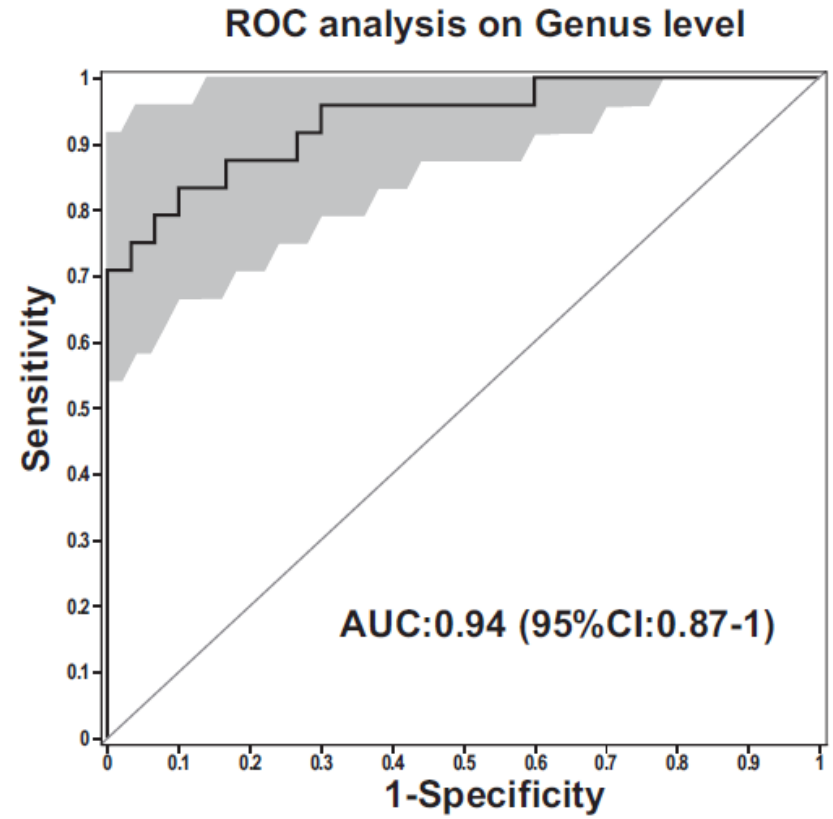
- The **Bray–Curtis** dissimilarity is bounded between 0 and 1, where 0 means the two sites have the same composition (that is they share all the species), and 1 means the two sites **do** not share any species

Microbiota changes are predictive of the type of infection

Prediction of 5 biomarkers in the microbiome of COVID-19 patients and healthy controls



Prediction of 7 biomarkers in the microbiome of COVID-19 and H1N1 patients



Intestinal dysbiosis and systemic complications in COVID-19

SARS-Cov-2 infection



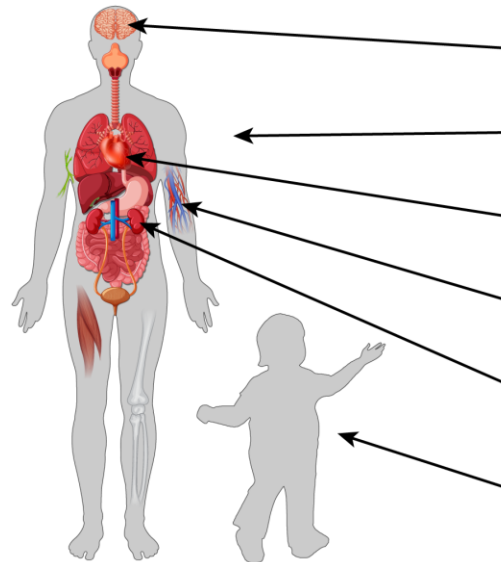
➤ **Dysbiosis**
➤ **Gut barrier dysfunction**



**S.I.R.S: IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ ,
oxidative stress**



**Endotoxemia
PAMPs translocation
Bacterial translocation**



Neurological disorders

Hyperinflammation

Cardiac dysfunction

Hypercoagulability

Acute kidney injury

**Multisystem inflammatory
syndrome in children (MIS-C)**

Στρατηγικές πρόληψης και θεραπείας

Διατήρηση
Ομοιοστασίας της
Εντερικής χλωρίδας

- Προβιοτικά
- Πρεβιοτικά
- Συνβιοτικά

Αποστείρωση
Πεπτικού από
μικρόβια με
δυναμικό
αλλόθεσης

- Μη απορροφήσιμα αντιβιοτικά (SDD)

Ενίσχυση
Εντερικού φραγμού

- Έγκαιρη αιμοδυναμική ανάνηψη
- Πρώιμη εντερική σίτιση
- Ανοσοδιατροφή
 - γλουταμίνη,
 - Αργινίνη
 - Ω-3 λιπαρά
 - σελήνιο

Ανοσολογική
παρέμβαση

- Βακτηριοκτόνος/αυξάνουσα τη διαπερατότητα πρωτεΐνη (Bactericidal/permeability increasing protein)
- αντιοξειδωτές

Χειρουργικοί
ασθενείς
περιεγχειρητικά

Βαρύως πάσχοντες ασθενείς ΜΕΘ
Πρώιμη εντερική σίτιση σε μείζονα
χειρουργεία

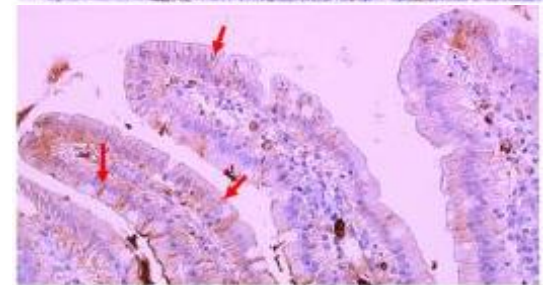
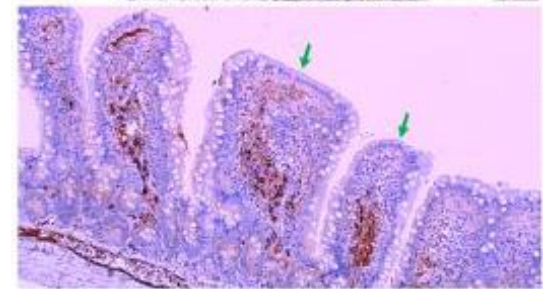
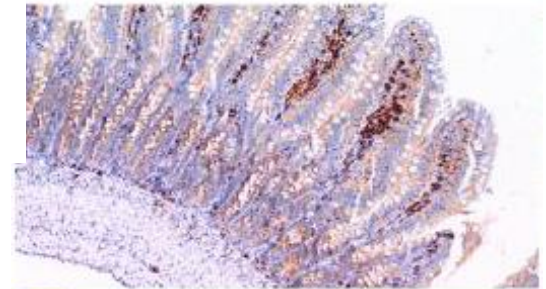
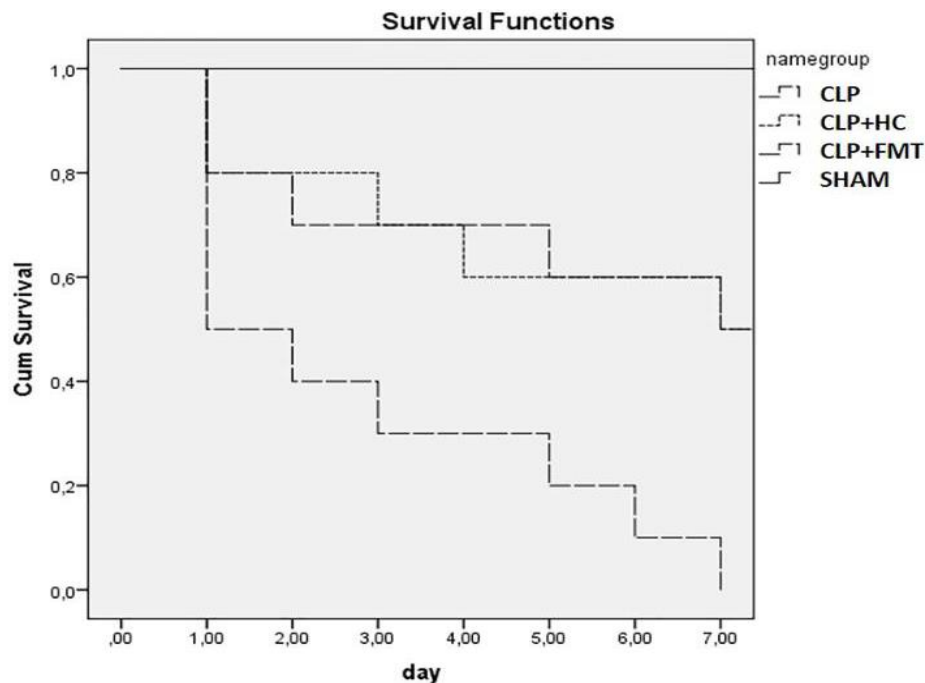
Υπό αξιολόγηση

Τροποποίηση μικροβιώματος ως θεραπευτικός χειρισμός σε σήψη

Shock. 2020 Jun 2. doi: 10.1097/SHK.0000000000001566. Online ahead of print.

Fecal Microbiota Transplantation and Hydrocortisone Ameliorate Intestinal Barrier Dysfunction and Improve Survival in a Rat Model of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis

Stelios F. Assimakopoulos, Iliana Papadopoulou, Dimitra Bantouna, Anne-Lise de Lastic, Maria Rodi, Athanasia Mouzaki, Charalambos Gogos, Vassiliki Zolota, Ioannis Maroulis





ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!