

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Tatjana J. Varljen

ISPITIVANJE UČESTALOSTI  
POLIMORFIZAMA GENA ZA FAKTOR  
NEKROZE TUMORA  $\alpha$ , INTERLEUKIN 6 I  
INTERLEUKIN 1 $\beta$  KOD PREVREMENO  
ROĐENE DECE KAO FAKTORA RIZIKA ZA  
NASTANAK SEPSE

DOKTORSKA DISERTACIJA

U Beogradu, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Tatjana J. Varljen

ANALYSIS OF TUMOR NECROSIS  
FACTOR  $\alpha$ , INTERLEUKIN 6 AND  
INTERLEUKIN 1 $\beta$  GENE  
POLYMORPHISMS FREQUENCY IN  
PRETERM INFANTS AS RISK FACTORS  
FOR DEVELOPMENT OF SEPSIS

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2019

**MENTOR: Prof. dr Tatjana Damnjanović**, specijalista pedijatrije, klinički genetičar, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

**KOMENTOR: Prof. dr Vesna Vujić**, diplomirani farmaceut, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

- 1. Prof. dr Vera Pravica**, specijalista imunologije, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
- 2. Prof. dr Miloš Ješić**, specijalista pedijatrije, neonatolog, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
- 3. Prof. dr Snežana Pavlekić**, specijalista sudske medicine, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
- 4. Doc. Dr Nela Maksimović**, diplomirani molekularni biolog i fiziolog, docent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
- 5. Doc. dr Danijela Todorović**, diplomirani molekularni biolog i fiziolog, docent na Fakultetu medicinskih nauka Univerzitetu u Kragujevcu

**ZAHVALJUJEM:**

*Mojoj mentorki, profesorki dr Tatjani Damnjanović na stručnom rukovođenju ovim istraživanjem, posvećenom vremenu, strpljenju a pre svega poverenju koje mi je ukazala od samog početka mog usavršavanja*

*Zhvaljujem se kolegama Instituta za humanu genetiku u Beogradu na stručnoj pomoći tokom laboratorijskog rada i izrade teze*

*Zhvaljujem se pedijatrima i ostalom osoblju Instituta za neonatologiju u Beogradu na pomoći u prikupljanju uzoraka i podataka*

*Veliku zahvalnost na podršci i velikoj pomoći u prikupljanju uzoraka i podataka za ovu disertaciju dugujem mojoj prijateljici dr Gordani Sekulović, pedijatru na Institutu za Neonatologiju*

*Kolegama na Institutu za sudsku medicinu koji su pokazali razumevanje tokom mog rada na izradi ove teze*

*Beskrajnu zahvalnost na ukazanom poverenju i strpljenju dugujem mojim najmilijima!*

## SAŽETAK

Neonatalna sepsa predstavlja vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod prevremeno rođene dece. Genetički faktori mogu uticati na nastanak, tok i ishod rane neonatalne sepse. Cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo povezanost *TNF $\alpha$  -308 G/A*, *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizama sa nastankom i ishodom rane neonatalne sepse kod prematurusa. Istraživanje je obuhvatilo 471 prevremeno rođeno dete, 282 sa sepsom (151 hemokulturom potvrđenom i 131 kliničkom sepsom) i 189 bez sepse koji su činili kontrolnu grupu. Učestalost alela A i AA genotipa *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma je statistički značajno veća kod prematurusa sa sepsom u odnosu na prematuruse kontrolne grupe. GA+AA genotipovi polimorfizma *TNF $\alpha$  -308 G/A* su statistički značajno povezani sa nastankom hemokulturom potvrđene sepse i kliničke sepse. Učestalost AA genotipa *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma statistički je značajno veća u grupi prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom i kliničkom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, AA genotip *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma udružen je sa letalnim ishodom od sepse kod prematurusa. Logistička regresiona analiza sa gestacijskom starošću, porođajnom telesnom masom i Apgar skorom u '5 kao kovarijatama potvrdila je statistički značajnu povezanost genotipova GA+AA *TNF $\alpha$  -308 G/A* i AA *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma sa nastankom sepse. U našoj studiji nema statistički značajne razlike u učestalosti alela i genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma između grupa prematurusa sa hemokulturom potvrđenom, kliničkom sepsom i kontrolne grupe prematurusa.

Rezultati naše studije pokazuju da su alel A i AA genotip *TNF $\alpha$  -308 G/A* i AA genotip *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma faktori rizika za razvoj rane neonatalne sepse. Genotip AA *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma je faktor rizika za smrtni ishod od rane neonatalne sepse prematurusa.

**Ključne reči:** *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizam, *IL-6 -174 G/C* polimorfizam, *IL-1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizam, rana neonatalna sepsa, letalni ishod

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

## ABSTRACT

Neonatal sepsis is the major cause of morbidity and mortality among preterm infants. Genetic predisposition may have an impact on sepsis susceptibility and outcome. The aim of our study was to explore the association of *TNF $\alpha$*  -308 G/A, *IL-6* -174 G/C and *IL-1 $\beta$*  -511 G/A gene polymorphisms with susceptibility and outcome of early onset sepsis (EOS) in preterm infants. Study included 471 preterm infants, 282 with EOS (culture proven sepsis 151 and clinical sepsis 131) and 189 as a control group. We observed significantly higher frequency of A allele and AA genotype of *TNF $\alpha$*  -308 G/A polymorphism in blood culture proven EOS or clinical EOS compared to the control group. Statistically significant difference was observed in *TNF $\alpha$*  -308 G/A genotypes distribution between sepsis and control groups by dominant model (GG/GA+AA). The frequencies of A allele and AA genotype of *IL-1 $\beta$*  -511G/A polymorphism are significantly higher in clinical EOS and blood culture proven EOS compared to the control group. A significant difference was observed between clinical EOS and blood culture proven EOS and control group by recessive model (GG+GA/AA). Our study has shown that AA genotype of *IL-1 $\beta$*  -511 G/A polymorphism was a significant predictor of lethal outcome. Logistic regression with BMW, gestational age, and Apgar score as covariates confirmed significant association between *TNF $\alpha$*  -308 G/A and *IL-1 $\beta$*  -511 G/A genotypes and development of sepsis. Genotype and allele frequencies of *IL6* -174G/C polymorphism were not significant different between culture proven EOS group, clinical EOS group and the control group did not show significant differences.

According to our results *TNF $\alpha$* -308 A allele and AA genotype and *IL-1 $\beta$*  -511 AA genotype may be risk factors for the development of EOS while *IL-1 $\beta$*  -511 AA genotype may be predictor of EOS lethal outcome.

**Key words:** *TNF $\alpha$*  -308 G/A polymorphism, *IL6* -174 G/C polymorphism, *IL1 $\beta$*  -511 G/A polymorphism, early onset sepsis, lethal outcome

**Naučna oblast:** Medicine

**Uža naučna oblast:** Molecular medicine

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PREVREMENO ROĐENJE .....	1
1.1.1 Epidemiologija prematuriteta .....	2
1.1.2 Faktori rizika prematuriteta .....	3
1.1.3. Morbiditet udružen sa prematuritetom .....	4
1.2. SEPSA .....	6
1.2.1. Epidemiologija sepse.....	8
1.3. NEONATALNA SEPSA .....	10
1.3.1. Faktori rizika za razvoj neonatalne sepse .....	12
1.3.2 Patogeni agensi neonatalne sepse .....	12
1.3.3. Dijagnostika neonatalne sepse .....	13
1.3.4. Citokini .....	17
1.3.5. Osnova patogeneze neonatalne sepse .....	19
1.4. MOLEKULARNA OSNOVA NEONATALNE SEPSE.....	24
1.4.1. Genski polimorfizmi .....	25
1.4.2. Tipovi polimorfizama i mehanizam nastanka.....	25
1.4.3. Primena polimorfizama .....	27
1.4.4. Geni kandidati povezani sa nastankom neonatalne sepse .....	28
1.4.5. Struktura, funkcija i polimorfizmi TNF $\alpha$ gena .....	29
1.4.6. Struktura, funkcija i polimorfizmi IL6 gena.....	32

1.4.7. Struktura, funkcija i polimorfizmi IL1 $\beta$ gena .....	33
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	36
3. ISPITANICI I METODE .....	37
3.1. ISPITANICI.....	37
3.2. METODE .....	37
3.2.1. Utvrđivanje kliničkih pokazatelja neonatalne sepse .....	37
3.2.2. Izolacija molekula DNK.....	39
3.2.3. Ispitivanje polimorfizama.....	41
3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	45
4. REZULTATI .....	46
4.1. OSNOVNI PODACI O PREVREMENO ROĐENOJ DECI.....	46
4.2. REZULTATI ISPITIVANJA OPŠTIH KARAKTERISTIKA KOD PREMATURUSA SA HEMOKULTUROM POTVRĐENOM SEPSOM, KLINIČKOM SEPSOM I U KONTROLNOJ GRUPI .....	49
4.3. ISPITIVANJE KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH POKAZATELJA NEONATALNE SEPSE KOD PREMATURUSA SA HEMOKULTUROM POTVRĐENOM SEPSOM, KLINIČKOM SEPSOM I U KONTROLNOJ GRUPI ..	50
4.4. OPŠTI PODACI O MAJCI, TOKU TRUDNOĆE I POROĐAJU .....	53
4.5. REZULTATI GENETIČKIH ANALIZA .....	55
4.5.1. Rezultati ispitivanja TNF $\alpha$ -308 G/A polimorfizma .....	55
4.5.2. Rezultati ispitivanja IL6 -174 G/C polimorfizma .....	62
4.5.3. Rezultati ispitivanja IL1 $\beta$ -511 G/A polimorfizma.....	69
4.6. REZULTATI MOLEKULARNO – GENETIČKIH ANALIZA UDRUŽENIH POLIMORFIZAMA .....	76
5. DISKUSIJA.....	82



6. ZAKLJUČCI .....	100
7. LITERATURA .....	102
8. BIOGRAFIJA .....	121

# 1. UVOD

## 1.1. PREVREMENO ROĐENJE

Trudnoća fiziološki traje  $280 \pm 11$  dana ili 40 gestacijskih nedelja (GN). Prevremeno rođeno dete je novorođenče rođeno pre punih 37 nedelja ili 259 dana gestacije. Perinatalni period se najčešće definiše kao period od 28. GN do sedmog dana po rođenju. Rođenje deteta pre 28. nedelje gestacije definiše se kao ekstremni prematuritet. Dete rođeno između 28. i 32. GN smatra se veoma nezrelo, a ono rođeno između 32. GN do kraja 36. nedelje gestacije je umereno nezrelo novorođenče. U odnosu na telesnu masu pri rođenju (PTM), novorođenčad možemo podeliti na novorođenčad male telesne mase (eng. *Low Birth Weight* – LBW) čija je PTM <2500g, novorođenčad veoma male telesne mase (eng. *Very Low Birth Weight* – VLBW) čija je PTM <1500g i novorođenčad ekstremno male telesne mase na rođenju (eng. *Extremely Low Birth Weight* – ELBW) sa PTM <1000g. Gestacijska starost (GS) i porođajna telesna masa su najčešće u direktnoj vezi, ali ne i isključivo, s obzirom da usled intrauterinog zastoju u rastu PTM može biti manja od očekujuće za određenu GS.

Od „zrelosti“ prematurusa koja se procenjuje prema gestacijskoj starosti i porođajnoj telesnoj masi zavisi da li će novorođenče preživeti, kao i kakva je struktura morbiditeta kod ovih pacijenata.

Neonatalni period traje prvih 28 dana nakon rođenja, i nadalje se može podeliti na:

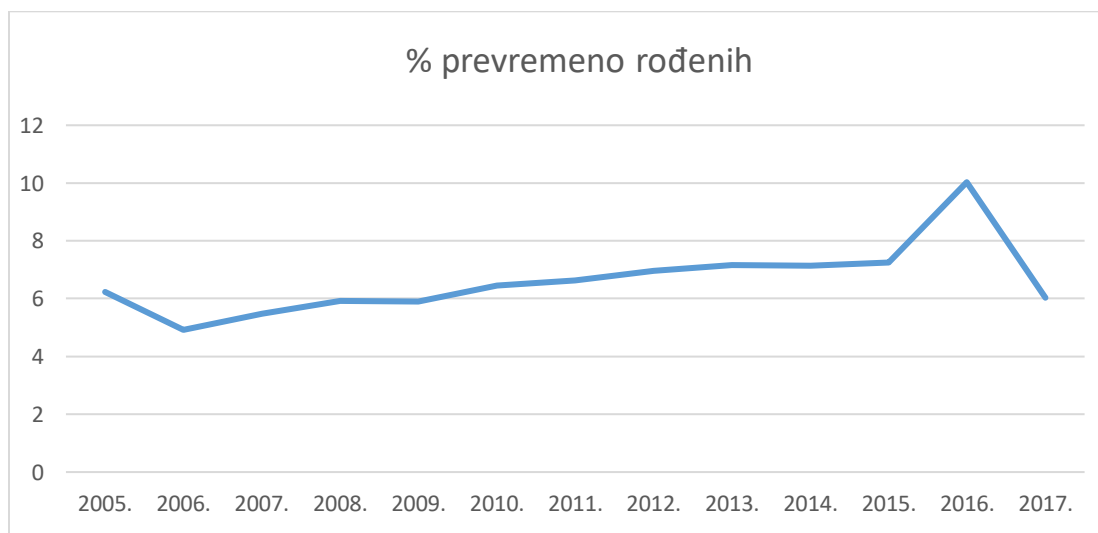
- vrlo rani neonatalni period koji obuhvata prvih 24 časa života
- rani neonatalni period koji obuhvata prvih sedam dana života
- kasni neonatalni period traje od sedmog do 28. dana po rođenju (1).

Preživljavanje prevremeno rođene dece od šezdesetih godina prošlog veka je u neprestanom porastu usled napretka tehnologije (inkubator, mehanička respiratorna potpora), unapređenja kliničke prakse i neonatoloških terapijskih protokola. Značajno je povećano i preživljavanje ekstremno nezrelih prematurusa rođenih u 23. i 24. GN čije je preživljavanje pre 1960. godine bilo veoma retko. Danas se stopa preživljavanja

prematurusa rođenih u 23. GN kreće oko 15%, preživljavanje prematurusa rođenih u 24. GN je približno 55%, a onih rođenih u 25. GN iznosi oko 80% (2).

### 1.1.1 Epidemiologija prematuriteta

Godišnje se rodi 15 miliona beba pre završetka 36. nedelje gestacije što predstavlja ozbiljan medicinski problem. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2018. godine koji važe za 184 zemlje, stopa prevremenog rođenja se kretala od 5% do 18% od ukupnog broja rođene dece. Od 65 zemalja koje imaju pouzdane podatke o trendovima prematuriteta, u poslednjih 20 godina u 63 zemlje postoji neprestani porast u ukupnom broju rođenih prematurusa (3). Prema zvaničnim podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ za period od 2005. do 2017. godine prosečna stopa prevremenog rođenja u Republici Srbiji je slična onoj u razvijenim zemljama i iznosi 6,62% (4). Kao i u većini zemlja i kod nas se uočava tendencija porasta stope rođenja prematurusa (Grafikon 1.).



**Grafikon 1.** Stopa prevremeno rođene dece u odnosu na ukupan broj rođene dece u R Srbiji za period od 2005. do 2017. godine (4.)

Porast broja prevremeno rođene dece je posledica promena karakteristika trudnica (veći broj trudnica starijih od 35 godina ili veoma mladih), kao i povećanja broja višeplođnih i visoko rizičnih trudnoća.

Prematuritet predstavlja vodeći uzrok smrtnosti kod dece mlađe od 5 godina. Oko milion dece umre svake godine zbog komplikacija koje su posledica prevremenog rođenja (5).

### **1.1.2 Faktori rizika prematuriteta**

Etiologija prevremenog rođenja je multifaktorska, složena i nije u potpunosti poznata. Prevremeni porođaj je čest ishod visokorizičnih trudnoća. Faktori rizika za prevremeno rođenje u visokorizičnim trudnoćama su: višeplođnost, prethodni porođaji završeni carskim rezom, prethodna neplodnost i trudnoća ostvarena biomedicinski potpomognutom oplodnjom, abnormalni fetalni rast, visok ili nizak nivo  $\alpha$ -fetoproteina kod trudnice.

Glavni faktori rizika koji dovode do prematuriteta mogu se podeliti na maternalne, fetoplacentalne, medicinske i socio-ekonomske faktore. Hronične bolesti trudnice poput dijabetes melitusa, hipertenzije, urođene bolesti srca i autoimune bolesti su najčešći maternalni faktori rizika prevremenog rođenja. Takođe, infekcije donjih i gornjih delova urogenitalnog trakta tokom trudnoće i horionamnionitis su maternalni faktori rizika za datu trudnoću.

U fetoplacentalne faktore rizika spadaju intrauterina restrikcija rasta, intrauterine infekcije ploda, malformacije i metabolički poremećaji ploda, prevremeno odlublјivanje posteljice (abruptio placentae), prednjačeća posteljica (placenta previa) i prevremena ruptura plodovih ovojaka (PROM). PROM se javlja kod 30 – 40 % prevremenih porođaja.

Teška preeklampsija i eklampsija trudnice, poremećaji srčanog ritma ploda i sl. su medicinski razlozi za prevremenu terminaciju trudnoće s obzirom da nose veliki rizik po život trudnice i ploda.

Socio-ekonomski faktori rizika prevremenog porođaja su nizak nivo obrazovanja majke, materijalno stanje, loša ishrana trudnice i njena neuhranjenost, loša ili neadekvatna zdravstvena zaštita trudnice, vanbračni status majke, nedostatak podrške porodice, stresni životni događaji, porodično nasilje i loše zdravstvene navike trudnice (pušenje, konzumiranje alkohola i narkotika).

U faktore rizika prevremenog rađanja spadaju i kratki period između trudnoća, raniji prevremeni porođaji ili rođenje dece male težine, nasledne bolesti i drugo.

Incidenca rađanja prematurusa je nešto viša u gradovima nego u selu (6). Iz nepoznatih razloga među ženama negroidne rase zabeležena je najviša stopa prevremenog porođaja u odnosu na trudnice ostalih humanih populacija (1).

U mnogim slučajevima tačan uzrok preuranjenog rođenja ostaje nepoznat i smatra se da ga je izazvalo dva ili više faktora. U razvijenim zemljama jatrogeni faktori su odgovorni za oko polovinu porođaja između 28. i 35. nedelje.

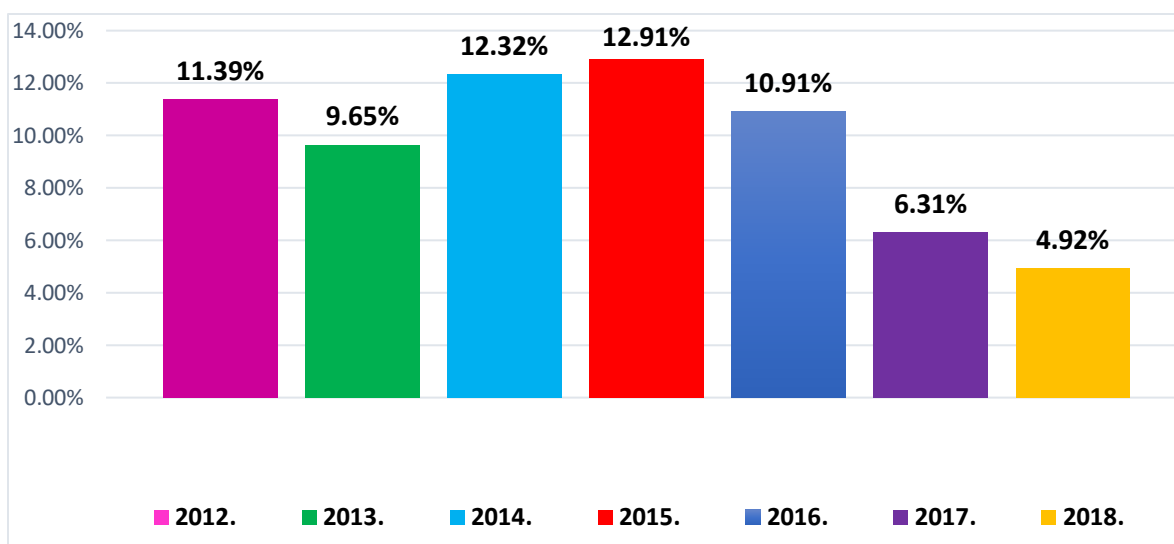
### **1.1.3. Morbiditet udružen sa prematuritetom**

Prematurus je novorođenče sa visokim rizikom za postnatalni morbidet koji nastaje zbog fiziološke nezrelosti usled kraćeg intrauterinog razvoja. Najčešće bolesti respiratornog sistema su respiratorni distress sindrom, bronhopulmonalna displazija i masivna plućna hemoragija. Neurološki problemi koji se javljaju kod prematurusa su apnea, interkranijalno krvarenje i cerebralna paraliza. Arterijski pritisak prematurusa je nestabilan i pod uticajem različitih faktora kao što su asfiksija, hiperkapnija, apneja i dr. Kod polovine prematurusa javlja se hipotenzija, dok je hipertenzija povezana sa plasiranjem nazogastrične sonde. Učestalost otvorenog arterijskog kanala kod prematurusa je i do 80% i obrnuto je proporcijalna gestacijskoj starosti. Kod značajnog broja prematurusa javlja se anemija i trombocitopenija. Prematuritet je praćen poremećajem metabolizma glukoze (hiperglikemija/hipoglikemija) i elektrolita. Poseban problem predstavlja nestabilna acidobazna ravnoteža. Relativno velika telesna površina u odnosu na telesnu masu, slaba termička izolacija zbog nedostatka podkožnog masnog tkiva, kao i nedostatak zaliha

energije u vidu glikogena i mrkog masnog tkiva čine da je hipotermija uobičajena za prematuruse. Zbog toga se bebe PTM manje od 2000 g neguju u inkubatoru.

Tokom života prematurusi su suočeni sa trajnim invaliditetom, koji uključuje teškoće sa učenjem i probleme sa vidom i sluhom.

Uprkos značajnom poboljšanju ginekološke i neonatološke kliničke prakse i terapijskih protokola, neonatalna sepsa još uvek predstavlja glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u populaciji prevremeno rođenih beba. Rizik za neonatalnu infekciju i nastanak sepse obrnuto je proporcionalan gestacijskoj dobi, a veća telesna masa na rođenju do 37. nedelje gestacije doprinosi zaštiti novorođenčeta od infekcije (7).



**Grafikon 2.** Stopa mortaliteta pacijenata na Institutu za neonatologiju u periodu 2012. – 2019. godine (32.)

Za našu zemlju ne postoji tačna procena stope mortaliteta prevremeno rođene dece na nivou Republike. Prema podacima Instituta za neonatologiju u Beogradu u periodu od 2012. do 2019. godine prosečna stopa smrtnosti hospitalizovanih neonatusa iznosila je 9,72%. Stope mortaliteta neonatusa za svaku godinu ovog perioda prikazane su u Grafikonu 2.

## 1.2. SEPSA

Sepsa je po život ugrožavajući poremećaj u funkcionisanju organa usled abnormalnog i neregulisanog zapaljenskog odgovora domaćina na infekciju. Ova savremena definicija sepse predstavljena je 2016. godine Trećim međunarodnim konsenzusom za sepsu i septični šok (8). Sepsa je sindrom čiji je okidač potvrđena (dokazana) ili suspektna infekcija patogenim mikroorganizmima što je jasno razlikuje od neinfektivnog zapaljenskog procesa kao što su pankreatitis, ishemija, trauma i dr. a koji mogu imati sličan klinički, biohemijski i patološki odgovor domaćina izazvan endogenim faktorima. Ono što sepsu razlikuje od infekcije koja može imati lokalni karakter, jeste prekomerni imunološki odgovor domaćina koji vodi ka disfunkciji organa (8). Najčešći patogeni uzročnik sepse je bakterija, ali uzročnici infekcije mogu biti i gljivice, virusi ili protozoe.

Ukoliko se ne prepozna u početnoj fazi i ne počne odmah sa adekvatnim lečenjem, sepsa može preći u septični šok koji se ispoljava produbljenim cirkulacijskim, ćelijskim i metaboličkim abnormalnostima, višestrukim otkazivanjem organa, a ishod je često fatalan.

Kriterijumi za utvrđivanje sepse obuhvaćeni su SOFA skoring sistemom (eng. *Sequential Organ Failure Assessment*) koji se zasniva na ocenama dobijenim kvantifikacijom abnormalnosti kliničkih i laboratorijskih nalaza ili terapijskih procedura (Slika 1.). (9).

Sistem	Skor				
	0	1	2	3	4
<b>Disanje</b>					
PaO <sub>2</sub> /FuO <sub>2</sub> , mmHg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) uz respiratornu podršku	<100 (13,3) uz respiratornu podršku
<b>Koagulacija</b>					
Trombociti, x10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Jetra</b>					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12 (204)
<b>Cirkulacija</b>	SAP ≥ 70 mmHG	SAP < 70 mmHG	Dopamin <5 ili dobutamin (bilo koja doza) *	Dopamin 5,1-15 ili adrenalin ≤0,1 ili noradrenalin ≤0,1*	Dopamin >15 ili adrenalin >0,1 ili noradrenalin >0,1*
<b>CNS</b>					
Glazgovska koma skala**	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Bubrezi</b>					
Kreatinin, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (110)	1,2-1,9 ((110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	>5,0 (440)
Diureza, mL/d				<500	<200
Skrtačnice: PaO <sub>2</sub> – parcijalni pritisak kiseonika; FuO <sub>2</sub> – frakcija udahnutog kiseonika; SAP – srednji arterijski pritisak; *Doze kateholamina date kao μg/kg/min u toku najmanje sat vremena; **Glazgovska koma skala ima raspon 3-15					

**Slika 1.** SOFA skoring sistem – klinički i laboratorijski nalazi, terapijske procedure za utvrđivanja sepse.

Stanje septičnog pacijenta može biti dodatno komplikovano postojećim akutnim bolestima, dugotrajnim komorbitetom, lekovima i intervencijom.

Reč sepsa je grčkog porekla i izvedena je od pojma „σήψις“ koji se tumači kao razlaganje organske materije pod uticajem bakterija. U medicinskom kontekstu, reč sepsa je prvi put upotrebio Homer u svojoj poemi pre oko 2700 godina, koristeći termin „σήπω“ u značenju „raspadanje“. Otac medicine, Hipokrat (cca. 460 pne – 377 pne) u svojim zapisima „*Corpus Hippocraticum*“ sepsu opisuje kao opasno, biološko propadanje koje se može pojaviti u telu (10). Nadalje, Claudius Galenius - Galen i Celsus opisuju da su znakovi koji ukazuju na zapaljenje – sepsu: groznica, periferna vazodilatacija, bol, povećana kapilarna propustljivost i otkazivanje organa (11).

Devetnaesti vek predstavlja zlatnu eru sticanja znanja o zaraznim bolestima zahvaljujući radu Joseph Lister-a, Ignaz Semmelwiss Louis Paster-a i Robert Koch-a. Ova



saznanja su dovela i do unapređenja u razumevanju nastanka sepse (10). Uprkos velikom medicinskom napretku i razvoju dijagnostičkih tehnika u kliničkoj praksi tokom dvadesetog veka pa sve do danas, sepsa je ostala najčešći uzrok smrtnosti kod hospitalizovanih pacijenata. Savremena medicinska saznanja još uvek ne objašnjavaju osnovu bioloških mehanizama koji dovode do poremećaja u funkcionisanju i do otkazivanja organa koji se javljaju kod septičnih pacijenata (12).

### **1.2.1. Epidemiologija sepse**

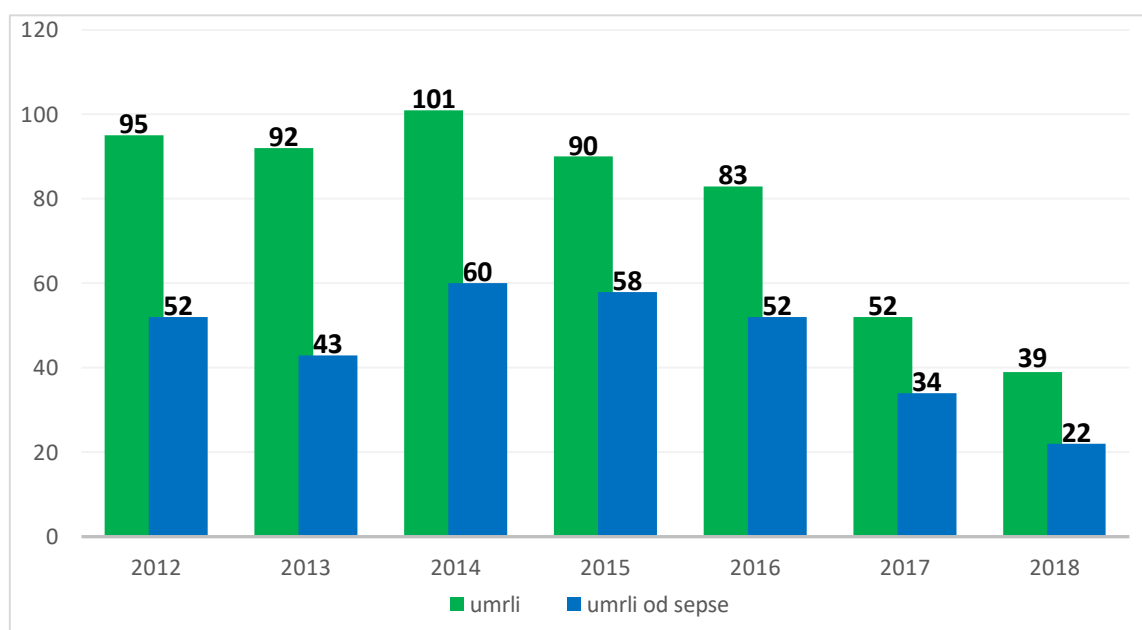
Iako je mortalitet od sepse i septičkog šoka sveden na istorijski minimum, lečenje ovog sindroma još uvek predstavlja veliki izazov s obzirom da je nespecifično i da je ograničeno prvenstveno na upotrebu antibiotika, mehaničke ventilacije i intenzivnog monitoringa vitalnih funkcija. Procene su da širom sveta godišnje od sepse oboli 31.5 miliona ljudi, a kod 5.3 miliona pacijenata ishod je fatalan (13). Iako ne isključivo, do komplikovanih infekcija koje kao posledicu imaju ispoljavanje septičnog sindroma, predominantno dolazi u zdravstvenim ustanovama tokom invazivnih medicinskih procedura i pružanja dugotrajne zdravstvene nege. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije približno 30% pacijenata jedinica intenzivne nege u razvijenim zemljama pogođeno je najmanje jednom epizodom generalizovane infekcije stečene tokom hospitalizacije, dok je u nerazvijenim zemljama učestalost barem duplo veća (14). Epidemiološki podaci o incidenci i mortalitetu od sepse u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju su oskudni, usled čega se zaključci donose posredno.

Nekoliko medicinskih stanja povećavaju osetljivost pacijenata na infekciju i razvoj sepse, pre svega ona koja dovode do znatnog slabljenja imunološkog sistema. Takva su stanja onkoloških bolesnika, pacijenata sa teškom traumom i opekotinama, pacijenata na imunosupresivnoj terapiji, pacijenata sa cirozom jetre, bubrežnih bolesnika i dijabetičara. Iz razloga što se sepsa retko prijavljuje kao primarna dijagnoza kod pacijenata sa dugom hospitalizacijom, smatra se da je stopa morbiditeta i mortaliteta od sepse potcenjena.

Svako ko je pogođen infekcijom može razviti septički sindrom što zavisi od opšteg stanja jedinke i njenog imunološkog stanja. U ranjivu grupu spadaju hronični bolesnici, starije osobe, osobe obolele od sindroma stečene imunodeficijencije, trudnice i novorođenčad.

Posebno veliki problem u lečenju sepse postoji kod pedijatrijskih pacijenata, a kod neonatoloških pacijenata predstavlja i glavni uzrok morbiteta. Kao glavni direktni uzroci neonatalne smrti navode se prematuritet (28%), teška infekcija (26%) i asfiksija (23%) (15).

Procena je da 3 miliona novorođenčadi i 1.2 miliona dece mlađe od 5 godina svake godine obole od sepse (16). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije za 2016. godinu uzrok 7% smrtnih slučajeva kod dece mlađe od 5 godina bila je sepsa, odnosno 15% kada su u pitanju neonatusi. U nerazvijenim zemljama mortalitet uzrokovan sepsom u populaciji neonatusa kreće se i do 56% (17).



**Grafikon 3.** Broj umrlih i umrlih od neonatalne sepse pacijenata na Institutu za neonatologiju u Beogradu za period 2012 – 2019. godine (32.)

Prema podacima Instituta za neonatologiju u Beogradu prosečna stopa smrtnosti neonatusa od sepse u ovom zdravstvenom centru u periodu od 2012. do 2019. godine iznosi

58,2%. U grafikonu 3. prikazana je smrtnost neonatusa od sepse za svaku godinu u periodu 2012. – 2019.

### 1.3. NEONATALNA SEPSA

Neonatalna sepsa predstavlja sistemski inflamatorni odgovor organizma na invaziju mikrobijalnih patogena koji se javljaju tokom neonatalnog perioda, odnosno prvih 28 dana života novorođenčeta. Rođenjem novorođenče prelazi iz intrauterine, sterilne sredine u sredinu bogatu mikrobnim i nutritivnim antigenima. Prevremeno rođena deca pokazuju izrazito oslabljene urođene imunološke funkcije s obzirom da se sazrevanje ovog sistema dešava tokom poslednja tri meseca intrauterinog razvoja. Do sepse dolazi usled abnormalne proizvodnje medijatora inflamacije koji uzrokuju prekomernu aktivaciju trombocita i faktora koagulacije, vaskularnih oštećenja i progresivno otkazivanje organskih sistema.

Najčešće mesto infekcije je pupak, ali ne retko i koža, sluzokoža, respiratorni i digestivni trakt. Mnoge fokalne infekcije (meningitis, pneumonija, infekcija urinarnog trakta, gastroenteritis, osteomijelitis i dr.) kod neonatusa, a pogotovu kod prematurusa, brzo eskaliraju i prelaze u generalizovanu infekciju.

Klinička manifestacija sepse varira i zavisi od virulentnosti i masovnosti etiološkog agensa, puta i vremena nastanka infekcije, imunološkog statusa odnosno gestacijske starosti neonatusa. Rani klinički simptomi su obično nejasni, neodređeni i nespecifični, a pridruženi znakovi opšteg stanja novorođenčeta često komplikuju dijagnozu i lečenje. Obično se manifestuje kao izmenjeno opšte stanje ograničene simptomatologije sa jednim opštim anamnestičkim podatkom da „dete nije dobro“ (18).

U odnosu na vreme nastanka neonatalna sepsa se deli na ranu i kasnu neonatalnu sepsu (19, 20). Ova podela se, suštinski, odnosi na peripartalnu patogenezu.

Rana neonatalna sepsa (eng. *Early Onset Neonatal Sepsis* - EONS) se javlja tokom prvih sedam dana života novorođenčeta i posledica je vertikalne transmisije infekcije sa majke na dete. Kongenitalna infekcija nastaje tokom intrauterinog perioda kao rezultat kliničke ili subkliničke infekcije majke koja se transplacentarno prenosi na fetus. Ovakva vrsta infekcije može nastati bilo kad tokom gestacije i može uzrokovati rani spontani

pobačaj, kongenitalne malformacije, intrauterini zastoj u rastu, prevremeno rođenje, ranu sepsu ili asimptomatsku perzistentnu infekciju tokom neonatalnog perioda. Perinatalna infekcija nastupa neposredno pre ili tokom samog porođaja mikroorganizmima koji kolonizuju urogenitalni trakt majke. Produžena ruptura plodovih ovojaka ( $\geq 18h$ ) može uzrokovati infekciju amnionske tečnosti čime nastaju uslovi za nastanak EONS-a.

Kasna neonatalna sepsa (eng. *Late Onset Neonatal Sepsis* - LONS) ispoljava se od sedmog do 28. dana neonatalnog života i posledica je infekcija koje nastupaju nakon porođaja patogenima stečenih u bolnici ili sredini u kojoj dete živi. Pod većim rizikom od razvoja LONS-a su prevremeno rođena deca kao i neonatusi koji iz određenih razloga zahtevaju produženu hospitalizaciju ili rehospitalizaciju, a tokom koje bivaju podvrgnuti neinvazivnim i invazivnim medicinskim procedurama.

Najuticajniji neonatalni faktori koji predisponiraju infekciju su prematuritet i mala telesna masa na rođenju. Među ovim pacijentima učestalost infekcije je tri do deset puta veća u odnosu na terminsku decu i onu sa normalnom telesnom težinom (1). Ukupna stopa smrtnosti od neonatalne sepse među novorođenčadi iznosi oko 15%, ali utvrđeno je da je ona ipak veća kod prevremeno rođene dece, a značajno veća kod ekstremno nezrelih prematurusa. Stopa mortaliteta od neonatalne sepse značajno se povećava sa smanjenjem GN pri rođenju i za period od 22. do 24. GN iznosi 54%, od 25. do 28. GN iznosi 30%, dok je u periodu između 29. do 33. GN stopa mortaliteta 12%. Kod novorođenčadi koja se rode posle 37. GN stopa mortaliteta opada na svega 3% (21). Rizik od neonatalne sepse je obrnuto proporcionalan sa porođajnom težinom. Stratifikovano po težini, 10% novorođenčadi PTM između 1000 i 1500 g, 35% novorođenčadi manje od 1000 g, odnosno 50% onih čija je PTM bila ispod 750 g imaće dijagnozu sepse tokom neonatalnog perioda (19).

### 1.3.1. Faktori rizika za razvoj neonatalne sepsse

U odnosu na to da li se odnose na majku ili neonatus faktori rizika za razvoj neonatalne sepsse mogu se podeliti na dve grupe:

- maternalne faktore rizika: nedovoljno lečene fokalne infekcije majke (vaginalne, cervikalne, infekcije urinarnog trakta), sistemske infekcije majke (sepsa) ili povišena temperatura bez fokusa zapaljenja, aktuelna polno prenosiva bolest majke, ruptura plodovih ovojaka duža od 18 h, kefalhematom, perinatalna asfiksija, malnutricija i niži socijalni status majke.
- neonatalne faktore rizika: prematuritet, mala PTM, muški pol, nezreo imunski sistem, metabolički poremećaji (galaktozemija nosi sa sobom povećan rizik za razvoj gram-negativne sepsse), prevelika doza gvožđa, produžena hospitalizacija, prisustvo stranih materija (endotrahealni tubusi, umbilikalni kateteri, ventrikuloperitonealni šantovi), primena visokokaloričnih hiperkalimentacionih infuzionih tečnosti, neutropenija, mehanička ventilaciona potpora.

### 1.3.2 Patogeni agensi neonatalne sepsse

Neonatalna sepsa je najčešće posledica infekcije bakterijama, znatno ređe je posledica gljivične, viralne infekcije, a retko infekcije protozoama.

Pedesetih godina prošloga veka najčešći uzročnici neonatalnih infekcija su bili *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Sa povećanjem stope preživljavanja prematurusa male zrelosti (23 – 25 GN) čiji je imuni sistem nerazvijen, proširio se i spektar mikroorganizama uzročnika infekcije za oportunističke infektivne organizme koji ranije nisu imali patogeni potencijal. Jedan od takvih patogena je i koagulaza negativna *Staphylococcus* (ConS) (22, 23, 24). Od šezdesetih pa do devedesetih godina prošlog veka *Streptococcus agalactiae* (streptokoka grupe B – GBS) postaje primaran gram-pozitivan

infektivni mikroorganizam u indukciji neonatalne sepsse (25, 26, 27, 28). Narednih decenija zbog raširene upotrebe antibiotika, pogotovu onih širokog spektra dejstva koji su doprineli selekciji mikroba otpornih na veći broj lekova, broj „neuobičajenih“ patogena je nastavio da raste. Tako CnoS postaje najrasprostranjeniji patogen u neonatalnom okruženju, a samim tim i najčešći infektivni agens koji uzrokuje kasnu sepsu u odeljenjima neonatalne intenzivne nege (29, 30, 31). Značajan doprinos imaju i gram-negativni bacili (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*) enterokoke *Staphylococcus aureus*, a od gljivica *Candida* (1).

Prema izveštajima Svetske zdravstvene organizacije i u II dekadi 21. veka najčešći infektivni organizam rane sepsse u razvijenim zemljama ostao je *Streptococcus agalactiae* (GBS), a slede *E. coli* i ConS (20).

### 1.3.3. Dijagnostika neonatalne sepsse

Klinički znaci neonatalne sepsse variraju i veoma često su nespecifični. Dijagnostika sepsse je posebno otežana kod prematurusa i LBW neonatusa s obzirom da rani simptomi sepsse nisu isključivo karakteristični za generalizovanu infekciju već su često povezani s drugim morbiditetima vezani za prematuritet, što komplikuje dijagnostiku i lečenje sepsse kod ove grupe pacijenata.

Rane kliničke manifestacije sistemske ili fokalne infekcije je izmenjeno opšte stanje, hipotermija ili hipertermija, apnea ili tahipnea, žutica, respiratorni distres, tahikardija, vazomotorna nestabilnost, poremećaji u ishrani, povraćanje, diareja, meteorizam, letargija ili razdražljivost, otežana pokretljivost jednog ekstremiteta praćena plaćem, bledilo kože i ostale kožne promene (32).

Dok terminsko novorođenče na bakterijsku infekciju reaguje groznicom, prematurus češće reaguje hipotermijom usled poteškoća u kontroli telesne temperature (33).

Kasni respiratorni znaci generalizovane infekcije su cijanoza, ječanje, dispneja. Znaci koji su vezani za centralni nervni sistem su piskav plač, zabačena glava, napeta fontanela, konvulzije. Ostali kasni simptomi generalizovane infekcije su: intestinalna

opstrukcija, hemoragijska dijateza, diseminovana intravaskularna koagulacija (DIC) sa krvarenjem iz mesta uboda i petehijama, skleredem.

S obzirom na nespecifičnost kliničkih simptoma neonatalne sepse u početnoj fazi od velike važnosti su laboratorijski nalazi koji omogućavaju ranu dijagnostiku i povećavajući mogućnost pravovremene primene adekvatne terapije.

Od najvećeg značaja su rezultati mikrobioloških analiza kojim se utvrđuje prisustvo infektivnog agensa u sterilnim telesnim fluidima neonatusa.

Infekcija, generalizovana ili lokalizovana, se utvrđuje na osnovu:

- hemokulture
- urinokulture (kada je to klinički indikovano)
- kulture cerebrospinalnog likvora (indikovana je kada je hemokultura pozitivna ili su prisutni klinički znaci infekcije CNS)
- kulture trahealnog aspirata (intubiranog novorođenčeta sa suspektnom pneumonijom ili iznenadnom promenom količine i izgleda trahealnog aspirata)
- koprokulture (ukoliko je stolica izmenjena)
- kulture sekreta očiju ili kože (kada je klinički indikovano)
- kulture sinovijalne tečnosti (kada je klinički indikovano).

Kontrolni bakteriološki pregled vrši se 48-72 h od početka odgovarajuće antibiotske terapije (32).

Iako su mikrobiološki nalazi od velikog značaja i još uvek predstavljaju zlatni standard za postavljanje dijagnoze neonatalne sepse, kao veliki nedostatak ove dijagnostičke metode navodi se vreme potrebno za dobijanje rezultata, a koje može iznositi i nekoliko dana. Ovo vreme može biti ključno za VLBW i ELBW prematurusa kod kojih, zbog nezrelosti imunog sistema, infekcije često imaju fudrojantan tok usled čega početna faza sepse, kada je lečenje najefikasnije, može biti propuštena.

Kod znatnog broja novorođenčadi sa generalizovanom infekcijom hemokultura može dati negativan nalaz iako su kliničke manifestacije sepse uočljive. U tim slučajevima govorimo o kliničkoj sepsi, odnosno kliničkoj infekciji i dodatni dijagnostički testovi su od velike pomoći. Najčešće korišćen je hematološki test kojim se određuje ukupan broj

leukocita, polimorfonukleara (PMN), nezrelih PMN, odnos nezrelih prema ukupnom broju PMN (I:T), odnos nezrelih prema zrelih PMN (I:M), zatim se utvrđuje prisutstvo toksičnih granulacija i vakuola u PMN i broj trombocita. Odstupanje svakog navedenog elementa od normalnih vrednosti ocenjuje se ocenom 1. Ukoliko se ovim hematološkim sistemom bodovanja (eng. *Hematologic Scoring System* - HSS) dobije zbirna ocena 3 ili više ona nam govori u prilog infekcije. Danas se u neonatologiji najčešće koristi Rodwell-ov HSS (34) (Tabela 1.).

**Tabela 1.** Rodwell-ov hematološki skoring sistem

Kriterijum	Abnormmalne vrednosti	Skor
<b>Ukupan br leukocita</b>	$\leq 5000/\mu\text{L}$	1
	$\geq 25000$ – na rođenju	1
	$\geq 30000$ – 12-24 h	
	$\geq 21000$ – od drugog dana	
<b>Ukupan br PMN</b>	1800-5400	0
	Nema zrelih PMN	2
	Povećan/smanjen	1
<b>Broj nezrelih PMN</b>	600	0
	Povećan	1
<b>Odnos I:T PMN</b>	0,120	0
	Povećan	1
<b>Odnos I:M PMN</b>	$\leq 0,3$	0
	$\geq 0,3$	1
<b>Degenerativne promene PMN</b>	Toksične strukture u citoplazmi	1
<b>Broj trombocita</b>	$\leq 150000/\mu\text{L}$	1

Ocnom  $\geq 3$  može se utvrditi sepsa kod 26 od 27 novorođenčadi, što čini ovaj sistem bodovanja visoko osetljivim (senzitivnost 96%) i specifičnim ( $p < 0,05$ ) a time i pouzdanim za utvrđivanje sepse (sa pozitivnom prediktivnom vrednošću 31%).



Najpouzdaniji pojedinačni pokazatelji infekcije ovog dijagnostičkog sistema su I:T (senzitivnost – 96%; specifičnost – 71%), povećani ili smanjen broj ukupnih neutrofila (senzitivnost – 96%; specifičnost – 61%) i ukoliko je I:M  $\geq$  3 (senzitivnost – 93%; specifičnost – 81%). Iako je mali broj biomarkera u rutinskoj upotrebi za dijagnostiku i praćenje sepse, brojna su istraživanja u potrazi za markerom, odnosno, setom markera visoke senzitivnosti i specifičnosti koji bi se koristili pre svega u akutnoj hiperinflamatornoj fazi.

C reaktivni protein (CRP) je najčešće korišćeni biomarker akutne faze infekcije koji se koristi već dugi niz godina posebno u pedijatriji (35). Njegova sinteza je pod regulacijom interleukina 6 (IL6) i odvija se u jetri. Iako uloga CRP-a tokom akutne inflamacije nije sasvim jasna, poznato je da vezuje fosfolipidne komponente mikroorganizama i na taj način olakšava njihovo uklanjanje od strane makrofaga (36). CRP ima nisku senzitivnost za detekciju neonatalne sepse u ranoj fazi zbog odložene indukcije njegove sinteze u jetri. Međutim, u kombinaciji sa drugim biomarkerima njegova senzitivnost se povećava. Serijom merenja u periodu 24 - 48 sati od početka infekcije povećava se senzitivnost (74 – 98%) i specifičnost (71 – 94%) ovog biomarkera zbog čega se u neonatalnoj sepsi koristi kao značajan parametar tokom tretmana antibioticima (37).

Tokom poslednje dekade veliki značaj kao biomarker rane faze neonatalne sepse dobio je prokalcinin (PCT). Radi se o prekursoru hormona kalcitonina, sintetisanom od strane monocita i hepatocita, koji je privukao pažnju pošto je utvrđeno da pacijenti sa bakterijskom infekcijom imaju jako povišeni nivo u krvi ovog prekursora. Naknadno je utvrđeno da ga tokom sistemskog infektivnog odgovora koji vodi u tešku sepsu proizvode mnoga tkiva (38).

Kao i CRP, i PTC može imati proinflamatorne efekte i predstavlja važan biomarker sepse, s tom razlikom što u poređenju sa CRP-om njegova koncentracija u krvi mnogo brže raste pa se smatra senzitivnijim markerom. Svega 3 do 4 sata od početka infekcije dolazi do značajnog povećanja serumske koncentracije, a maksimalne vrednosti dostiže u periodu od 18 do 24 sata od početka infekcije (39). Značajna ograničavajuća karakteristika ovog biomarkera jeste fiziološko povećanje njegove vrednosti odmah nakon rođenja, što ograničava njegovu upotrebu u dijagnostici rane neonatalne sepse (prva dva do četiri dana

života) i naglasak da se procena vrednosti ovog markera mora vršiti uz primenu starosno specifičnih graničnih vrednosti za svaki period (40).

Serumski amiloid A (eng. *Serum amyloid A* – SAA), lipopolisaharidno vezujući protein (eng. *Lipopolysaccharide binding protein* - LBP) manozno vezujući protein (eng. *Mannose binding protein* – MBP) i laktat su serumski biomarkeri neonatalne sepse koji još uvek nemaju široku kliničku primenu kao dijagnostički testovi (41).

Sa razvojem protočne citometrije ulogu obećavajućih biomarkera neonatalne sepse dobijaju površinski ćelijski adhezioni molekuli na neutrofilima i monocitima, pre svega CD64 i CD11, ali i drugi površinski adhezioni molekuli leukocita (CD14, E-selektin, L-selektin i dr.) pokazujući visoku senzitivnost i specifičnost kao dijagnostički markeri neonatalne sepse (42). S obzirom da koncentracija citokina u cirkulaciji ne mora nužno odražavati i njihovu biološku aktivnost, procena ćelijskog odgovora na iste u vidu adhezivnih molekula može biti bolji način za identifikaciju ranog odgovora na bakterijsku invaziju.

Studija Fjaertofa i saradnika je pokazala da kod prevremeno rođene dece neutrofili pokazuju umereno povećanu ekspresiju CD64 tokom infekcije u odnosu na terminsku novorođenčad (43) zbog nezrelosti urođenog imunog sistema, što smanjuje snagu ovog biomarkera u ovoj populaciji pacijenata.

#### **1.3.4. Citokini**

Grupu veoma potentnih biomarkera neonatalne sepse čine citokini. To su mali signalni, proteinski molekuli neophodni za regulisanje hematopoeze, razvoj i funkcionisanje urođenog i stečenog imunskog odgovora. Specifičnost ovih signalnih molekula jeste u tome što mogu delovati na autokrinom, parakrinom ili endokrinom nivou (44, 45, 46, 47). Većina citokina deluju na lokalnom nivou jednostavnim difuzijom ili kontaktom ćelije sa drugim ćelijama. Neke ćelije koje proizvode citokine istovremeno ekspimiraju i receptore za iste, a izlučeni citokini mogu se preko tih receptora vezati za ćelije koje ih proizvode i tako modulirati sopstvenu funkciju. Napuštanjem lokalne sredine

citokini mogu ući u cirkulaciju i tako dospeti do udaljenih delova tkiva gde stupaju u interakciju sa različitim organskim sistemima dovodeći do promene fiziologije domaćina.

Ovi molekuli imaju centralnu ulogu u orkestriranju imunološkog odgovora ali i u patogenezi sepse. Iako nisu poznati svi mehanizmi koji leže u osnovi nastanka septičnog sindroma, smatra se da je jedan od bitnih pokretača sindroma prekomerna produkcija citokina i njihovo oslobađanje u cirkulaciju (48). Ova inflamatorna oluja dovodi do narušavanja ravnoteže između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina koji su u vrlo interaktivnom i dinamičnom procesu (49). Fino regulisana ravnoteža mreže citokina je presudna u eliminaciji invazivnih faktora s jedne strane i izbegavanja prekomernog zapaljenja i oštećenja tkiva.

Prednost citokina kao biomarkera sepse je što im koncentracija u krvi nakon infekcije veoma brzo raste usled čega ih je kao dijagnostičke testove za sepsu moguće koristiti veoma rano u akutnoj fazi inflamatornog odgovora.

Citokini su podeljeni na proinflamatorne i antiinflamatorne citokine, mada neki mogu imati dvostruku ulogu, u zavisnosti od ciljne ćelije, prirode aktivirajućeg signala, miljea ostalih citokina i sl. (50).

U proinflamatorne citokine ubrojani su faktor nekroze tumora alfa (eng. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  – TNF $\alpha$ ), interleukin 1 beta (IL1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL6), interleukin 8 (IL8), interleukin 12 (IL12), interferon gama (IFN $\gamma$ ) i drugi.

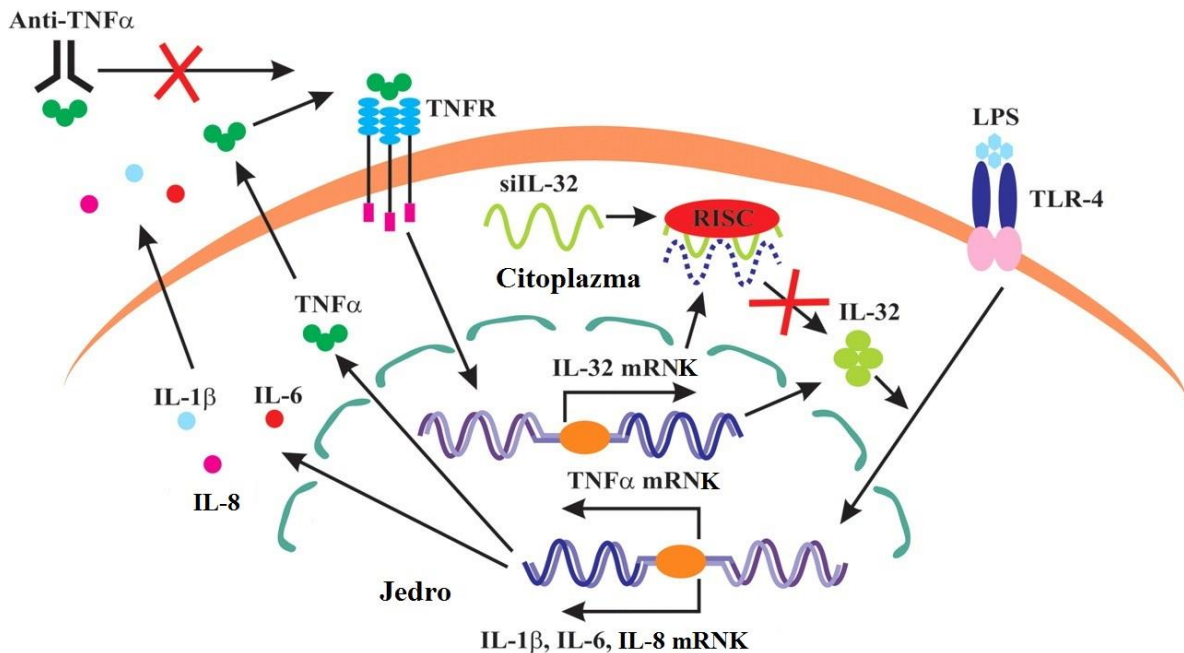
Antiinflamatorni citokini su interleukin 10 (IL10), interleukin 4 (IL4), receptor antagonist za IL1 (IL1Ra), interleukin 11 (IL11), transformacioni faktor rasta beta (eng. *Transforming growth factor  $\beta$*  – TGF $\beta$ ), IL6 i mnogi drugi.

Iako imaju mnoge prednosti kao biomarkeri sepse, (brzo povećanje serumske koncentracije nakon aktivacije, ne suviše kratko vreme poluživota i dr.) jedino se IL6 koristi kao dijagnostički marker sepse, a razlog je pouzdani način merenja njegove koncentracije (36).

### 1.3.5. Osnova patogeneze neonatalne sepse

U osnovi razvoja imunološkog odgovora nalazi se prepoznavanje patogena od strane imunih ćelija koje na svojoj površini imaju eksprimiran skup receptora poznat kao receptori za prepoznavanje patogena (eng. *Pathogen Recognition Receptors* – PRR). Veliki deo ovog repertoara PRR-a čine Toll nalik receptori (eng. *Toll-Like Receptors* – TLRs). Kod ljudi je poznato deset članova ove familije receptora eksprimiranih na različitim ćelijskim tipovima koji prepoznaju ekstracelularne i intracelularne produkte patogena. Ti produkti patogena koji ćelije domaćina prepoznaju PRR-om predstavljaju patogen asocirani molekularni obrasci (eng. *Pathogen Associated Molecular Patterns* – PAMPs). Prototip PAMP-a su lipopolisaharidi (eng. *LipoPolySaccharides* – LPS) na gram-negativnim bakterijama koji prepoznaju TLR4 i lektinski receptori na ćelijskoj površini. TLR2 receptor prepoznaje lipotehojsku kiselinu - PAMP gram-pozitivnih bakterija. Peptidoglikan na površini ovih bakterija čini PAMP koje ćelije domaćina prepoznaju preko nukleotid vezujućeg oligomerizujućeg domena – receptora koji nisu deo familije TLR receptora. Za TLR3 i retinoično-kiselinski indukovani protein I (eng. *Retinoic-acid-Inducible protein I* - RIG-I) PAMP predstavlja dvolančane RNK strukture virusa. Mikroorganizmi često istovremeno aktiviraju više od jednog TLR receptora i na taj način se definiše specifični odgovor domaćina na određeni patogen (51). Osim PAMP-a, TLR receptori mogu biti aktivirani i molekularnim obrazacem asociranim sa oštećenjem (eng. *Damage Associated Molecular Patterns* – DAMPs). DAMP predstavlja intracelularne medijatore koji se oslobađaju tokom ćelijskog oštećenja i ima ključnu ulogu u patogenezi sepse.

Vezivanje bakterijskog liganda za ćelijske PRR inicira produkciju proinflammatoryh citokina preko mitogen aktivirane protein kinaze (eng. *Mitogen Activated Protein Kinase* – MAPK) i transkripcionog nuklearnog faktor  $\kappa$ B (eng. *Nuclear Factor  $\kappa$ B* - NF- $\kappa$ B). Značajno veća produkcija, samim tim i viši nivoi proinflammatoryh citokina TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12, IL18 i IFN $\gamma$  registruju se tokom sepse i septičnog šoka. Povećanje nivoa proinflammatoryh citokina detektovano je i kod septičnih neonatusa.



**Slika 2.** Aktivacija inflamatornih odgovora: *LPS* – lipopolisaharid, *TLR-4* – Toll nalik receptor 4, *RISC* – RNK indukovani kompleks za utišavanje signala, *IL-1β* – interleukin 1 beta, *IL-6* – interleukin 6, *IL-8* – interleukin 8, *TNFα* – faktor nekroze tumora alfa, *IL-32* - interleukin 32, *siIL-32* – mala interferirajuća mRNK, *TNFR* – receptor za *TNFα*, *Anti-TNFα* – inhibitor *TNFα*

Međutim, istraživanja pokazuju da je produkcija *IL1β*, *TNFα*, *IFNγ* i *IL12* kod septičnih neonatusa u poređenju sa odraslima sa sepsom manja (52, 53, 54) što se, nadalje, povezuje sa smanjenom proizvodnjom važnih intracelularnih medijatora TLR signalizacije, a koja je specifična za gestacijsku starost ploda (55).

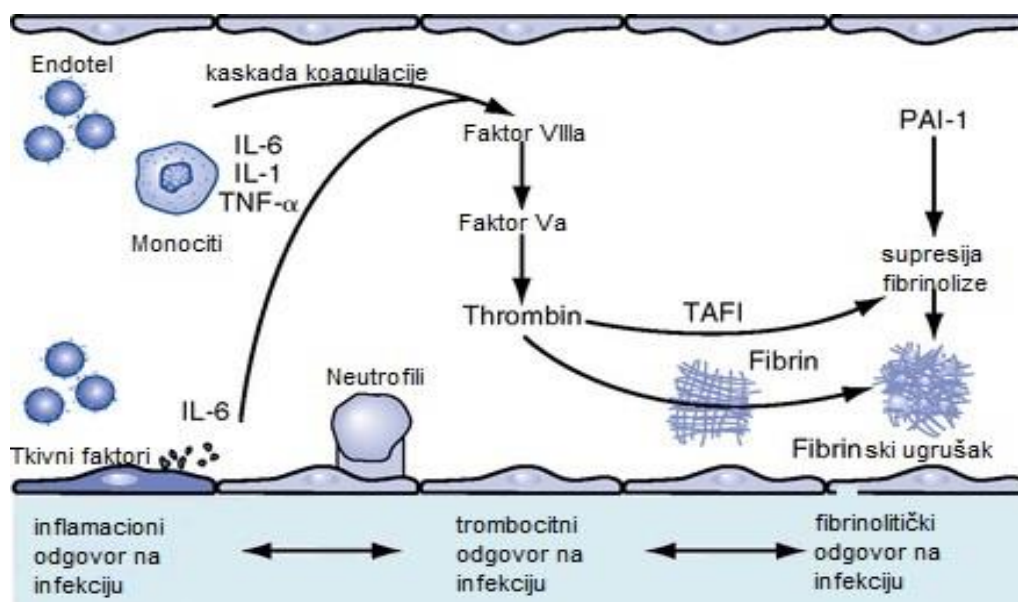
Sintetisani proinflamatorni citokini deluju na endotelne ćelije koje pod ovim stimulusom povećavaju ekspresiju ćelijskih adhezionih molekula (eng. *Cell Adhesion Molecules* –CAMs). Povećana ekspresija adhezionih molekula na površini endotelnih ćelija pokreće regrutovanje i ekstravaskularnu migraciju leukocita ka žarištu inflamacije. Pored CAM-a, važnu ulogu u privlačenju i akumulaciji leukocita na mestima zapaljenja ima gradijent hemokina proizvedenih od strane endotelnih ćelija i lokalnih makrofaga. Ukoliko

izostane adekvatno regrutovanje leukocita na mesto lokalne infekcije postoji rizik širenja infekcije na sistemski nivo.

Tokom generalizovane infekcije pojačava se sinteza i drugih hemoatraktivnih molekula uključujući elemente komplementa (C3, C5) i drugih proteina i peptida urođene odbrane. Komponente komplementa olakšavaju direktno ubijanje mikroorganizama putem opsonizacije, ali i indirektno preko svoje hemotaktičke ili anafilaktičke aktivnosti kojom povećavaju agregaciju leukocita i lokalnu vaskularnu permeabilnost na mestu invazije patogena. Elementi komplementa imaju važnu ulogu u proizvodnji proinflamatornih citokina i aktivaciji procesa koagulacije (56). Neonatusi, a posebno prematurusi imaju smanjenu bazalnu produkciju proteina komplemenata kao i smanjenu funkciju u klasičnim i alternativnim putevima (57, 58). Regulatorni proteini komplementa modifikuju efekte elemenata komplementa. Loša regulacija komplemenata može uzrokovati preveliku produkciju istih što nadalje rezultuje prekomernu ćelijsku stimulaciju u produkciji citokina i dodatnu aktivaciju endotelih ćelija, te vodi i doprinosi lokalnom oštećenju tkiva. Uloga ovih regulatora komplemenata u neonatalnoj sepsi još uvek nije dovoljno poznata.

Neposredno nakon infekcije i aktivacije produkcije proinflamatornih citokina dolazi i do povećane produkcije antiinflamatornih citokina TGF $\beta$ , IL4, IL10, IL11 i IL13. Ovi citokini smanjuju aktivnost fagocita, ublažavaju groznicu, modifikuju ekspresiju faktora koagulacije i smanjuju proizvodnju reaktivnih međuproizvoda kiseonika/azota, NO i drugih vazoaktivnih medijatora. Pored ovih citokina, tokom zapaljenja proizvode se i receptori antagonisti koji moduliraju delovanje proinflamatornih medijatora. Najznačajniji predstavnici ovih modulatora su TNFR2 (reguliše koncentraciju TNF $\alpha$ ), sIL6R, sIL2 i IL1ra. Suptilno uzajamno delovanje pro- i antiinflamatornih citokina kao i ostalih medijatora zapaljenja omogućava stvaranje adekvatnog imunološkog odgovora i obnavljanje homeostaze. U suprotnom dolazi do pojačanog zapaljenskog odgovora koji vodi ka sindromu sistemskog zapaljenskog odgovora (eng. *Systemic Inflammatory Response Syndrome* - SIRS) i na dalje ka višestrukome oštećenju organa, organskih sistema i letalnom ishodu.

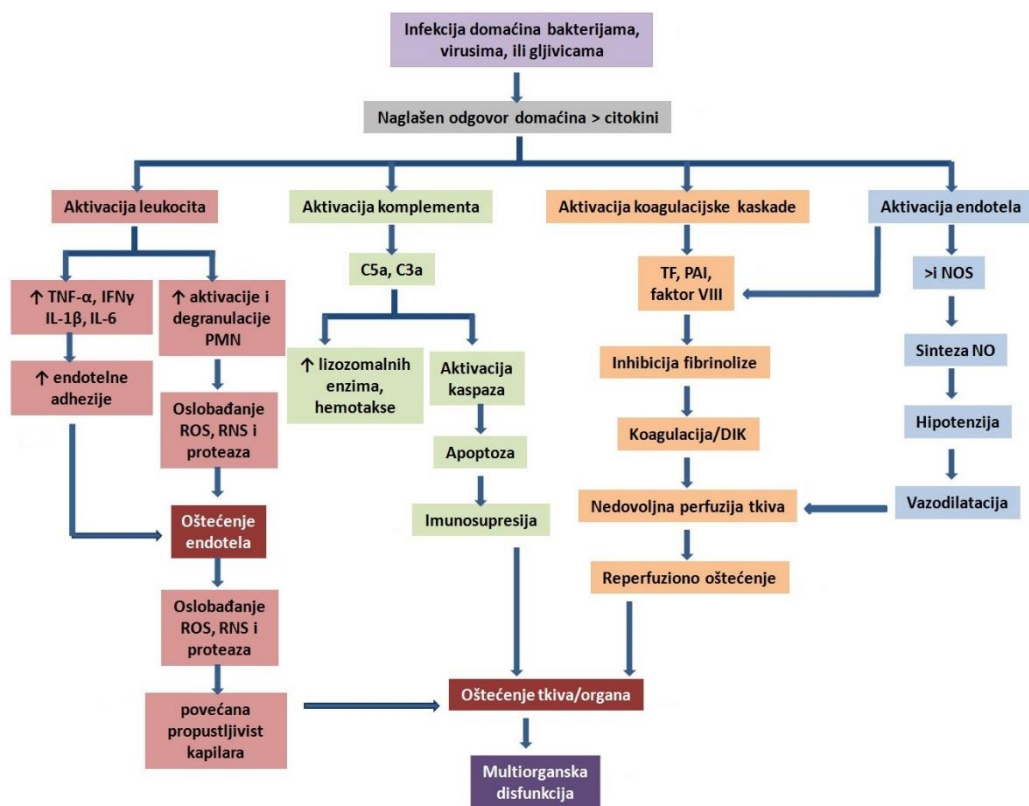
Razvoj prokoagulantnog stanja u mikrovaskulaturi neposrednog okruženja žarišta infekcije je odbrambeni mehanizam domaćina kojim se sprečava daljnje širenje patogena. Aktivirani neutrofili, monociti i endotelijarne ćelije infekcijom eksprimiraju tkivni faktor apoprotein koji inicira kaskadnu reakciju koagulacije povećanjem nivoa proteina zgrušavanja uz istovremeno smanjenje aktivnosti antikoagulantnih proteina i inaktivaciju C proteina.



**Slika 3.** Aktivacija kaskade koagulacije tokom inflamatornog odgovora na infekciju

Ukoliko ovo stanje eskalira može doći do ozbiljnih oštećenja tkiva kao posledica diseminovane intravaskularne koagulacije (eng. *Disseminated Intravascular Coagulation – DIC*). Neonatusi sa sepsom kod kojih se odnos proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina veoma rano povećava imaju povećani rizik za razvoj DIC-a (59). Kod ove grupe pacijenata često se registruje trombocitopenija kao posledica agregacije trombocita u mikrotrombu (60). Kod prematurusa smanjena funkcija trombocita tokom prvih dana života povećava rizik od hemoragije u stanjima generalizovane infekcije (61, 62).

Prekomerna sistemska proizvodnja citokina i vazoaktivnih supstanci dovodi i do prekomerne vaskularne dilatacije i krvarenja što može voditi ka otkazivanju organa i septičnog šoka.



Slika 4. Patofiziologija sepsa i septičnog šoka kod neonatusa.

Važnu ulogu u prvom odgovoru na infekciju kako kod odraslih tako i kod neonatusa imaju neutrofili ili polimorfonukleari (PMN). Međutim, neutrofili neonatusa pokazuju kvantitativne i kvalitativne nedostatke u odnosu na iste ćelije kod odraslih (63, 64). Premda njihov broj zavisi od gestacijske starosti na rođenju, novorođenčad u proseku imaju od 70 do 80% manje neutrofila u kosnoj srži u odnosu na odrasle. Osim smanjenog broja, abnormalna ekspresija adhezionih molekula, abnormalnosti u citoskeletu ćelija i smanjena deformabilnost doprinose oslabljenoj hemotaksiji neutrofila. Pored svega navedenog, kod prevremeno rođene dece narušen je i fagocitni sistem ovih ćelija što je razlog odloženom zapaljenskom odgovoru (65, 66). Smanjena funkcionalnost neutrofila u kombinaciji sa



hipotenzijom kod neonatusa sa sepsom povećava rizik od mikrovaskularne okluzije (67). Ireverzibilna agregacija PMN neonatusa u vaskularnom prostoru vodi ka smanjenju diapedeze, brzom osiromašenju rezervi u koštanoj srži i povećanju rizika od kompromitovane perfuzije tkiva, a nadalje i oštećenja organa (67, 68).

U zavisnosti od inteziteta inflamacije, prekursori PMN mogu napustiti koštanu srž i pre potpunog sazrevanja, pa se u cirkulaciji uočavaju različite nezrele forme ovih ćelija. U njima se mogu pojaviti i toksične vakuole i granulacije koje predstavljaju strukture sa povećanom koncentracijom antimikrobnih jedinjenja, dok Döhle tela predstavljaju agregate endoplazmatičnog retikuluma. Sve ove strukture predstavljaju markere bakterijske infekcije.

Funkcionisanje drugih ćelija imunog sistema (monocita, makrofaga, dendritskih ćelija, ćelija ubica (eng. *Natural Killer* – NK) i mast ćelija) tokom neonatalne sepse nije u potpunosti poznato.

Imunološka odbrana neonatusa od patogena se u velikoj meri oslanja na urođeni imuni sistem, s obzirom da se adaptivna komponenta imunog sistema postepeno obrazuje tokom ranih godina života. Kod prematurusa urođeni imuni sistem, koji u velikoj meri zavisi od gestacijske starosti, veoma je nezreo. Dodatno, kod prematurusa za razliku od neonatusa koji su rođeni u terminu, nedostaje zaštita majčinskih antitela koju fetus dobija transplacentarno tokom zadnjeg trimestra intrauterinog života. Sve ovo čini prematuruse imunodeficijentnom grupom pacijenata posebno osetljivom na infekcije (69).

#### **1.4. MOLEKULARNA OSNOVA NEONATALNE SEPSE**

Klasične populaciono genetičke studije ukazuju na jaku povezanost genetičke komponente sa rizikom od razvijanja sepse, sa tokom i sa ishodom u smislu preživljavanja (70). Genetičke studije fokusirane su na ispitivanju uticaja genske osnove pro- i antiinflamatornih citokina, citokinskih receptora, repertoara za prepoznavanje patogena, endotelnih i homeostaznih markera za patogenezu sepse. Genski polimorfizmi mogu izmeniti strukturu proteina ili ekspresiju gena koji kodiraju komponente imunog sistema, a

time mogu imati indirektne implikacije na osetljivost na infekciju, obim bolesti, odgovor na terapiju i klinički ishod (71).

### **1.4.1. Genski polimorfizmi**

Polimorfizam u genetici označava pojavu dve ili više formi sekvenci DNK (aleli, varijante) u populaciji čija se učestalost, najređe među njima, ne bi mogla održati samo zahvaljujući mutaciji. Po dogovoru, varijanta se smatra polimorfizmom ukoliko njena učestalost nije manja od 1%, odnosno učestalost heterozigota sa ovom varijantom u populaciji nije manja od 2%. Alel čija je učestalost manja od 1% označava se kao retka varijanta. Polimorfni genski lokus je region u molekulu DNK u kome se među jedinkama iste populacije može utvrditi postojanje najmanje dva alela. Procenjuje se da je najmanje 30% strukturnih gena čoveka polimorfno, odnosno da je svaki hiljaditi nukleotid u humanom genomu polimorfan. Na individualnom nivou, približno 20% genskih lokusa u genomu svake osobe je heterozigotno (72).

### **1.4.2. Tipovi polimorfizama i mehanizam nastanka**

Polimorfizmi su posledica mutacija kojima mogu biti zahvaćene pojedinačne baze, nekoliko stotina pa i do nekoliko desetina hiljada baza. Razlikujemo tri osnovna tipa polimorfizma:

- polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) koji predstavljaju zamenu jednog nukleotida drugim
- polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka (eng. *Variable Number of Tandem repeats* – VNTR) koje u zavisnosti od dužine ponovka delimo na mikrosatelite (eng. *Short Tandem Repeat* – STR, ponovak čini 2 do 10 bp) i minisatelite (ponovak čini od 10 do nekoliko stotina bp).

- inserciono delecioni polimorfizmi (eng. *INsertion/DELetion* – INDEL's) koji predstavljaju inserciju odnosno deleciju od jednog do nekoliko stotina nukleotida.

Najveći izvor genetičke varijabilnosti u humanom genomu predstavljaju polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) sa učešćem do 80% ukupne varijabilnosti. Nastaju usled mutacija po tipu supstitucije, zamenom jedne purinske baze drugom purinskom bazom (G→A, A→G) ili pirimidinske baze drugom pirimidinskom bazom (T→C, C→T) što predstavlja tranziciju, odnosno zamenom pirimidinske baze purinskom i obrnuto, što predstavlja transverziju.

Napretkom tehnologije došlo je do nagomilavanja podataka o polimorfizmima, što je nametnulo potrebu za njihovom sistematizacijom u obeležavanju. Za SNP-ove uveden je jedinstven način obeležavanja „rsN<sub>o</sub>“ gde rs potiče od „*reference SNP*“ a N<sub>o</sub> je jedinstven broj koji se dodeljuje datom polimorfizmu i kao takav se registruje u bazama podataka. Pored ovog načina obeležavanja zadržalo se i obeležavanje prema položaju polimorfno nukleotida i/ili fenotipskom efektu.

U zavisnosti od položaja u okviru gena polimorfizam može imati različite efekte. Ukoliko se SNP nalazi u nekodirajućem regionu gena on neće uticati na strukturu proteina, ali njegova pozicija u promotorskom regionu može mu dati regulatornu ulogu. U promotorskom regionu funkcionalna posledica bilo koje tačkaste mutacije (SNP ili INDEL) zavisi od njene lokacije i od toga da li pozicijom ometa interakciju sekvence DNK u kojoj se nalazi sa određenim proteinima (npr. transkripcionim faktorom ili RNK polimerazom). Ovakvom pozicijom polimorfizmi mogu menjati ekspresioni potencijal gena što se ispoljava smanjenom ili povećanom produkcijom proteina koji kodira taj gen, što nadalje može imati značajne funkcionalne posledice. Bazna supstitucija u kodirajućem regionu gena može imati nekoliko rezultata: promena kodona dovodi do zamene jedne aminokiseline drugom aminokiselinom, a time i do sinteze izmenjenog proteina („*missens*“ mutacija); SNP kodon menja u stop kodon („*nosens*“ mutacija); ili daje novi kodon ali za istu aminokiselinu usled čega nema promene u strukturi proteina („*silent*“ mutacije). Ove poslednje tačkaste mutacije u kodirajućem regionu su najčešće, s obzirom

da su mutacije koje dovode do promene u strukturi i funkciji proteina pod selekcionim pritiskom. Ipak „silent“ SNP-sovi nisu u potpunosti bez efekta, s obzirom da alternativni tripleti koji kodiraju iste aminokiseline mogu imati različit uticaj na brzinu transkripcije, a iRNK može imati različitu brzinu translacije zbog limitiranog pula dostupnih tRNK (73).

### **1.4.3. Primena polimorfizama**

Tri su osnovne strategije u istraživanjima koja imaju za cilj identifikaciju gena asociranih sa poligenkim tj. multifaktorskim osobinama: studije analize vezanosti (eng. *linkage studies*), studije asocijacije (eng. *association studies*) i studije asocijacije kompletnog genoma (eng. *Genome-Wide Association Studies – GWAS*). Preduslov za uspešno sprovođenje ovih studija je postojanje visokog stepena heritabilnosti osobine koja se prati.

Studijama analize vezanosti ispituje se vezanost genetičkih markera (polimorfnih DNK sekvenci) približno poznate lokacije na hromozomu, sa poznatim svojstvom, obično u porodici sa velikim brojem članova (74). Kao mera vezanosti posmatranog svojstva i markera koristi se LOD skor (eng. *Logaritam of the odds*) koji se izračunava na osnovu rezultata genetičke analize. Ako se utvrdi da postoji vezanost markera sa osobinom koju ispituujemo, nadalje se primenjuju metode pozicionog kloniranja, finog mapiranja i dubinsko resequenciranje kako bi se preciznije utvrdio odgovorni gen i njegove varijante. Ova strategija je posebno bila pogodna za istraživanje monogenih osobina ali je svoju primenu našla i u istraživanjima poligenih osobina.

U studijama asocijacije određuju se geni kandidati na osnovu poznavanja patofiziologije poremećaja i animalnog modela. Potom se testira asociranost polimorfizma u okviru gena kandidata sa ispoljavanjem ispitivanog poremećaja tako što se analizira učestalost polimorfizma u grupi obolelih (odnosno osoba sa određenim svojstvom) i upoređuje sa podacima u zdravoj populaciji (osobe koje nemaju određeno svojstvo). Ova istraživanja se često nazivaju i studije “slučaj – kontrola” Ukoliko se učestalosti

polimorfizama u dvema grupama bitno razlikuju tada govorimo o pozitivnoj ili negativnoj asocijaciji polimorfizma sa praćenom osobinom.

Studije asocijacije kompletnog genoma ne zahtevaju prethodnu hipotezu o kandidat genima za testiranje povezanosti sa određenim svojstvom. Kao i u studijama asocijacije porede se učestalosti polimorfizama između grupa „slučaj“ i kontrola, s tom razlikom što GWAS studije uključuju ispitivanje velikog broja (stotine i hiljade polimorfizama) nepristrasno uključenih SNP-ova iz celog genoma. Ovim pristupom izbegavaju se pretpostavke o važnim genima i putevima bolesti, te se dobija novi uvid u biologiju određenog svojstva (75).

#### **1.4.4. Geni kandidati povezani sa nastankom neonatalne sepse**

Do danas je u HapMap i srodnim projektima identifikovano oko 2.2 miliona SNP polimorfizama u humanom genomu čija učestalost ređe varijante nije manja od 5%. Najveću pažnju istraživača privlače polimorfizmi koji mogu imati funkcionalne ili regulatorne posledice na sintezu proteina koje kodiraju geni u okviru kojih se isti nalaze.

Studije asocijacije koje ispituju patogenezu sepse fokusirane su na gene kandidate (koji kodiraju proteine) uključene u aktivaciju imunog sistema, pojavu inflamatornog odgovora i proteine sistema koagulacije (75). Najviše proučavani geni koji su uključeni u aktivaciju imunog sistema su oni koji kodiraju proteine važne u prepoznavanju patogena. Opisano je nekoliko SNP-ova u genu za *TLR-4* koji mogu promeniti osetljivost ovog receptora na gram-negativne bakterije. Tako supstitucija adenina guaninom na poziciji 896 nizvodno od mesta transkripcije uzrokuje zamenu asparaginske kiseline glicinom na 299. poziciji (Asp299Gli) u peptidnom lancu koji ulazi u sastav *TLR-4* receptora. Ovaj polimorfizam (rs4986790) uzrokuje smanjenu ekspresiju i funkciju ovog receptora *in vitro*. Polimorfizam koji dovodi do supstitucije arginina u treonin (Arg753Thr) u proteinu *TLR-2* receptora povezan je povećanom prevalencom infekcije gram-pozitivnim bakterijama i oboljevanju od sepse (76). Često ispitivani polimorfizam u genu za *CD14* nalazi se 260 bp (rs2569190) uzvodno od mesta početka transkripcije. Manozna vezujući lektin (eng.

*Mannose-binding lectin* – MBL) je kolektin koji ima veoma značajnu ulogu u humoralnom imunom sistemu. Ovaj molekul prepoznaje manozne strukture na površini širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse, gljivice, protozoe, ali i višćelijskih parazita, i na taj način ulazi u sastav prve linije odbrane organizma od infekcije. Ispitivan je veći broj polimorfizama u *MBL*, ali nije nađena njihova povezanost sa neonatalnom sepsom (7).

Istraživano je nekoliko polimorfizama gena koji imaju ključnu ulogu u kaskadi koagulacije, s obzirom na važnu ulogu ovog procesa u patofiziologiji septičnog šoka. 4G alel delecija/insercija (4G/5G) SNP (rs1799889) u promotorskom regionu -675 gena plazminogen-aktivator-inhibitor tip 1 (PAI-1) na poziciji povezan je sa višom koncentracijom produkta ovog gena u plazmi.

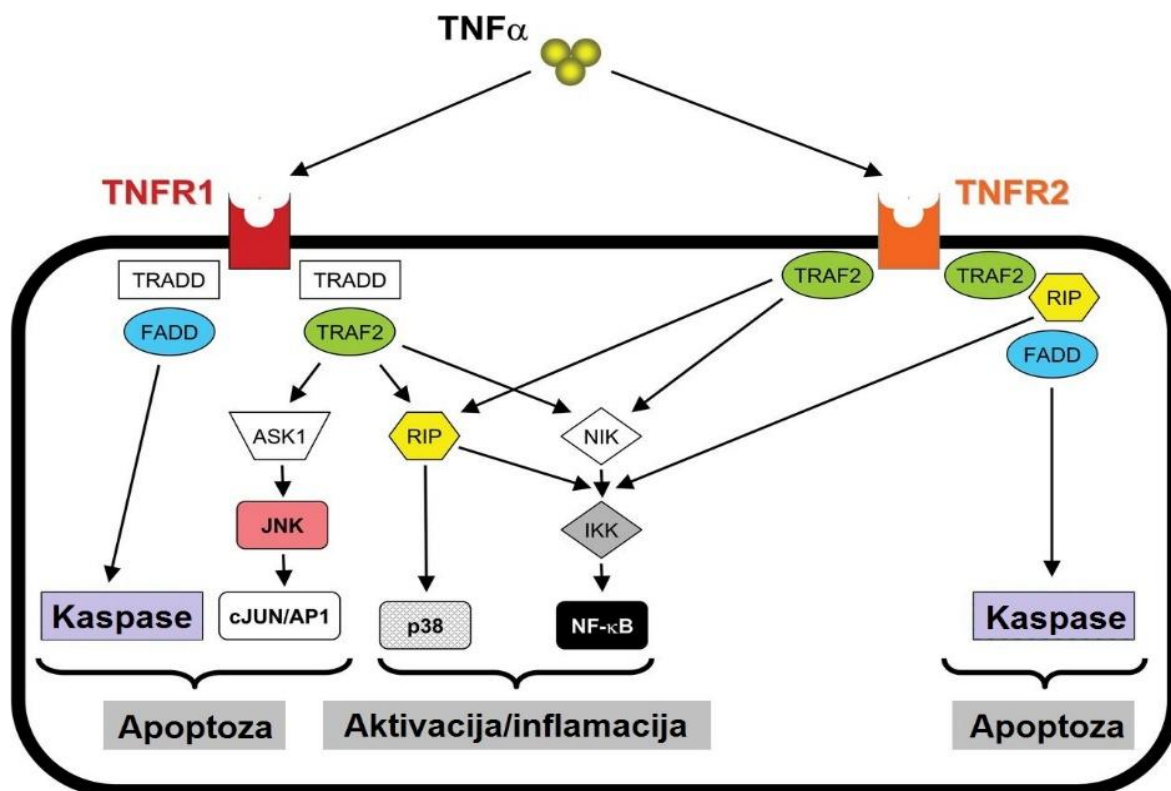
Pažnju privlači i polimorfizam rs5985 u genu za Faktor XIII a koji uzrokuje zamenu aminokiseline valin na poziciji 34 leucinom. Härtel i saradnici su u svojoj studiji koja je obuhvatala 586 VLBW prematurusa i 595 terminskih neonatusa pokazali da su nosioci supstitucije u ovom polimorfizmu imali veći rizik od oboljevanja od sepse i duže hospitalizacije (77).

Najčešće ispitivani geni kandidati uključeni u akutnu fazu inflamatornog odgovora su geni koji kodiraju proinflamatorne citokine, pre svega  $TNF\alpha$ , IL6 i IL1 $\beta$  koji čine prvi talas signalizacije aktiviranog imunog sistema.

#### **1.4.5. Struktura, funkcija i polimorfizmi $TNF\alpha$ gena**

$TNF\alpha$  je primarni proinflamatorni medijator imunog sistema. Ima kritičnu ulogu u orkestriranju upalnog odgovora kroz ćelijsku aktivaciju i inicijaciju citokinske kaskade. Ovaj citokin inače reguliše široki spektar bioloških procesa uključujući proliferaciju i diferencijaciju ćelija, apoptozu, metabolizam lipida i koagulaciju. Jedan je od najintenzivnije proučavanih medijatora čije ime, tradicionalno, nije promenjeno i određeno

je po njegovoj prvoj uočenoj funkciji, a to je sposobnost da pokrene nekrozu ćelija fibrosarkoma.



**Slika 5.** Signalni putevi TNF $\alpha$  aktivacije inflamacije odnosno apoptoze: *TNFR* – receptori TNF $\alpha$ , *TRADD* – adaptorni protein asociran sa „death“ domenom TNFR, *TRAF2* – asocirani faktor sa TNFR, *RIP* – ribozom inaktivirajući protein, *FADD* – adaptorni Fas-asocirani protein za „death“ domenom, *ASK1* – apoptoza signal-regulisana kinaza 1, *NIK* – NF- $\kappa$ B indukovana kinaza, *IKK* – I $\kappa$ B kinaza *JNK* – c-Jun NH<sub>2</sub> terminalna kinaza, *cJUN* – jedarni protein sa C terminalnim DNK vezujućim domenom, *API* – transkripcioni faktor (78).

TNF $\alpha$  primarno se sintetise kao 26 kDa transmembranski protein, a zrela forma TNF $\alpha$  od 17 kDa nastaje nakon proteolitičkog oslobađanja 233 aminokiselinskog peptidnog ostatka sa površine ćelije dejstvom disintegrin metaloproteinaze (79). Obe forme TNF $\alpha$ , i transmembranska i sekretovana, su funkcionalne.

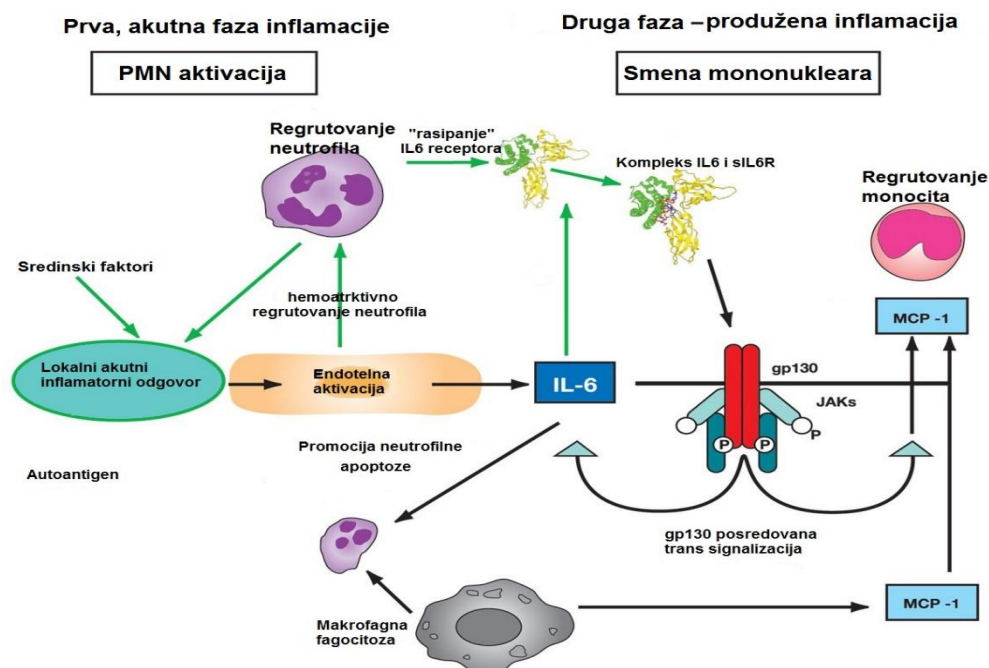
Gen koji kodira TNF $\alpha$  lociran je na 6-om hromozomu u regionu 6p21,3. Dužine je oko 2,8 kb i sadrži 4 egzona. Njegov promotorski region ima nekoliko vezujućih mesta za transkripcioni nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) preko kojih se vrši i kontrola povratnom spregom. Sama sinteza TNF $\alpha$  inicirana je inflamatornim stimulusima u koje svrstavamo PAMP, DAMP, IL1 ali i sam TNF $\alpha$ . Monociti i tkivni makrofagi su ćelije primarne produkcije ovog citokina, ali proizvode ga takođe i NK ćelije, T limfociti, neutrofili i dr. TNF $\alpha$  je signalni molekul aktivacije ćelija endotela i neutrofila koje imaju ključnu ulogu u procesu zapaljenja i koagulacije, stimulišući pojačanu ekspresiju adhezivnih molekula i hemokina od strane istih. Promoviše produkciju i diferencijaciju makrofaga iz progenitorskih ćelija, produžavajući inflamatorni odgovor. Dejstvom na ćelije hipotalamusa indukuje groznicu, a ćelije jetre stimuliše na sintezu proteina akutne faze inflamacije. Delujući na ćelije mišića i masnog tkiva dovodi do kaheksije (80). TNF $\alpha$  promoviše proizvodnju matriks kolagen-degradijućih metaloproteinaza, a suprimira biosintezu tkivnih inhibitora metaloproteinaza. Metaloproteinaze deluju na kolagen fetalne membrane što uzrokuje smanjenje njene čvrstoće (81). Makrofagi počinju produkciju TNF $\alpha$  30 minuta nakon stimulacije, a pik koncentracije u cirkulaciji se može detektovati od 60. do 90. minuta inflamatornog odgovora (82).

S obzirom na široki spektar dejstva i značaj koji ima TNF $\alpha$  u mnogim fiziološkim procesima, brojni polimorfizmi u *TNF $\alpha$*  genu su intenzivno proučavani. Najveći broj tih polimorfizama nalazi se u promotorskom regionu, a neki od njih su: *TNF $\alpha$*  -238A/G (rs361525), *TNF $\alpha$*  -1031C/T (rs1799964), *TNF $\alpha$*  -863A/C (rs1800630), *TNF $\alpha$*  -376A/G (rs1800750) i drugi. Najveću pažnju privlači promotorski SNP rs1800629 koji predstavlja supstituciju guanina (G) adeninom (A) 308 baznih parova uzvodno od mesta početka transkripcije *TNF $\alpha$* . Alel A, koji se tradicionalno obeležava i kao *TNF2* alel, povezan je sa većom ekspresijom TNF $\alpha$ . Pored toga, u studijama kod odraslih i dece školskog uzrasta pokazano je da nosioci TNF2 imaju povećani rizik od razvoja sepse (83, 84). Podaci o povezanosti ovog polimorfizma sa sepsom u neonatalnom periodu su malobrojni i kontradiktorni (7).



### 1.4.6. Struktura, funkcija i polimorfizmi IL6 gena

IL6 je plejotropni medijator sa širokim spektrom biološkog dejstva. Ima važnu ulogu regulatora zapaljenja, onkogeneze i hematopoeze. Ovaj citokin je važan induktor akutne faze imunog odgovora, kao i specifičnog ćelijskog i humoralnog imunog odgovora, uključujući aktivaciju T ćelija i maturaciju B ćelija.



**Slika 6.** Uloga IL6 u akutnoj i produženoj inflamaciji. *MCP-1* – monocitni hemoatraktivni protein

Ovaj medijator nije eksprimiran konstitutivno već ga primarno proizvode na mestima akutnog i hroničnog zapaljenja makrofagi, endotelne i T ćelije. Glavni je induktor sinteze C reaktivnog proteina jetre, a kako se u cirkulaciji tokom infekcije javlja pre ovog široko primenjivanog markera zapaljenja, IL6 se danas smatra boljim prediktorom akutne faze bakterijske infekcije. Serumski pik koncentracije IL6 postiže 4 sata od početka infekcije (48). U zavisnosti od nivoa ovog interleukina u serumu razviće se akutna ili hronična inflamacija zbog čega se smatra da ima glavnu ulogu u progresiji i ishodu bolesti.

Gen koji kodira IL6 nalazi se na 7. hromozomu (7p15,3), dužine 6,1 kb i ima šest egzona. Kao produkt njegove ekspresije nastaje jednolančani protein mase 21 kDa koga čine 212 aminokiseline.

Bez obzira na plejotropno dejstvo ovog medijatora znatno manji broj polimorfizama *IL6* je ispitivano u odnosu na *TNF $\alpha$* . Praćena je povezanost promotorskih polimorfizama *IL6 -597G/A* (rs1800797), *IL6 -572G/C* (rs1800796) i *IL6 -174G/C* (rs1800795) sa različitim stanjima i obolenjima. Poslednji navedeni polimorfizam rs1800795, koga čini supstitucija guanina u citozin 174 bp uzvodno od mesta transkripcije, privlači najviše pažnje. Istraživanja su potvrdila da ovaj polimorfizam utiče na ekspresiju *IL6*, te da je alel C povezan sa povećanom ekspresijom gena (85, 86, 87). Brojne studije ispitivale su povezanost ovog polimorfizma s različitim stanjima i bolestima, što je u skladu sa širokim spektrom aktivnosti produkta ovog gena.

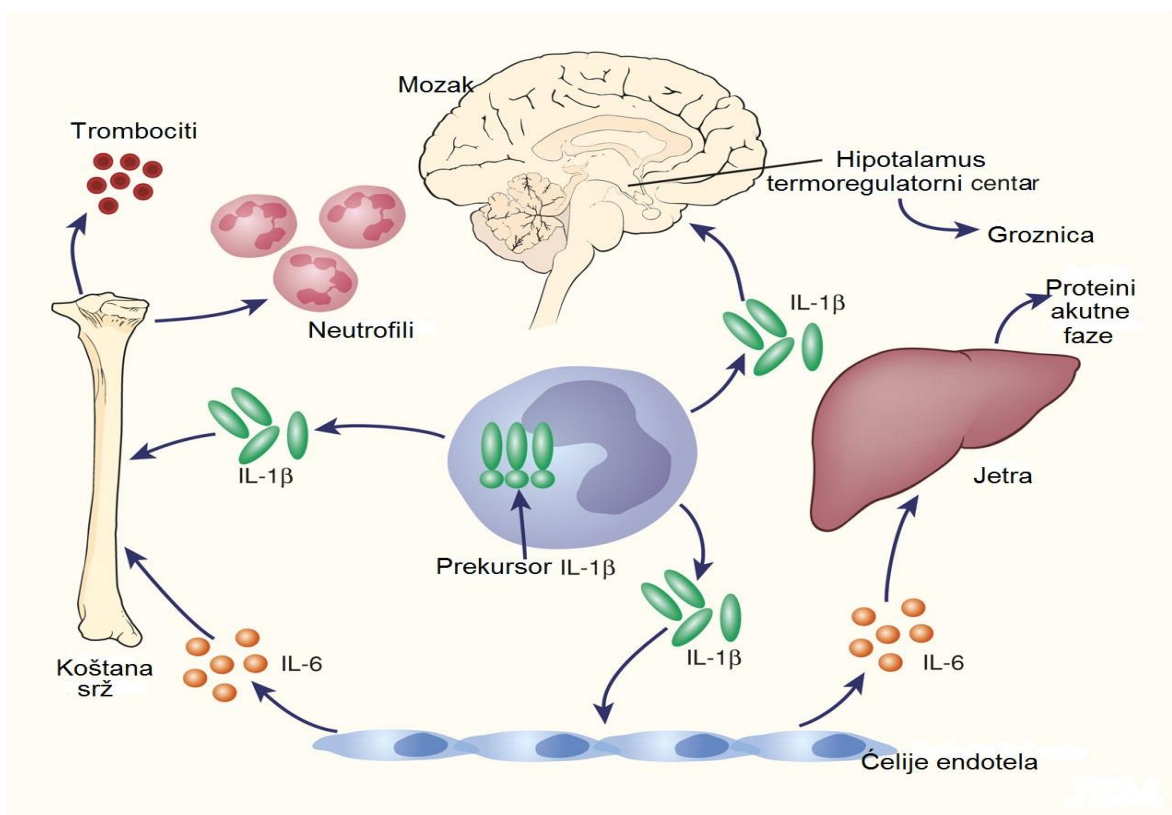
Postoji veći broj radova koji ukazuju da je *IL6 -174G/C* polimorfizam povezan sa septičkim šokom (88, 89). U studijama neonatusa rezultati nisu konzistentni kao u istraživanjima na odraslima, pa pitanje povezanosti ovog polimorfizma sa neonatalnom sepsom i septičkim šokom ostaje otvoreno (7).

U studiji na pedijatrijskim pacijentima, Michálek i saradnici su ispitivali efekat dva polimorfizma *IL6 -174 G/C* i *IL6 - 572 G/C*, na razvoj i patogenezu SIRS-a, sepse i septičkog šoka, i pokazala je da oba polimorfizma mogu biti pokazatelji rizika od razvoja i/ili pokazatelj ozbiljnosti stanja kod obolelih od sepse (90).

#### **1.4.7. Struktura, funkcija i polimorfizmi IL1 $\beta$ gena**

IL1 $\beta$  je član velike familije interleukin 1 citokina kojoj još pripadaju i IL1 $\alpha$ , IL18, IL33, IL36 $\alpha$ , IL36 $\beta$  i IL36 $\gamma$  interleukina, ali i brojni receptor antagonisti (IL1, IL36, IL38), kao i antiinflamatorni citokin IL37. Geni familije interleukina 1 grupisani su na drugom hromozomu, a *IL1 $\beta$*  se nalazi u 2q14,1 regionu i čine ga približno 7,2 kb i sedam egzona. IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$  su proizvodi različitih gena, a iako su homologe u samo 24% aminokiselinske

sekvence, njihove tercijarne strukture su slične, vezuju se za iste receptore i imaju slične biološke funkcije. Oba proteina nastaju kao 31 kDa teški proteinski prekursori. IL1 $\alpha$  predominantno ostaje u citosolu sa autokrinom funkcijom, a manja količina se transportuje na ćelijsku površinu gde učestvuje u međucelijskoj komunikaciji. Zreli protein od 17,5 kDa je biološki aktivna forma koja nastaje dejstvom membranske cistein proteaze - kalpain. Međutim, IL1 $\alpha$  se u cirkulaciji javlja samo u slučaju teških stanja bolesti.



**Slika 7.** Shema delovanja IL1 $\beta$  u akutnoj fazi inflamatornog odgovora (91).

Za razliku od IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  je aktivan jedino u zreloj, sekretovanoj formi. Sazrevanje u biološki aktivnu formu podrazumeva proteolitičku aktivnost kaspaze 1 iz inflamazoma (proteinski kompleks koji posreduje u aktivnosti kaspaze 1), proteaza neutrofila ili samih patogena. Solubilni IL1 $\beta$ , mase 17 kDa čine 153 aminokiseline i sintetišu ga različiti ćelijski tipovi uključujući monocite, makrofage, neutrofile, epitelne i endotelne ćelije,

fibroblaste, B i T limfocite, mikroglia ćelije, astrocite i dr. Sintezu ovog medijatora pokreću isti stimuli koji aktiviraju sintezu  $TNF\alpha$ -a, a maksimalnu koncentraciju u cirkulaciji  $IL1\beta$  dostiže 3 sata posle početka infekcije (82). Zajedno sa  $TNF\alpha$ -om ima prominentnu ulogu u akutnoj fazi inflamatornog odgovora i snažni je induktor groznice zbog čega je dobio i ime leukocitni pirogen. Izaziva aktivaciju endotela i indukuje proces hematopoeze i koagulacije.

Do sad je ispitivano svega par polimorfizama u odnosu na rizik od pojave sepse, septičkog šoka i ishoda. U petom egzonu  $IL1\beta$  na poziciji 3953 prisutan je SNP  $C/T$  (rs1143634) koji ne dovodi do promene aminokiselinske sekvence u peptidnom produktu, stoga ovaj polimorfizam nema efekt na strukturu produkta. U maloj studiji na svega 55 neonatusa, Khaertynov i saradnici ukazali su da postoji povezanost ovog polimorfizma sa povećanim rizikom od razvoja neonatalne sepse (92). U promotorskom regionu najčešće se ispituju SNP-ovi:  $IL1\beta$  -31  $C/T$  (rs1143627),  $IL1\beta$  -511  $G/A$  (rs16944),  $IL-1\beta$  -1464  $C/G$  (rs1143623) i  $IL-1\beta$  -3737  $G/A$  (rs4848306). Promotorski polimorfizam  $IL1\beta$  -31  $C/T$  potencijalni je regulator ekspresije. Supstitucija T u C na poziciji -31 dovodi do promene TATAAA u CATAAA i potencijalnog narušavanja TATA boxa, što za posledicu ima smanjenju ekspresiju  $IL1\beta$  kod nosioca C alela (93). Veliki broj istraživanja ispituju značaj polimorfizma  $IL1\beta$  -511  $G/A$  na ispoljavanje brojnih stanja i bolesti. Regulatorni značaj polimorfizma  $IL-1\beta$  -1464  $C/G$  i  $IL-1\beta$  -3737  $G/A$  nije pronađen.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ispitivanje je sprovedeno sa ciljem da se kod prevremeno rođene dece gestacijske dobi od 23. do 36. nedelje:

1. Utvrde učestalosti genotipova i alela *TNF $\alpha$  -308 G/A*, *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizama
2. Analizira povezanost ispitivanih polimorfizama sa nastankom sepse
3. Analizira povezanost ispitivanih polimorfizama sa mogućim smrtnim ishodom od sepse
4. Analizira povezanost ispitivanih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama udruženim sa sepsom
5. Analizira povezanost ispitivanih polimorfizama sa laboratorijskim i drugim znacima sepse

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

U ispitivanje su uključeni prematurusi oba pola, sa telesnom masom na rođenju do 3000 g i gestacijske starosti ispod 37 nedelja koji su hospitalizovani na Institutu za neonatologiju u Beogradu u periodu od januara 2012. do juna 2018. godine. Za sve prematuruse prikupljeni su sledeći podaci: GN, PTM, AS 5', rezultati hemokultura, laboratorijski rezultati krvne slike (CRP vrednost, broj leukocita, broj neutrofila, procenat nezrelih PMN, podatak o prisustvu toksičnih struktura), biohemijskih analiza o metaboličkoj acidozi, kao i podatak o primanju imunoterapije tokom hospitalizacije.

Osim podataka o prematurusima prikupljeni su i sledeći podaci o majci: starost, način začeća, tip porođaja, podatak o broju plodova, stanje plodove vode odnosno posteljice na porođaju, podatak o medikamentoznoj terapiji (antibiotska, kortikosteroidna, antihipertenzivna i tokolitička).

Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Instituta za neonatologiju i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Roditelj/i svakog od ispitanika obavešten je o cilju studije i potpisao je dobrovoljan pristanak za učestvovanje u njoj.

Uzorkovanje materijala za ovu studiju obavljao je predloženi lekar zaposlen na Institutu za neonatologiju, uzimajući od pacijenata bukalni bris, uz prethodno informisanje i pristanak roditelja.

#### **3.2. METODE**

##### **3.2.1. Utvrđivanje kliničkih pokazatelja neonatalne sepse**

Dijagnoza neonatalne sepse postavljena je na osnovu rezultata hemokulture, odnosno u slučaju kliničke sepse i negativnog nalaza hemokulture na osnovu kliničkih pokazatelja i

laboratorijskih rezultata prema protokolu Instituta za neonatologiju u Beogradu (32), a na osnovu modifikovanih Rodwell i Töllner skoring sistema (34, 94).

Tollnerov skoring sistem neonatalne sepse:

- Apneja / tahipneja / cijanoza / respiratorni distres;
- Bradikardija / tahikardija;
- Hipotonija / konvulzije;
- Loša perfuzija / arterijska hipotenzija;
- Iritabilnost / letargija / slaba ishrana;
- Hepatosplenomegalija / žutica / abdominalna distenzija.

Prisustvo simptoma sadržanih u 3 ili više navedenih kategorija ukazuje na generalizovanu infekciju.

Laboratorijski pokazatelji neonatalne sepse:

- Leukopenija i leukocitoza ( $\leq 5\ 000\ \mu\text{L} - 25\ 000\ \mu\text{L} \geq$ )
- Neutropenija ili neutrofilija (Tabela 2.)
- Povećani ili smanjeni broj PMN ( $< 1\ 800/\mu\text{L} - 5\ 400/\mu\text{L} >$ )
- Povećani ili smanjeni broj nezrelih PMN ( $< 600/\mu\text{L} >$ )
- Povećan odnos I : T ( $> 0,16$  prvih 24 h, odnosno  $> 0,12$  nakon 60. h života)
- Povećani odnos I : M ( $\geq 0,3$ )
- Prisustvo toksičnih struktura u PMN
- Trombocitopenija ( $\leq 150\ 000/\mu\text{L}$ )
- Povišen nivo CRP  $> 5\ \text{mg/L}$
- Metabolička acidoza (bazni ekscres  $0,210\ \text{mmol/L}$ )

Odstupanje svakog navedenog elementa od normalnih vrednosti ocenjuje se ocenom 1, tako da zbirna ocena 3 ili više govori u prilog infekcije.

Intraventrikularna hemoragija (IVH) je dijagnostikovana ultrazvučnim pregledom centralnog nervnog sistema, dok je sindrom respiratornog distresa (RDS) utvrđen na osnovu rendgenskog nalaza grudnog koša.

**Tabela 2.** Granične vrednosti neutrofila u zavisnosti od PTM i starosti neonatusa.

	Postnatalna starost (h)	PTM <1500 g (br Ne x 10 <sup>9</sup> /L)	PTM >1500 g (br Ne x 10 <sup>9</sup> /L)
<i>Neutropenija</i>	0	< 0,5	< 1,8
	12	< 2,2	< 7,2
	48	< 1,1	< 3,6
	60	< 1,1	< 1,8
<i>Neutrofilija</i>	0	> 6,0	> 6,0
	12	> 12,6	> 14,4
	48	> 9,0	> 8,6
	60	> 9,0	> 7,2

### 3.2.2. Izolacija molekula DNK

Kompletna genomska DNK iz uzorkovanih briseva izolovana je metodom organske ekstrakcije (95). Organska ili fenolska ekstrakcija je široko pimenjivana metoda u molekularnoj biologiji za izolaciju nukleinskih kiselina i proteina, a ovom metodom postiže se najbolji prinos i čistoća izolata. Ovaj tip izolovanja molekula DNK podrazumeva da se pamučni deo brisa prebaci u obeleženu mikrotubicu zapremine 2 mL na sterilan način. U svaku tubicu se na isečeni bris dodaje 300 µL TNS pufera i 30 µL proteinaze K. TNS pufer čine 1 x TE pufera, natrijum-hlorid, natrijumdodecilsulfat (SDS - *sodiumdodecilsulphate*) i voda. So natrijum-hlorid omogućava imbibiciju ćelija, njeno prskanje, cepanje ćelijskih membrana, a samim tim i oslobađanje hromatina. Natrijumdodecilsulfat je jak alkalni detergent koji olakšava degradaciju lipidnih komponenti ćelijskih membrana. Proteinaza K je proteaza širokog spektra sa ulogom enzimske razgradnje proteina, između ostalih i endonukleaza, enzima koji prekida lance molekula DNK na manje fragmente. Uzorci se potom inkubiraju u vodenom kupatilu sa mešanjem 2 sata na temperaturi 56<sup>0</sup>C, što dovodi do potpune aktivacije proteinaze K, a potom se preko noći inkubiraju na 37<sup>0</sup>C, optimalnoj temperaturi za aktivnost pomenutog enzima.



Nakon dvadesetvoročasovne inkubacije molekuli DNK oslobođeni od membrana i ostalih ćelijskih elemenata nalaze se pomešani u vodenom rastvoru TNS pufera. U sledećoj fazi molekuli DNK se prečišćavaju pomoću mešavine fenola – hloroforma - izoamil-alkohola (*Phenol – Chlorofom – Isoamyle alcohol*). u odnosu 25:24:1. Fenolska komponenta je organski rastvarač u kome se rastvaraju i zadržavaju degradovani proteini, lipidi i ostale ćelijske komponente. Hloroform olakšava izolaciju tako što omogućava da se tečna mešavina razdvoji na dve faze: donju, fenolsku i gornju, vodenu fazu sa nukleinskim kiselinama. Uloga izoamil alkohola je da stabilizuje hloroform a ujedno smanjuje penušavost mešavine koja se javlja zbog prisustva alkalnog detergenta. U gornjoj vodenoj fazi zaostaju rastvorene nukleinske kiseline. Tokom postupka izolacije u svaki uzorak se dodaje jedna zapremina uzorka mešavine fenol-hloroform-izoamil alkohola npr. na 300  $\mu$ L liziranog uzorka dodajemo 300  $\mu$ L mešavine fenol-hloroform-izoamilalkohola. Potom se uzorci centrifugiraju 5 minuta na 4000 rpm, nakon čega se u mikrotubama jasno mogu uočiti dve faze. Gornja, vodena faza sa nukleinskim kiselinama se prebacuje u novu, obeleženu mikrotubu u koju se u sledećem koraku dodaje jedna zapremina mešavine hloroforma – izoamil-alkohola da bi smo uklonili rezidualni fenol iz vodene faze sa molekulima DNK. Hloroform i izoamil alkohol se u ovoj mešavini nalaze u odnosu 24:1. Nakon centrifugiranja pod istim uslovima kao i u predhodnom koraku ponovno se dobijaju dve faze: donja, hloroformska faza sa eventualno preostalim fenolom i nečistoćama, i gornja vodena faza sa prečišćenom DNK. Gornja, vodena faza koja predstavlja prečišćeni rastvor genomske DNK, odvaja se prebacivanjem u novu, obeleženu mikrotubu. Koncentracija molekula DNK u ovako dobijenom rastvoru, a samim tim i koncentracija ciljanih sekvenci s kojima se nadalje želi manipulirati, u većini slučajeva je mala. Da bi smo dobili vodeni rastvor molekula DNK veće koncentracije dobijeni rastvor koncentrujemo u procesu precipitacije, tako što se dobijenom rastvoru DNK dodaje 3M rastvora natrijum-hlorida ili neke druge soli (na primer natrijum-acetata) u zapremini koja odgovara 1/10 zapremine rastvora DNK i dve zapremine hladnog apsolutnog etanola. Pozitivni joni iz soli vezuju se jakim jonskim vezama za fosfatne grupe u okosnici lanca DNK. Apsolutni etanol ima ulogu da smanji polarizovanost vodene sredine koja okružuje molekule DNK, usled čega su lanci molekula DNK dostupniji pozitivnim jonima soli, čime

se olakšava njihovo vezivanje za fosfatne grupe na lancu DNK. Ovim korakom lanci molekula DNK postaju teži („opterećeniji“), agregiraju zbog čega je njihovo taloženje pod uticajem jake centrifugalne sile olakšano. Uzorci se po dodavanju soli i apsolutnog etanola drže na  $-20^{\circ}\text{C}$  najmanje 2 do 24 sata, a potom centrifugiraju 30 minuta na brzini 15000 rpm pri temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon uklanjanja supernatanta odlivanjem, na talog se dodaje 70%-tni etanol u kome se rastvaraju soli a DNK se taloži ponovnim centrifugiranjem na  $4^{\circ}\text{C}$  15 minuta. Dekantovanjem supernatanta dobija se prečišćena DNK u vidu taloga koji se nakon 24-voro časovnog sušenja rastva u 100  $\mu\text{L}$  ampularne vode. Ovim postupkom dobijaju se vodeni rastvori molekula DNK visoke čistoće, koncentracij od 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  pa do nekoliko stotina nanograma po mikrolitru.

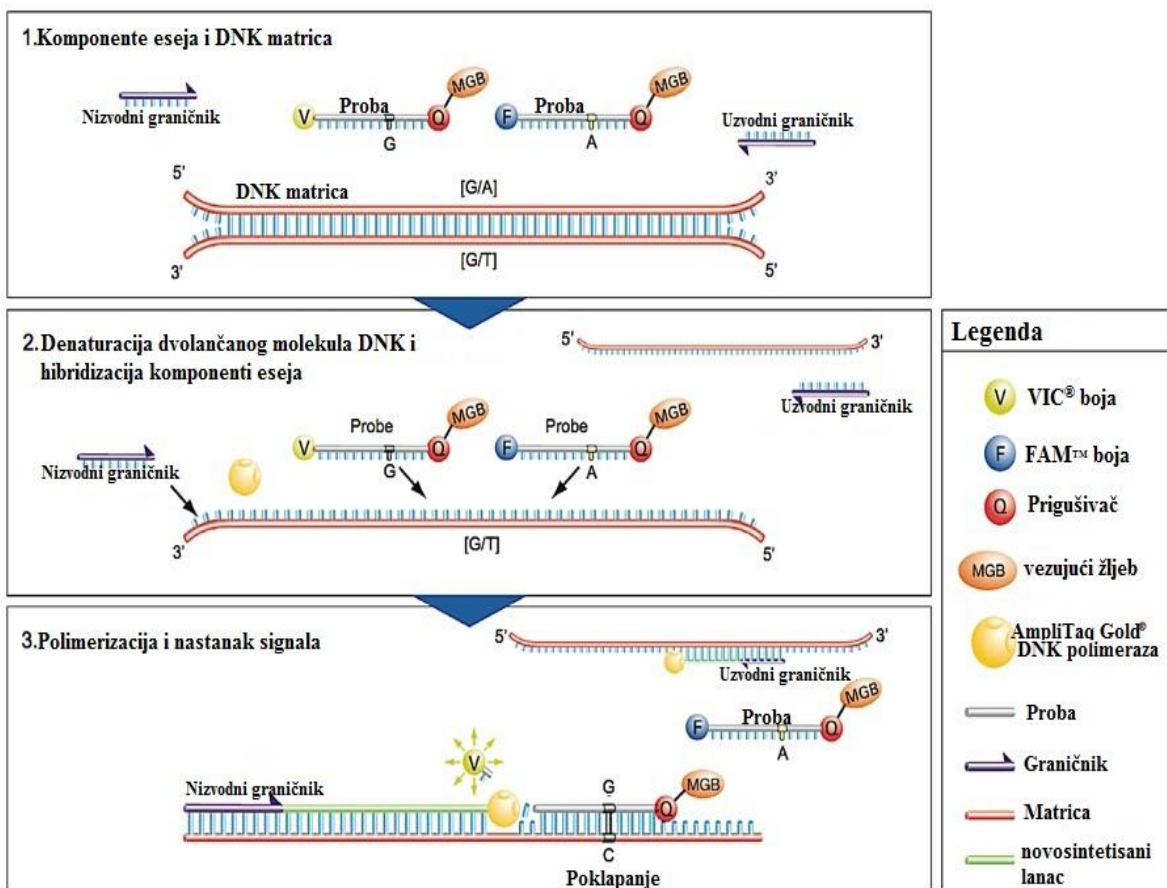
### 3.2.3. Ispitivanje polimorfizama

Na dobijenim izolatima DNK izvršena je genotipizacija polimorfizama u promotorskim regionima *TNF $\alpha$*  -308 G/A (rs1800629), *IL6* -174 G/C (rs1800795) i *IL1 $\beta$*  -511 G/A (rs16944). Analiza je vršena putem lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *Real-time Polymerase Chain Reaction, real-time PCR*) na 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Sjedinjene Američke Države) aparatu uz korišćenje komercijalno dizajniranih TaqMan<sup>®</sup> proba (Applied Biosystems, Foster City, Sjedinjene Američke Države).

PCR u realnom vremenu je *in vitro* kvantitativna metoda koja predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a, s tom razlikom što je ovim putem moguće pratiti povećanje broja amplikona nakon svakog ciklusa PCR u realnom vremenu. U reakciji PCR se pored prajmera koriste i alel-specifične oligonukleotidne probe na čijem se 5' kraju nalazi fluorescentno obeležena fotofora (reporter) a na 3' kraju probe se nalazi prigušivač (quencher) koji blokira emisiju fluorescencije (Slika 8.). Reakcija PCR se odvija kroz tri koraka. Tokom prvog koraka koji traje deset minuta dolazi do aktivacije termostabilnog enzima Taq polimeraze na  $95^{\circ}\text{C}$ . Pri ovoj temperaturi denaturiše protein koji se nalazi u žljebu aktivnog mesta Taq polimeraze. Denaturacijom ovog proteina aktivno mesto enzima

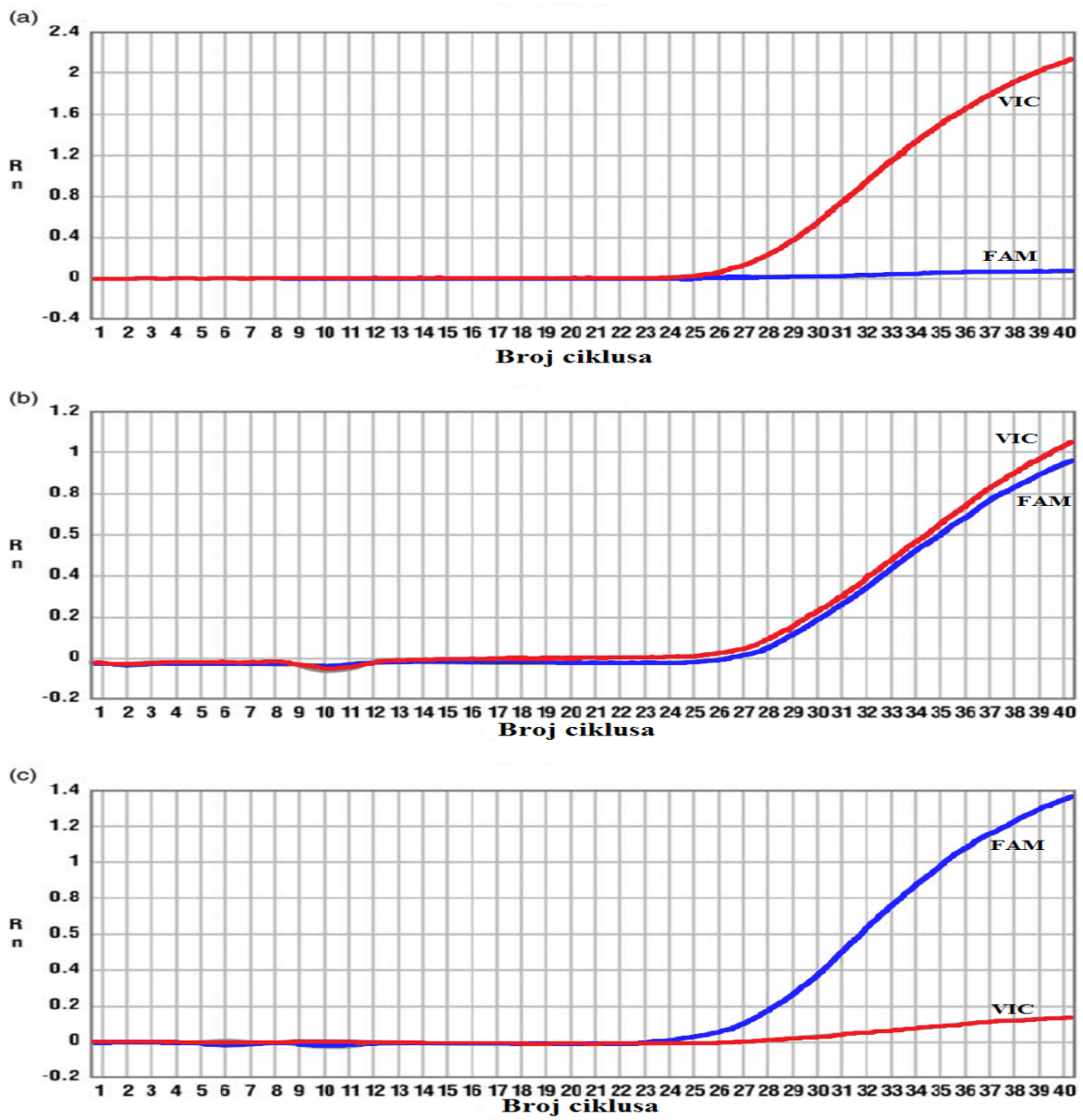
se oslobađa i postaje dostupno molekulima s kojima stupa u reakciju. Tokom drugog koraka na temperaturi od 95<sup>0</sup>C dolazi do denaturacije molekula DNK a dvolančani molekuli se prevode u jednolančane strukture i tako postaju dostupni oligonukleotidnim graničnicima (eng. *primers*) koji se u sledećem - trećem koraku vezuju za komplementarne krajeve ciljane sekvence u molekulu DNK. Ovaj korak traje jedan minut, na temperaturi koja zavisi od temperature topljenja graničnika. Osim graničnika, tokom ovog koraka se za DNK matricu, u delu između graničnika, specifično vezuju fluorescentno obeležene probe koje omogućavaju detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju željenog proizvoda. Graničnici se, aktivnošću Taq polimeraze koja dodaje nukleotide po principu komplementarnosti sa jednolančanom DNK matricom, produžuju (elongacija). Enzim će tokom elongacije doći do dela sa hibridizovanom probom i svojom 5'-3'egzonukleaznom aktivnošću će sa hibridizovane probe ukloniti nukleotid na 5' kraju za koji je vezana fluorescentna fotofora. Ovim odsecanjem razdvaja se reporter - fluorescentna fotofor od prigušivača – quencher-a, usled čega prestaje dejstvo prigušivača na reporter odnosno, uklanja se blokada emisije fluorescencije te reporter počinje da emituje svetlost. Emitovana svetlost predstavlja detektabilni fluorescentni signal koji se registruje CCD kamerom u aparatu.

Nakon ovog koraka, četrdeset do pedeset puta se ponavljaju druga i treća faza, a iz ciklusa u ciklus raste broj amplikona a time i intezitet fluorescencije što omogućava da se u realnom vremenu prati dinamika PCR reakcije. Za genotipizaciju svakog bialelskog SNP-sa korišćene su po dve specifične probe obeležene različitim fotoforama (VIC, FAM). Pored boje koje emituju, ove dve probe se međusobno razlikuju u sekvenci i to samo na mestu bazne zamene.



**Slika 8.** Komponente TaqMan eseja i koraci reakcije PCR u realnom vremenu

Ukoliko je osoba homozigotna u analiziranom regionu, odnosno, ukoliko je od oba roditelja nasledila istu alelsku varijantu u ispitivanom regionu, tada će se tokom reakcije za DNK matricu vezivati samo jedna proba što će biti detektovano u vidu fluorescentne emisije svetlosti jedne boje. Na ekranu računara koji je povezan sa aparatom vidi se jedna kriva koja nastaje eksponencijalnim umnožavanjem prisutne jedne alelske varijante (Slika 9. a i c). Ukoliko je osoba heterozigotna u analiziranom regionu tada će se za matricu vezivati obe probe, a heterozigotnost se detektuje kao dve krive na ekranu računara (Slika 9. b). Prednost ove metode je u činjenici da se celokupna analiza obavlja u jednoj reakcionoj tubici tokom jedne PCR reakcije i da nema potrebe za daljom obradom uzorka. Analiza je gotova za svega 2-3 sata, rezultati se obrađuju softverski i prikazuju se tabelarno.



Slika 9. Real time PCR rezultati

### 3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada prikupljenih podataka izvedena je korišćenjem SPSS softvera, verzija 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2009).

Atributivne varijable prikazane su brojevima i procentima, a kontinualne srednjim vrednostima i standardnom devijacijom.  $\chi^2$  test korišćen je za procenu razlike u polu, razlike u preživljavanju, uočenih anomalija i kliničkih pokazatelja u odnosu na utvrđenu dijagnozu sepse i u zavisnosti od alela, genotipa i grupisanih genotipova po dominantnom odnosno recesivnom modelu. Fišerov test tačne verovatnoće je primenjivan ukoliko je učestalost određene varijable u odnosu na alele, genotipove, grupisane genotipove manja od 5. ANOVA je korišćena pri ispitivanju efekta pojedinačnih i grupisanih genotipova na GN, PTM, AS 5'.

Multipla logistička regresiona analiza korišćena je za testiranje zavisnosti genotipova sa nastankom sepse kod prematurusa uz PTM i GN, AS 5' i način porođaja kao kovarijante. Primenjena su dva modela: genotipski i grupisani genotipovi po dominantnom odnosno recesivnom modelu.

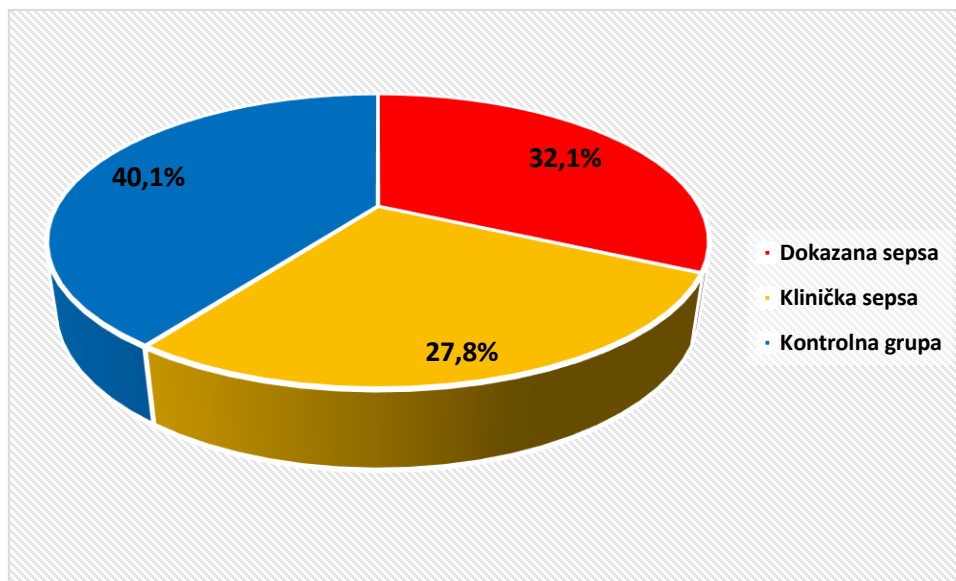
P vrednost  $< 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. OSNOVNI PODACI O PREVREMENO ROĐENOJ DECI

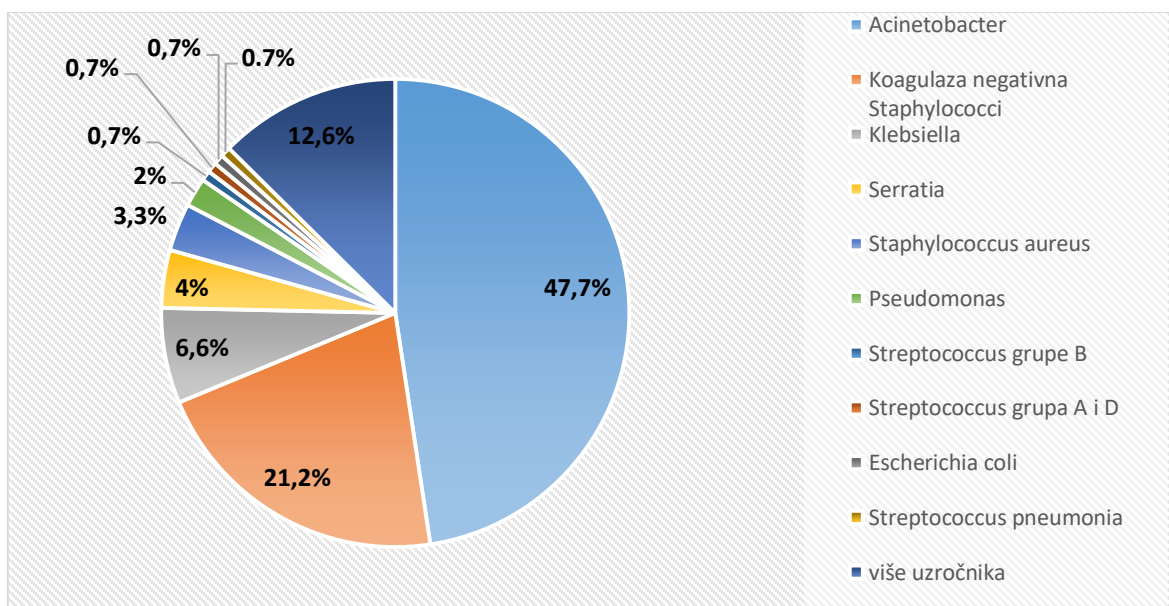
Naša studija obuhvatila je 471-o novorođenče hospitalizovano na Institutu za neonatologiju u Beogradu, u periodu od januara 2012. do juna 2018. godine. U ispitivanje su uključena prevremeno rođena deca gestacijske dobi od 23. do završetka 36. nedelje. Prosečna gestacijska starost prematurusa je  $28,96 \pm 3,50$  nedelja. U studiju su uključeni prematurusi čija je PTM bila manja od 3000 g, a prosečna telesna masa prematurusa na rođenju iznosi  $1196,74 \pm 481,87$  grama. Procena vitalnosti novorođenčeta na osnovu kliničkih znakova objedinjena je APGAR skorom koji se određuje u prvoj i petoj minuti života. Za ispitivane prematuruse prosečan AS 5' iznosi  $4,44 \pm 2,51$ . Ispitanike čine 256 (54,4%) prematurusa muškog i 215 (45,6%) prematurusa ženskog pola. Dvadeset i jedan (4,5%) prematurus je imao dijagnostikovanu anomaliju, kao što je rascep usne i nepca, polidaktilija, sindaktilija i drugo.

Od 471-o neonatusa koji su bili uključeni u studiju, kod 282 (59,9%) prematurusa dijagnostikovana je rana neonatalna sepsa. 151 (32,1%) prematurus sa ranom neonatalnom sepsom imao je pored kliničkih znakova sepse pozitivan nalaz hemokulture. Kod preostalih 131 (27,8%) septičnih neonatusa nalaz hemokulture je bio negativan, a klinička sepsa je utvrđena na osnovu kliničkih i laboratorijskih nalaza od strane ordinirajućeg neonatologa. Kontrolnu grupu u studiji činila su deca koja tokom hospitalizacije nisu imala znakove generalizovane ili lokalne infekcije i u ovu grupu je uvršćeno 189 (40,1%) prematurusa (grafikon 4.).



**Grafikon 4.** Učestalost prematurusa sa neonatalnom sepsom i prematurusa bez znakova infekcije u našoj studiji.

Ispitivanjem uzročnika neonatalne sepse kod prematurusa koji su imali hemokulturom potvrđenu sepsu utvrđeno je da je u 72 slučaja uzročnik bio *Acinetobacter*, a u 32 slučaja koagulaza negativni *Staphylococci* (CoNS).

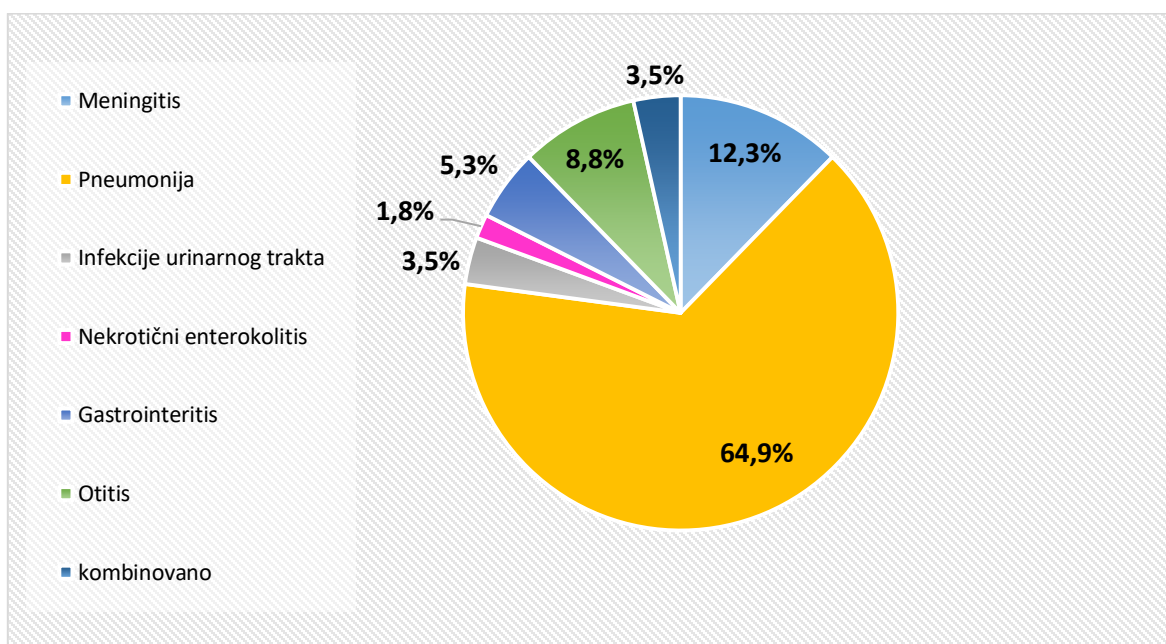


**Grafikon 5.** Učestalosti uzročnika neonatalne sepse kod ispitivanih prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom.



U 10 hemokultura prematurusa sa potvrđenom sepsom pronađena je *Klebsiella*, u 6 *Serratia*, u 5 *Staphylococcus aureus* i u 3 *Pseudomonas*. *Streptococcus* grupe B, *Streptococcus* grupa A i D, *Escherichia coli* i *Streptococcus pneumonia* su bili uzročnici u po jednom slučaju neonatalne sepse. Kod 19 prematurusa u hemokulturama je izolovano više od jedne bakterije (grafikon 5.).

Kod 57-oro (12,1%) prevremeno rođene dece u našoj studiji registrovana je lokalizovana infekcija (grafikon 6.). Ovi prematurusi su imali i ostale kliničke i laboratorijske znakove neonatalne sepse.



**Grafikon 6.** Učestalosti lokalizovanih infekcija u ispitivanoj grupi prematurusa

Najčešća lokalizovana infekcija je pneumonija koju je imalo 37 (64,9%) od 57 prematurusa. Meningitis je ispoljen kod 7 prematurusa, otitis kod 5 prematurusa, a gastroenteritis je imalo 3 prematurusa. Dvoje prematurusa je imalo infekciju urinarnog trakta, a dvoje je imalo dve lokalizovane infekcije. Kod jednog prematurusa dijagnostikovao je nekrotični enterokolitis.

## 4.2. REZULTATI ISPITIVANJA OPŠTIH KARAKTERISTIKA KOD PREMATURUSA SA HEMOKULTUROM POTVRĐENOM SEPSOM, KLINIČKOM SEPSOM I U KONTROLNOJ GRUPI

U tabeli 3. prikazana je učestalost pola, letalnog ishoda i ispoljenih anomalija kod ispitivanih prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi. Za prematuruse iz svake grupe prikazane su prosečne vrednosti GN, PTM i AS 5'.

**Tabela 3.** Osnovne karakteristike ispitivanih prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi

	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
Muško/žensko	85/66	74/57	97/92	0,56
GN*	27,79±3,19	28,55±3,38	30,19±3,44	<b>0,000</b>
PTM*	1018,84 ±410,36	1161,30 ±510,26	1363,44 ±460,29	<b>0,000</b>
AS 5'*	3,69±2,28	3,89±2,31	5,44±2,51	<b>0,000</b>
Letalni ishod %	98 64,9	67 51,1	63 33,3	<b>0,000</b>
Anomalija %	7 4,6	5 3,8	9 4,8	0,915

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Nema razlike u učestalosti prematurusa muškog pola između grupa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi. Takođe, ne postoji razlika u učestalosti dijagnostikovanih anomalija između pomenutih grupa. Statistički značajna razlika između analiziranih grupa utvrđena je za vrednosti GN, PTM i AS 5' i preživljavanje prematurusa. Vrednosti GN, PTM i AS 5' prematurusa kontrolne

grupe su statistički značajno više nego kod prematurusa sa sepsom (hemokulturom potvrđenom i kliničkom). Broj prematurusa koji su imali nepovoljan ishod bio je statistički značajno viši u grupi prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom i sa suspektnom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu.

### **4.3. ISPITIVANJE KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH POKAZATELJA NEONATALNE SEPSE KOD PREMATURUSA SA HEMOKULTUROM POTVRĐENOM SEPSOM, KLINIČKOM SEPSOM I U KONTROLNOJ GRUPI**

Od kliničkih pokazatelja praćeni su:

- akutni respiratorni distres sindrom koji je zabeležen kod 443 (94,1%) prematurusa
- bronhopulmonalna displazija razvila se kod 38 (8,1%) prematurusa
- intraventrikularna hemoragija je registrovana kod 76 (16,1%) pacijenta.

Analizom laboratorijskih pokazatelja sepse utvrđeno je da kod 449 (95,3%) prematurusa za koje smo imali podatak o visini serumskog C reaktivnog proteina, njih 226 (50,3%) je imalo povišenu vrednost ovog markera. Leukopeniju je imalo svega petoro (1,1%) a leukocitozu 112 (23,8%) prematurusa.

Za pet prematurusa nisu postojali podaci o broju neutrofila, a za još jednog, ukupno 6 nedostajali su podaci o broju polimorfonukleara i o toksičnim granulacijama/vakuolama u istim. Ispitvanjem 466 (98,9%) prematurusa utvrđeno je da je njih 10 (2,1%) imalo neutropeniju, 215 (46,1%) neutrofiliju. Čak 342 (73,5%) prematurusa imalo je povišeni broj PMN. Kod 269 (57,8%) prematurusa uočene su toksične strukture u PMN.

Povišeni broj nezrelih PMN imalo je 176 (37,8%) prematurusa. 110 (23,7%) prematurusa imalo je povećanu vrednost odnosa broja nezrelih prema ukupnom broju PMN

(I:T), dok je 38 (8,2%) imalo povećanu vrednost odnosa nezrelih prema zrelim PMN. Trombocitopenija u prvih 7 dana života utvrđena je kod 212 (45%) prematurusa. Metaboličku acidozu je imalo 324 (68,8%) prematurusa.

U tabeli 4. prikazane su učestalosti ispoljavanja respiratornog distres sindroma, bronhopulmonalne displazije i intraventrikularne hemoragije kod prevremeno rođene dece tri ispitivane grupe: hemokulturom potvrđena sepsa, klinička sepsa i kontrola.

**Tabela 4.** Učestalosti ispoljavanja RDS, BPD i IVH kod prematurusa tri ispitivane grupe: hemokulturom potvrđena sepsa, klinička sepsa i kontrola.

<b>Klinički faktori</b>	<b>Potvrđena sepsa</b>	<b>Klinička sepsa</b>	<b>Kontrolna grupa</b>	<b>p vrednost</b>
RDS	145/443	123/443	175/443	0,417
%	32,7	27,8	39,5	
IVH	30/76	28/76	18/76	<b>0,006</b>
%	39,5	36,8	23,7	
BPD	12/38	18/38	8/38	<b>0,000</b>
%	31,6	47,3	21,1	

Analizom rezultata iz tabele 4. zaključujemo da:

- ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti ispoljavanja RDS-a kod prematurusa različitih grupa
- postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa prematurusa u ispoljavanju IVH i BPD. Učestalost ispoljavanja IVH i BPD je statistički značajno veća kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom nego u kontrolnoj grupi.

U tabeli 5. prikazane su učestalosti odstupanja vrednosti laboratorijskih parametara od normalnih kod prematurusa tri ispitivane grupe: hemokulturom potvrđena sepsa, klinička sepsa i kontrola.

**Tabela 5.** Učestalost odstupanja vrednosti laboratorijskih parametara kod prematurusa tri ispitivane grupe

<b>Laboratorijski pokazatelji</b>	<b>Potvrđena sepsa</b>	<b>Klinička sepsa</b>	<b>Kontrolna grupa</b>	<b>p vrednost</b>
Povišen CRP %	120/226 53,1	86/226 38,1	20/226 8,8	<b>0,000</b>
Leukopenija %	3/5 60,0	2/5 40,0	0/5 0,0	<b>0,000</b>
Leukocitoza %	45/112 40,2	44/112 39,3	23/112 20,5	
Neutopenija %	2/10 20,0	4/10 40,0	4/10 40,0	<b>0,000</b>
Neutrofilija %	84/215 39,1	70/215 32,6	61/215 28,4	
Povišeni PMN %	110/342 32,2	101/342 29,5	131/342 38,3	0,306
Povišeni nezreli PMN %	66/176 37,5	59/176 33,5	51/176 29,0	<b>0,001</b>
Povišen I:T %	42/110 38,2	33/110 30,0	35/110 31,8	0,102
Povišen I:M %	16/38 42,1	10/38 26,3	12/38 31,6	0,336
Toksične strukture u PMN %	104/269 38,7	85/269 31,6	80/269 29,7	<b>0,000</b>
Trombocitopenija %	94/212 44,3	75/212 35,4	43/212 20,3	<b>0,000</b>
Metabolička acidoza %	126/324 38,9	107/324 33,0	91/324 28,1	<b>0,000</b>
Imunoterapija %	13/24 54,2	10/24 41,7	1/24 4,2	<b>0,001</b>
Rodwell $\geq 3$ %	132/304 43,4	117/304 38,5	55/304 18,1	<b>0,000</b>

Töllner $\geq 3$	149/391	126/391	116/391	<b>0,000</b>
%	38,1	32,2	29,7	

Analiza dobijenih rezultata iz tabele 5. pokazala je da:

- postoji statistički značajno veća učestalost prematurusa sa povišenim vrednostima CRP, sa odstupanjima od normalnih vrednosti leukocita i neutrofila, sa povećanim brojem nezrelih PMN, sa toksičnim strukturama u PMN, sa trombocitopenijom i metaboličkom acidozom u grupama sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu
- postoji statistički značajno veća učestalost prematurusa sa Rodwell-ovim i Töllner-ovim skorom  $\geq 3$  u grupama sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu
- statistički je značajno veća učestalost prematurusa koji su primali imunoterapiju u grupi sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu
- ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti prematurusa sa povišenim brojem PMN, povišenim odnosom I:T i povišenim odnosom I:M između analiziranih grupa.

#### 4.4. OPŠTI PODACI O MAJCI, TOKU TRUDNOĆE I POROĐAJU

Podaci o starosti majke, načinu začeća, tipu porođaja, blizanačkoj trudnoći, stanju posteljice i plodove vode, kao i terapije koju je majka primala tokom trudnoće prikazani su u tabeli 6. po ispitivanim grupama: hemokulturom potvrđena sepsa, klinička sepsa i kontrola.

**Tabela 6.** Podaci o majci, toku trudnoće i porođaju

Kliničke karakteristike	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
Starost majke*	30,15±6,12	30,01±6,74	30,81±5,87	0,454
IVF %	21/151 13,9	25/131 19,1	47/189 24,9	<b>0,040</b>
Carski rez %	66/151 43,7	57/131 43,5	113/189 59,8	<b>0,003</b>
Višeploidna trudnoća %	39/151 25,8	36/131 27,5	64/187 34,9	0,183
Patološka plodova voda %	36/120 30,0	29/107 27,1	28/165 17,0	<b>0,024</b>
Patološka posteljica %	8/35 22,9	4/42 9,5	11/40 27,5	<b>0,035</b>
Antibiotska terapija %	40/151 26,5	39/131 29,8	60/189 31,7	0,571
Kortikosteroidna terapija %	57/151 37,7	52/131 39,7	96/189 50,8	<b>0,032</b>
Antihipertenzivna terapija %	16/151 10,6	18/131 13,7	43/189 22,8	
Tokolitička terapija %	11/151 7,3	8/131 6,1	28/189 14,8	<b>0,001</b>
Antihipertenziva + tokolitička terapija %	5/151 3,3	3/131 2,3	4/189 2,1	

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

- nema statistički značajne razlike u starosti majke, učestalosti višeplođnih trudnoća i primene antibiotske terapije tokom trudnoće među analiziranim grupama
- postoji statistički značajno veća učestalost začeca IVF-om, rođenja carskim rezom, primene kortikosteroida i antihipertenziva i/ili tokolitika u terapiji majki

tokom trudnoće kod prematurusa u kontrolnoj grupi

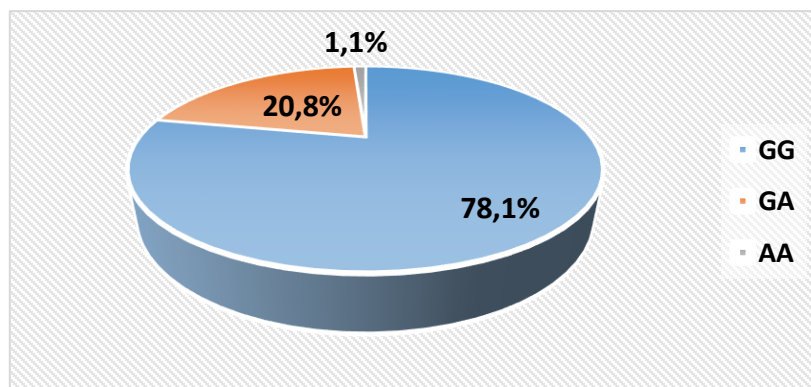
- postoji statistički značajno veća učestalost patološke plodove vode kod majki čija su novorođenčad u grupi hemokulturom potvrđene sepse. Nasuprot tome, statistički značajno manja je učestalost patološke posteljice kod majki novorođenčadi sa kliničkom sepsom.

#### 4.5. REZULTATI GENETIČKIH ANALIZA

Molekularno – genetičko ispitivanje polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A (rs1800629), *IL6* -174 G/C (rs1800795) i *IL1 $\beta$*  -511 G/A (rs16944) sprovedeno je kod 471-og prematurusa.

##### 4.5.1. Rezultati ispitivanja *TNF $\alpha$* -308 G/A polimorfizma

Analizom polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A utvrđeno je da je 368 (78,1%) prematurusa homozigotno za alel G, petoro (1,1%) je homozigotno za alel A, a 98 (20,8%) prematurusa je heterozigotno za ispitivani genski lokus. Rezultati su ilustrovani grafikonom 7. Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalost alela. Učestalost alela G je 88,5% a alela A 11,5%. Genotipovi analiziranog polimorfizma nalaze se u Hardi – Vajbergovoj ravnoteži.



**Grafikon 7.** Učestalost *TNF $\alpha$*  -308 G/A genotipova kod svih ispitivanih prematurusa



U tabeli 7. predstavljene su distribucije genotipova, udruženih genotipova po dominantnom modelu (GG/GA+AA) i alela u svakoj grupi prematurusa: sa hemokulturom potvrđenom sepsom, sa kliničkom sepsom i kontrolnoj grupi.

**Tabela 7.** Učestalosti genotipova, udruženih genotipova po dominantnom modelu i učestalosti alela za polimorfizam *TNF $\alpha$*  -308 G/A u ispitivanim grupama

<i>TNF<math>\alpha</math></i> -308G/A	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
GG %	110 72,8	99 75,6	159 84,1	<b>0,010</b>
GA %	40 39,5	28 21,4	30 15,9	
AA %	1 0,7	4 3,1	0 0,0%	
GG %	110 72,8	99 75,6	159 84,1	<b>0,031</b>
GA+AA %	41 27,2	32 24,4	30 15,9	
G %	260 86,1	226 86,3	348 92,1	<b>0,035</b>
A %	42 13,9	36 13,7	30 7,9	

Analiza dobijenih rezultata za polimorfizam *TNF $\alpha$*  -308 G/A pokazala je da:

- postoji statistički značajna razlika u učestalosti alela (hemokulturom potvrđena sepsa u odnosu na kontrolnu grupu:  $\chi^2 = 5,71$ ; p = 0,017; OR = 0,534; 95% CI 0,325 – 0,876; klinička sepsa u odnosu na kontrolnu grupu:  $\chi^2 = 5,03$ ; p = 0,025; OR = 0,541; 95% CI 0,324 – 0,904), pojedinačnih genotipova i grupisanih genotipova (hemokulturom potvrđena sepsa u odnosu na kontrolnu grupu:  $\chi^2 = 5,8$ ; p = 0,016; OR = 0,506; 95% CI 0,298 – 0,86; klinička sepsa u odnosu na kontrolnu grupu  $\chi^2 = 3,1$ ; p = 0,078; OR = 0,584; 95% CI 0,334 – 1,02) između grupa prematurusa sa potvrđenom, kliničkom sepsom i

kontrolne grupe prematurusa. Učestalost A alela, kao i učestalost AA genotipa je statistički značajno veća kod prematurusa sa sepsom nego u kontrolnoj grupi.

Logistička regresiona analiza potvrdila je statistički značajnu povezanost GA+AA genotipova polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A i hemokulturom potvrđene sepse (B = -0,718; p = 0,013; OR = 1,98; 95% CI 1,163 – 3,356), kao i kliničke sepse (B = -0,602; p = 0,027; OR = 1,71; 95% CI 0,981 – 2,992) uz PTM, GN, AS 5' i tip porođaja kao kovarijate.

Distribucija genotipova, grupisanih genotipova po dominantnim modelu (GG/GA+AA) i alela *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma u odnosu na preživljavanje u grupi prematurusa sa sepsom (hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom) prikazana je u tabeli 8.

**Tabela 8.** Učestalost genotipova *TNF $\alpha$*  -308 G/A kod neonatusa sa sepsom u odnosu na preživljavanje

<i>TNF<math>\alpha</math></i> -308G/A	Živi	Letalan ishod	p vrednost
GG %	86 72,3	125 75,3	0,652
GA %	30 25,2	39 23,5	
AA %	3 2,5	2 1,2	
GG %	86 72,3	125 75,3	0,565
GA+AA %	33 27,7	41 24,7	
G %	202 84,9	289 87,0	0,538
A %	36 15,1	43 13,0	

Ispitivanjem uticaja polimorfizma *TNF $\alpha$  -308 G/A* na letalan ishod kod prematurusa sa sepsom, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa prematurusa. Razlika se ne uočava ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom modelu, kao ni u učestalosti alela između grupa koje su analizirane.

Ispitali smo i moguće razlike u ispoljavanju kliničkih karakteristika prematurusa (GN, PTM, AS 5', preživljavanje, RDS, BPD, IVH i metaboličke acidoze) u zavisnosti od *TNF $\alpha$  -308 G/A* genotipova. Rezultati ovih analiza predstavljeni su za pojedinačne genotipove i genotipove grupisane po dominantnom modelu u tabeli 9.

**Tabela 9.** Kliničke karakteristike prematurusa u zavisnosti od genotipova *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma

Klinički faktori	GG	GA	AA	p vrednost	GG	GA+AA	p vrednost
GN*	29,0 ±3,55	28,88 ±3,34	28,30 ±3,03	0,874	29,0 ±3,55	28,85 ±3,31	0,708
PTM*	1207,38±48 9,03	1170,61±45 5,03	926,0 ±449, 59	0,360	1207,38±48 9,03	1158,74±45 5,65	0,366
AS 5'*	4,46±2,54	4,43±2,46	3,8±1, 79	0,845	4,46 ±2,54	4,4 ±2,41	0,839
letalni ishod %	179/368 48,6	47/98 48	2/5 40,0	0,924	179/368 48,6	49/103 47,6	0,848
RDS %	344/368 93,5	94/98 95,9	5/5 100,0	0,565	344/368 93,5	99/103 96,1	0,317
BPD %	22/368 6,0	14/98 14,3	2/5 40,0	<b>0,001</b>	22/368 6,0	16/103 15,5	<b>0,002</b>
IVH %	59/368 16	16/98 16,3	1/5 20,0	0,970	59/368 16,0	17/103 16,5	0,908
Metabolička acidoza %	248/368 67,4	71/98 72,4	5/5 100,0	0,200	248/368 67,4	76/103 73,8	0,216

\*srednja vrednost  $\pm$  jedna standardna devijacija

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 9. može se zaključiti da:

- postoji statistički značajna razlika učestalosti ispoljavanja bronhopulmonalne displazije kod prematurusa u odnosu na genotip. Kod nosioca AA genotipa u odnosu na druga dva genotipa bronhopulmonalna displazija se javlja statistički značajno češće. Statistički značajna razlika se potvrđuje i nakon grupisanja genotipa po dominantnom modelu ( $\chi^2 = 9,907$ ;  $p = 0,002$ ; OR = 0,346; 95% CI 0,174 – 0,686).
- ne postoji statistički značajna razlika između nosioca GG, GA i AA genotipova *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma u srednjoj vrednosti GN na rođenju, PTM, AS u 5', kao i učestalosti preživljavanja, pojave RDS, IVH i metaboličke acidoze. Ni posle grupisanja genotipova po dominantnom modelu nisu uočene statistički značajne razlike u navedenim kliničkim karakteristikama.

U tabeli 10. prikazane su učestalosti odstupanja vrednosti laboratorijskih parametara od normalnih između različitih *TNF $\alpha$  -308 G/A* genotipova, kao i između grupisanih genotipova po dominantnim modelom (GG/GA+AA).

**Tabela 10.** Odstupanje laboratorijskih pokazatelja od normalnih vrednosti u zavisnosti od genotipova *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma

Laboratorijski pokazatelji	GG	GA	AA	P vrednost	GG	GA+AA	P vrednost
Povišen CRP %	167/350 47,7	55/94 58,5	4/5 80,0	0,073	167/350 47,7	59/99 59,6	<b>0,037</b>
Leukopenija %	2/368 0,5	3/98 3,1	0/5 0,0	0,135	2/368 0,5	3/103 2,9	0,067
Leukocitoza %	92/368 25,9	20/98 20,4	0/5 0,0		92/368 25,0	20/103 19,4	
Neutopenija %	6/365 1,6	4/96 4,2	0/5 0,0	0,133	6/365 1,6	4/101 4,0	0,300
Neutrofilija %	172/365 47,1	43/96 44,8	0/5 0,0		172/365 47,1	43/101 42,6	
Povišeni PMN %	273/364 75,0	66/96 68,8	3/5 60,0	0,367	273/364 75,0	69/101 68,3	0,178
Povišeni nezreli PMN %	146/364 40,1	29/96 30,2	1/5 20,0	0,146	146/364 40,1	30/101 29,7	0,056
Povišen I:T %	87/364 23,9	22/96 22,9	1/5 20,0	0,962	87/364 23,9	23/101 22,8	0,813
Povišen I:M %	30/364 8,2	7/96 7,3	1/5 20,0	0,596	30/364 8,2	8/101 7,9	0,917
Toksične strukture u PMN %	209/364 57,4	56/96 58,3	4/5 80,0	0,594	209/364 57,4	60/101 59,4	0,720
Trombocitopenija %	161/368 43,8	46/98 46,9	5/5 100,0	<b>0,039</b>	161/368 43,8	51/103 49,5	0,299
Imunoterapija %	19/368 5,2	5/98 5,1	0/5 0,0	0,873	19/368 5,2	5/103 4,9	0,900
Rodwell $\geq 3$ %	233/368 63,3	66/98 67,3	5/5 100,0	0,190	233/368 63,3	71/103 68,9	0,292
Töllner $\geq 3$ %	301/368 81,8	86/98 87,8	4/5 80,0	0,371	301/368 81,8	90/103 87,4	0,182

Ispitivanjem uticaja polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A na odstupanja laboratorijskih parametara od normalnih vrednosti kod prematurusa utvrđeno je da:

- postoji statistički značajna razlika učestalosti ispoljavanja trombocitopenije kod

prematurusa u odnosu na genotip. Nosioci AA genotipa u odnosu na druga dva genotipa imaju trombocitopeniju statistički značajno češće. Nakon grupisanja genotipova po dominantnom modelu (GG/GA+AA) statistička značajnost se gubi.

- statistički značajno češće povišeni CRP javlja se kod nosioca A alela (GA+AA) nakon grupisanja genotipova po dominantnom modelu ( $\chi^2 = 4,358$ ;  $p = 0,037$ ; OR = 0,619; 95% CI 0,393 – 0,973).
- učestalost povišenog CRP je veća kod prematurusa nosioca genotipa AA, ali ne dostiže statističku značajnost ( $p = 0,073$ )
- učestalosti odstupanja od normalnih vrednosti broja leukocita, i ako ne dostižu statističku značajnost ( $p = 0,067$ ), pokazuju značajne razlike između genotipova grupisanih po dominantnom modelu. Nosioci genotipa GG značajno češće su imali leukocitozu u odnosu na grupisani genotip GA+AA.
- odstupanja od normalnih vrednosti u broju nezrelih PMN veća je kod nosioca GG genotipa u odnosu GA+AA, ali ne dostižu statističku značajnost ( $p = 0,056$ ).
- ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti odstupanja ostalih laboratorijskih parametara od normalnih vrednosti između prematurusa sa različitim *TNF $\alpha$*  -308 G/A genotipom, kao ni nakon grupisanja genotipova prematurusa po dominantnom modelu.

Učestalosti koji se odnose na način začeća, tip porođaja, stanje posteljice i plodove vode, kao i antriotske i kortikosteroidne terapije koju je majka primala tokom trudnoće u zavisnosti od genotipova polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A prikazani su u tabeli 11.

**Tabela 11.** Karakteristike koje se odnose na trudnoću u zavisnosti od genotipova *TNF $\alpha$*  - 308 G/A polimorfizma

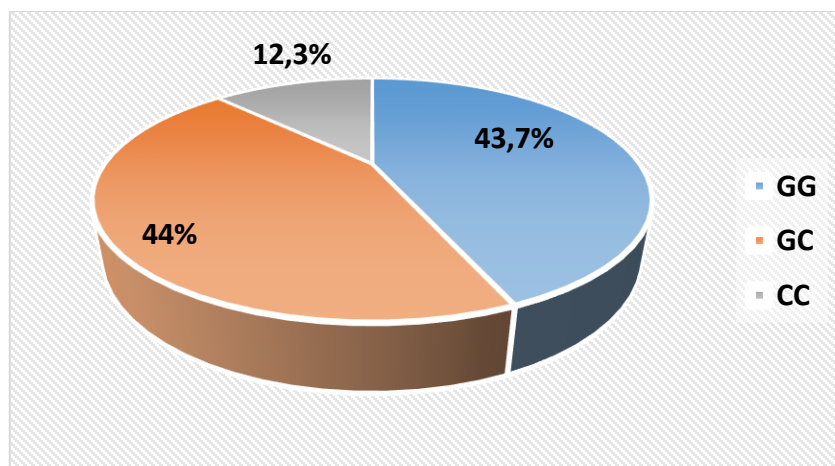
Kliničke karakteristike	GG	GA	AA	P vrednost	GG	GA+AA	P vrednost
IVF %	76/368 20,7	17/98 17,3	0/5 0,0	0,411	76/368 20,7	17/103 16,5	0,350
Carski rez %	187/368 50,8	46/98 46,9	3/5 60,0	0,718	187/368 50,8	49/103 47,6	0,561
Patološka plodova voda %	79/307 25,7	14/82 17,1	0/5 0,0	0,163	79/307 25,7	14/87 16,5	0,076
Patološka posteljica %	18/368 4,9	5/98 5,1	0/5 0,0	0,733	18/368 4,9	5/103 4,9	0,628
Antibiotska terapija %	106/368 28,8	31/98 31,6	2/5 60,0	0,754	106/368 28,8	33/103 32,0	0,525
Kortikosteroidna terapija %	106/368 43,5	42/98 42,9	3/5 60,0	0,752	106/368 43,5	45/103 43,7	0,970

Analizom prikazanih rezultata u tabeli 11. nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti praćenih parametara koji se odnose na trudnoću u zavisnosti od genotipova polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A. Učestalost patološke plodove vode veća je kod prematurusa nosioca GG genotipa nakon udruživanja po dominantnom modelu, ali ne dostižu statističku značajnost ( $p = 0,076$ ). Ostali parametri koje smo pratili ne pokazuju statističke razlike ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom modelu.

#### 4.5.2. Rezultati ispitivanja IL6 -174 G/C polimorfizma

Analizom polimorfizma *IL6* -174 G/C u našem uzorku od 471 prematurusa utvrđeno je da su 206 (43,7%) prematurusa nosioci GG genotipa, 207 (44,0%) su nosioci GC genotipa, a 58 (12,3%) prematurusa su nosioci genotipa CC. Rezultati su predstavljeni grafikonom 8. Genotipovi analiziranog polimorfizma nalaze se u Hardy – Vajbergovoj

ravnoteži. Na osnovu učestalosti genotipova izračunata je učestalost alela i ona za alel G iznosi 65,7% a za alel C iznosi 34,3%.



**Grafikon 8.** Učestalost *IL6* -174 G/C genotipova u ispitivanoj grupi prematurusa

Učestalosti genotipova, udruženih genotipova po recesivnom modelu (GG+GC/CC) i učestalosti alela u svakoj ispitivanoj grupi za polimorfizam *IL6* -174 G/C prikazani su u tabeli 12.



**Tabela 12.** Učestalosti genotipova, udruženih genotipova po recesivnom modelu i učestalosti alela za polimorfizam *IL6 -174 G/C* u ispitivanim grupama

<i>IL6 -174 G/C</i>	Potvrđena sepsa 151	Klinička sepsa 131	Kontrolna grupa 189	p vrednost
GG	65	57	84	0,878
%	43,0	43,5	44,4	
GC	66	61	80	
%	43,8	46,6	42,3	
CC	20	13	25	0,619
%	13,2	9,9	13,2	
GG+GC	131	118	164	
%	86,8	90,1	86,8	
CC	20	13	25	0,887
%	13,2	9,9	13,2	
G	196	175	248	
%	64,9	66,8	65,6	
C	106	87	130	
%	35,1	33,2	34,4	

Analizom rezultata za polimorfizam *IL6 -174 G/C* utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinačnih, ni grupisanih genotipova, kao ni razlika u učestalosti alela ovog polimorfizma između grupa prematurusa sa sepsom (potvrđenom i kliničkom) i kontrolne grupe. Oba alela su homogeno raspoređena unutar ispitivane grupe pacijenata.

Logistička regresiona analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost između genotipa polimorfizma *IL6 -174 G/C* i potvrđene sepse, kao ni kliničke sepse uz telesnu masu na rođenju, gestacijsku starost, AS 5' i tipa porođaja kao kovarijate. *IL6 -174 G/C* nije faktor rizika za razvoj neonatalne sepse.

Distribucija genotipova, grupisanih genotipova po recesivnom modelu (GG+GC/CC) i alela *IL6 -174 G/C* polimorfizma u odnosu na preživljavanje u grupi prematurusa sa sepsom (hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom) prikazana je u tabeli 13.

**Tabela 13.** Učestalost genotipova *IL6 -174 G/C* u grupi septičnih neonatusa u odnosu na preživljavanje

<i>IL6 -174G/C</i>	Živi	Letalan ishod	p vrednost
GG %	46 38,7	77 46,4	0,384
GC %	56 47,1	71 42,8	
CC %	17 14,3	18 10,8	
GG+GC %	102 85,7	148 89,2	0,383
CC %	17 14,3	18 10,8	
G %	148 62,2	225 67,8	0,196
C %	90 37,8	107 32,2	

Analiza podataka iz tabele 13. pokazala je da je distribucija pojedinačnih genotipova *IL6 -174 G/C*, odnosno grupisanih genotipova po recesivnom modelu GG+GC/CC između preživelih prematurusa sa sepsom i prematurusa sa letalnim ishodom od sepse ujednačena. Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti alela ispitivanog polimorfizma između prematurusa sa sepsom u odnosu na preživljavanje.

Uticaj pojedinačnih genotipova polimorfizma *IL6 -174 G/C* i genotipova ovog polimorfizma udruženih po recesivnom modelu na kliničke karakteristike prematurusa: GN, PTM, AS 5', preživljavanje, RDS, BPD, IVH i metabolička acidoza predstavljeni su u tabeli 14.

**Tabela 14.** Kliničke karakteristike prematurusa u zavisnosti od genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma

Klinički faktori	GG	GC	CC	P vrednost	GG+GC	CC	P vrednost
GN*	29,19 ±3,48	28,82 ±3,51	28,67 ±3,56	0,457	29,0 ±3,49	28,67 ±3,56	0,499
PTM*	1219,2±47 3,66	1190,6±49 2,67	1138,88±47 4,53	0,519	1204,87±48 2,91	1138,88±47 4,53	0,329
AS 5**	4,5 ±2,48	4,42 ±2,51	4,31 ±2,66	0,869	4,46 ±2,49	4,31 ±2,66	0,669
Letalni ishod %	100/206 48,5	101/207 48,8	27/58 46,6	0,954	201/413 48,7	27/58 46,6	0,763
RDS %	199/206 96,6	189/207 91,2	55/58 94,8	0,072	388/413 93,9	55/58 94,8	0,791
BPD %	16/206 7,8	17/207 8,2	5/58 8,6	0,973	33/413 8,0	5/58 8,6	0,869
IVH %	31/206 15,0	38/207 18,4	7/58 12,1	0,440	69/413 16,7	7/58 12,1	0,369
Metabolička acidoza %	139/206 67,5	147/207 71,0	38/58 65,5	0,627	286/413 69,2	38/58 65,5	0,566

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Analiza rezultata iz tabele 14. je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u ispoljavanju kliničkih karakteristika prematurusa u zavisnosti od genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma. Ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu nisu uočene statistički značajne razlike između grupa u ispoljavanju navedenih kliničkih karakteristika.

Distribucija genotipova polimorfizma *IL6 -174 G/C* i udruženih genotipova ovog polimorfizma po recesivnom modelu u odnosu na odstupanja laboratorijskih parametara od normalnih vrednosti: vrednost CRP, broja leukocita, neutrofila, PMN, trombocita i nezrelih

PMN, odnosa I:T, I:M, toksičnih struktura u PMN kao i povećani Rodwell i Töllner skor predstavljeni su u tabeli 15.

**Tabela 15.** Odstupanje laboratorijskih pokazatelja od normalnih vrednosti u zavisnosti od genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma

Laboratorijski pokazatelji	GG	GC	CC	P vrednost	GG+GC	CC	P vrednost
Povišen CRP %	104/196 53,1	95/200 47,5	27/53 50,9	0,540	199/396 50,3	27/53 50,9	0,925
Leukopenija %	2/206 1,0	2/207 1,0	1/58 1,7	0,971	4/413 1,0	1/58 1,7	0,867
Leukocitoza %	51/205 24,8	47/207 22,7	14/58 24,1		98/413 23,7	14/58 24,1	
Neutopenija %	5/205 2,4	2/203 1,0	3/58 5,2	0,400	7/408 1,7	3/58 5,2	0,228
Neutrofilija %	96/205 46,8	94/203 46,3	25/58 43,1		190/408 46,6	25/58 43,1	
Povišeni PMN %	156/204 76,5	147/203 72,4	39/58 67,2	0,330	303/407 74,4	39/58 67,2	0,244
Povišeni nezreli PMN %	88/204 43,1	67/203 33,0	21/58 36,2	0,105	155/407 38,1	21/58 36,2	0,783
Povišen I:T %	45/204 22,1	54/203 26,6	11/58 19,0	0,374	99/407 24,3	11/58 19,0	0,369
Povišen I:M %	13/204 6,4	21/203 10,3	4/58 6,9	0,319	34/407 8,4	4/58 6,9	0,705
Toksične strukture u PMN %	123/204 60,3	105/203 51,7	41/58 70,7	<b>0,023</b>	228/407 56,0	41/58 70,7	<b>0,034</b>
Trombocitopenija %	92/206 44,7	91/207 44,0	29/58 50,0	0,710	183/413 44,3	29/58 50,0	0,415
Imunoterapija %	6/206 2,9	15/207 7,2	3/58 5,2	0,135	21/413 5,1	3/58 5,2	0,977
Rodwell ≥3 %	131/206 63,6	133/207 64,3	40/58 69,0	0,746	264/413 63,9	40/58 69,0	0,452
Töllner ≥3 %	170/206 82,5	173/207 83,6	48/58 82,8	0,959	343/413 83,1	45/58 82,8	0,956

Analizom uticaja polimorfizma *IL6 -174 G/C* na odstupanje laboratorijskih pokazatelja od normalnih vrednosti utvrđena je:

- statistički značajno veća učestalost toksičnih struktura u PMN u grupi prematurusa koji su nosioci CC genotipa u odnosu na druga dva genotipa. Statistički značajna razlika se potvrđuje i nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu ( $\chi^2 = 4,481$ ;  $p = 0,032$ ; OR = 0,528; 95% CI 0,290-0,961)

- nema statistički značajne razlike u učestalosti odstupanja ostalih laboratorijskih parametara od normalnih vrednosti između prematurusa sa različitim *IL6 -174 G/C* genotipom, kao ni nakon grupisanja genotipova prematurusa po recesivnom modelu.

Distribucija genotipova i grupisanih genotipova po recesivnom modelu za *IL6 -174 G/C* polimorfizam u zavisnosti od parametara vezanih za trudnoću prikazani su u tabeli 16.

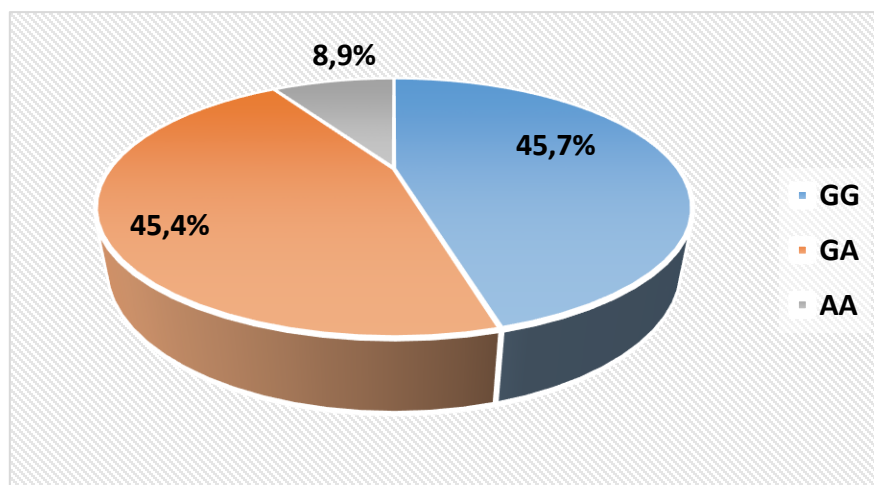
**Tabela 16.** Karakteristike koje se odnose na trudnoću u zavisnosti od genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma

Kliničke karakteristike	GG	GC	CC	P vrednost	GG+GC	CC	P vrednost
IVF %	44/206 21,4	38/207 18,4	11/58 19,0	0,736	82/413 19,9	11/58 19,0	0,873
Carski rez %	107/206 51,9	100/207 48,3	29/58 50,0	0,761	207/413 50,1	29/58 50,0	0,986
Patološka plodova voda %	39/170 22,9	41/172 23,8	13/50 26,0	0,904	80/342 23,4	13/50 26,0	0,686
Patološka posteljica %	14/206 6,8	7/207 3,4	2/58 3,4	0,495	21/413 5,1	2/58 3,4	0,860
Antibiotska terapija %	55/206 26,7	60/207 29,0	24/58 41,4	0,094	115/213 27,8	24/58 41,4	<b>0,034</b>
Kortikosteroidna terapija %	85/206 41,3	94/207 45,4	26/58 44,8	0,681	179/413 43,3	26/58 44,8	0,831

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 16. pokazuje da su prematurusi sa CC genotipom statistički značajna češće primali antibiotsku terapiju u odnosu na prematuruse sa GG+GC genotipovima ( $\chi^2 = 4,478$ ;  $p = 0,034$ ; OR = 0,547; 95% CI 0,311 – 0,962). Ostali parametri koje smo pratili nisu pokazali razliku u distribuciji u zavisnosti od genotipova polimorfizma *IL6 -174 G/C*.

#### 4.5.3. Rezultati ispitivanja *IL1 $\beta$ -511 G/A* polimorfizma

Analizom polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* u našem uzorku od 471 prematurusa utvrđeno je da su 215 (45,7%) prematurusa homozigotni nosioci G alela, 58 (8,9%) prematurusa su homozigotni nosioci alela A, a 214 (45,4%) su nosioci GA genotipa. Rezultati su prikazani u grafikonu 9. Genotipovi analiziranog polimorfizma nalaze se u Hardy – Vajbergovoj ravnoteži. Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela i ona za alel G iznosi 68,4% a za alel A iznosi 31,6%.



**Grafikon 9.** Učestalost *IL1 $\beta$  -511 G/A* genotipova kod svih ispitivanih prematurusa

U tabeli 17. prikazane su distribucije genotipova, grupisanih genotipova po recesivnom modelu (GG+GA/AA) i alela za polimorfizam *IL1 $\beta$*  -511 G/A.

**Tabela 17.** Učestalosti genotipova, udruženih genotipova po recesivnom modelu i učestalosti alela za polimorfizam *IL1 $\beta$*  -511 G/A u ispitivanim grupama

<i>IL1<math>\beta</math></i> -511 G/A	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
GG	72	59	84	<b>0,008</b>
%	47,7	45,0	44,4	
GA	67	51	96	
%	44,4	38,9	50,8	
AA	12	21	9	<b>0,002</b>
%	7,9	16,0	4,8	
GG+GA	139	110	180	
%	92,1	84,0	95,2	
AA	12	21	9	<b>0,024</b>
%	7,9	16,0	4,8	
G	211	169	264	
%	69,9	64,5	69,8	
A	91	93	114	<b>0,024</b>
%	30,1	35,5	30,2	

Analizom dobijenih rezultata distribucije genotipova i alela polimorfizma *IL1 $\beta$*  -511 G/A utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti alela, pojedinačnih i grupisanih genotipova između grupa prematurusa sa hemokulturom potvrđenom, kliničkom sepsom i kontrolnom grupom (grupa klinička sepsa u odnosu na kontrolnu grupu  $\chi^2 = 10,28$ ;  $p = 0,001$ ; OR = 0,262; 95% CI 0,116 – 0,592). Učestalost alela A, kao i učestalost homozigotnog genotipa ovog alela statistički su značajno više u grupi prematurusa sa kliničkom sepsom.

Logistička regresiona analiza je potvrdila statistički značajnu povezanost AA genotipa polimorfizma *IL1 $\beta$*  -511 G/A sa nastankom sepse kod prematurusa uz PTM i GN,

AS 5' i način porođaja kao kovarijate (B = -1,345, p = 0,002; OR = 0,435, 95% CI 0,111 - 0,611).

Učestalosti alela, pojedinačnih i udruženih genotipova po recesivnom modelu (GG+GA/AA) za polimorfizam *IL1β* -511 G/A u odnosu na preživljavanje u grupi prematurusa sa sepsom (hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom) prikazana je u tabeli 18.

**Tabela 18.** Učestalost genotipova *IL1β* -511 G/A kod prematurusa sa sepsom u odnosu na preživljavanje

<i>IL1β</i> -511G/A	Živi	Letalan ishod	p vrednost
GG %	56 47,1	75 45,2	<b>0,033</b>
GA %	56 47,1	65 39,2	
AA %	7 5,9	26 15,7	
GG+GA %	112 94,1	140 84,3	<b>0,011</b>
AA %	7 5,9	26 15,7	
G %	168 70,6	215 64,8	0,170
A %	70 29,4	117 35,2	

Analizom uticaja polimorfizma *IL1β* -511 G/A na letalan ishod u grupi prematurusa sa sepsom utvrđeno je da:

- postoji statistički značajno viša učestalost genotipa AA kod prematurusa sa sepsom koji su imali letalni ishod. Statistički značajna razlika se potvrđuje i nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu ( $\chi^2 = 6,476$ ; p = 0,011; OR = 2,971; 95% CI 1,244 - 7,098)



- nema statistički značajne razlike u distribuciji alela između analiziranih grupa prematurusa.

Logistička regresija koja je uključivala PTM i GN kao kovarijate, potvrdila je povezanost polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* sa letalnim ishodom kod prematurusa sa sepsom (B = 1,556, p = 0,002; OR = 9,232; 95% CI 1,157 - 12,937).

Distribucija genotipova polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* i udruženih genotipova ovog polimorfizma po recesivnom modelu u odnosu na kliničke faktore prematurusa: GN, PTM, AS 5', preživljavanje, RDS, BPD, IVH i metabolička acidoza predstavljeni su u tabeli 19.

**Tabela 19.** Klinički karakteristike prematurusa u zavisnosti od *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma

Klinički faktori	GG	GA	AA	P vrednost	GG+GA	AA	P vrednost
GN*	29,12 ±3,42	28,85 ±3,61	28,75 ±3,35	0,656	28,98 ±3,52	28,75 ±3,35	0,678
PTM*	1214,0 ±475,94	1183,69 ±478,15	1174,88 ±537,42	0,772	1198,88 ±476,73	1174,88 ±537,42	0,758
AS 5'*	4,57 ±2,43	4,42 ±2,59	3,88 ±2,5	0,262	4,5 ±2,51	3,88 ±2,5	0,129
Letalni ishod %	102/215 47,4	98/214 45,8	28/42 66,7	<b>0,043</b>	200/429 46,6	28/42 66,7	<b>0,013</b>
RDS %	198/215 92,1	203/214 94,9	42/42 100,0	0,112	401/429 93,5	42/42 100,0	0,088
BPD %	20/215 9,3	15/214 7,0	3/42 7,1	0,666	35/429 8,2	3/42 7,1	0,818
IVH %	35/215 16,3	35/214 16,4	6/42 14,3	0,943	70/429 16,3	6/42 14,3	0,733
Metabolička acidoza %	144/215 67,0	145/214 67,8	35/42 83,3	0,102	289/429 67,4	35/42 83,3	<b>0,033</b>

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 19. može se zaključiti da:

- ne postoji statistički značajna razlika u ispoljavanju kliničkih karakteristika (GN PTM, AS 5', pojavu RDS, IVH) prematurusa u zavisnosti od genotipova *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma. Ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu nisu uočene statistički značajne razlike između grupa u ispoljavanju navedenih kliničkih karakteristika.
- statistički značajna razlika uočava se u pojavi letalnog ishoda između prematurusa pojedinačnih genotipova kao i nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu ( $\chi^2 = 6,156$ ;  $p = 0,013$ ; OR = 2,290; 95% IC 1,173 - 4,471). Učestalost letalnog ishoda statistički je značajno viša kod nosioca AA genotipa.
- posle grupisanja genotipova po recesivnom modelu uočava se statistički značajno češće ispoljavanje metaboličke acidoze kod nosioca AA genotipa ( $\chi^2 = 4,543$ ;  $p = 0,033$ ; OR = 0,413; 95% IC 0,179 - 0,953).

Uticao pojedinačnih genotipova polimorfizma *IL1 $\beta$*  -511 G/A i genotipova ovog polimorfizma udruženih po recesivnom modelu na odstupanja laboratorijskih pokazatelja sepse predstavljen je u tabeli 20.

**Tabela 20.** Odstupanje laboratorijskih pokazatelja od normalnih vrednosti u zavisnosti od genotipova *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma

Laboratorijski pokazatelji	GG	GA	AA	P vrednost	GG+GA	AA	P vrednost
Povišen CRP %	108/208 51,9	95/201 47,3	23/40 57,5	0,409	203/409 49,6	23/40 57,5	0,342
Leukopenija %	1/215 0,5	3/214 1,4	1/42 2,4	0,772	4/429 0,9	1/42 2,4	0,647
Leukocitoza %	51/215 23,7	52/214 24,3	9/42 21,4		103/429 24,0	9/42 21,4	
Neutopenija %	4/213 1,9	6/212 2,8	0/41 0,0	0,375	10/425 2,4	0/41 0,0	0,554
Neutrofilija %	91/213 42,7	106/212 50,0	18/41 43,9		197/425 46,4	18/41 43,9	
Povišeni PMN %	147/212 69,3	165/212 77,8	30/41 73,2	0,140	312/424 73,6	30/41 73,2	0,954
Povišeni nezreli PMN %	78/212 36,8	85/212 40,1	13/41 31,7	0,545	163/424 38,4	13/41 31,7	0,396
Povišen I:T %	54/212 25,5	47/212 22,2	9/41 22,0	0,700	101/424 23,8	9/41 22,0	0,788
Povišen I:M %	16/212 7,5	20/212 9,4	2/41 4,9	0,562	36/424 8,5	2/41 4,9	0,420
Toksične strukture u PMN %	125/212 59,0	123/212 58,0	21/41 51,2	0,654	248/424 58,5	21/41 51,2	0,368
Trombocitopenija %	99/215 46,0	92/214 43,0	21/42 50,0	0,648	191/429 44,5	21/42 50,0	0,496
Imunoterapija %	15/215 7,0	7/214 3,3	2/42 4,8	0,217	22/429 5,1	2/42 4,8	0,918
Rodwell $\geq 3$ %	138/215 64,2	138/214 64,5	28/42 66,7	0,954	276/429 64,3	28/42 66,7	0,763
Töllner $\geq 3$ %	182/215 84,7	170/214 79,4	39/42 92,9	0,073	352/429 82,1	39/42 92,9	0,075

Rezultati predstavljeni u tabeli 20 pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti odsupanja praćenih laboratorijskih parametara od normalnih vrednosti,

Rodwell-ovog i Töllner-ovog skora, te primljene imunoterapije u zavisnosti od različitih *IL1 $\beta$*  -511 G/A genotipova, kao ni grupisanih genotipova po recesivnom modelu.

Takođe, analizirali smo karakteristike vezane za trudnoću (IVF, tip rađanja, patološka plodova voda, patološka posteljica i medikamentne terapije majke tokom trudnoće) u zavisnosti od *IL1 $\beta$*  -511 G/A genotipa.

**Tabela 21.** Karakteristike koje se odnose na trudnoću u zavisnosti od genotipova *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma

Kliničke karakteristike	GG	GA	AA	P vrednost	GG+GA	AA	P vrednost
IVF %	45/215 20,9	42/214 19,6	6/42 14,3	0,612	87/429 20,3	6/42 14,3	0,352
Carski rez %	119/215 55,3	94/214 43,9	23/42 54,8	<b>0,050</b>	216/429 50,3	19/42 45,2	0,527
Patološka plodova voda %	41/180 22,8	43/180 23,9	9/32 28,1	0,805	84/360 23,3	9/32 28,1	0,541
Patološka posteljica %	7/215 3,3	14/214 6,5	2/42 4,8	0,627	21/429 4,9	2/42 4,8	0,987
Antibiotska terapija %	58/215 27,0	70/214 32,7	11/42 26,2	0,379	128/429 29,8	11/42 26,2	0,621
Kortikosteroidna terapija %	98/215 45,6	90/214 42,1	17/42 40,5	0,699	188/429 43,8	17/42 40,5	0,676

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da postoji razlika na granici statističke značajnosti u učestalosti tipa porođaja između prematurusa sa različitim genotipom. Nosioци genotipa GA su najčešće rađani prirodnim putem. Grupisanjem genotipova po recesivnom modelu ova statistička razlika se gubi. Ostali parametri koje smo pratili nisu pokazali statistički različitu distribuciju u odnosu na genotipove *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma.

## 4.6. REZULTATI MOLEKULARNO – GENETIČKIH ANALIZA UDRUŽENIH POLIMORFIZAMA

Analizirali smo distribuciju udruženih genotipova po dva polimorfizma koji su grupisani po dominantnom ili recesivnom modelu, između grupa prematurusa sa hemokulturom potvrđenom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi.

Prva dva polimorfizma čije smo udružene genotipove pratili su *TNF $\alpha$  -308 G/A* i *IL6 -174 G/C* (tabela 22.).

**Tabela 22.** Distribucija udruženih genotipova polimorfizama *TNF $\alpha$  -308 G/A* i *IL6 -174 G/C* grupisanih po dominantnom i recesivnom modelu kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi.

<i>TNF<math>\alpha</math>/IL6</i>	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
GG+GA/GG %	93 61,6	87 66,4	138 73,0	0,148
GG+GA/GC+CC %	17 11,3	12 9,2	21 11,1	
AA/GG %	38 25,2	31 23,7	26 13,8	
AA/GC+CC %	3 1,9	1 0,7	4 2,1	

Učestalosti udruženih genotipova polimorfizama *TNF $\alpha$  -308 G/A* i *IL6 -174 G/C* grupisanih po dominantnom (GG/GA+AA) i recesivnom (GG+GC/CC) modelu ne pokazuju statistički različitu razliku između prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi.

Takođe, analizirali smo kliničke karakteristike (GN, PTM, AS 5', RDS, BPD, IVH, metabolička acidoza i ishod lečenja) u odnosu na udružene genotipove polimorfizama grupisane po dominantnom i recesivnom modelu.

**Tabela 23.** Kliničke karakteristike prematurusa po udruženim genotipovima polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL6* -174 G/C grupisanim po dominantnom i recesivnom modelu

Kliničke karakteristike	GG/GG+GC	GG/CC	GA+AA/GG+GC	GA+AA/CC	p vrednost
GN*	29,04±3,55	28,74±3,62	28,90±3,32	28,25±3,37	0,873
PTM*	1216,64 ±489,63	1148,50 ±485,92	1165,47 ±459,99	1079,75 ±419,54	0,590
AS 5'	4,48±2,51	4,28±2,70	4,39±2,42	4,50±2,51	0,953
Letalni ishod %	155/318 48,7	24/50 48,0	46/95 48,4	3/8 37,5	0,941
RDS %	297/318 93,4	47/50 94,0	91/95 95,8	8/8 100,0	0,738
BPD %	19/318 6,0	3/50 6,0	14/95 14,7	2/8 25,0	<b>0,012</b>
IVH %	54/318 17,0	5/50 10,0	15/95 15,8	2/8 25,0	0,566
Metabolička acidoza %	214/318 67,3	34/50 68,0	72/95 75,8	4/8 50,0	0,281

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Analiza podataka iz tabele 23. pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti ispoljavanja bronhopulmonalne displazije između grupa udruženih genotipova za polimorfizme *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL6* -174 G/C grupisanih po dominantnom (GG/GA+AA) i recesivnom (GG+GC/CC) modelu. Učestalost ispoljavanja BPD je statistički značajno veća kod prematurusa nosioca alela A za *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizam.

Ostale ispitivane kliničke karakteristike ne pokazuju statistički značajnu razliku u ispoljavanju u zavisnosti od udruženih genotipova.

**Tabela 24.** Distribucija udruženih genotipova polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL1 $\beta$*  -511 G/A grupisanih po dominantnom i recesivnom modelu kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi.

<i>TNF<math>\alpha</math>/IL1<math>\beta</math></i>	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
GG+GA/GG %	100 66,2	83 63,4	151 80,0	<b>0,002</b>
GG+GA/GA+AA %	10 6,7	16 12,2	8 4,2	
AA/GG %	39 25,8	27 20,6	29 15,3	
AA/GA+AA %	2 1,3	5 3,8	1 0,5	

Analiza podataka učestalosti udruženih genotipova polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL1 $\beta$*  -511 G/A grupisanih po dominantnom (GG/GA+AA) i recesivnom (GG+GA/AA) modelu (tabela 24.) pokazala je da postoji statistički značajno veća učestalost udruženih genotipova koji uključuju AA genotip polimorfizma *IL1 $\beta$*  -511 G/A (GG/AA i GA+AA/AA) u grupi prematurusa sa kliničkom sepsom.

**Tabela 25.** Kliničke karakteristike prematurusa po udruženim genotipovima polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL1 $\beta$*  -511 G/A grupisanim po dominantnom i recesivnom modelu

Kliničke karakteristike	GG/GG+GA	GG/AA	GA+AA/GG+GA	GA+AA/AA	p vrednost
GN*	29,00±3,55	28,97±3,61	28,94±3,4	27,81±1,77	0,825
PTM*	1206,17 ±481,88	1219,26 ±562,35	1173,26 ±459,70	986,25 ±388,11	0,583
AS 5'*	4,51±2,54	3,94±2,56	4,46±2,42	3,63±2,39	0,489
Letalni ishod %	156/334 46,7	23/34 67,6	44/95 46,3	5/8 62,5	0,101
RDS	310/334 92,8	34/34 100,0	91/95 95,8	8/8 100,0	0,252
BPD	21/334 6,3	1/34 2,9	14/95 14,7	2/8 25,0	<b>0,010</b>
IVH	54/334 16,2	5/34 14,7	16/95 16,8	1/8 12,5	0,983
Metabolička acidoza	220/334 65,9	28/34 82,4	69/95 72,6	7/8 87,5	0,102

\*srednja vrednost ± jedna standardna devijacija

Analiza podataka iz tabele 25. pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti ispoljavanja bronhopulmonalne displazije između grupa udruženih genotipova za polimorfizme *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL1 $\beta$*  -511 G/A grupisanih po dominantnom (GG/GA+AA) i recesivnom (GG+GA/AA) modelu. Učestalost ispoljavanja BPD statistički je značajno veća kod prematurusa nosioca alela A za *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizam.

Ostale ispitivane kliničke karakteristike ne pokazuju statistički značajnu razliku u ispoljavanju u zavisnosti od udruženih genotipova polimorfizama *TNF $\alpha$*  -308 G/A i *IL1 $\beta$*  -511 G/A.

Učestalosti udruženih genotipova polimorfizama *IL6* -174 G/C i *IL1 $\beta$*  -511 G/A grupisanih po recesivnom modelu kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi prikazane su u tabeli 26.



**Tabela 26.** Distribucija udruženih genotipova polimorfizama *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* grupisanih po recesivnom modelu kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i u kontrolnoj grupi.

<i>IL6/IL1<math>\beta</math></i>	Potvrđena sepsa	Klinička sepsa	Kontrolna grupa	p vrednost
GG+GC/GG+GA %	121 80,1	99 75,6	156 82,6	<b>0,035</b>
GG+GC/AA %	10 6,7	19 14,5	8 4,2	
CC/GG+GA %	18 11,9	11 8,4	24 12,7	
CC/AA %	2 1,3	2 1,5	1 0,5	

Analiza učestalosti udruženih genotipova polimorfizama *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* grupisanih po recesivnom modelu (GG+GC/CC i GG+GA/AA) (tabela 26.) pokazala je da postoji statistički značajno veća učestalost udruženih genotipova koji uključuju AA genotip polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* (GG+GC/AA i CC/AA) u grupama prematurusa sa sepsom.

**Tabela 27.** Kliničke karakteristike prematurusa po udruženim genotipovima polimorfizama *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* grupisanim po recesivnom modelu

Klinički faktori	GG+GC/GG+GA	GG+GC/AA	CC/GG+GA	CC/AA	p vrednost
GN*	29,03±3,52	28,70±3,20	28,63±3,48	29,10±4,76	0,840
PTM*	1210,41 ±483,42	1148,51 ±480,53	1117,08 ±421,31	1370,00 ±910,08	0,430
AS 5’*	4,52±2,49	3,81±2,45	4,30±2,64	4,40±3,13	0,406
Letalni ishod %	177/376 47,1	24/37 64,9	23/53 43,4	4/5 80,0	0,078
RDS %	351/376 93,4	37/37 100,0	50/53 94,3	5/5 100,0	0,392
BPD %	30/376 8,0	3/37 7,9%	5/53 9,4	0/5 0,0	0,902
IVH %	63/376 16,8	6/37 7,9%	7/53 13,2	0/5 0,0	0,704
Metabolička acidoza %	255/376 67,8	31/37 83,8	34/53 64,2	4/5 80,0	0,182

Analiza podataka iz tabele 27. pokazala je da nema statistički značajne razlike u učestalosti ispoljavanja RDS, BPD, IVH i metaboličke acidoze između grupa udruženih genotipova za polimorfizme *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A* grupisanih po recesivnom modelu. Učestalost letalnog ishoda veća je kod prematurusa nosioca udruženih genotipova sa AA genotipom *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma (GG+GC/AA i CC/AA), ali ne dostiže statističku značajnost ( $p = 0,078$ ).

Ostale ispitivane kliničke karakteristike ne pokazuju statistički značajnu razliku u ispoljavanju u zavisnosti od udruženih genotipova polimorfizama *IL6 -174 G/C* i *IL1 $\beta$  -511 G/A*.

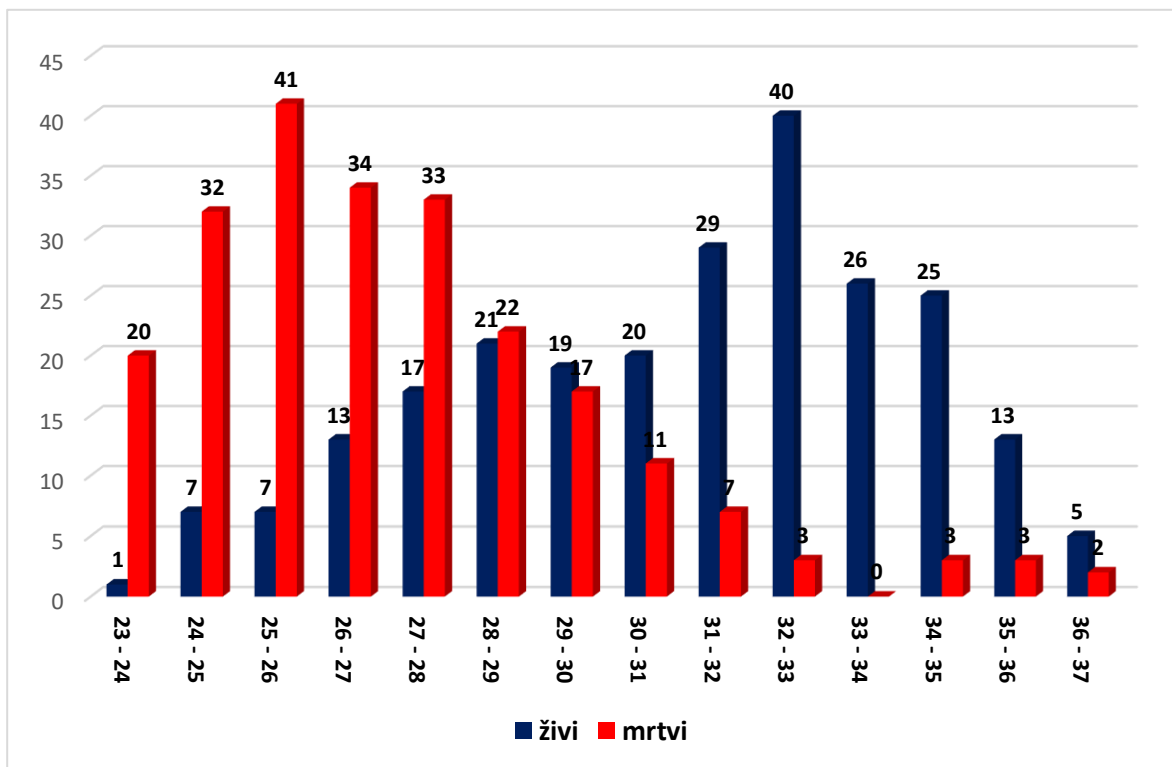
## 5. DISKUSIJA

Sepsa predstavlja sistemsku bolest koje nastaje kao posledica nekontrolisanog imunološkog odgovora organizma izazvanog invazijom patogena na normalno sterilno tkivo (96). Prevrneno rođena deca su posebno osetljiva na nastnak sepse, pa jedna trećina prematurusa razvije sepsu (31, 97, 98). Visoka incidenca sepse u populaciji prematurusa posledica je složenih interakcija između imunog sistema majke i nezrelog fetalnog imunog sistema modifikovanog genetičkim faktorima fetusa (99, 100, 101). Nivo citokina, kao glavnih medijatora u patofiziologiji sepse, pokazuje inter individualno variranje koje zavisi od uzrasta, genetičkih faktora i faktora sredine (71). U poređenju sa populacijom odraslih osoba, podaci o aktivaciji, oslobađanju i efektu citokina tokom sepse za populaciju prematurusa su manje poznati.

Da bi se utvrdilo da li polimorfna varjanta predstavlja predispoziciju za ispoljavanje poremećaja primenjuju se studije asocijacije u kojima se ispituje udruženost ispitivanog oboljenja sa određenim genskim varijantama. Istraživanja genskih varijanti citokina u neonatalnoj populaciji su malobrojna, a rezultati tih istraživanja su nedosledni i često kontradiktorni (102, 103).

Naša studija predstavlja genetičku studiju asocijacije sprovedenu na populaciji prematurusa koji su bili hospitalizvani na Institutu za neonatologiju u Beogradu. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno 471 prematurusa, od toga 256 (54,4%) prematurusa muškog i 215 (45,6%) prematurusa ženskog pola. Najmanja gestacijska starost na rođenju prematurusa hospitalizovanih na Institutu bila je 23 nedelje.

Preživljavanje, odnosno smrtnost, prematurusa stratifikovano po GN prikazano je u Grafikonu 10. Sa povećanjem gestacijske starosi povećava se verovatnoća preživljavanja prevremeno rođene dece. Dobijena učestalost preživljavanja prematurusa po GN je očekivana i povezana je sa fiziološkim i anatomskim sazrevanjem fetusa tokom intrauterinog života (69). Odnos preživelih i umrlih se menja u korist preživelih u grupi rođenih u 29 GN, što se poklapa sa početkom perinatalnog perioda fetusa.



**Grafikon 10.** Broj preživelih/preminulih prematurusa stratifikovano po gestacijskoj starosti na rođenju (32.)

Istraživanjem je obuhvaćen 151 prematurus, kod kojeg je sepsa potvrđena hemokulturom i 131 prematurus kod kojeg je hemokultura bila negativna, a sepsa je dijagnostikovana na osnovu kliničkih i drugih laboratorijskih pokazatelja. Kontrolnu grupu činilo je 189 prematurusa koji tokom hospitalizacije na Institutu za neonatologiju nisu imali ni jednu epizodu generalizovane ili lokalne infekcije. Kod ispitivanih prematurusa sa pozitivnim nalazom hemokulture, gram – negativne bakterije su u 69,7% slučajeva izazvale sepsu. Najčešći izolovani uzročnik bio je *Acinetobacter*. Kod čak 47,7% prematurusa ova gram-negativna bakterija je utvrđeni uzročnik rane neonatalne sepse. Bakteriološki profil uzročnika neonatalne sepse varira između regiona i populacija i menja se tokom vremena (104). Brojne studije ukazuju da je gram - pozitivna bakterija *Streptococcus* grupe B (GBS) dominantni uzročnik ENOS u razvijenim zemljama (20, 105, 106, 107). Međutim,

epidemiološki trendovi pokazuju smanjenje učestalosti ovog patogena kao uzročnika rane sepse, što je rezultat prenatalnog skrininga i primene intraportalne antibiotske terapije (108, 109, 110). Poslednje tri decenije vrste roda *Acinetobacter sp.* postale su važan uzročnik različitih nozokomijalnih infekcija kao što su infekcije donjeg respiratrnog trakta, krvotoka, urinarnog trakta (111). Velika upotreba antibiotika, pre svega preventivnih antibiotskih tretmana u jedinicama intenzivne nege, stvara mogućnost pojave bakterijske rezistencije. Prema studiji Cisnerosa i saradnika osetljivost *Acinetobakter baumannii* na antibiotik širokog spektra imipenem 1991. godine bila je 100%, a već 2000. godine smanjila se na 50% (112). Neke studije ukazuju na povezanost genitalne infekcije majke vrstom *A. baumannii* sa povećanim rizikom od spontanog pobačaja, prevremenih porođaja, horioamnionitisa i perinatalne smrti (113, 114, 115). Sve veći broj studija uglavnom sa bliskog istoka i sa područja Azije pokazuje da vrste roda *Acinetobacter* postaju dominantni uzročnik rane neonatalne sepse u ovim populacijama (116, 117, 118, 119).

Drugi po učestalosti uzročnik ENOS kod ispitivanih prematurusa je CoNS. Ova gram-pozitivna bakterija često se navodi kao drugi najčešći uzročnik neonatalne sepse i u razvijenim zemljama (120, 121). Učestalost drugih bakterijskih vrsta u indukovanju neonatalne sepse kod naših ispitanika slična je kao u drugim studijama (20, 21, 122). Za razliku od drugih istraživanja, u kojima se *Escherichia coli* navodi kao drugi po učestalosti uzročnik EONS-a zajedno sa CoNS (1, 107, 123), u našoj studiji *Escherichia coli* je bila uzročnik EONS samo kod jednog prematurusa (0,7%).

Pneumonija je najčešća lokalna infekcija koja se javlja kod naših prematurusa što je posledica primarne ekspozicije respiratornog trakta tokom porođaja, a posebno ukoliko se prvi udah deteta tokom rađanja desi intrauterino i dođe do aspiracije plodove vode (124). Koža i sluzokoža prematurusa su tanje i nepotpuno razvijene u odnosu na terminsko dete, pa samim tim predstavljaju slabiju barijeru za prodor patogena u organizam. Ostale lokalne infekcije: meningitis, otitis, gastroenteritis, infekcija urinarnog trakta i nekrotični enterokolitis, znatno se ređe javljaju kod naših ispitanika, a njihovo zajedničko učešće u odnosu na sveukupni broj registrovanih lokalnih infekcija čini nešto manje od 40%.

S obzirom da nema statistički značajne razlike u učestalosti muškog, odnosno ženskog pola kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom, kliničkom sepsom i kontrolne grupe u našoj studiji, možemo zaključiti da pol ne predstavlja faktor rizika za nastanak rane neonatalne sepse. Međutim, podaci iz literature navode da je muški pol faktor rizika za EONS, odnosno da se EONS češće dijagnostikuje kod prematurusa muškog pola (1, 6, 32). Takođe, kod ispitivanih prematurusa anomalije nisu faktor rizika za nastanak EONS.

Statistički značajna razlika između ispitivanih prematurusa sa EONS i kontrolne grupe, utvrđena je za vrednosti GN, PTM i AS 5' i preživljavanje. Prematurusi iz kontrolne grupe imaju statistički značajno više vrednosti GN na rođenju, PTM i AS 5' u odnosu na prematuruse sa hemokulturom potvrđenom sepsom i one sa kliničkom sepsom. Ovakvi rezultati su u skladu sa dosadašnjim saznanjima da su prematurusi manje GN, PTM na rođenju i AS podložniji infekciji odnosno ova stanja predstavljaju faktore rizika za dobijanje neonatalne sepse. Manja gestacijska starost je u direktnoj korelaciji sa telesnom masom prematurusa, ali i sa zrelošću i efikasnošću imunog sistema da se odbrani od invazije patogena. Prematurusi rođeni pre 30 GN nemaju razvijen urođeni imuni sistem, a transmisija maternalnog – pasivnog imuniteta je značajno manja nego u poslednjem trimestru (125). Zbog nepotpune fiziološke razvijenosti organskih sistema i neurološke nezrelosti, prematurusi manjih GN dobijaju niže vrednosti AS. (126). AS indirektno ukazuje i na imunološku nezrelost, a samim tim i na podložnost infekcijama.

Letalni ishod bio je statistički značajno češći kod prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom i sa suspektom sepsom u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav rezultat potvrđuje stanovište struke da je neonatalna sepsa još uvek glavni uzrok mortaliteta među prevremeno rođenom decom u prvim danima života (127, 128).

Respiratorni distres sindrom (RDS) ili hijalinomembranska bolest javlja se zbog nedovoljne sinteze plućnog surfaktanta, a najvažniji faktor rizika za nastanak RDS-a je prevremeno rođenje. Učestalost RDS-a kod prematurusa  $\leq 28$  GN dostiže 80% (126). Ovo je razlog zašto se RDS javlja podjednako često i među prematurusima koji su imali potvrđenu/kliničku sepsu i onih iz kontrolne grupe, s obzirom da je skoro polovina

prematurusa u našoj studiji imalo  $GN \leq 28$  (srednja vrednost za starost prematurusa ~ 29GN).

Ostala dva klinička faktora: interkranijalna hemoragija III i IV stepena i bronhopulmonalna displazija statistički su značajno učestaliji u grupama prematurusa sa hemokulturom potvrđenom ili samo kliničkom sepsom u odnosu na grupu prematurusa koji su činili kontrolnu grupu. Naime, učestalost pojavljivanja IVH je obrnuto proporcionalna sa GN, a s obzirom da su sepsi podložnija deca koja su na rođenju imala manju GN, upravo kod tih prematurusa se češće javlja IVH koja je povezana sa fragilnošću kapilara. Ova pojava je u tesnoj vezi sa asfiksničnim oštećenjima, koja nastaju kao posledica porođajne traume i naglog porođaja (129).

Incidencija bronhopulmonalne displazije bila je statistički značajno viša u grupi prematurusa sa klinički potvrđenom sepsom i hemokulturom potvrđenom sepsom u odnosu na prematuruse iz kontrolne grupe. Najveći rizik za razvoj ovog oboljenja imaju prevremeno rođena deca ( $< 32GN$  na rođenju) male PTM ( $< 1500g$ ). Ova deca rađaju se sa nezrelim plućima u kanalikularnoj i sakularnoj fazi razvoja uz čestu incidencu akutnog respiratornog problema uzrokovanog RDS-om. Osim toga često su podvrgnuta intenzivnim i invazivnim metodama lečenja koja istovremeno povećavaju rizik od nastanka BPD. Dodatni faktor rizika za razvoj BPD je prenatalno pokrenuta inflamacija i dejstvo medijatora inflamacije koji predstavljaju okidač za nastanak oštećenja pluća koje se nastavljaju nakon rođenja i praćena su mnogobrojnim insultima i s druge strane intenzivnim procesom konkomitentne reparacije (130).

Većina laboratorijskih pokazatelja sepse (CRP, broj leukocita, neutrofila, nezrelih PMN, trombocita, toksičnih struktura u PMN, bazni deficit i pH vrednost krvi) pokazuje statistički značajno češće odstupanje od normalnih vrednosti kod prematurusa sa EONS u odnosu na kontrolnu grupu. S obzirom da su odstupanja ovih hematoloških pokazatelja od normalnih vrednosti posledica patofiziološkog razvoja inflamatornog odgovora organizma, očekivano je da će se češće javiti kod prematurusa sa EONS u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Samim tim Rodwell skor je statistički značajno češće pozitivan u grupama prematurusa sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom u odnosu na kontrolnu

grupu. Ovakav trend kod ispitivanih grupa prematurusa pokazao je i pozitivan ( $\geq 3$ ) Töllner skor. Osim toga, kod prematurusa sa EONS je statistički značajno češće primenjena imunoterapija. Između analiziranih grupa prematurusa nema značajnog odstupanja od normalnih vrednosti u broju PMN, kao i u odnosu I:T i odnosu I:M.

U nastanku rane neonatalne sepse važnu ulogu imaju maternalni faktori rizika, pre svega infekcije tokom trudnoće i hronične bolesti majke. Međutim, faktore rizika za nastanak rane sepse neonatusa mogu predstavljati i način začeća, način porođaja, kao i da li je bila u pitanju jednoplodna ili višeplodna trudnoća. Od posmatranih parametara koji se odnose na majku i trudnoću, statistički značajna razlika između ispitivanih grupa prematurusa uočava se za: tip začeća (prirodni/IVF), tip porođaja (vaginalni/carski rez), patološku plodovu vodu i patološku posteljicu, kao i primenu kortikosteroida i antihipertenziva i/ili tokolitika u terapiji majki tokom trudnoće. Učestalost prematurusa začetih IVF procedurom u kontrolnoj grupi je statistički značajno veća nego u druge dve grupe prematurusa. Ovo se može objasniti aktivnijim praćenjem toka trudnoće i većim brojem pregleda i analiza kod žena koje su trudnoću ostvarile biomedicinski potpomognutom oplodnjom. Time se redukuju faktori rizika za razvoj rane neonatalne sepse, adekvatnim terapijskim i pravovremenim lečenjem. U našoj studiji statistički značajno veći broj prematurusa u kontrolnoj grupi je rođen carskim rezom. Ovo je očekivano i u skladu sa podacima iz literature, koji ukazuju da se transmisija mikroorganizama sa majke na dete uglavnom dešava tokom prolaska bebe kroz porođajni kanal (19, 131).

Patološko stanja plodove vode se prema rezultatima naše studije najčešće sreće u grupi prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom. S druge strane patološka posteljica je značajno ređe uočena kod majki prematurusa sa kliničkom sepsom.

Poznato je da antenatalna primena kortikosteroidne terapije do 34 GN značajno redukuje incidencu RDS i IVH, samim tim i mortalitet prematurusa (132, 133). Mehanizam delovanja terapije kortikosteroidima uključuje povećanje fetalne produkcije kortikosteroida i povećanu ekspresiju glukokortikoidnih receptora, što ubrzava sazrevanje pneumocita tip II, povećava produkciju plućnog surfaktanta i alveolizaciju respiratornog sistema (134,



135). Statistički je značajno veći broj prematurusa iz kontrolne grupe čije su majke tokom trudnoće primile antenatalnu kortikosteroidnu terapiju nego u grupi prematurusa sa hemokulturom potvrđenom odnosno kliničkom sepsom. Naši rezultati ukazuju da antenatalna primena kortikosteroida ima protektivnu ulogu na nastanak sepse kod prematurusa. Ovo možemo objasniti uspešnošću primenjene kortikosteroidne terapije koja ubrzava sazrevanje pluća pa se kod prematurusa čije su majke primile terapiju ređe se javljaju komplikacije vezane sa asfiksijom, uključujući infekcije. Malobrojni podaci o efektu antenatalne steroidne terapije na intrauterinu infekciju, kao što su rezultati meta analize Been i saradnika pokazuju da antenatalni steroidi smanjuju nepovoljan neonatalni ishod nakon prevremenog porođaja povezanog sa horioamnionitisom (136).

Samo antihipertenzivnu ili samo tokolitičku terapiju su znatno češće primale majke prematurusa iz kontrolne grupe. Ove terapije su indikovane u stanjima majke koja predstavljaju faktore rizike za prevremeni porođaj (137). Međutim, terapija i antihipertenzivima i tokoliticima istovremeno, podjednako je primenjivana kod majki u sve tri grupe prematurusa.

Studijom je utvrđeno da starost majke i višepodna trudnoća su bili faktori rizika za nastanak EONS-a u našoj ispitivanoj grupi prematurusa. Takođe, nije uočena razlika u učestalosti primene antibiotske terapije između majki prematurusa sa sepsom i majki prematurusa kontrolne grupe.

TNF $\alpha$  proizvode mononukleari placente i fetalne Kupferove ćelije kao odgovor na stimulaciju PAMP-a i LPS-a tokom drugog i trećeg trimestra intrauterinog života (138, 139). Prematurusi rođeni pre 30 GN trudnoće imaju smanjenu LPS stimulisanu produkciju i sekreciju TNF $\alpha$  u odnosu na terminske neonatuse odnosno odrasle osobe (140). Neka istraživanja ukazuju na značajno smanjenu produkciju ovog medijatora od strane monocita krvi iz pupčane vrpce (141-144). Smanjenu produkciju pokazuju i kultivisani monociti i makrofagi iz krvi pupčanika neonatusa nakon LPS stimulacije u odnosu na isti tip ćelija odraslih osoba (141, 145). Usled ovakve fetalne produkcije TNF $\alpha$ , koji ima prominentnu ulogu u indukciji imunog odgovora, očekivano je veća podložnost neonatusa i prematurusa infekcijama, a posebno osetljivu grupu čine ekstremno nezreli prematurusi.

Brojna istraživanja ukazuju da genski polimorfizmi u *TNF $\alpha$*  genu utiču na osetljivost i otpornost na infekciju (146, 147, 148). Podacima iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Centar for Biotechnology Information* – NCBI) (149) o učestalosti alela u globaloj, pojedinim humanim populacijama i našoj grupi prematurusa tabelarno su prikazani u sledećoj tabeli:

**Tabela 28.** Učestalosti alela i genotipova *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma u globalnoj, većim humanim populacijama i našoj studiji

<b>Populacija</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>
Globalna populacija	0,88	0,12	0,83	0,16	0,01
Evropska	0,84	0,16	0,74	0,25	0,01
Istočno Azijska	0,92	0,08	0,89	0,11	0,00
Američka	0,94	0,06	0,86	0,13	0,01
Afrička	0,88	0,12	0,77	0,22	0,01
<b>Srbija – prematurusi</b>	0,89	0,11	0,78	0,21	0,01

Naša studija je pokazala da učestalosti alela *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma u ispitivanoj populaciji prematurusa ne odstupa od učestalosti alela u globalnoj populaciji. Sličnosti u učestalosti genotipova ovog polimorfizma uočene su između naše studije i evropske populacije (tabela 28.) Podaci o učestalosti genotipova u opštoj i populacijama različitih kontinenata preuzeti su iz Ensembl baze podataka (150).

U našoj studiji, prematurusi nosioci ređeg alela A (AA i GA) za *TNF $\alpha$*  -308 G/A varijantu su podložniji ranoj neonatalnoj sepsi. Svi nosioc AA genotipa razvili su EONS. Ispitivanjem nakon udruživanja genotipova po dominantnom modelu (GG/GA+AA), potvrđeno je da su prematurusi sa sepsom statistički značajno češće nosioci alela A u odnosu na kontrolnu grupu. Neka istraživanja ukazuju da upravo alel A, koji se još obeležava i kao *TNF2*, može biti povezan sa značajnim povećanjem nivoa transkripcije

*TNF $\alpha$*  (83, 151, 152). Povećana sinteza i oslobađanje *TNF $\alpha$*  u akutnoj fazi inflamatornog odgovora pokreće oslobađanje ostalih proinflamatornih citokina, amplifikujući inflamatorni odgovor (153). U slučaju fetalnog inflamatornog odgovora ova prekomerna produkcija citokina lako može dovesti do oštećenja krhkih fetalnih tkiva i komplikacija povezanih sa sepsom.

Studije koja su ispitivale povezanost ovog polimorfizma *TNF $\alpha$*  sa nastankom neonatalne sepse su malobrojne, a njihovi rezultati su kontradiktorni. Härtela i saradnici, ispitivanjem dve velike kohortne studije, koje su obuhvatile 2870 VLBW prematurusa pokazali su da ne postoji povezanost *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma sa hemokulturom potvrđenom sepsom kod ovih prematurusa (154). Suprotno našim rezultatima, istraživanje Allama i saradnika na terminskim neonatusima pokazalo je povezanost G alela ovog polimorfizma sa EONS (155). Do sličnog rezultata došla je i Srinivasan sa saradnicima u svojoj meta analizi na neonatusima, ukazavši da nosioci GG genotip *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma pokazuju trend povećanog rizika od sepse (156). Meta analiza Wanga i saradnika u kojoj su objedinjeni rezultati 34 publikacije sa ukupno 12284 ispitanika ukazala je da genotipovi *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma udruženi po dominantnom modelu doprinose riziku od sepse i seprtičkog šoka kod kavkazoidnih ispitanika. Naši rezultati su u skladu sa navedenom meta analizom uz napomenu da je ona obuhvatala ispitanike različitih starosnih grupa, odnosno samo 4 studije na neonatusima koje su zajedno doprinele studiji sa 3279 ispitanika (157). Kontradiktorni rezultati istraživanja na prematurusima mogu biti posledica razlika u dizajnu studija, etničke pripadnosti ispitanika kao i male veličine uzorka.

Ispitali smo da li *TNF $\alpha$ -308 G/A* polimorfizam utiče na smrtnost od rane sepse među prematurusima sa sepsom (hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom). Naši rezultati su pokazali da ovaj polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za mortalitet od rane neonatalne sepse kod prematurusa. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizma kao i udruženih genotipova po dominantnom modelu između prematurusa sa sepsom koji su hospitalizaciju na Institutu za neonatologiju završili u dobrom opštem stanju ili smrtnim ishodom. Do istog zaključka

došli su i Wang sa saradnicima u svojoj meta analizi (157). Nasuprot našim rezultatima, Hedberg sa saradnicima pokazao je u svom istraživanju jaku povezanost GA i AA genotipova sa smrtnošću od neonatalne sepse (158).

Nadalje smo hteli da utvrdimo da li polimorfizam *TNF $\alpha$  -308 G/A* utiče na kliničke karakteristike, GN, PTM i AS '5 u našoj grupi prematurusa. Rezultati sprovedenih analiza pokazuju da nema statistički značajne razlike u srednjim vrednostima GN, PTM i AS'5 između prematurusa sa različitim *TNF $\alpha$  -308 G/A* genotipovima, kao i između prematurusa sa genotipovima grupisanim po dominantnom modelu. Ipak, uočava se da su srednje vrednosti GN, PTM i AS '5 najniže u grupi prematurusa koji su AA homozigoti. Analizom svih prematurusa u našoj studiji uočeno je da *TNF $\alpha$  -308 G/A* genotip kao nezavistan faktor nije uticao na letalni ishod. Takođe, učestalost prematurusa kod kojih je dijagnostikovano RDS, IVH i metabolička acidoza bila je približno ista u sve tri grupe genotipa. Razlike u učestalosti praćenih kliničkih faktora nisu uočene i nakon grupisanja genotipova. Ovakav rezultat nam ukazuje da genotip ne utiče na razvoj RDS, IVH i metaboličke acidoze u našoj grupi prematurusa. Studije koje ispituju uticaj genskih varijanti na pojavu RDS su malobrojne. RDS se veoma često registruje kod prematurusa što je posledica fiziološke nezrelosti organizma i nemogućnosti sintetisanja surfaktanata. U novijoj studiji, na populaciji prematurusa iz Irana, dobijeni su rezultati koji su u skladu sa našim i ukazuju da *TNF $\alpha$  -308 G/A* polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za razvoj RDS-a (159). Naši rezultati o uticaju ovog polimorfizma na pojavu IVH kod prematurusa u skladu su sa drugim istraživanjima i ističu da isti ne predstavlja faktor rizika za razvoj IVH (160, 161). Statistički visoko značajna razlika uočava se u učestalosti ispoljavanja BPD između prematurusa sa različitim *TNF $\alpha$  -308 G/A* genotipom, što se potvrđuje i dominantnim modelom. Nosioci A alela imaju veće šanse da razviju ovo hronično obolenje pluća. Ovakvi rezultati su očekivani s obzirom da u osnovi BPD leži hronični inflamatorni proces, a veća produkcija *TNF $\alpha$*  koja se javlja kod nosioca A alela doprinosi pojačanom inflamatornom odgovoru, intenzivnijoj hemotaksi neutrofila koji posreduju u oštećenju endotela, inhibiciji surfaktanata i oslobađanju elastaze, enzima koji dodatno oštećuje nežno plućno tkivo prematurusa. Za razliku od našeg istraživanja, ne tako jaka povezanost ovog

polimorfizma sa BPD kod prematurusa pokazana je u meta analizi Chauhana i saradnika (162). U studiji na VLBW prematurusima Kazzi sa saradnicima ne nalazi bilo kakvu povezanost *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma sa ispoljavanjem BPD, ukazujući da bi polimorfizam *TNF $\alpha$*  -238 G/A mogao uticati na smanjenje rizika od BPD (163).

Na osnovu deskriptivnih podataka i načinjenih statističkih testova, identifikovane su one varijable koje su se statistički značajno razlikovale između ispitivanih grupa prematurusa i koje su, uz genotip, predstavljale dodatne faktore rizika za nastanak sepse. Za naše ispitanike ti faktori su: GN, PTM, AS i tip porođaja. Ove varijable su uključene u regresioni logistički model kao nezavsne varijable. Logistička regresiona analiza pokazala je da je A alel *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma nezavisan faktor rizika za nastanak sepse ispitivanih prematurusa, a da su GN, PMN, AS'5 i carski rez dodatni faktori rizika za nastanak EONS-a.

Ispitivali smo da li postoji povezanost *TNF $\alpha$*  -308 G/A polimorfizma sa odstupanjima od normalnih vrednosti laboratorijskih parametara, povišenim Rodwel-ovim i Töllner-ovim skorom i primljenom imunoterapijom. Laboratorijski parametri koji su pokazali povezanost sa ovim polimorfizmom su trombocitopenija i povišeni CRP. Kod svih prematurusa sa AA genotipom registrovana je trombocitopenija, ali i EONS. Prematurusi nosioci GA i AA genotipa statistički značajno češće imaju povišene vrednosti CRP.

Kako su rezultati našeg istraživanja pokazali, A alel predstavlja faktor rizika za razvoj rane sepse kod prematurusa, te je očekivano da se kod ovih prematurusa registruje i trombocitopenija kao posledica intenzivnog inflamatornog odgovora izazvanog jačom ekspresijom *TNF $\alpha$*  kod nosioca A alela. Naši rezultati u skladu su sa rezultatima studije koja je sprovedena na 824 odrasla pacijenta iz populacije kavkazoida Velike Britanije (164). Studije asocijacije ovog polimorfizma i trombocitopenije kod prematurusa nisu rađene.

Nema istraživanja koja bi pratila povezanost polimorfizma *TNF $\alpha$*  -308 G/A sa nivoom CRP kod prematurusa. Kazemi sa saradnicima je ispitivao značaj ovog polimorfizma za razvoj ishemijske bolesti srca koja predstavlja hroničan inflamatorni proces (165). Autori su u studiji pratili povezanost ovog polimorfizma sa

antropometrijskim i biohemijskim karakteristikama pacijenata. Suprotno našim rezultatima ova studija je pokazala da su nosioci genotipa AA u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa <50% opstrukcije u najmanje jednoj koronarnoj arteriji imali statistički značajno više vrednosti CRP-a. Ovakva relacija između genotipa i nivoa CRP-a nije uočena u grupi pacijenata sa  $\geq 50\%$  opstrukcije koronarne arterije.

Naša studija nije utvrdila povezanost *TNFA* -308 G/A polimorfizma sa karakteristikama koji se odnose na trudnoću: tip začeća, tip porođaja, stanje plodove vode i posteljice u trenutku rađanja, antibiotskom i kortikosteroidnom terapijom koju je majka primala tokom trudnoće.

Pleiotropni interleukin 6 pod LPS stimulacijom počinje da se proizvodi već u trinaestoj nedelji od začeća u fetalnim Kupferovim ćelijama (138). Brojne studije su potvrdile da tokom intrauterine infekcije monociti fetusa vrše intenzivnu produkciju ovog citokina (140, 144, 166, 167, 168). U studiji na terminskim neonatusima, Angelone sa saradnicima je pokazao da je LPS stimulirana proizvodnja IL6 u krvi iz pupčanika viša nego u perifernoj krvi odraslih osoba. Studije kod prematurusa su pokazale značajno nižu produkciju ovog inflamatornog medijatora što doprinosi većoj osetljivosti ove populacije prema bakterijskim infekcijama (167, 169, 170).

Nekoliko studija koje su ispitivale uticaj polimorfizma *IL6* -174 G/C na gensku ekspresiju pokazalo je da je C alel povezan sa povećanom produkcijom IL6 (85, 86, 87). U tabeli 29. prikazane su učestalosti alela i genotipova polimorfizma *IL6* -174 G/C za humanu populaciju globalno, populacije kontinenata i naše ispitanike. Podaci o učestalosti alela preuzeti su iz baze podataka NCBI (149), a o učestalosti genotipova u opštoj i populacijama kontinenata preuzeti su iz Ensembl baze podataka (150).

Ovaj genski polimorfizam pokazuje velika međupopulaciona variranja kako u učestalosti alela tako i u učestalosti genotipova. Učestalost češćeg G alela se kreće od 0,99 u istočnoazijskoj populaciji pa do 0,54 u evropskoj populaciji. Vrednosti učestalosti alela u našoj grupi ispitanika najbliže su podacima o humanoj globalnoj populaciji. Distribucija učestalosti genotipova u našoj grupi prematurusa najsličnija je onoj u evropskoj populaciji.

Najveću razliku u učestalostima alela i genotipova pokazuje istočnoazijska populacija u odnosu na sve druge predstavljene u tabeli 29.

**Tabela 29.** Učestalosti alela i genotipova *IL6 -174 G/C* polimorfizma u globalnoj, većim humanim populacijama i našoj studiji

<b>Populacija</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>
Globalna populacija	0,68	0,32	0,76	0,19	0,05
Evropska	0,54	0,46	0,36	0,45	0,19
Istočno Azijska	0,99	0,01	0,99	0,01	0,00
Američka	0,82	0,18	0,67	0,29	0,04
Afrička	0,92	0,08	0,96	0,03	0,01
<b>Srbija – prematurusi</b>	0,66	0,34	0,44	0,44	0,12

Povezanost *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa nastankom rane neonatalne sepse u našoj studiji nije uočena. Distribucija alela i genotipova bila je ujednačena između grupa prematurusa sa hemokulturom potvrđenom, odnosno kliničkom sepsom i grupi prematurusa bez sepse. *IL6* je važan medijator akutne faze infekcije i glavni induktor sinteze CRP u jetri. Veoma rano po aktivaciji imunog odgovora ovaj medijator dostiže visoke serumske vrednosti što ga čini dobrim markerom sepse visokog stepena osetljivosti i specifičnosti (171). Brojna istraživanja na pedijatrijskoj i neonatalnoj populaciji ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa nastankom, tokom i ishodom sepse (172, 173, 174, 175, 176) što je suprotno našim rezultatima. Ipak, u dve meta analize koje su istraživale značaj ovog polimorfizma na nastanak EONS-a, povezanost nije utvrđena što je u skladu sa našim rezultatima (171, 177).

Nije pronađena veza *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa letalnim ishodom od sepse u grupi septičnih prematurusa. Nije uočena razlika u učestalosti alela i genotipova između prematurusa sa sepsom koji su hospitalizaciju na Institutu za neonatologiju završili u dobrom opštem stanju ili smrtnim ishodom. Suprotno našim rezultatima, meta analiza koja

obuhvata 20 studija, od kojih je 9 sa pedijatrijskim pacijentima, utvrdila je da postoji moguća povezanost između *IL6 -174 G/C* polimorfizma i mortaliteta izazvanog sepsom (nakon Bonferoni korekcije dobijena statistička značajnost nije potvrđena) (178).

Različiti rezultati istraživanja o uticaju *IL6 -174 G/C* polimorfizma na nastanak i ishod neonatalne sepse mogu biti posledica razlika u dizajnu studija, etničke pripadnosti ispitanika kao i malog broja ispitanika.

Nije pronađena povezanost *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa kliničkim faktorima koje smo pratili: RDS, BPD, IVH i metaboličkom acidozom. U svim grupama genotipova vrednosti GN, PTM i AS '5 su bile slične. Takođe, povezanost nije pronađena ni sa letalnim ishodom prematurusa u ukupnoj grupi ispitivanih prematurusa. Literaturni podaci ukazuju na povećani nivo IL6 kod prevremeno rođene dece sa BPD-om (179, 180, 181). Međutim, skorašnja studija Szpecht-a i saradnika nije potvrdila vezu između *IL6 -174 G/C* polimorfizma i BPD-a u Poljskoj populaciji prematurusa GS na rođenju  $\leq 32$  nedelje (182), što je u skladu sa rezultatima naše studije.

Ispitujući povezanost ovog inflamatornog medijatora sa intraventrikularnom hemoragijom i periventrikularnom leukomalacijom kod prematurusa, Heep i saradnici su zaključili da serumski IL6 može biti dobar rani marker hemoragije, s obzirom da je povišeni serumski nivo ovog medijatora povezan ne samo sa povišenim rizikom od IVH već i sa stepenom IVH kod prematurusa  $< 28$  GN (183). Göpel sa saradnicima u svojoj studiji na 1206 VLBW prematurusa ( $< 1500$ g) nije utvrdio asocijaciju *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa sepsom i IVH (184). Navedeni rezultati u skladu su sa rezultatima našeg istraživanja u kojem smo utvrdili da ovaj polimorfizam nije faktor rizika za nastanak sepse, RDS-a, BPD-a i IVH-a kod prematurusa.

Nadalje, istraživali smo da li postoji povezanost polimorfizma *IL6 -174 G/C* sa odstupanjima od normalnih vrednosti laboratorijskih parametara, povišenim Rodwel-ovim i Töllner-ovim skorom i primljenom imunoterapijom. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da od svih gore navedenih parametara ovaj polimorfizam pokazuje asocijaciju samo sa pojavom toksičnih struktura u PMN. Kod nosioca CC genotipa toksične strukture u



PMN statistički značajno češće su uočavane u odnosu na druga dva genotipa. Ova statistički značajna razlika održala se i nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu. Naime, iako ova karakteristika PMN ulazi u sastav hematološkog sistema bodovanja za utvrđivanje infekcije, zasebno samo ova karakteristika nema dovoljno značaja da ukaže na genotip koji predstavlja faktor rizika za nastanak sepse.

Distribucija prematurusa koji su začeti IVF kao i onih koji su rođeni carskim rezom ujednačena je u pojedinačnim *IL6 -174 G/C* i udruženim genotipovima po recesivnom modelu. Takođe, nema razlike u distribuciji prematurusa kod kojih je tokom rođenja utvrđena patološka plodova voda, odnosno patološka posteljica u odnosu na genotipove po kodominantnom ili recesivnom modelu. Ujednačena je i učestalost prematurusa čije su majke tokom trudnoće primale kortikosteroidnu terapiju u odnosu na genotipove *IL6 -174 G/C* polimorfizma. Jedina statistički značajna razlika uočena je u učestalosti prematurusa čije su majke primale antibiotsku terapiju tokom trudnoće u odnosu na genotip i to samo posle grupisanja po recesivnom modelu. Prematurusi čije su majke tokom trudnoće primale antibiotsku terapiju statistički značajno češće su bili nosioci CC genotipa.

Poput predhodna dva citokina i  $IL1\beta$  proizvode fetalne Kupferove ćelije kao odgovor na stimulaciju LPS-om tokom intrauterinog razvoja (138).  $IL1\beta$  ima ključnu ulogu u otpočinjanju inflamatornog odgovora indukujući sintezu ostalih medijatora inflamacije, kao i u patogenezi sepse i septičkog šoka stimulišući proizvodnju ključnih medijatora vazodilatacije: prostaglandina i azot oksida (185). Osim toga, ovom medijatoru se pripisuje važna uloga u težini i ishodu sepse (171).

Brojne studije potvrdile su da je nestimulisana produkcija  $IL1$  od strane monocita iz krvi pupčanika terminske ali i prevremeno rođene dece na nivou produkcije kod odraslih zdravih jedinki (186, 187, 188, 189). Srugo je sa svojim saradnicima utvrdio da kod prematurusa sa bakterijskom sepsom monocitna produkcija  $IL1$  niža tokom akutne faze infekcije, uz naknadno povećanje tokom oporavka (190). S druge strane, LPS stimulisani neutrofili iz krvi pupčanika imaju značajno povećanu ekspresiju  $IL1$  u poređenju sa neutrofilima odraslih jedinki (191). Iako neutrofili tokom akutne faze inflamatornog odgovora primarno funkcionišu kao brze efektorske ćelije sa malom imunoregulatornom

funkcijom, ovakva njihova osobina u neonatalnom imunološkom sistemu može biti od velike važnosti u smislu pojačavanja ranog odgovora na infekciju.

Literaturni podaci ukazuju da genske varijante u *IL1 $\beta$*  genu mogu uticati na nastanak i patogenezu sepse (71, 192). Pociot i saradnici identifikovali su polimorfno mesto u promotorskom regionu *IL1 $\beta$*  -511 G/A (rs16944) i utvrdili na osnovu svog istraživanja da nosioci AA genotipa sekretuju značano više IL1 $\beta$  u odnosu na heterozigote, koji pak sekretuju više IL1 $\beta$  u odnosu na nosioce GG genotipa (193). U kasnijem istraživanju Chen sa saradnicima je došao do saznanja da A alel utiče na malo povećanje transkripcione aktivnosti gena *IL1 $\beta$*  ali u kombinaciji sa T alelom *IL1 $\beta$*  -31 C/T (rs1143627) (194).

Distribucija alela i genotipova *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma u globalnoj i većim humanim populacijama prikazana je u tabeli 30.

**Tabela 30.** Učestalosti alela i genotipova *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma u globalnoj, većim humanim populacijama i našoj studiji

<b>Populacija</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>
Globalna populacija	0,58	0,42	0,25	0,48	0,27
Evropska	0,65	0,35	0,43	0,45	0,12
Istočno Azijska	0,56	0,44	0,29	0,49	0,22
Američka	0,44	0,56	0,23	0,44	0,033
Afrička	0,46	0,54	0,18	0,32	0,50
<b>Srbija – prematurusi</b>	0,68	0,32	0,46	0,45	0,09

Učestalosti alela i genotipova u našoj studiji najsličnija je distribuciji u evropskoj populaciji. Učestalosti genotipova ovog polimorfizma pokazuju značajna međupopulaciona variranja od 0,12 do 0,5 za homozigotne nosioce alela A (150). Međupopulaciona variranja u distribuciji alela manje su izražena (149).

Rezultati naše studije su pokazali da *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizam utiče na nastanak sepse kod prevremeno rođene dece. Statistički značajna razlika uočava se na sva tri praćena nivoa: alelskom, pojedinačnim i udruženim genotipovima po recesivnom modelu (GG+GA/AA). Nosioi genotipa AA statistički se značajno češće javljaju među prematurusima sa sepsom, ukazujući na to da je alel A povezan sa nastankom sepse. Ova razlika u učestalosti AA genotipa izraženija je između grupe prematurusa sa kliničkom sepsom i kontrolne grupe nego grupe prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom i kontrolne grupe prematurusa. Logistička regresiona analiza potvrdila je da je A alel polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* nezavisan faktor rizika za nastanak sepse u našoj grupi prematurusa, a da GN, PMN, AS'5 i carski rez predstavljaju dodatni faktori rizika za nastanak EONS-a.

Brojne studije koje su ispitivale funkcionalnost ovog polimorfizma nisu uspele da pronađu vezu između *IL1 $\beta$  -511 G/A* i neonatalne sepse (7, 195, 196, 197). Međutim, u skorašnjoj studiji na adultnim pacijentima koji su bili podvrgnuti većem operativnom zahvatu, Jiménez-Sousa sa saradnicima je uspela da pronađe asocijaciju AA genotipa *IL1 $\beta$  -511 G/A* sa septičkim šokom, ali i sa smrtnim ishodom kod ovih pacijenata (198). Navedeni nalazi u skladu su sa rezultatima našeg istraživanja na prematurusima u kome je uočena povezanost genotipa AA ne samo sa nastankom EONS-a, već i sa letalnim ishodom u grupi prematurusa kod kojih je dijagnostikovana sepsa. Ova povezanost genotipa AA i letalnog ishoda kod septičnih prematurusa postala je još izraženija u našem uzorku nakon udruživanja genotipova po recesivnom modelu. Značajnost se nije izgubila ni pošto smo ispitivanje asocijacije polimorfizma na letalni ishod proširili na kompletnu grupu ispitanika (tabela 19). Logistička regresiona analiza potvrdila je da je A alel *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma nezavisan faktor rizika za letalni ishod kod prematurusa sa sepsom. Ovom analizom utvrdili smo da GN, PMN, AS'5 i carski rez predstavljaju dodatne faktore rizika za letalni ishod od rane neonatalne sepse kod prematurusa sa sepsom. Druge studije koje su se bavile ispitivanjem prematurusa nisu dale ovakve rezultate o uticaju *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma na ishod sepse. Razlike u rezultatima istraživanja mogu se objasniti razlikama u dizajnu studija, etničke pripadnosti ispitanika kao i mali broja ispitanika.

U svim grupama genotipova *IL1 $\beta$  -511 G/A*, vrednosti GN, PTM i AS '5 bile su ujednačene tako da nije utvrđena statistički značajna razlika srednjih vrednosti praćenih karakteristika prematurusa u zavisnosti od genotipa. U našem istraživanju nisu uočene razlike u učestalosti prematurusa kod kojih je dijagnostikovano RDS, IVH i BPD u zavisnosti od genotipa. Baier je u svom opsežnom istraživanju na 215 VLBW prematurusa utvrdio da je A alel faktor rizika za nastanak IVH (199). Ryckman sa saradnicima je ispitivao uticaj drugog polimorfizma *IL1 $\beta$  -31 C/T* na nastanak IVH kod prematurusa, a njihovi rezultati su pokazali da je C alel, odnosno CC genotip ovog polimorfizma faktor rizika za nastanak hemoragije III i IV stepena kod prematurusa (200). Između ova dva polimorfizma u *IL1 $\beta$*  promotorskom regionu postoji snažna gametska neravnoteža (engl. *Linkage Disequilibrium* – LD). Nema istraživanja o asocijaciji *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma sa RDS-om i BPD-om kod prematurusa. Szpecht sa saradnicima je u svojoj studiji na prematurusima ( $\leq 32$  GN na rođenju) ispitivao asocijaciju *IL1 $\beta$  +3953 C/T* polimorfizma i BPD-a, ali rezultati nisu pokazali povezanost ovog polimorfizma sa BPD-om (182).

Istraživanjem smo uspeli da utvrdimo asocijaciju AA genotipa *IL1 $\beta$  -511G/A* polimorfizma grupisanog po recesivnom modelu sa metaboličkom acidozom u našoj grupi prematurusa.

Istraživali smo povezanost polimorfizma *IL1 $\beta$  -511 G/A* sa odstupanjima od normalnih vrednosti laboratorijskih parametara, povišenim Rodwel-ovim i Töllner-ovim skorom i primljenom imunoterapijom. Naše istraživanje nije pokazalo povezanost ni jednog od praćenih parametara sa genotipovima *IL1 $\beta$  -511 G/A* polimorfizma.

U našoj studiji nosioci različitih *IL1 $\beta$  -511 G/A* genotipova su imali istu šansu da budu začeti IVF. Nosioci GA genotipa statistički češće su rađani carskim rezom (granica statističke značajnosti  $p = 0,05$ ). Takođe, nema razlike u učestalosti ispoljavanja patološke plodove vode, odnosno patološke posteljice u zavisnosti od *IL1 $\beta$  -511 G/A* genotipa prematurusa. Ujednačena je i učestalost prematurusa čije su majke primale antibiotiku, odnosno kortikosteroidnu terapiju tokom trudnoće u svim grupama *IL1 $\beta$  -511 G/A* genotipova.

## 6. ZAKLJUČCI

U ispitivanom uzorku od 471 prematurusa, srednja vrednost GN, PTM i AS '5 kod prematurusa sa ranom sepsom bila je statistički značajno niža u odnosu na prematuruse iz kontrolne grupe. Letalan ishod je statistički značajno češći kod prematurusa sa sepsom. Prematurusi sa sepsom statistički značajno češće su rođeni iz spontano začetih trudnoća koje su završene vaginalnim porođajem. Majke prematurusa sa sepsom statistički ređe su primale kortikosteroidnu i antihipertenzivnu terapiju tokom trudnoće. Terapija antibioticima tokom trudnoće nije uticala na nastanak rane neonatalne sepse. Najčešći uzročnik rane neonatalne sepse u našoj populaciji bile su vrste roda *Acinetobacter*.

### **Ispitivanje *TNF $\alpha$* -308 G/A polimorfizma pokazalo je:**

- da je učestalost GG genotipa 78,1%, heterozigota GA 20,8% i AA genotipa 1,1%. Učestalost G alela je 88,5% a A alela 11,5%
- da je alel A faktor rizika za nastanak rane neonatalne sepse kod prematurusa.
- logističkom regresionom analizom sa GN, PTM i AS '5 kao kovarijatama potvrđena je statistički značajna povezanost GA+AA genotipova sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom.
- da ovaj polimorfizam ne utiče na letalan ishod prematurusa od EONS-a
- da je AA genotip kod prematurusa faktor rizika za nastanak BPD
- da je AA genotip prematurusa povezan sa trombocitopenijom
- da su prematurusi sa GA i AA genotipovima imali povišene vrednosti CRP

### **Ispitivanje *IL6* -174 G/C polimorfizma pokazalo je:**

- da je učestalost GG genotipa 43,7%, heterozigota GC 44,0% i CC genotipa 12,3%. Učestalost G alela je 65,7% a C alela 34,3%
- da nema asocijacije ovog polimorfizma sa nastankom EONS-a kod prematurusa u našoj populaciji
- da ovaj polimorfizam nije asociiran sa letalnim ishodom prematurusa od EONS-a

- da nema asocijacije ovog polimorfizma sa RDS, BPD, IVH i metaboličkom acidozom
- da se kod nosioca CC genotipa statistički češće javljaju toksične strukture u PMN

**Ispitivanje *IL1 $\beta$*  -511 G/A polimorfizma pokazalo je:**

- da je učestalost GG genotipa 45,7%, heterozigota GA je 45,4% i AA genotipa 8,9%. Učestalost G alela je 68,4% a A alela 31,6%
- da je učestalost AA genotipa statistički značajno veća u grupi prematurusa sa kliničkom sepsom
- logističkom regresionom analizom sa GN, PTM i AS '5 kao kovarijatama potvrđena je statistički značajna povezanost AA genotipa sa nastankom sepse.
- da je AA genotip faktor rizika za letalni ishod od EONS-a kod prematurusa
- logističkom regresionom analizom koja je uključivala PTM i GN kao kovarijate potvrđena je statistički značajna povezanost AA genotipa sa letalnim ishodom kod prematurusa sa sepsom
- da postoji povezanost AA genotipa sa nastankom metaboličke acidoze
- da nema asocijacije ovog polimorfizma sa odstupanjima od normalnih vrednosti laboratorijskih parametara, povišenim Rodwel-ovim i Töllner-ovim skorom, kao ni primljenom imunoterapijom

## 7. LITERATURA

1. Kliegman R, Stanton B, St Geme JW, Schor NF, Behrman RE. Nelson's textbook of pediatrics (20th edn.). Philadelphia, PA: Elsevier. 2016.
2. Cloherty JP. Care of the Extremely Low Birth Weight Infant". Manual of neonatal care (7th ed.). 2012. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
3. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
4. <http://www.batut.org.rs/index.php?lang=1>
5. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016;388(10063):3027-35.
6. Mardešić D i suradnici. Pedijatrija 8. Dopunjeno izdanje. Školska knjiga Zagreb. 2016.
7. Carvalho JK, Batalha D, Ii M, Alves R, Iii L, Iv PPX. Prediction of sepsis-related outcomes in neonates through systematic genotyping of polymorphisms in genes for innate immunity and inflammation: a narrative review and critical perspective. *Sao Paulo Medical Journal*. 2013;131(5):338–50.
8. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. American Medical Association (AMA). 2016;315(8):801.
9. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707–710.
10. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History. *Critical Care Clinics*. 2009;25(1):83–101.
11. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *The Lancet*. 2013;381(9868):774–5.

12. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463–75.
13. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259-72.
14. <http://www.who.int/iris/handle/10665/80135>  
World Health Organization. (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide.
15. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *The Lancet*. 2005;891–900.
16. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018;6(3):223-30.
17. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>
18. Perišić VN, Janković B. *Pedijatrija – za studente medicine*. Libri Medicorum, Beograd. 2010.
19. Plano LRW. The changing spectrum of neonatal infectious disease. *J Perinatol*. 2010;30:S16–S20.
20. Polin RA. Management of Neonates With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. *Pediatrics*. 2012;129(5):1006–15.
21. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017;390:1770-80.
22. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J*. 1990;9:819–825.
23. Philip AG. The changing face of neonatal infection: experience at a regional medical center. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:1098–1102.
24. Levine EM, Ghai V, Barton JJ, Strom CM. Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1999;7:210–213.



25. Baker CJ, Barrett FF, Gordon RC, Yow MD. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr.* 1973;82:724–729.
26. Barton LL, Feigin RD, Lins R. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *J Pediatr.* 1973;82:719–723.
27. Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr.* 1973;82:707–718.
28. Mc Cracken GH Jr. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr.* 1973;82:703–706.
29. Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in verylow-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:638–680.
30. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr.* 1996;129:63–71.
31. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003;27:293–301.
32. Institute of Neonatology, Belgrade, Serbia, Protocols in neonatology, Bacterial infections of newborns. <http://www.neonatologija.rs/files/rad16-KON-2.pdf> Accessed: May, 2003. In Serbian.
33. Hofer N, Müller W, Resch B. Neonates presenting with temperature symptoms: role in the diagnosis of early onset sepsis. *Pediatr Int.* 2012;54:486-90.
34. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *The Journal of Pediatrics;* 1988;112(5):761–7.
35. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of c-reactive protein in pediatrics. *Ped Infect Dis.* 1997;16:735–8.
36. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 2013;50(1):23–36.

37. Hofer N, Zacharias E, Müller W, Resch B. An Update on the Use of C-Reactive Protein in Early-Onset Neonatal Sepsis: Current Insights and New Tasks. *Neonatology*. 2012;102(1):25–36.
38. Muller B, White JC, Nylen ES, et al. Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:396–404.
39. Altunhan H, Annagür A, Örs R, Mehmetoğlu I. Procalcitonin measurement at 24hours of age may be helpful in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Int J Infect Dis*. 2011;15(12):e854–e858.
40. Turner D. Procalcitonin in preterm infants during the first few days of life: introducing an age related nomogram. *Arch Dis Child*. 2006;91(4):F283–F286.
41. Delanghe JR, Speeckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta*. 2015;451:46–64.
42. Swarnkar K, Vagha J. Sepsis Biomarkers In Early Onset Neonatal Infections: A Review. *Int J Infect Dis*. 2013;11:1-9.
43. Fjaertoft G, Douhan Håkansson L, Pauksens K, Sisask G, Venge P. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: A study on the kinetics and the impact of major surgery. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(6-7):525–35.
44. Medzhitov R: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007; 449:819–826.
45. Dinarello CA: Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1): S34–S45.
46. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118:503–508.
47. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ: Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:703–718.
48. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthesia*. 1996;77:110–117.
49. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. 2013;2013:1–16.

50. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001;47(4):697-702.
51. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and Treatment of Septic Shock in Neonates. *Clin Perinatol*. 2010;37(2):439–79.
52. Ng PC, Li K, Wong RP, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(3):F209–F213.
53. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF- $\alpha$  induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol*. 2004;173(7):4627–4634.
54. Hodge G, Hodge S, Haslam R, et al. Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 microl sample volumes--association with neonatal sepsis. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(2):402–407.
55. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis*. 2007;195(2): 296–302.
56. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776–787.
57. Wolach B, Dolfin T, Regev R, Gilboa S, Schlesinger M. The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr*. 1997;86(5):523–527.
58. Notarangelo LD, Chirico G, Chiara A, et al. Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestational age infants. *Pediatr Res*. 1984;18(3):281–285.
59. Ng PC, Li K, Leung TF, et al. Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants. *Clin Chem*. 2006;52(6):1181–1189.

60. Sola MC, Del Vecchio A, Rimsza LM. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Clinics in Perinatology*. 2000;27(3):655–679.
61. Finkelstein Y, Shenkman B, Sirota L, Vishne TH, Dardik R, Varon D, et al. Whole blood platelet deposition on extracellular matrix under flow conditions in preterm neonatal sepsis. *Eur J Pediatr*. 2002;161(5):270–274.
62. Bednarek FJ, Bean S, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD. The platelet hyporeactivity of extremely low birth weight neonates is age-dependent. *Thromb Res*. 2009;124(1):42–45.
63. Urlichs FSC. Neutrophil function in preterm and term infants. *NeoReviews* 2004;5:e417–e430.
64. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol*. 2006;118(2–3):137–144.
65. Prosser A, Hibbert J, Strunk T, Kok CH, Simmer K, Richmond P, et al. Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. *Pediatric Research*. 2013;74(5):503–10.
66. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, Davidson B, Salles É da SL, Bhatia J, et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Front Immunol*. 2018;9:1759.
67. Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, Gulbins E, Lang F. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr Res*. 1998;44(6):946–950.
68. Mease AD, Burgess DP, Thomas PJ. Irreversible neutrophil aggregation. A mechanism of decreased newborn neutrophil chemotactic response. *Am J Pathol*. 1981;104(1):98–102.
69. Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW. *Fetal and Neonatal Physiology* (5th edn.). Philadelphia, PA: Elsevier. 2017.
70. Zhang A, Yue C, Gu W, Du J, Wang H, Jiang J. Association between CD14 Promoter -159C / T Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(8):e71237.

71. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009;20(1):43–59.
72. Turnpenny P, Ellard S. *Emery's elements of medical genetics*. 13th eds. Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
73. Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W. *An introduction to genetic analysis*. 7th eds. New York: W.H. Freeman and company. 2000.
74. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273:1516-1517.
75. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Critical Care*. 2009;13(2):210.
76. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Critical Care Medicine*. 2005;33(3):638–44.
77. Härtel C, König I, Köster S, et al. Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2006;118(2):683-9.
78. <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/7368>
79. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385:729–733.
80. Gomes AP, Balbino Miguel PS. Pro-Inflammatory Cytokines in Sepsis: Biological Studies and Prospects From In Silico Research. *Biological Systems: Open Access*. 2015;05(01).
81. Pandey M, Chauhan M, Awasthi S. Interplay of cytokines in preterm birth. *Indian J Med Res*. 2017;147;316-327.
82. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfandetal JA. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*. 1990;161(1);79–84.
83. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNFalpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *Jama* 1999;282(6):561–568.

84. Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2010;38(1):276-82.
85. 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.
86. Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Cantini F, Macchioni P, Bajocchi G, Catanoso MG, Pulsatelli L, Consonni D, Salvarani C. Relationship between interleukin 6 promoter polymorphism at position -174, IL-6 serum levels, and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol.* 2006;33(4):703-8.
87. Totaro F, Cimmino F, Pignataro P, Acierno G, De Mariano M, Longo L, et al. Impact of Interleukin-6 -174 G>C Gene Promoter Polymorphism on Neuroblastoma. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e76810.
88. Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30:32–37.
89. Tischendorf JJ, Yagmur E, Scholten D, Vidacek D, Koch A, Winograd R, Gressner AM, Trautwein C, Wasmuth HE, Lammert F. The interleukin-6 (IL6) -174G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the ex vivo secretion of IL6. *Int J Immunogenet.* 2007;34:413–418.
90. Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, Klimovic M, Klapacova L, Bartosova D, Hubacek JA. Interleukin-6 gene variants and the risk of sepsis development in children. *Hum Immunol.* 2007;68(9):756–60.
91. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(9):1355-9.

92. Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Daviduk YN, Lubin SA. Genetic Polymorphisms and Bacterial Infections in Neonates. *BioNanoScience*. 2016;7(1):78–84.
93. Lind H, Haugen A, Zienolddiny S. Differential binding of proteins to the IL1B–31 T/C polymorphism in lung epithelial cells. *Cytokine*. 2007;38:43–48.
94. Töllner U. Early diagnosis of septicemia in the newborn. *Eur J Pediatr*. 1982;138(4):331–7.
95. Budowle B et al. *DNA Typing Protocols: Molecular Bioogy and Forensic Analysis*. Eaton Publishing. 2000.
96. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*. 2007;335(7625):879–83.
97. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010; 126(3):443–56.
98. Wynn JL, Cvijanovich NZ, Allen GL, Thomas NJ, Freishtat RJ, Anas N, Meyer K, Checchia PA, Lin R, Shanley TP, Bigham MT, Banschbach S, Beckman E, Wong HR. The influence of developmental age on the early transcriptomic response of children with septic shock. *Mol Med*. 2011;17(11–12):1146–56.
99. Bhandari V, Bizzarro MJ, Shetty A, Zhong X, Page GP, Zhang H, Ment LR, Gruen JR; Neonatal Genetics Study Group. Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics*. 2006;117(6):1901–6.
100. Härtel C, Schultz C, Herting E, Göpel W. Genetic association studies in VLBW infants exemplifying susceptibility to sepsis--recent findings and implications for future research. *Acta Paediatr*. 2007;96(2):158–65.
101. Christaki E, Giamarellos-Bourboulis EJ. The beginning of personalized medicine in sepsis: small steps to a bright future. *Clin Genet*. 2014;86(1):56–61.
102. Systematic review and meta-analysis of gene association studies in neonatal sepsis. *EPAS*. 2013:1540.643.
103. Swarr D, Sharma M, Cotten C, Kirpalani H, Srinivasan L. Systematic Review and Meta-analysis: Gene Association Studies in Neonatal Sepsis. *Am J Perinatol*. 2016;34(07):684–92.

104. Shrestha S, Adhikari N, Rai BK, Shreepaili A. Antibiotic resistance pattern of bacterial isolates in neonatal care unit. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2010;50:277-281.
105. Puopolo KM. Bacterial and fungal infections. In: *Manual of neonatal care.* Cloherty JP, Eichenwald EC and Stark AR (eds). 6th edition. Lippincott William and Wilkins, Philadelphia, PA. 2008.
106. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID, III, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B streptococcal and E.coli disease continues. *Pediatrics.* 2011;127:817–826.
107. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):21–47.
108. Bauserman MS, Laughon MM, Hornik CP, Smith PB, Benjamin DK Jr, Clark RH, Engmann C, Cohen-Wolkowicz M. Group B Streptococcus and Escherichia coli infections in the intensive care nursery in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:208–212.
109. Puopolo KM, Eichenwald EC. No change in the incidence of ampicillin-resistant, neonatal, early-onset sepsis over 18 years. *Pediatrics.* 2010;125:e1031–e1038.
110. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.* 2008;299:2056–2065.
111. Brito DD, Oliveira EJ, Abdallah VO, Costa Darini AL, Filho PP. An outbreak of *Acinetobacter baumannii* septicemia in a neonatal intensive care unit of Federal University Hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:301–9.
112. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):687–93.



113. He M, Kostadinov S, Gundogan F, Struminsky J, Pinar H, Sung CJ. Pregnancy and perinatal outcomes associated with *Acinetobacter baumannii* infection. *AJP Rep*. 2013;3(1):51-6.
114. Aivazova V, Kainer F, Friese K, Mylonas I. *Acinetobacter baumannii* infection during pregnancy and puerperium. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281(1):171-4.
115. Mc Grath EJ, Chopra T, Abdel-Haq N, Preney K, Koo W, Asmar BI, Kaye KS. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a neonatal intensive care unit: investigation and control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(01):34-41.
116. De A, Rathi M, Mathur M. Mortality audit of neonatal sepsis secondary to *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis*. 2013;5(1):3.
117. Zhou B, Liu X, Wu JB, Jin B, Zhang YY. Clinical and microbiological profile of babies born with risk of neonatal sepsis. *Exp Ther Med*. 2016;12(6):3621–5.
118. Sood M, Mohd Zain Z, Abu NA, Chee SC, Mohd Nor NS. Maternal and neonatal effects of *Acinetobacter* colonisation in preterm premature rupture of membrane and term labour. *Med J Malaysia*. 2019;74(1):40-44.
119. Nazir A. Multidrug-resistant *Acinetobacter* septicemia in neonates: A study from a teaching hospital of Northern India. *J Lab Physicians*. 2019;11(1):23-28.
120. Voller SMB, Myers PJ. Neonatal sepsis. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*. 2016;17(2):1-5.
121. Cailes B, Kortsalioudaki C, Buttery J, Pattnayak S, Greenough A, Matthes J, Bedford Russell A, Kennea N, Heath PT, neonIN network. Epidemiology of UK neonatal infections: the neonIN infection surveillance network. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2018;103(6):F547-F553.
122. Guo J, Luo Y, Wu Y, Lai W, Mu X. Clinical Characteristic and Pathogen Spectrum of Neonatal Sepsis in Guangzhou City from June 2011 to June 2017. *Med Sci Monit*. 2019;25:2296-2304.
123. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis An old problem with new insights. *Virulence*. 2013;5(1):170–8.

124. Gleason CA, Devaskar SU, Avery ME. Avery's diseases of the newborn (9th edited). Philadelphia, PA: Elsevier. 2011.
125. Crawford NW, Buttery JP. Preterm infants immunization. *Paediatrics and Child Health*. 2010;20(6):297–301.
126. Bogdanović R, Radlović N. *Pedijatrija Udžbenik za posdiplomsko usavršavanje lekara*. Akademska misao. 2016.
127. Palazzi DL, Klein JO, Baker CJ: Bacterial sepsis and meningitis. In: Baker JSROKBWJ, editor: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, Philadelphia: WB Saunders. 2006;pp247–295.
128. Harris MC, Polin RA: Diagnosis of neonatal sepsis. In Spitzer AR, editor: *Intensive care of the fetus and neonate*, St Louis. 2005. CV Mosby.
129. Paneth N, Pinto-Martin J, Gardiner J, Wallenstein S, Katsikiotis V, Hegyi T, Hiatt IM, Susser M. Incidence and Timing of Germinal Matrix/Intraventricular Hemorrhage in Low Birth Weight Infants. *Am J Epidemiol*. 1993;137(11):1167–76.
130. Bancalari E, Claure N. Definitions and Diagnostic Criteria for Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol*. 2006;30(4):164-70.
131. Kimberlin DW, Baley J. Guidance on Management of Asymptomatic Neonates Born to Women With Active Genital Herpes Lesions. *Pediatrics*. 2013;131(2):e635–e646.
132. Chiswick M. Antenatal TRH. *Lancet* 1995;345:872-3.
133. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*. 1972;50:515–25.
134. Vyas J, Kotecha S. Effects of antenatal and postnatal corticosteroids on the preterm lung. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 1997;77(2):F147–F150.
135. Adamson IYR, King GM. Postnatal development of rat lung following retarded fetal lung growth. *Pediatric Pulmonology*. 1988;4(4):230–6.

136. Been JV, Degraeuwe PL, Kramer BW, Zimmermann LJ. Antenatal steroids and neonatal outcome after chorioamnionitis: a meta-analysis. *BJOG*. 2011;118(2):113–22.).
137. Bertagnolli M, Luu TM, Lewandowski AJ, Leeson P, Nuyt AM. Preterm Birth and Hypertension: Is There a Link? *Current Hypertension Reports*. Springer Nature. 2016;18(4).
138. Kutteh WH, Rainey WE, Beutler B, Carr BR. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta production by human fetal Kupffer cells. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:112–120.
139. Kutteh WH, Rainey WE, Carr BR. Regulation of interleukin-6 production in human fetal Kupffer cells. *Scand J Immunol*. 1991;33:607–613.
140. Förster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res*. 2005;58:121–124.
141. Burchett SK, Weaver WM, Westall JA, Larsen A, Kronheim S, Wilson CB. Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 1988;140:3473–3481.
142. Peters AM, Bertram P, Gahr M, Speer CP. Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha by neonatal monocytes. *Biol Neonate*. 1993;63:157–162.
143. Seghaye MC, Heyl W, Grabitz RG, Schumacher K, von Bernuth G, Rath W, Duchateau J. The production of pro- and antiinflammatory cytokines in neonates assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth. *Biol Neonate*. 1998;73:220–227.
144. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA, Levy O. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF- $\alpha$  production in vitro and in vivo. *Pediatr Res*. 2006;60:205–209.
145. Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS. Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to

- decreased production and expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors. *Pediatr Res*. 1996;40:475–483.
146. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha –308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(3):163–72.
  147. Del Vecchio A, Ladisa G, Laforgia N, De Felice C, Presta G, Latini G. Genetic polymorphisms in neonatal sepsis. *Haematologica Reports*. 2006;2(10):31-37.
  148. 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(4):323–9.
  149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
  150. [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population)
  151. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:401–406.
  152. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Peña AS. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 1996;43:456–463.
  153. Cernada M, Serna E, Bauerl C, Collado MC, Pérez-Martínez G, Vent M. Genome-wide expression profiles in very low birth weight infants with neonatal sepsis. *Pediatrics*. 2014;133:e1203-e1211.
  154. Härtel C, Hemmelmann C, Faust K, Gebauer C, Hoehn T, Kribs A, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter –308 G/A polymorphism and susceptibility to sepsis in very-low-birth-weight infants. *Critical Care Medicine*. 2011;39(5):1190–5.

155. Allam G, Alsulaimani AA, Alzaharani AK, Nasr A. Neonatal infections in Saudi Arabia: association with cytokine gene polymorphisms. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40:68-77.
156. Srinivasan L, Swarr DT, Sharma M, Cotten CM, Kirpalani H. Systematic review and meta-analysis: gene association studies in neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2017;34:684-692.
157. Wang H, Guo S, Wan C, Yang T, Zeng N, Wu Y, Chen L, Shen Y, Wen F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A polymorphism and risk of sepsis, septic shock, and mortality: an updated meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8:94910-94919.
158. 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.
159. Khoshdel A, Kheiri S, Omidvari P, Moradi F, Hamidi M, Teimori H. Association between Interleukin-10-1082 G/A and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  308 G/A Gene Polymorphisms and Respiratory Distress Syndrome in Iranian Preterm Infants. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–8.
160. Heep A. Association of two tumour necrosis factor gene polymorphisms with the incidence of severe intraventricular haemorrhage in preterm infants. *J Med Genet.* 2005;42(7):604–8.
161. Szpecht D, Gadzinowski J, Seremak-Mrozikiewicz A, Kurzawińska G, Drews K, Szymankiewicz M. The significance of polymorphisms in genes encoding IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-1RN in the pathogenesis of intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Childs Nerv Syst.* 2017;33(11):1905–16.
162. Chauhan M, Bombell S, McGuire W. Tumour necrosis factor (-308A) polymorphism in very preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;94(4):F257–F259.
163. Kazzi SNJ, Kim UO, Quasney MW, Buhimschi I. Polymorphism of Tumor Necrosis Factor- and Risk and Severity of Bronchopulmonary Dysplasia Among Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics.* 2004;114(2):e243–e248.

164. Sarpatwari A, Bussel JB, Ahmed M, Erqou S, Semple JW, Newland AC, Bennett D, Pharoah P, Provan D. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis demonstrates a significant association of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNFA) with primary immune thrombocytopenia among Caucasian adults. *Hematology*. 2011;16(4):243–8.
165. Kazemi E, Jamialahmadi K, Avan A, Mirhafez SR, Mohiti J, Pirhoushiaran M, Hosseini N, Mohammadi A, Ferns GA, Pasdar A, Ghayour-Mobarhan M. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A gene polymorphism with coronary artery diseases: An evidence-based study. *J Clin Lab Anal*. 2017;32(1):e22153.
166. Yachie A, Takano N, Yokoi T, Kato K, Kasahara Y, Miyawaki T, Taniguchi N. The capability of neonatal leukocytes to produce IL-6 on stimulation assessed by whole blood culture. *Pediatr Res*. 1990;27:227–233.
167. Liechty KW, Koenig JM, Mitchell MD, Romero R, Christensen RD. Production of interleukin-6 by fetal and maternal cells in vivo during intraamniotic infection and in vitro after stimulation with interleukin-1. *Pediatr Res*. 1991;29:1–4.
168. Yachie A, Takano N, Ohta K, Uehara T, Fujita SI, Miyawaki T, Taniguchi N. Defective production of interleukin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens. *Infect Immun*. 1992;60:749–753.
169. Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P. Modulation of pro- and antiinflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine*. 2003;21:200–206.
170. Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock*. 2006;25:329–337.
171. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, dos Reis MA, Corrêa RR, Celes MR. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:269681.
172. Harding D, Dhamrait S, Millar A, Humphries S, Marlow N, Whitelaw A, Montgomery H. Is interleukin-6 -174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? *Pediatrics*. 2003;112:800-803.

173. Ahrens P, Kattner E, Köhler B, Härtel C, Seidenberg J, Segerer H, Möller J., Göpel W. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2004;55:652-656.
174. Baier RJ, Loggins J, Yanamandra K. IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Med.* 2006;12:4:10.
175. Wynn J, Cornell TT, Wong HR, Shanley TP, Wheeler DS. The host response to sepsis and developmental impact. *Pediatrics.* 2010;125:1031–1041.
176. Jabandzie P, Smerek M, Michalek J, Fedora M, Kosinova L, Hubacek JA, Michalek J. Multiple gene-to-gene interactions in children with sepsis: a combination of five gene variants predicts outcome of life-threatening sepsis. *Crit Care.* 2014;18:R1.
177. 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.
178. Gao J, Zhang A, Pan W, Yue C, Zeng L, Gu W, Jiang J. Association between IL-6-174G/C Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118843.
179. Ambalavanan N, Carlo WA, D’Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, et al. Cytokines Associated With Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics.* 2009;123(4):1132–41.
180. Hsiao CC, Chang JC, Tsao LY, Yang RC, Chen HN, Lee CH, Lin CY, Tsai YG. Correlates of Elevated Interleukin-6 and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels in Tracheal Aspirates from Very Low Birth Weight Infants Who Develop Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr Neonatol.* 2017;58(1):63–9.
181. Rocha G, Proença E, Guedes A, Carvalho C, Areias A, Ramos JP, Rodrigues T, Guimarães H. Cord blood levels of IL-6, IL-8 and IL-10 may be early predictors of bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns small for gestational age. *Dis Markers.* 2012;33:51–60.
182. Szpecht D, Gadzinowski J, Nowak I, Cygan D, Seremak-Mrozikiewicz A, Kurzawińska G, Madajczak D, Drews K, Szymankiewicz M. The significance of

- IL-1 $\beta$  +3953C>T, IL-6 -174G>C and -596G>A, TNF- $\alpha$  -308G>A gene polymorphisms and 86 bp variable number tandem repeat polymorphism of IL-1RN in bronchopulmonary dysplasia in infants born before 32 weeks of gestation. *Cent Eur J Immunol.* 2017;3:287–93.
183. Heep A, Behrendt D, Nitsch P, Fimmers R, Bartmann P, Dembinski J. Increased serum levels of interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88(6):501–504.
  184. Göpel W, Härtel C, Ahrens P, König I, Kattner E, Kuhls E, Küster H, Möller J, Müller D, Roth B, Segerer H, Wieg C, Herting E. Interleukin-6-174-genotype, sepsis and cerebral injury in very low birth weight infants. *Genes Immun.* 2006;7(1):65–68.
  185. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med.* 1993;328:106–13.
  186. Dinarello CA, Shparber M, Kent EF, Jr, Wolff SM. Production of leukocytic pyrogen from phagocytes of neonates. *J Infect Dis.* 1981;144:337–343.
  187. Wilmott RW, Harris MC, Haines KM, Douglas SD. Interleukin-1 activity from human cord blood monocytes. *Diagn Clin Immunol.* 1987;5:201–204.
  188. Bessler H, Sirota L, Notti I, Dulitzky F, Djaldetti M. IL-1 $\beta$  and IL-3-like activity in preterm infants. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:320–324.
  189. Hebra A, Strange P, Egbert JM, Ali M, Mullinax A, Buchanan E. Intracellular cytokine production by fetal and adult monocytes. *J Pediatr Surg.* 2001;36:1321–1326.
  190. Srugo I, Berger A, Lapidot Z, Pollak S. Interleukin-1 secretion by blood monocytes of septic premature infants. *Infection.* 1991;19(3):150–154.
  191. Contrino J, Krause PJ, Slover N, Kreutzer D. Elevated interleukin-1 expression in human neonatal neutrophils. *Pediatr Res.* 1993;34:249–252.
  192. Kumpf O, Schumann RR. Genetic Variation in Innate Immunity Pathways and Their Potential Contribution to the SIRS/CARS Debate: Evidence from Human Studies and Animal Models. *J Innate Immun.* 2010;2(5):381–94.



193. Pociot F, Mølviq J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gene correlates with IL-1 $\beta$  secretion in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*. 1992;22(6):396–402.
194. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, Rogus J, Beck JD, Offenbacher S, Cork MJ, Rafie-Kolpin M, Hsieh CM, Kornman KS, Duff GW. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet*. 2006;15(4):519–29.
195. Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit Care Med*. 2002;30:1046–1050.
196. Treszl A, Kocsis I, Szathmári M, Schuler A, Héninger E, Tulassay T et al. Genetic Variants of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 Receptor  $\alpha$ -Chain, IL-6 and IL-10 Genes Are Not Risk Factors for Sepsis in Low-Birth-Weight Infants. *Biol Neonate*. 2003;83:241–245.
197. Esposito S, Zampiero A, Pugin L, Tabano S, Pelucchi C, Ghirardi B, Terranova L, Miozzo M, Mosca F, Principi N. Genetic Polymorphisms and Sepsis in Premature Neonates, *PLoS One*. 2014;9:e101248.
198. Jiménez-Sousa MÁ, Medrano LM, Liu P, Almansa R, Fernández-Rodríguez A, Gómez-Sánchez E, Rico L, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Pesquera E, Tamayo E, Resino S. IL-1Brs16944 polymorphism is related to septic shock and death. *Eur J Clin Invest*. 2016;47(1):53–62.
199. Baier RJ. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infant. *Front Biosci*. 2006;11:1371–1387.
200. Ryckman KK, Dagle JM, Kelsey K, Momany AM, Murray JC. Replication of genetic associations in the inflammation, complement, and coagulation pathways with intraventricular hemorrhage in LBW preterm neonates. *Pediatr Res*. 2011;70(1):90–95.

## 8. BIOGRAFIJA

Tatjana Varljen, rođena 1973. u Kruševcu. Osnovnu školu i prva tri razreda Srednje kemijske škole „Vladimir Nazor“ završila je u Splitu. Srednjoškolsko obrazovanje završava u Kruševcu i stiče zvanje hemijskog tehnološkog tehničara.

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1992/93 školske godine. Tokom studiranja opredeljuje se za smer humana i primenjena genetika. Eksperimentalni deo diplomskog rada na temu „Ispitivanje funkcionalnog statusa kože MTT testom u organokulturi kože“ izradila je na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Diplomski rad je odbranila sa ocenom 10 pod mentorstvom akademika dr Marka Anđelkovića 2000. godine.

U periodu od 2000. – 2002. godine na volonterskom je usavršavanju u laboratoriji za eksperimentalnu i medicinsku genetiku Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije.

Od jula 2002. godine radi u DNK laboratoriji Međunarodne komisije za nestala lica na Institutu za sudsku medicinu, Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Od aprila 2004. godine zaposlena je kao stručni saradnik na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U periodu 2008. – 2012. bila je angažovana na projektu Ministarstva zdravlja R Srbije „Obezbeđivanje uslova za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze kod dece u Srbiji“.

2011/12 godine upisala je doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, studijska grupa Molekularna medicina.

Od 2013. godine angažovana je na projektu pod naslovom „Uticaj formalina i parafinskog bloka na stepen fragmentacije molekula DNK u tkivima jetre, srca i mozga izuzetih prilikom izvođenja sudskomedicinskih obdukcija“, koji je finansiran od strane Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.

Služi se engleski jezikom.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a TATJANA VARLJEN

broj upisa MM-24/11

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA FAKTORA NEKROZE  
TUMORA  $\alpha$ , INTERLEUKIN 6 I INTERLEUKIN 1 $\beta$  KOD PREUREMENO  
RODENE DECE KAO FAKTOR RIZIKA ZA NASTANAK SEPSE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17. 5. 2019.

Tatjana Varljen

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije  
doktorskog rada**

Ime i prezime autora TATJANA VARLJEN

Broj upisa HM 24/11

Studijski program MOLEKULARNA MEDICINA

Naslov rada ASSOCIATION BETWEEN TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  PROMOTER  
-309 G/A POLYMORPHISM AND EARLY ONSET SEPSIS IN PRETERM INFANTS

Mentor \_\_\_\_\_

Potpisani W. Zemanovic

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.05.2019.

Tatjana Varljen

Prilog 3.

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA FAKTOR NEKROZE TUMORA  
INTERLEUKINA 6 I INTERLEUKINA 1 $\beta$  KOD PREVRREMENO ROĐENE DECE KAO  
koja je moje autorsko delo. FAKTOR RIZIKA ZA NASTANAK SEPSE

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na polednjoj listi).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17. 05. 2019.

Jajana Vargić