



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Jelena D. Vučić**

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ  
INFLAMATORNIH MEDIJATORA  
IZ PUPČANE VRPCE I PERIFERNE KRVI  
ZA RAZVOJ SEPSE  
KOD PREVREMENO RODJENE DECE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Jelena D. Vučić**

**THE IMPORTANCE OF INFLAMMATORY  
MEDIATORS FROM THE UMBILICAL CORD  
AND PERIPHERAL BLOOD  
IN THE PREDICTION OF SEPSIS  
IN PRETERM NEONATES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Doc. dr Tatjana Stanković, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Naslov: Prognostički značaj inflamatornih medijatora iz pupčane vrpce i periferne krvi za razvoj sepse kod prevremeno rođene dece

Rezime:

Neonatalna sepsa predstavlja veliki zdravstveni problem širom sveta, sa visokim stepenom morbiditeta. Prevremeno rođena deca su posebno osetljiva populacija za razvoj sepse, prvenstveno zbog nezrelosti njihovog imunog sistema. Rano i pravovremeno prepoznavanje septičnog stanja omogućuje brži i bolji terapijski pristup kod prematurusa. Iako su sprovedena mnogobrojna ispitivanja, u cilju otkrivanja potencijalnih biomarkera za ranu detekciju sepse, do sada ne postoji opšti konsenzus o preciznim prognostičkim faktorima za razvoj sepse. U našoj studiji pokušali smo da evaluacijom pojedinih kliničkih varijabli kod prematurusa, kao i nivoa citokina i hemokina u krvi pupčane vrpce i periferne krvi, detektujemo potencijalne biomarkere koji mogu pokazati prediktivni potencijal za razvoj sepse. Rezultati dobijeni u našoj studiji pokazuju da evaluirane kliničke varijable, vrednosti IL-5, kao i neki standardni faktori inflamacije (CRP, ukupan broj leukocita) ne pokazuju prediktivni faktor za razvoj sepse kod prematurusa. Vrednosti prokalcitonina i interferona gama u perifernoj krvi su pokazale značajan prediktivni potencijal za razvoj sepse kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje. Analiza vrednosti hemokina iz krvi pupčane vrpce (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ) pokazala je pozitivnu korelaciju sa razvitkom rane sepse kod prematurusa, što nije slučaj sa analizom njihove vrednosti iz periferne krvi. Evaluacija dobijenih rezultata u našoj studiji pokazuje da vrednost interferona gama, prokalcitonina iz periferne krvi, kao i vrednosti hemokina (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ) iz krvi pupčane vrpce, mogu predstavljati dobre prediktivne faktore sa razvoj sepse kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.

Naučna oblast: Medicina

Naučna disciplina: Pedijatrija

Ključne reči: prematurusi, septično stanje, krv pupčane vrpce, periferna krv, citokini, hemokini, predikcija

UDK: 618.38:[616.94-053.32(043.3)]

CERIF klasifikacija: B 660

Tip licence Kreativne zajednice: CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Assistant Professor dr Tatjana Stanković, MD, PhD, Faculty of Medicine University of Niš

Title: The importance of inflammatory mediators from the umbilical cord and peripheral blood in the prediction of sepsis in preterm neonates

Abstract: Neonatal sepsis represents huge health problem worldwide with high level of morbidity. Preterm neonates are especially vulnerable group, due to immature immune system. Early detection of preterm sepsis is one of the main goal for better treatment of preterm neonates. Even there are numerous studies about the possible biomarkers for early detection of sepsis in preterm neonates, positive biomarkers for sepsis prediction still remain uncertain. In our study, we tried to evaluate some preterm clinical variables, as well as levels of certain cytokines and chemokines as potential biomarkers for sepsis prediction in preterm neonates. Results obtained in our study show that some clinical variables, IL-5 levels and some inflammatory markers (CRP and white cell count) do not have predictive value for sepsis development. Levels of procalcitonin and IFN $\gamma$ , in venous blood, showed positive predictive potential for sepsis prediction in preterm neonates, 32.-36. gestational age. Values of analyzed chemokines (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ) corresponded with early sepsis development in cord blood but not in the venous blood. Evaluation of obtained results indicates that procalcitonin and IFN $\gamma$  in venous blood and chemokine levels (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ) in cord blood may represent biomarkers with great potential for sepsis prediction in preterm neonates 32.-36. gestational age.

Scientific Field: Medicine

Scientific Discipline: Pediatrics

Key Words: preterm neonates, sepsis, cord blood, venous blood, cytokines, chemokines, prediction

UDC: 618.38:[616.94-053.32(043.3)]

CERIF Classification: B 660

Creative Commons License Type: CC BY-NC-ND

*Izražavam veliku zahvalnost Prof. dr Saši Živiću koji je u meni pokrenuo inicijativu za sticanje akademskog zvanja, kao i ogromnu stručnu pomoć, savete i bezrezervnu podršku, koje mi je davao tokom izrade doktorske disertacije.*

*Iskrenu zahvalnost iskazujem svim članovima komisije, na pružanju pomoći i sugestijama pri izradi doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svom kolektivu Klinike za dečje interne bolesti, na stručnoj pomoći i podršci koju su mi pružili sve ovo vreme.*

*Takodje, zahvaljujem se kolektivu Klinike za ginekologiju i akušerstvo, koji mi je pomogao u prikupljanju materijala i podataka za izradu rada.*

*Upućujem zahvalnost laborantima Klinike za hematologiju koji su bili angažovani u obradi i čuvanju materijala, do završne analize uzoraka.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojim roditeljima za ideale koje su u meni izgradili, kao i za ogromnu podršku tokom svih ovih godina školovanja i usavršavanja.*

*I na kraju, ovu disertaciju posvećujem najvećoj svetlosti u mom životu, mojoj porodici, suprugu Miodragu i deci Marku i Andjeli.*

*Jelena D. Vučić*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
<i>1.1. Specifičnosti imunološkog sistema kod prevremeno rođene dece</i> .....	7
<i>1.2. Citokinski profil sindroma fetalnog inflamatornog odgovora</i> .....	16
2. CILJ RADA .....	21
3. MATERIJAL I METODE .....	22
<i>3.1. Vrsta studija i populacija koja se ispitivala</i> .....	22
<i>3.2. Dijagnoza septičnog stanja kod prevremeno rođene dece</i> .....	23
<i>3.3. Biohemijske i druge analize</i> .....	23
<i>3.4. Analiza citokina</i> .....	24
<i>3.5. Statistička analiza</i> .....	24
4. REZULTATI.....	26
5. DISKUSIJA .....	54
6. ZAKLJUČAK.....	65
7. LITERATURA .....	67
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	83
IZJAVE AUTORA .....	84

## LISTA SKRAĆENICA

**SIRS** - Sindrom sistemskog inflamatornog odgovora

**PCR** - Polimerizovana lančana reakcija

**CRP** - C reaktivni protein

**PCT** - Prokalcitonin

**TNF $\alpha$**  - Tumor nekrotizirajući faktor alfa

**I:T** - Odnos između nezrelih i ukupnog broja leukocita

**I:T<sup>2</sup>** - Odnos između nezrelih i ukupnog broja neutrofila

**IFN $\gamma$**  - Interferon gama

**APP** - Antimikrobni peptidi i proteini

**MBL** - Manozna vezujući lektin

**NK** - Čelije prirodne ubice

**TLR** - Tolu slični receptori

**MHC** - Glavni histokompatibilni kompleks

**TGF $\beta$**  - Tumorski faktor rasta beta

**FIRS** - Fetalni inflamatorni odgovor

**GM-CSF** - Granulocitno-monocitni stimulišući faktor rasta

**MIP-1 $\alpha$  (CCL3)** - Inflamatorni protein makrofaga 1 alfa

**MCP-1 (CCL2)** - Monocitni hemotaksni protein 1

## 1. UVOD

Neonatalna sepsa predstavlja veliki zdravstveni problem širom sveta, sa visokim stepenom morbiditeta i mortaliteta, pogotovo u razvijenim zemljama (Oza S. et al., 2015). Razvoj neonatalne sepse kod prevremeno rođene dece rezultuje značajnim mortalitetom, koji se kreće između 40%-80% (prosečno oko 49,7%) i u značajnoj meri zavisi od socio-ekonomskih uslova, dostupnosti i razvijenosti zdravstvenog sistema (Thaver D. et al., 2009). Pored toga, neonatalni mortalitet izazvan sepsom povezan je i sa vremenom pojavljivanja septičnog stanja. Uprkos značajnom napretku u neonatalnoj prevenciji, učestalost i smrtnost ove bolesti i dalje je veoma visoka. Istraživanja su pokazala da pojava rane sepse (unutar prvih 72 sata života) dostiže oko 50%, kasna sepsa (koja se javlja nakon 72 sata života) dostiže oko 15% mortaliteta (Oza S. et al., 2015; Prieto CL. et al., 2013). Učestalost razvoja sepse se značajno smanjuje, sa porastom gestacione starosti novorođenčeta, tako da u 28. gestacionoj nedelji starosti iznosi oko 20% (Stoll BJ. et al., 2010). Prevremeno rođena deca su posebno osetljiva za razvoj sepse, usled imunološke zrelosti i koegzistencije drugih bolesti (bolest hijalinih membrane, perinatalna asfiksija i druge) u odnosu na ostale uzrastne grupe novorođenčadi. U poredjenju sa decom koja su rođena u terminu, prematurusi pokazuju znatno veću stopu smrtnosti i češće je udružena sa trajnim kognitivnim i neuromuskularnim poremećajima (Turhan EE. et al., 2015; Greenberg RG. et al., 2017).

Termin neonatalna sepsa, uglavnom se koristi za označavanje sistemskog poremećaja, nastalog dejstvom različitih mikroorganizama, koje je najčešće povezano sa hemodinamskim promenama i drugim kliničkim manifestacijama (Shane AL. et al., 2017). Postavljanje dijagnoze neonatalne sepse, za razliku od drugih sistemskih infekcija, značajno je otežana. Uprkos različitom i širokom kliničkom iskustvu, sa potvrđenom ili suspektom novorođenačkom sepsom, jedinstvena i uniformna definicija i konsenzus definicije neonatalne sepse i dalje predstavlja jedan od vodećih problema u neonatologiji (Wynn JL. et al., 2014). Uobičajeno, definicija neonatalne sepse uključivala je izolaciju patogena najčešće iz krvi ili cerebrospinalne tečnosti. Međutim, imajući u vidu da klinička manifestacija septičkog stanja može biti inicirana različitim proinflamatornim citokinima, današnja definicija neonatalne sepse podrazumeva termin sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS) (Shane AL. et al., 2017).



Sadašnja istraživanja definišu sepsu kao sistemski inflamatorni odgovor u prisustvu suspektne ili dokazane infekcije, koji se razvija u prvih 28 dana života (Ohlin A. 2011). SIRS predstavlja inflamatornu reakciju organizma na različite infektivne i neinfektivne agense. Kriterijumu SIRS-a su: telesna temperatura  $>38,5^{\circ}\text{C}$  ili  $<36^{\circ}\text{C}$ , tahikardija (srčani ritam  $>2\text{SD}$  za uzrast), tahipnea (broj respiracija  $>2\text{SD}$  za uzrast), leukocitoza ili leukopenija. Sepsa je udružena sa dva ili više SIRS kriterijuma, pri čemu je obavezno prisustvo izmenjene telesne temperature ili promene u ukupnom broju leukocita (Goldstein B. et al., 2005).

U zavisnosti od vremena pojavljivanja septičnog stanja, neonatalna sepsa se može podeliti na ranu i kasnu sepsu. Oba ova oblika neonatalne sepse međusobno se razlikuju po etiološkim faktorima koji dovode do njihovog nastajanja. Naime, kliničke manifestacije rane sepse se javljaju u prvih 72 časova života i u najvećoj meri su izazvane infekcijom beta hemolitičkog streptokoka, ređe ešerijihijom koli (Shane AL. et al., 2017). Ovaj tip neonatalne sepse najčešće se javlja kao posledica tzv. vertikalne transmisije, odnosno transmisijom uzročnika sa majke na plod. S druge strane, kasna neonatalna sepsa, koja se javlja posle 72 časova nakon porodjaja, predstavlja tzv. horizontalni tip transmisije, kao posledica uticaja faktora spoljašnje sredine (prolongiranog intenzivnog lečenja, mehaničke ventilacije, intravaskularne kateterizacije, parenteralne ishrane, torakalne i lumbalne punkcije kao i interreacije sa okolinom tokom boravka u neonatalnim intenzivnim jedinicama (Simonsen KA. et al., 2014; Dong Y. et al., 2015). Rana neonatalna sepsa započinje u uterusu, kao posledica transplacentalnog prolaska antigena ili ascedentim ulaskom patogena iz vaginalnog okruženja. Takodje, ovaj tip sepse može nastati i kao posledica prolaska kroz porodjajne kanale, u kojima su prisutni različiti patogeni. Naime, porodjajni kanal je kolonizovan različitim aerobnim i anaerobnim bakterijama koji mogu biti vertikalno transmitovani, dovodeći do infekcije amnionske tečnosti ili infekcije neonatusa tokom porodjaja (Rampersaud R. et al., 2012). Horioamnionitis, koji nastaje kao posledica prodora patogena, može izazvati tipičnu kliničku sliku kod majke ali može proći i asimptomatski, sa promenama u laboratorijskim analizama. Najčešći simptom koji se javlja kod ploda je tahikardija, da bi kasnije usledilo prevremeno pucanje plodovih ovojaka i prevremeno rodjenje (Wortham JM. et al., 2016). Nerazvijenost imunog sistema kod novorodjenčeta, sa smanjenom funkcijom neutrofila i niskom koncentracijom imunoglobulina, predstavlja jedan od osnovnih uzroka za nastanak kasne neonatalne sepse. Odmah nakon rodjenja, novorodjenčad je izložena brojnim patogenima u

okolini u kojoj borave, uključujući kontakt sa bolničkim osobljem, članovima porodice, medicinskom opremom, kao i nutritivnim izvorima. Izlaganje nezrelog imunog sistema novorođenčeta različitim patogenima, na kraju rezultuje razvitkom kasne neonatalne sepse (Shane AL. et al., 2017). Takođe, intravaskularna kateterizacija predstavlja etiološki faktor za ulazak patogena u organizam novorođenčeta. Infekcije izazvane ovim putem, najčešće se pripisuju gram pozitivnim mikroorganizmima, uključujući koagulaza negativne stafilokoke i streptokoke (Bizzarro MJ. et al., 2011).

Klinički simptomi i znaci neonatalne sepse su veoma nespecifični, minimalni, često slični neinfektivnim stanjima i variraju u zavisnosti od gestacione starosti i težine inflamatornog procesa. Inicijalni simptomi kod prematurusa se javljaju u vidu apneje, bradikardije i cijanoze koji se javljaju kod oko 66% obolelih, nakon čega slede letargija (49%) i povećan respiratorni napor (43%) (Lim WH. et al., 2012). Kasnije komplikacije sepse mogu uključiti respiratorni kolaps, plućnu hipertenziju, kardijalni kolaps, disfunkciju digestivnog trakta, renalnu disfunkciju, disfunkcije CNS-a, disfunkciju jetre, šok, trombozu i disfunkciju koštane srži (Shane AL. et al., 2017). Imajući u vidu brojne komplikacije koje se mogu javiti nakon inicijacije neonatalne sepse, empirijska upotreba antibiotika, bez dokazane hemokulture, je opravdana odmah nakon pojavljivanja prvih kliničkih znakova bolesti. Neonatalna sepsa potvrđena pozitivnom hemokulturom, predstavlja tzv. zlatni standard u dijagnozi septičnog stanja. Za pravilnu i potpunu identifikaciju patogena hemokulturom, neophodno je minimum dve venepunkcije (sa dva različita mesta) u kojima je detektovano prisustvo identičnog patogena (Shane AL. et al., 2017). Na osnovu odluke neonatologa, indikovane su i mikrobiološke, citološke i biohemijske analize drugih telesnih tečnosti (urin, cerebrospinalne tečnosti, trahealnog aspirata). Ovo je neophodno napomenuti, s obzirom da pojedini patogeni mogu biti detektovani samo u cerebrospinalnoj tečnosti ali ne i u krvi, što ukazuje da u pojedinim slučajevima lumbalna punkcija neonatusa predstavlja neohodan korak za dijagnozu septičnog stanja (Stoll BJ. et al., 2004). Pored toga, urinarne infekcije po tipu urosepse se pojavljuju često kod prematurusa, pa ih treba uzeti u obzir pri evaluaciji sepse kod prevremeno rođene dece (Ruangkit C. et al., 2016). Takođe, primena savremenih tehnika u molekularnoj biologiji, kao što je PCR (Polymerase chain reaction - Polimerizovana lančana reakcija), omogućuje znatno bržu identifikaciju uzročnika infekcije, bez prethodne analize hemokulture. Iako ova metoda pokazuje izrazitu senzitivnost u detekciji uzročnika infekcije, glavni nedostatak je nemogućnost razlikovanja

akutne infekcije od ranijih infekcija koje su u remisiji (Benitz WE. 2010), ukazujući da nije umnogome doprinela većoj senzitivnosti samih dijagnostičkih algoritama (Straub J. et al., 2017; Tuzun F. et al., 2019).

Prethodno navedene činjenice ukazuju da je neophodno uvođenje novih analiza, kao i novih biomarkera, koji bi omogućili bržu i precizniju detekciju sepse od ostalih stanja koji mogu pokazivati sličnu simptomatologiju. Pravovremena i pravilna detekcija septičnog stanja kod novorodjenčadi, rezultirala bi racionalnijom upotrebom antibiotske terapije. Naime, pokazano je da prematurusi, posebno sa malom porodjajnom težinom, dobijaju antibiotsku terapiju u prvim danima života, bez prethodne mikrobiološke potvrde infektivnog agensa (Flannery DD. et al., 2018). Iako je primena ove terapije opravdana i neophodna, prolongirana antibiotska terapija je često povezana sa povećanom mogućnošću za razvoj nekrotizirajućeg enterokolitisa, gljivičnih infekcija, antibiotske rezistencije, i retinopatije kod prevremeno rođene dece (Novitsky A. et al., 2015). Imajući u vidu sve moguće komplikacije koje se mogu javiti, definisanje novih biomarkera koji bi omogućili razlikovanje novorodjenčadi kojoj je ova terapija zaista neophodna, predstavljalo bi značajan korak unapred u svakodnevnom kliničkom radu.

S obzirom da inflamatorni proces predstavlja dominantan proces u nastanku septičnog stanja, mnogobrojna ispitivanja su bila usmerena na evaluaciju brojnih inflamatornih medijatora u cilju rane dijagnoze septičnog stanja kod prevremeno rođene dece. Inicijalna ispitivanja su prevashodno obuhvatala proteine akutne faze zapaljenja, uključujući CRP (C reaktivni protein) i prokalcitonin (PCT). CRP je jedan od najčešće ispitivanih laboratorijskih markera u dijagnozi neonatalne sepse. Prolazak CRP-a kroz placentu je kvantitativno veoma mali i povećane vrednosti kod neonatusa ukazuju na endogenu sintezu. Ovaj protein akutne faze zapaljenja sintetiše se u hepatocitima, pri čemu značajnu ulogu u stimulaciji sinteze ovog proteina pentamerne strukture, poseduju brojni citokini, kao što si IL-6, IL-1 i TNF $\alpha$  (Ismail AQ. et al., 2015). Njegova osnovna uloga u urođenom imunom sistemu jeste opsonizacija različitih mikroorganizama i stimulacija sistema komplementa (Sproston NR. et al., 2018). Osnovni nedostatak ovog proteina, jeste njegov poluživot, koji iznosi 24-48 sati i neophodno mu je 10-12 sati da postigne povećane vrednosti u krvi (Hofer N. et a., 2012), zbog čega ne može biti sa sigurnošću upotrebljen u dijagnozi septičnog stanja kod novorodjenčadi. Serijsko ispitivanje vrednosti CRP-a, u terminu od 24-48 sati od početka inicijalnih simptoma, pokazala su da se

senzitivnost CRP-a, u predikciji razvoja kasne neonatalne sepse, povećava (Hofer N. et al., 2012), kao i da poseduje značajnu ulogu u monitoringu odgovora na primenjenu terapiju (Franz AR. et al., 1999). Takodje, serijsko praćenje vrednosti CRP-a, koje pokazuju normalne vrednosti, predstavljaju dobar indikator odsutnosti neonatalne sepse, nakon čega može doći do prekida antibiotske terapije (Benitz WE. 2010).

Prokalcitonin, predstavlja još jedan protein akutne faze zapaljenja ali je ujedno i prohormon kalcitonina. Iako je prohormon kalcitonina, na vrednosti ovog peptida ne utiče koncentracija kalcitonina. PCT proizvode i sekretuju hepatociti i makrofazi i pokazano je da je u uskoj vezi sa imunomodulacijom i vaskularnim odgovorom koji se javlja kod SIRS-a (Sharma D. et al., 2018). Detaljna uloga i značaj PCT-a u patogenezi razvika septičnog stanja još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, pokazano je da PCT povećava adhezivna svojstva leukocita, njihovu sposobnost da proizvode proinflatorne citokine, kao i azot monoksid i na taj način povećava proinflatornu kaskadu u septičnom stanju (Becker KL. et al., 2010). Jedna od glavnih karakteristika ovog proteina jeste da vrednosti PCT-a rastu 2-4 sata nakon izlaganja bakterijskom endotoksinu, dok se maksimalne vrednosti postižu u roku od 6-8 sati i ostaju povećane sledećih 24 sata (Dandona P. et al., 1994). Ovakav nagli porast vrednosti PCT-a, u inicijalnoj fazi bakterijske infekcije, ukazuje na njegovu dobru prediktivnu vrednost u dijagnozi rane sepse kod neonatusa. Još jedna od značajnih prednosti PCT-a jeste da njegove vrednosti ostaju veoma dugo prisutne u serumu, u odnosu na neke druge biomarkere, uključujući IL-6 i TNF $\alpha$ , omogućujući njegovu primenu u predikciji infekcije i praćenju odgovora na primenjenu terapiju (Whicher J. et al., 2001). Pored toga, pokazano je da kod novorodjenčadi postoji tzv. fiziološka fluktuacija vrednosti PCT-a, neposredno nakon rođenja. Naime, na rođenju vrednosti PCT-a su relativno niske, nakon čega rastu u prvih 24 sata života, da bi se ponovo vratile na fiziološki nivo nakon 48 časova. Ovakva fluktuacija koncentracije PCT-a može se objasniti bakterijskom kolonizacijom digestivnog trakta neonatusa, kao i izvesnim perinatalnim (perinatalna asfiksija) i materalnim (horioamnioitis, preeklampsija) faktorima (Chiesa C. et al., 1998; Chiesa C. et al., 2003).

Pored navedenih proteina akutne faze zapaljenja (CRP i PCT), ukupan broj leukocita, kao i vrednosti pojedinih subpopulacija (apsolutna i relativna leukocitarna formula), takodje se svakodnevno koriste u cilju dijagnoze septičnog stanja kod neonatusa. Ispitivanja su pokazala da,

pored ukupnog broja leukocita, odnos između nezrelih i ukupnog broja leukocita (I:T), kao i odnos između nezrelih i ukupnog broja neutrofila (I:T<sup>2</sup>), imaju značajnu ulogu u predikciji razvoja septičnog stanja (Sharma D. et al., 2018). Također, pokazano je da u odnosu na ukupan broj leukocita, I:T<sup>2</sup> i I:T odnos imaju mnogo veći prediktivni potencijal za predikciju bakterijske infekcije, kada se analiziraju posle 4. sata od rođenja (Newman TB. et al., 2014). Potrebno je napomenuti i da promenjene vrednosti ukupnog broja leukocita mogu nastati kao posledica fetalnog izlaganja intrauterinoj inflamaciji, ali ne i kod sepse, što se često može videti kod razvijenog horioamnionitisa (Jackson GL. et al., 2004). Glavni učinak, određivanja ukupnog broja leukocita, jeste mogućnost negativne predikcije. S tim u vezi, ranija ispitivanja su pokazala da normalan I:T odnos, zajedno sa dokazanom sterilnom hemokulturom, predstavljaju negativne prediktore za razvoj neonatalne sepse (Murphy K. et al., 2012). Pored toga, potrebno je uzeti u obzir da vrednosti ukupnog broja leukocita pokazuju dinamičke vrednosti, pogotovo u prvih 12 časova života, ukazujući da bi serijsko određivanje ukupnog broja leukocita u periodu od 24 časova, imalo mnogo bolji prediktivni potencijal za razvoj septičnog stanja (Mikhael M. et al., 2014).

Iako se svi navedeni biomarkeri rutinski koriste prilikom identifikacije neonatalne sepse, najveći broj studija pokazao je da se stepen njihove dijagnostičke senzitivnosti i specifičnosti, uglavnom, ostvaruje u vremenskom rasponu od 24-24 časova (Gilfillan M. et al., 2019). S obzirom na brzinu razvoja kliničke slike sepse i mogućnosti njenih komplikacija, posebno kod prevremeno rođene dece, od posebnog značaja bila bi identifikacija odgovarajućih biomarkera, koji bi omogućili ranu predikciju razvoja septičnog stanja. Potencijalni biomarkeri bi morali biti uključeni u proces patogeneze sepse, u što ranijoj fazi, što bi na kraju rezultiralo njihovom boljom specifičnošću i senzitivnošću. Rana predikcija i pravovremeni terapijski pristup kod prevremeno rođene dece prevenirali bi moguće komplikacije. Imajući u vidu visok stepen morbiditeta i mortaliteta kod neonatalne sepse, posebno kod prevremeno rođene dece, brojna istraživanja su bila usmerena na identifikaciji takvih biomarkera. Ranija ispitivanja su bila fokusirana na evaluaciju proinflamatornih citokina (IL-6, IL-8 IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ ), kao i stepen ekspresije CD64 molekula (koji predstavlja visoko afinitetni receptor za IgG) na površini leukocita (Leal YA. et al., 2019; Hibbert J. et al., 2020; Otsubo Y. et al., 2017). Evaluirani biomarkeri pokazali su komparabilnu dijagnostičku senzitivnost i specifičnost, u odnosu na klasične ispitivane biomarkere (CRP i PCT). Međutim, navedeni biomarkeri pokazali su daleko

raniju senzitivnost u odnosu proteine akutne faze zapaljenja, zbog čega mogu poslužiti kao rani markeri razvoja septičnog stanja (Meem M. et al., 2011; Shane AL. et al., 2017; Sharma D. et al., 2018).

Brojna istraživanja usmerena su na ispitivanje i identifikaciju mogućih biomarkera za ranu dijagnozu septičnog stanja kod neonatusa u cilju prevencije razvoja septičnog stanja. Ovakva strategija se prvenstveno bazira na definisanju imunoloških parametara, koji bi identifikovali neonatuse sa povećanim rizikom za razvoj septičnog stanja. To se pre svega odnosi na određivanje nivoa citokina i hemokina preko kojih bi se, još na rođenju, stekla slika imunološkog profila neonatusa koja može da ukaže na već prisutnu infekciju ili povećanu sklonost za razvoj infekcije. Različite studije su pokazale da povećane koncentracije IL-6 i IL-8 mogu posedovati značajan prediktivni potencijal u detekciji razvoja ranog septičnog stanja (Leal YA. et al., 2019; Otsubo Y. et al., 2017). U cilju pravilne definicije imunoloških parametara, koji bi potencijalno imali prediktivni značaj za razvoj neonatalne sepse, neophodno je uzeti u obzir specifičnosti imunološkog sistema neonatusa, posebno prematurusa. Naime, kod prevremeno rođene dece, imunološki sistem nije u potpunosti razvijen i formiran, što ujedno predstavlja i osnovni razlog veće učestalosti i smrtnosti od sepse u ovoj uzrastnoj grupi novorodjenčadi.

### ***1.1. Specifičnosti imunološkog sistema kod prevremeno rođene dece***

Nakon rođenja, kao i kod drugih organa i sistema, imunološki sistem novorodjenčadi nije u potpunosti razvijen. Nezrelost imunološkog sistema je još više izražena kod prevremeno rođene dece, što predstavlja jedan od osnovnih etioloških faktora koji su odgovorni za razvoj sepse (Wynn JL. et al., 2009). Prematurusi poseduju nepotpuno razvijen urođeni i stečeni imunitet, te nedostatak interakcije između ova dva sistema, u velikoj meri olakšava različitim faktorima da značajnu modulišu aktivnost njihovog imunološkog sistema (Strunk T. et al., 2004). Najranija zaštita novorodjenčadi od patogenih mikroorganizama se postiže antitelima koje plod dobija transplacentarno od majke. Međutim, ovaj vid pasivne imunosti je relativno kratkotrajan i ne traje duže od šest meseci, ali omogućuje da se imunološki sistem prilagodi uslovima spoljašnje sredine. S obzirom da se proces transfera antitela intenzivira nakon 32. gestacione nedelje prevremeno rođena deca su u značajnoj meri uskraćena za ovaj vid zaštite (van den Berg JP. et al., 2011). Zbog svega navedenog, prematurusi se uglavnom oslanjaju na odbrambene sposobnosti urođenog imunološkog sistema, koji je slab i posledica je njegove nezrelosti. S

druge strane, imunološki sistem neonatusa je tolerantnijih karakteristika u odnosu na adultni organizam, što je delimično posledica imunosupresivne mikrosredine koja se uspostavlja intrauterino. Ova karakteristika je značajna u prevenciji nekontrolisanog inflamacijskog odgovora protiv brojnih bezopasnih antigena sredine, sa kojima novorođenče stupa u kontakt neposredno nakon rođenja, ali je ujedno i razlog veće podložnosti infekcijama (van den Berg JP. et al., 2011).

Urođeni imunitet kod prevremeno rođene dece je slabo razvijen. Takođe, potencijal urođenog imuniteta za adekvatnim odgovorom je smanjen, prevashodno kao posledica nedostatka solubilnih proteina i peptida, kao i umanjenog celularnog odgovora na infekciju (Melville JM. et al., 2013). Naime, urođeni imunitet pored epitelnih barijera obuhvata različite ćelije krvi, tkiva kao i solubilne medijatore krvne plazme koji poseduju mikrobicidna svojstva. Sve ove navedene komponente urođenog imuniteta, omogućuju ranu zaštitu od infekcije, a ujedno su i neophodne za pokretanje stečenog imuniteta.

Različiti solubilni proteini i peptidi u krvnoj plazmi pružaju ranu zaštitu od infekcije, na taj način što ispoljavaju direktna mikrobicidna svojstva ili vrše opsonizaciju mikroorganizama što na kraju rezultuje olakšanom identifikacijom i posledičnom fagocitozom. Antimikrobni proteini i peptidi (APP - antimicrobial peptides and proteins) predstavljaju katjonske molekule koje oslobadaju neutrofile, monociti, makrofazi i epitelne ćelije digestivnog, respiratornog i urogenitalnog trakta, što rezultuje time da su prisutni gotovo u svim telesnim tečnostima. APP obuhvata široku grupu proteina i peptida, uključujući defenzine, protegrine, kalprotektin, laktoferin, kao i lizozim. Oni svojim vezivanjem za mikroorganizme različitim mehanizmima posreduju u njihovoj eliminaciji (Kai-Larsen Y. et al., 2014). Ukupna količina navedenih peptida i proteina je smanjena kod prevremeno rođene dece, u odnosu na novorođenčad u terminu, u krvnoj plazmi ali i unutar ćelija imunološkog sistema i epitela (Strunk T. et al., 2011). Ranija ispitivanja su pokazala da je aplikovanje laktoferina dovelo do smanjene pojave kasne neonatalne sepse, kod dece sa veoma malom porođajnom težinom (Manzoni P. et al., 2009).

U okviru urođenog imuniteta kod prevremeno rođene dece, sistem komplementa (klasičan, alternativan i lektinski put aktivacije) je, takođe, redukovano. Naime, kod prevremeno rođene dece postoji smanjena produkcija C1 i C4 komponente komplementa (neophodne za aktivaciju klasičnog puta), kao i faktora B (neophodnog za aktivaciju alternativnog puta), u

odnosu na novorođenčad rođenu u terminu (McGreal EP. et al., 2012). Kod prematurusa postoji smanjena produkcija manosa vezujućeg lektina (MBL – mannose binding lectin), koji svojim vezivanjem za površinu mikroorganizama vrše njegovu opsonizaciju i aktiviraju sistem komplementa lektinskim putem. Produkcija MBL-a se povećava sa gestacionom starošću, pa je njihova količina, kod prematurusa, očekivano mala (Swierzko AS. et al., 2009). Ovakvi nedostaci nećelijskog odgovora na prisustvo patogena na kraju dovode do smanjene sposobnosti fagocitoze i umanjene eradikacije patogena kod prevremeno rođene dece (Melville JM. et al., 2013).

Tokom fetalnog razvoja, prvo dolazi do formiranja urođenog imuniteta. Sazrevanje granulocita započinje tokom 12. gestacione nedelje, monociti i makrofazi počinju sa maturacijom tokom 16. gestacione nedelje, dok sazrevanje NK (natural killers - ćelije prirodne ubice) se odigrava tokom 21. gestacione nedelje (Segura-Cervantes et al., 2016). T i B limfociti se prvi put pojavljuju, u nezreloj formi, tokom 7. gestacione nedelje. Limfociti podležu procesu maturacije, kada dolazi do ekspresije brojnih molekula na svojoj površini, koji im omogućuju da razlikuju sopstvene od stranih antigena. Njihova potpuna maturacija se ne završava pre 32. gestacione nedelje, što može poslužiti kao jedan od osnovnih uzroka u različitim vrstama citokina koje mogu produkovati limfociti prematurusa rođenih pre ili posle 32. gestacione nedelje (Segura-Cervantes et al., 2016).

Imajući u vidu da su neutrofili najzastupljenija populacija granulocita, ove ćelije prve dolaze na mesto inflamacije, pružajući ranu antibakterijsku zaštitu, zbog čega su one najbolje proučene ćelije imunološkog sistema novorođenčeta. S obzirom na vreme i dužinu maturacije neutrofila, kod prematurusa ukupan broj neutrofila u krvi je znatno manji, u odnosu na terminski rođenu decu. Depoi neutrofila u koštanoj srži su takodje manji, tako da prematurusi rođeni pre 32. gestacione nedelje poseduju depoe neutrofila koji iznose svega 20% u odnosu na depoe kod dece rođene u terminu (Carr R. et al., 2000). Smanjen ukupan broj neutrofila kod prematurusa dovodi i do slabijeg neutrofilnog odgovora u slučaju infekcije, čime se može objasniti i nastanak neutropenije u septičnom stanju kod prevremeno rođene dece. Pored smanjenog ukupnog broja neutrofila kod prematurusa, prisutne su i redukovane fiziološke sposobnosti ovih ćelija, u odnosu na terminski rođenu decu. Naime, neutrofili prematurusa poseduju manju ekspresiju TLR (Toll like receptors –Tolu slični receptori), što dovodi do redukovane sposobnosti da pokrenu



proinflamacijski program u ćeliji, rezultujući njihovom slabijom efikasnošću u prepoznavanju mikroorganizama. Takođe, neutrofili prematurusa imaju smanjenu ekspresiju adhezivnih molekula, kao što su L i E selektina, zbog čega je njihova migracija ka mestu inflamacije značajno smanjena (Nussbaum C. et al., 2011). Sem toga, smanjena produkcija slobodnih kiseoničkih radikala i smanjena kapacitativnost fagocitoze, kao posledica njihove nepotpune zrelosti, umanjuje fagocitnu sposobnost neutrofila kod prematurusa i povećava njihovu sklonost ka infekciji (Yost CC. et al., 2009).

Pored fagocitne sposobnosti koja omogućuje direktnu eliminaciju bakterijskih mikroorganizama, monociti su ćelije koje su posebno značajne u pokretanju stečenog imunog odgovora, imajući u vidu da se nakon migracije u tkiva mogu transformisati u makrofage i dendritične ćelije, koje se ponašaju kao profesionalne antigen prezentujuće ćelije. Kod prematurusa, ukupan broj monocita kao i njihova fiziološka funkcija je redukovana, u odnosu na terminski rodjenu decu (Iliodromiti Z. et al., 2013). To se pre svega odnosi na njihovu sposobnost da produkuju i sekretuju proinflamatorne citokine (IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ), nakon stimulacije mikroorganizmima, dok je njihova fagocitna sposobnost gotovo podjednako efikasna kao i kod terminske novorodjenčadi (Currie AJ. Et al., 2011; Pérez A. et al., 2010). Potrebno je naglasiti da postoji njihova redukovana sposobnost u aktivaciji stečenog imunog odgovora, prevashodno kao posledica smanjene ekspresije MHC (Major histocompatibility complex - glavni histokompatibilni kompleks) molekula II klase na površini leukocita prematurusa, što na kraju dovodi do nemogućnosti prezentovanja antigena T ćelijama i njihovu konačnu aktivaciju (Pérez A. et al., 2010).

NK ćelije predstavljaju posebnu subpopulaciju limfocita koja se ubraja u komponente urođenog imuniteta. Ove ćelije su veoma značajne u odbrani od virusnih infekcija, jer imaju sposobnost da, medju prvima, prepoznaju sopstvene inficirane ćelije. Takođe, učestvuju u procesu eliminacije inficiranih ćelija, oslobadjanjem velikih količina IFN $\gamma$ , koji predstavlja jedan od najpotentnijih stimulatora mikrobicidnih svojstava makrofaga. Sa porastom gestacione starosti dolazi i do povećanja ukupnog broja NK ćelija, kao i njihove citotoksične sposobnosti (Georgeson GD. et al., 2001). Potrebno je napomenuti da na rodjenju, NK ćelije eksprimiraju veću količinu inhibicijskih receptora (CD94/NKG2A i LIR-1/ILT-2), a istovremeno poseduju manju količinu aktivacionih receptora (NKG2D). Navedeni fenotip NK ćelija ukazuje da je

neophodan znatno snažniji signal za aktivaciju ovih ćelija. S druge strane, njihova sposobnost da produkuju  $\text{IFN}\gamma$  je mnogo veća u poredjenju sa adultnim NK ćelijama (Le Garff-Tavernier M. et al., 2010). Sem toga, potrebno je istaći da nizak nivo ukupnog broja NK ćelija na rođenju, kod prematurusa, pogoduju razvoju infekcije (Ma L. et al., 2014).

Dendritične ćelije i makrofazi, pored toga što predstavljaju profesionalne antigen prezentujuće ćelije, ujedno su i glavni nosioci urođenog imuniteta u tkivima. Ove ćelije, nakon fagocitoze odgovarajućeg patogena, prikazuju antigen na svojoj površini, u sklopu MHC molekula, T ćelijama. To je neophodno za pravilnu i potpunu aktivaciju T ćelija, jer na taj način dobijaju neophodan drugi (kostimulacijski) signal. Kod prevremeno rođene dece, dendritične ćelije eksprimiraju manji nivo TLR receptora (TLR-2 i TLR-4) (Quinello C. et al., 2014), što rezultuje time da indukuje slabiju produkciju proinflamatornih citokina (IL-6, IL-12,  $\text{IFN}\gamma$ , TNF $\alpha$ ) u odnosu na terminsku novorođenčad. Za razliku od proinflamatornih citokina, nije detektovana razlika u produkciji imunosupresivnog citokina (IL-10) između prematurusa i terminske novorođenčadi (Lavoie PM. et al., 2010). Takođe, pokazana je manja ekspresija MHC molekula II klase na površini dendritičnih ćelija prematurusa (Langrish CL. et al., 2002), kao i manja ekspresija kostimulacijskih molekula (CD80 i CD86), što ukazuje na njihovu slabiju sposobnost prerade i prezentacije antigena, kao i redukovanu inicijaciju stečenog imunog odgovora. U prilog ovakvim nalazima, govore rezultati istraživanja koji su pokazali da ovakav fenotip dendritičnih ćelija u kulturama sa alogenim T ćelijama rezultuje smanjenim intenzitetom ćelijske proliferacije i produkcije  $\text{IFN}\gamma$  (Langrish CL. et al., 2002).

Stečeni imunitet obuhvata T i B limfocite i predstavlja daleko specifičniji imuni odgovor na patogene, uključujući i formiranje imunološke memorije. Ovaj imunitet pruža daleko efikasniju i dugotrajniju zaštitu organizma. Genetska rekombinacija različitih površinskih receptora na limfocitima, omogućuje povećan repertoar za prepoznavanje različitih patogena, što na kraju rezultuje znatno bržim i efikasnijim imunim odgovorom u eliminaciji specifičnog patogena. Sazrevanje stečenog imuniteta se odigrava, nakon rođenja, tako da sva novorođenčad poseduju smanjen kapacitet T ćelijske aktivacije i produkcije imunoglobulina, u odnosu na adultne osobe (Melville JM. et al., 2013).

T ćelije su nosioci celularnog imuniteta koji je prevashodno značajan u zaštiti od infekcija izazvanih intracelularnim mikroorganizmima. Na osnovu eksprimiranih površinskih

markera, kao i vrste efektorskih funkcija, T ćelije se mogu podeliti u dve velike grupe, uključujući CD8<sup>+</sup> T ćelije i CD4<sup>+</sup> T ćelije. Nakon aktivacije, CD8<sup>+</sup> T ćelije veoma brzo proliferišu i diferenciraju se u citotoksične T ćelije. Ovako formirane ćelije odlaze do mesta infekcije, gde prepoznaju sopstvene inficirane ćelije i pomažu u njihovoj eradikaciji produkcijom citolitičkih proteina, kao što su perforin i granzim. S druge strane, CD4<sup>+</sup> T ćelije se nakon aktivacije diferenciraju u pomoćničke T ćelije (T helper cells, Th), koje poseduju sposobnost produkcije i sekrecije citokina, čime stimulišu efektorske funkcije drugih ćelija imunološkog sistema. Th ćelije se mogu podeliti na nekoliko različitih subpopulacija, u zavisnosti od vrste transkripcionih faktora, od vrste produkovanih citokina, kao i specifičnosti njihovih funkcija (Melville JM. et al., 2013). Najznačajnije subpopulacije Th ćelija, uključuju Th1, Th2, Th17 i regulatorne T ćelije. Th1 ćelije nastaju ukoliko CD4<sup>+</sup> T ćelije, prilikom aktivacije, budu izložene visokim koncentracijama IFN $\gamma$  i IL-12. U takvim situacijama dolazi do aktivacije transkripcionog faktora T-bet, koji je odgovoran za nastanak fenotipskih karakteristika ove ćelijske linije. Odmah nakon formiranja, Th1 ćelije proizvode ogromne količine IL-2 i IFN $\gamma$  koji dovode do razvoja proinflamatornog M1 fenotipa makrofaga, što na kraju dovodi do povećanja mikrobicidnih kapaciteta makrofaga (Luckheeram RV. et al., 2012). Za razliku od Th1 ćelija, Th2 ćelije nastaju u prisustvu velikih količina IL-4, što dovodi do ekspresije transkripcionog faktora GATA-3. Aktivacija navedenog transkripcionog faktora dovodi do pojačane produkcije i oslobađanja IL-4, IL-5 i IL-13 (Luckheeram RV. et al., 2012). Navedeni citokini su veoma značajni u odbrani od parazita ali istovremeno stimulišu nastanak M2 fenotipa makrofaga, koji posreduju u rezoluciji inflamatornog procesa i reparaciji tkiva, prevashodno produkcijom imunosupresivnih citokina (IL-10 i TGF $\beta$ ), kao i sekrecijom različitih faktora rasta (Melville JM. et al., 2013). Pored navedenih subpopulacija CD4<sup>+</sup> T ćelija, Th17 subpopulacija nastaje u uslovima visokih koncentracija IL-1, IL-6, IL-23 i TGF $\beta$ . Prisutnost navedenih citokina, aktivira njihov specifični transkripcioni faktor ROR $\gamma$ T. Najznačajniji citokini koje proizvode ove ćelije su IL-17 i IL-22. Ovi citokini prevashodno jačaju funkciju epitelnih barijera, ali su, takodje, uključene u odbrani organizma od ekstracelularnih patogena i gljivičnih infekcija (Luckheeram RV. et al., 2012). Za razliku od prethodno navedenih ćelija, regulatorne T ćelije nastaju u prisustvu visokih koncentracija IL-2 i TGF $\beta$ . Navedeni citokini stimulišu specifični transkripcioni faktor ovih ćelija (FoxP3). Nakon aktivacije ovih ćelija, one proizvode i sekretuju velike količine IL-10 i TGF $\beta$  i istovremeno, na svojoj površini, ekspimiraju negativne

kostimulatore (PD-1L I CTLA-4). Aktivacijom ovih ćelija dolazi do značajne imunosupresije, čime je omogućena kontrola intenziteta imunološke reakcije, što je neophodno za uspostavljanje imunološke autotolerancije (Luckheeram RV. et al., 2012).

Celularni imunitet se razvija tokom čitavog života, tako da na rođenju broj T ćelija je znatno niži u odnosu na odrasle. Jedna od osnovnih karakteristika T ćelija neonatusa jeste postojanje tzv. naivnog fenotipa (CD45RA+), odnosno izuzetno mali procenat memorijskih T ćelija. Navedene karakteristike nastaju najverovatnije kao posledica izostanka antigenske stimulacije, a delimično kao posledica neadekvatne funkcije dendritičnih ćelija (Huenecke S. et al., 2016). Potrebno je istaći da kod prevremeno rođene dece u subpopulaciji CD4+ T ćelija susreće se manji procenat naivnih ćelija i veći procenat efektorskih (CD27-) i aktivisanih (CD45RO+) ćelija, u odnosu na terminsku novorođenčad (Scheible KM. et al., 2015). Navedeni fenotip ćelija može nastati kao posledica postojanja inflamatornog procesa (horioamnioitisa) koji može predstavljati osnovni faktor za prevremeni porodaj (Luciano AA. et al., 2011). S druge strane, neka ispitivanja ukazuju da navedeno stanje može nastati zbog slabijeg oslobađanja T ćelija iz timusa, zbog čega kompenzatorno dolazi do spontane proliferacije T ćelija (Amatuni GS. et al., 2019). Na ovaj način dolazi do stvaranja većeg broja CD8+ T ćelija sa ograničenim antigenim repertoarom, dok istovremeno pokazuju fenotipske karakteristike aktivisanih ćelija. Zbog svega navedenog, ove ćelije imaju niži prag aktivacije (zbog slabije ekspresije regulatornog CD31 molekula) i veći kapacitet produkcije proinflamatornih citokina (IFN $\gamma$ , IL-2 i TNF $\alpha$ ) (Scheible KM. et al., 2015). Navedena imunološka disregulacija CD8+ T ćelija, kod prematurusa, može da ukaže na neefikasnost ovih ćelija i njihovu sklonost ka nespecifičnom inflamatornom odgovoru, koji se nalazi u osnovi mnogih patoloških stanja, uključujući i septično stanje.

Različita ispitivanja su pokazala da je deficit, u apsolutnom broju subpopulacije limfocita, najizraženiji na nivou CD4+ T ćelija (Walker JC. Et al., 2011; Huenecke S. et al., 2016). Prilikom analize transkripcionih faktora subpopulacija CD4+ T ćelija, odnosno T-bet, GATA-3 i ROR $\gamma$ T, pokazan je snižen odnos T-bet/GATA-3 (Qazi KR. et al., 2020). S druge strane, mononuklearne ćelije, izolovane iz pupčane vrpce prevremeno rođene dece, proizvode niži nivo Th1 citokina (IFN $\gamma$ ) i znatno veće nivoe Th2 citokina (IL-5) (Dirix V. et al., 2013), što ukazuje na dominantnu Th2 polarizaciju imunološkog odgovora. Ovakva polarizacija može

nastati kao posledica fenotipskih karakteristika dendritičnih ćelija, kao i manje produkcije IL-12 koji je neophodan za diferencijaciju Th1 imunološkog odgovora. Takođe, razlog može biti i karakteristika CD4+ T ćelija, imajući u vidu da neonatalne Th1 ćelije eksprimiraju povećan nivo receptora za IL-4, čija stimulacija uvodi ove ćelije u programiranu ćelijsku smrt, favorizujući Th2 dominaciju (Lee HH. et al., 2008). Stvorena Th2 dominacija ima značajnu ulogu u formiranju neonatalne tolerancije, ali istovremeno i razlog povećane sklonosti ka infekcijama (Holt PG. 2004). Treba napomenuti da kod prevremeno rođene dece nisu uočene značajne razlike u nivou ekspresije transkripcionog faktora Th17 ćelija, u odnosu na terminsku novorođenčad (Qazi KR. et al., 2020). Dalje, CD4+ T ćelije, izolovane iz pupčane vrpce, ne pokreću proces diferencijacije ka Th17 fenotipu u prisustvu diferencijalnih faktora, kao što su IL-6 i IL-23 (de Roock S. et al., 2013). Kod prematurusa, na nivou CD4+ T ćelija, postoji veći procenat TNF $\alpha$  produkujućih ćelija (CD31-) koje nastaju u jetri. Istovremeno, smanjen je udeo CD31+ CD4+ ćelija, oslobođenih iz timusa, koje sekretuju IL-8 (Scheible KM. et al., 2018). Produkovani IL-8 pripada hemokinima (CXCL8) čija je primarna funkcija da izazove hemotaksu neutrofila, a pored toga stimuliše njihovu mikrobicidnu aktivnost. Smanjen broj sekretujućih CD4+ T ćelija na rođenju je doveden u vezu sa razvojem septičnog stanja (Kamdar S. et al., 2020). S druge strane, u pojedinim ispitivanjima pokazano je da kod dece rođene pre 30. gestacione nedelje, najveći broj CD4+ T ćelija sekretuje IL-8 (Gibbons D. et al., 2014). Ukupna zastupljenost regulatornih T ćelija pokazuje obrnutu korelaciju sa gestacionom starošću na rođenju (Qazi KR. et al., 2020). Ove ćelije, kod prematurusa, uglavnom poseduju sniženu ekspresiju negativnog kostimulatora (CTLA-4), u odnosu na terminski rođenu decu (Rennó C. et al., 2016). Imajući u vidu imunosupresivna svojstva ovih ćelija, svakako značajno doprinosi nastanku imunokompromitujućeg stanja kod prevremeno rođene dece.

Humoralni imunitet je posredovan B ćelijama i prevashodno je značajan u zaštiti od ekstracelularnih patogena. Za razliku T ćelija koje prepoznaju samo proteinske antigene, B limfociti prepoznaju proteine, ugljene hidrate i lipide u njihovom nativnom, neobradjenom, obliku posredstvom antitela IgG i IgM klase. Intenzitet i kvalitet humoralnog imunog odgovora značajno se razlikuje od prirode antigena. Nakon prepoznavanja proteinskih antigena, nastupa njegova fagocitoza, preobrada i prezentacija u sklopu MHC molekula II klase. Tako obradjeni i prezentovani antigeni, na površini B ćelija, prikazuju se antigen specifičnim CD4+ T ćelijama (Melville JM. et al., 2013). Tokom ove interakcije, CD4+ T ćelije eksprimiraju na svojoj

površini CD40L molekul koji se vezuje sa CD40 molekulom na površini B limfocita, što predstavlja osnovni signal njihove aktivacije (Melville JM. et al., 2013). Nakon aktivacije, B ćelije podležu procesu izmene klasa teških lanaca imunoglobulina, tj. dolazi do početka produkcije antitela klase IgG, IgA i IgE. Pored toga, nastupa i proces afinitetnog sazrevanja, prilikom koga dolazi do povećanja afiniteta antitela prema specifičnom antigenu. Imajući u vidu da za pokretanje imunog odgovora na proteinske antigene, pomoću B ćelija, neophodna pomoć T limfocita, proteinski antigeni se, takodje, označavaju i kao T zavisni antigeni (Luckheeram RV. et al., 2012). Nasuprot tome, za inicijaciju humoralnog imunog odgovora na ugljene hidrate i lipide nije potrebna pomoć T ćelija, pa se zbog toga oni označavaju kao T nezavisni antigeni. U takvim situacijama, stvorena antitela, uglavnom, pripadaju IgM klasi i pokazuju nizak afinitet prema antigenu (Luckheeram RV. et al., 2012).

Ukupan broj B limfocita, kod prevremeno rođene dece, izrazito je smanjen, a to je najvidljivije kod dece sa gestacionom starošću manjom od 26 nedelja. Pored toga, kod prematurusa uglavnom se proizvode antitela koja pripadaju IgM klasi sa veoma niskim afinitetom (Huenecke S. et al., 2016). Odmah nakon rođenja, smanjeni su procesi izmene klase teških lanaca imunoglobulina, kao i sazrevanja afiniteta, što je najverovatnije posledica redukovane ekspresije CD40L molekula na površini CD4+ T ćelija (Rennó C. et al., 2016). Sve ove navedene promene su izražene mnogo jačim intenzitetom kod prevremeno rođene dece (Nonoyama S. et al., 1995). Pored toga, B limfociti ekspimiraju mnogo manje receptora koji pripadaju TNF familiji, čija je signalizacija neophodna za pokretanje T nezavisnog humoralnog imunog odgovora. Takodje, stimulacija ovih receptora rezultuje slabijim proliferativnim odgovorom B limfocita (Nonoyama S. et al., 1995). Iako je osnovna funkcija B ćelija produkcija antitela, ove ćelije su sposobne da proizvode različite citokine koji su uključeni u regulaciju imunog odgovora. Naime, postoji posebno definisana subpopulacija B ćelija koja je sposobna da proizvode IL-10, čime omogućuje supresiju T ćelijskog odgovora. Ove ćelije se označavaju kao regulatorne B ćelije i pokazano je da u krvi pupčane vrpce čine oko 50% svih B limfocita, za razliku od adultnog organizma gde one iznose oko 1% (Kaur K. et al., 2007). Kod prevremeno rođene dece sugerisan je značaj ovih ćelija u imunopatogenezi kasne neonatalne sepse, imajući u vidu da deca sa većim brojem regulatornih B ćelija imaju bolju prognozu, što se objašnjava boljom sposobnošću kontrolisanja sistemskog inflamatornog odgovora (Sarvaria A. et al., 2016).

## ***1.2. Citokinski profil sindroma fetalnog inflamatornog odgovora***

Intrauterina inflamacija je često hronična i asimptomatska i smatra se jednim od glavnih uzročnika koji dovode do prevremenog porodjaja (Fahey JO. 2008). Stvorena intrauterina inflamacija može nastati kao posledica bakterijske infekcije, koja se odigrava ascedentnim putem preko porodjajnog kanala, preko placente ili plodovih ovojnica, kao i mogućnošću unosa patogena preko amniocenteze (Melville JM. et al., 2013). Različita istraživanja su pokazala da prisustvo bakterija ili proinflamatornih citokina u amnijskoj tečnosti može dovesti do nastanka tzv. fetalnog inflamatornog odgovora (fetal inflammatory response-FIRS) (Goldenberg RL. et al., 2000; Gonçalves LF. et al., 2002). Danas se FIRS dovodi u vezu sa brojnim, ozbiljnim postnatalnim komplikacijama koje, pored neonatalne sepse, obuhvataju bronhopulmonalnu displaziju i brojne neurološke poremećaje (Yoon BH. et al., 2000). Slično kao kod SIRS-a, FIRS se karakteriše nastankom tzv. citokinske oluje, odnosno intenzivnom produkcijom proinflamatornih medijatora (citokina i hemokina), kao posledica ekcesivne stimulacije imunološkog sistema (Matsuda N. et al., 2006). Međutim, s obzirom na karakteristike imunološkog sistema kod prevremeno rođene dece, FIRS pokazuje izvesne specifičnosti u odnosu na SIRS, koji se razvija kod adultnih osoba. Do danas, ne postoje precizno definisani i ustanovljeni kriterijumi koji bi u potpunosti opisali stanje FIRS-a. Pojedini autori smatraju da inflamacija pupčane vrpce na rođenju predstavlja jedan od osnovnih znakova FIRS-a (Kim CJ. et al., 2001), dok drugi autori predlažu da određivanje ukupne količine IL-6 i CRP-a, u krvi pupčane vrpce, predstavljaju osnovne dijagnostičke parametre za definiciju FIRS-a (Yoon BH. et al., 2003).

Kao i kod SIRS-a, tako i FIRS-u, najznačajnija karakteristika jeste proinflamacijski citokinski profil koji se intenzivno razvija. Kod FIRS-a su zabeleženi povećana sekrecija različitih citokina i hemokina, uključujući TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 (CXCL8), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MCP-1 (CCL2), kao i GM-CSF (granulocitno-monocitni stimulišući faktor rasta) (Madsen-Bouterse SA. et al., 2010; Kallapur SG. et al., 2009; Gotsch F. et al., 2007). Pored toga, pokazana je pojačana aktivnost monocita i neutrofila, kao i njihov ukupan broj u fetalnoj cirkulaciji tokom inflamatornog procesa (Kallapur SG. et al., 2007).

IL-1 i TNF $\alpha$  predstavljaju osnovne proinflamatorne citokine urođenog imuniteta. Navedene citokine prvenstveno oslobadjaju monociti i tkivni makrofazi. Pored toga, ove citokine

moгу produkovati i druge ćelije kao odgovor na prisustvo mikroorganizama, njihovih produkata ili u slučaju oštećenja (Madsen-Bouterse SA. et al., 2010). Tokom porodjaja, ovi citokini vrše inhibiciju proliferacije amnionskih ćelija, stimulišu produkciju prostaglandina u amnionu, decidualnoj placenti, miometriјumu i ujedno stimulišu oslobađanje matriks proteinaza, koje imaju značajnu ulogu u procesu ruptore plodovih ovojnica (Romero R. et al., 2003). Takodje, TNF $\alpha$  je identifikovan kao jedan od ranih i najznačajnijih medijatora sistemskog inflamatornog odgovora, koji dovodi do razvoja hiperpireksije, hemodinamskih abnormalnosti, leukopenije i koagulopatije (Jaffer U. et al., 2010). U stanju FIRS-a, vrednosti TNF $\alpha$  su povećane u krvi pupčane vrpce. Medjutim, ovo povećanje nije toliko izraženo kao u slučaju SIRS-a, što se može objasniti slabijim kapacitetom mononuklearnih ćelija neonatusa da produkuju navedeni citokin (Madsen-Bouterse SA. et al., 2010).

Različite studije su pokazale da vrednosti IL-6 iznad 11 pg/ml se ubrajaju u dijagnostičke kriterijume FIRS-a, imajući u vidu da su njegove vrednosti značajno povećane u odnosu na TNF $\alpha$  i IL-1 (Yoon BH. et al., 2000; Gomez R. et al., 1998). IL-6 predstavlja citokin sa izrazito širokim spektrom bioloških aktivnosti. Naime, on je najznačajniji stimulator produkcije proteina akutne faze u jetri. U koštanoj srži stimuliše proces trombocitopoeze, kao i da ostvaruje svoje efekte na komponente stečenog imunog sistema u smislu stimulacije proinflamacijskog Th17 imunog odgovora, redukcije odgovora posredovanog regulatornim T ćelijama, kao i da vrši stimulaciju B limfocita u produkciji antitela (Tanaka T. et al., 2014). Kod prevremeno rodjene dece, nivo IL-6 je povećan u krvi pupčane vrpce i negativno koreliše sa gestacionom starošću prematurusa (Pereira LH. et al., 2014). Pored toga, pokazana je i direktna povezanost nivoa IL-6 i povećanog rizika za nastanak neonatalne sepsa (Kim CJ. et al., 2001), što ukazuje da je IL-6 direktno uključen u proces patogeneze FIRS-a, kao i u SIRS-u kod adultnih osoba (Jaffer U. et al., 2010).

Kao što je ranije napomenuto, IL-8 predstavlja hemokin CXCL8 čija je primarna funkcija u inicijaciji hemotakse neutrofila ali i drugih ćelja imunološkog sistema. Istovremeno, ovaj hemokin deluje i kao snažan aktivator neutrofila, imajući u vidu da stimuliše produkciju slobodnih kiseoničkih radikala, čime značajno utiče na intenzitet fagocitoze. Brojne ćelije poseduju sposobnost produkcije i sekrecije ovog hemokina, ali se ona višestruko uvećava pod uticajem IL-1 i TNF $\alpha$  (Qazi BS. et al., 2011). Pokazano je da su povećane koncentracije IL-8 u



cervikalnom sekretu povezane sa horioamnioitismom i infekcijom amnionske šupljine. Ujedno u ovakvim okolnostima registrovana je i pojačana placentalna produkcija ovog hemokina (Kacerovsky M. et al., 2015), što nije potvrđeno u nekim ispitivanjima (Laham N. et al., 1999). U krvi pupčane vrpce, nivoi IL-8 su značajno povećani kod prevremeno rođene dece, u odnosu na terminski rođenu decu. Takođe, ovako povećane vrednosti IL-8 povezane su i sa povećanim rizikom za nastanak respiratornog distres sindroma i neonatalne hronične bolesti pluća (Otsubo Y. et al., 2017). Pored toga, postoje i kontradiktorni podaci koji ukazuju da smanjen broj IL-8 sekretujućih CD4+ T ćelija, u perifernoj krvi prevremeno rođene dece, predstavljaju faktor rizika za nastanak postnatalne respiratorne disfunkcije i septičnog stanja (Kamdar S. et al., 2020).

U poslednje vreme, posebna pažnja je posvećena proučavanju CXCL10 hemokina i njegovoj ulozi u nastanku FIRS-a. Navedeni hemokin predstavlja biomarker odbacivanja transplantiranog organa (Romagnani P. et al., 2012). Naime, prevremeni porodaj pored toga što može biti posledica intrauterine inflamacije izazvane infekcijom, takođe može biti posledica prestanka imunološke tolerancije majke prema plodu (Lee J. et al., 2013). U takvim slučajevima, dolazi do infiltracije T ćelijamajke u plodove ovojnice. Ove ćelije su vodjene hemokinima prisutnim u amnionskoj tečnosti, uključujući i CXCL10 (Gomez-Lopez N. et al., 2013). Potrebno je napomenuti da u ovakvim okolnostima dolazi do razvoja FIRS-a, ali drugačijih karakteristika imajući u vidu da inflamatorni proces nije akutan, već hroničnog karaktera. Iz tih razloga, u fetalnoj krvi se ne pojavljuju povećane vrednosti IL-6, već dolazi do porasta vrednosti CXCL10, pa se zbog svega navedenog ovaj oblik FIRS-a naziva FIRS 2 (Romero R. et al., 2017).

Hemokin MIP-1 $\alpha$  (CCL3) predstavlja makrofagalni inflamacijski faktor, koga proizvode monociti i makrofazi. Produkcija ovog hemokina stimulirana je nakon izlaganja bakterijskom endotoksinu ili proinflamatornim citokinima (Menten P. et al., 2002). Biološki efekti ovog hemokina ostvaruju se njegovim vezivanjem sa svojim ligandima (CCR1 i CCR5) koji se nalaze ekspimirani na površini ćelija, što na kraju rezultira masivnom hemotaksom kao i sekretovanjem brojnih bioaktivnih molekula. MIP-1 $\alpha$  najveći uticaj pokazuje na monocite, T limfocite, dendritične ćelije i NK ćelije ali poseduje mogućnost indukcije oslobađanja različitih proinflamatornih citokina (Qin CC. et al., 2017).

S druge strane, MCP-1 je hemokin koga uglavnom proizvode monociti, makrofazi i dendritične ćelije. Nakon oslobađanja, ovaj citokin dovodi do hemotakse monocita, memorijskih T limfocita i dendritičnih ćelija do mesta inflamacije, kao posledica tkivnog oštećenja ili inflamacije (Yoshimura T. et al., 2018). Zbog svoje izrazite sposobnosti za hemotaksu monocita, MCP-1 je često uključen u patogenezu različitih imunoloških oboljenja, koja se karakterišu masovnim monocitnim nagomilavanjem (Xia M. et al., 2009). Slično IL-8 hemokinu, vrednosti MCP-1 i MIP-1 $\alpha$  su povećane u krvi pupčane vrpce prevremeno rođene dece i indikatori su perinatalnih komplikacija, kao što su respiratorni distres sindrom i neonatalna hronična bolest pluća (Takahashi N. et al., 2010). U eksperimentalnom modelu prevremeno rođenih životinja, horioamnioitisa koji je indukovano aplikacijom lipopolisaharida praćen je porastom vrednosti MCP-1, što ukazuje na značaj i ulogu ovog hemokina u nastanku FIRS-a (Shah TA. et al., 2010). Pored toga, vrednosti ovih hemokina u perifernoj krvi novorođenčadi sa ranom neonatalnom sepsom su značajno povećane (Sugitharini V. et al., 2013).

Tokom razvoja FIRS-a, dolazi do aktivacije limfocita, što ukazuje da u patogenezi ovog stanja određenu ulogu preuzima stečeni imuni odgovor (Duggan PJ. et al., 2001). Trudnoća predstavlja stanje u kome postoji dominacija tolerantnijeg Th2 imunog odgovora. Međutim, sam porodaj se dovodi u vezu sa izmenom Th1/Th2 balansa, tako da dolazi do dominacije Th1 imunog odgovora. Th1 citokini mogu da promovišu (direktno ili indirektno) produkciju prostaglandina i različitih enzima koji stimulišu kontraktilnost miometrijuma i rupturu plodovih ovojnica. U slučaju intrauterine infekcije obično dolazi do inicijacije Th1 imunog odgovora, koji posledično pokreće imunološku kaskadu koja može biti razlog prevremenog porodaja (Sykes L. et al., 2012). S druge strane, izloženost ploda proinflamacijskim stimulusima dovodi do izmene njegovog profila celularnog imunog odgovora. U skladu sa tim, povećani nivoi IFN $\gamma$  su prisutni u krvi pupčane vrpce prevremeno rođene dece majki sa horioamnioitisom (Takahashi N. et al., 2010). Međutim, u drugim studijama nisu zabeležene značajne razlike u nivoima Th1 (IFN $\gamma$ ) i Th2 (IL-4) citokina kod prevremeno rođene dece, sa i bez razvijenog stanja FIRS-a (Otsubo Y. et al., 2017).

Razvoj septičnog stanja kod prevremeno rođene dece je u uskoj vezi sa postojanjem FIRS-a na rođenju (Hofer N. et al., 2013). Zbog svega navedenog, precizno definisanje imunoloških parametara, koji ukazuju na postojanje FIRS-a, omogućili bi rano prepoznavanje

novorođenčadi sa povećanim rizikom za nastanak ozbiljnih perinatalnih i postnatalnih komplikacija. Iako je ova oblast istraživanja veoma zastupljena u savremenoj literaturi, dostupni podaci se veoma kontradiktorni i predstavljaju prvenstveno rezultat ispitivanja medijatora inflamacije samo iz pupčane vrpce ili periferne krvi prevremeno rođene dece. Imajući u vidu navedene razloge istovremena analiza pojedinih medijatora inflamatornog procesa, iz krvi pupčane vrpce i periferne krvi, može pružiti nove rezultate i otkrivanje novih biomarkera u procesu inicijacije i razvitka septičnog stanja kod prevremeno rođene dece.

## 2. CILJ RADA

Imajući u vidu rezultate dobijene u brojnim studijama o nastanku i ranoj detekciji septičnog stanja, kao i najnovija saznanja o mogućim biomarkerima koji ukazuju na razvoj sepse kod prevremeno rođene dece, cilj našeg rada je bio:

- Utvrditi povezanost pojedinih kliničkih varijabli (rast, pol, težinu, vrednosti Apgar skora-1. minutu i zastupljenost primene carskog reza) sa razvojem sepse kod prevremeno rođene dece.
- Evaluirati ulogu pojedinih standardnih inflamatornih markera periferne krvi (CRP, PCT, ukupan broj leukocita) u predikciji razvoja sepse kod prematurusa.
- Ispitati ulogu pojedinih citokina ( $\text{IFN}\gamma$  i IL-5) u krvi pupčane vrpce i periferne krvi u predikciji razvoja sepse kod prevremeno rođene dece.
- Analizirati ulogu pojedinih hemokina (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ) u perifernoj krvi i krvi pupčane vrpce prematurusa u predikciji razvoja septičnog stanja.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Vrsta studija i populacija koja se ispitala

Istraživanje je obavljeno na Klinici za dečje interne bolesti kao i na Klinici za Ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra u Nišu. Navedeno ispitivanje, dizajnirano je kao prospektivna studija gde je analizirano 101 prevremeno rodjeno dete, u vremenskom periodu od decembra 2017. do decembra 2018. godine. Majka svakog ispitanika detaljno je upoznata sa metodama i ciljevima ispitivanja, što je potvrđeno pismenom saglasnošću za učešće u našem istraživanju. Takodje, za izvodjenje studije postoji odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (broj 35144, od 6.11.2017. godine).

Prevremeno rodjena deca, uključena u studiju, podeljena su u dve velike grupe, prema vremenu rođenja (Segura-Cervantes et al., 2016). Prva grupa obuhvatala je prevremeno rodjenu decu do 32. gestacione nedelje, dok su drugu grupu činili prematurusi rodjeni između 32. i 36. gestacione nedelje. Istovremeno, na osnovu vremena pojavljivanja sepse, prevremeno rodjena deca su podeljena u grupu sa ranom sepsom (vreme pojavljivanja u prvih 72 sata od rođenja) i grupu sa kasnom sepsom (vreme pojavljivanja posle 72 sata od rođenja) (Hornik et al., 2012). Prevremeno rodjena deca sa razvijenim znacima sepse činila bi eksperimentalnu grupu, dok prematurusi koji nisu razvili sepsu, u navedenom periodu, predstavljali bi kontrolnu grupu ispitanika (Leal YA. et al., 2019).

U studiju nisu uključena novorodjena deca čije su majke imale znakove infekcije (horioamionitis, urinarne infekcije, pijelonefritis ili febrilna stanja), novorodjenčad majki sa sistemskim bolestima, šećernom bolešću, povišenom vrednošću krvnog pritiska, kao ni novorodjenčad majki sa PROM-om (prevremena ruptura plodovih ovojaka). Takodje, iz studije je isključena novorodjenčad sa kongenitalnim anomalijama, hromozomskim anomalijama, TORCH infekcijom (Toxoplasma, Rubela virus, Citomegalovirus i Herpes simplex virus), novorodjenčad iz blizanačkih trudnoća kao i novorodjenčad rodjena u terminu.

### ***3.2. Dijagnoza septičnog stanja kod prevremeno rođene dece***

Dijagnoza septičnog stanja kod prevremeno rođene dece, koja su uključena u ovu analizu, ustanovljena je na osnovu ranije definisanih kriterijuma (Goldstein B. et al., 2005; Wynn, JL. et al., 2010). Ukratko, sepsa predstavlja sistemski inflamatorni odgovor u prisustvu suspektne ili dokazane infekcije. Sistemski inflamatorni odgovor (SIRS) predstavlja inflamatornu reakciju organizma na različite infektivne i neinfektivne agense. Kriterijumi SIRS-a su: telesna temperatura  $>38.5^{\circ}\text{C}$  ili  $<36^{\circ}\text{C}$ , tahikardija (srčani ritam  $>2\text{SD}$  za uzrast), tahipnea (broj respiracija  $>2\text{SD}$  za uzrast), leukocitoza ili leukopenija. Prisustvo SIRS-a pokazuje se postojanjem izmenjene 2 od ukupno 4 fiziološke varijable (telesna temperatura, broj respiracija, srčana frekvencija i ukupan broj leukocita), pri čemu jedna varijabla mora predstavljati izmenjenu telesnu temperaturu ili promenu u ukupnom broju leukocita (Goldstein B. et al., 2005; Wynn, JL. et al., 2010).

### ***3.3. Biohemijske i druge analize***

Kod sve prevremeno rođene dece, koja su uključena u ovu studiju, odmah nakon rođenja, uzorkovano je po 1ml krvi iz pupčane vrpce, kao i 1ml periferne krvi, pri čemu su korišćene epruvete obložene sa EDTA (etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina) (Sarstaedt, Numbrecht, Germany). Od prikupljenih uzoraka krvi (periferna krv i krv iz pupčane vrpce) 0,5ml krvi korišćen za određivanje rutinskih laboratorijskih analiza, uključujući: ukupan broj leukocita, leukocitarnu formulu, nivo C reaktivnog proteina i nivo prokalcitonina. Ostatak uzoraka krvi (0,5ml) odmah je centrifugiran (Eppendorf 5702, Hamburg, Germany) 10 minuta na 2000 obrtaja ( $300 \times g$ ), izdvojena je krvna plazma koja je potom likvotirana u ependofre, zamrznuta na  $-80^{\circ}\text{C}$  i čuvana do finalne analize pojedinih citokina iz uzorkovane krvi.

Određivanje ukupnog broja leukocita i leukocitarne formule određivan je u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Niš, standardnim laboratorijskim analizama, na aparatu Horiba-Microsemi (Roma, Italy), kao i na odeljenju medicinske biohemije Dečje interne klinike Kliničkog centra u Nišu, pomoću aparata Pentra MS, Horiba (Roma, Italy).

Standardnim laboratorijskim analizama, na aparatu Horiba-Microsemi (Roma, Italy) određivan je nivo CRP-a u Centru za medicinsku biohemiju, kao i na aparatu Dimension RL

Max (Siemens, Erlangen, Germany), na odeljenju medicinske biohemije Dečje interne klinike u Nišu.

Nivo prokalcitonina u krvi određivan je u Centru za medicinsku biohemiju, standardnim laboratorijskim metodama, korišćenjem aparata Cobas e411 (Roche/Hitachi, Bellport, USA).

### ***3.4. Analiza citokina***

Do same analize nivoa citokina i hemokina u perifernoj krvi i krvi iz pupčane vrpce, krvna plazma je čuvana na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ . Likvotirani uzorci krve plazme su odmrznuti neposredno pre samog određivanja nivoa citokina. Kvantifikacija IL-5 i IL-8, kao i ostalih citokina (IFN- $\gamma$ , MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ ), uradjena je primenom ELISA metode. Pri analizi korišćene su mikrotitarske ploče, sa ravnim dnom, od 96 mesta (Express Assaz Format Human Cytokine Group, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Svaki ispitivani interleukin ili citokin radjen je u triplikatu i dobijene vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti triplikata  $\pm$  SD. Očitavanje dobijenih vrednosti uradjeno je korišćenjem čitača za mikroploče BioPlex 2200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Celokupna analitička metoda, kao i interpretacija dobijenih vrednosti uradjena je prema upustvima proizvođača.

### ***3.5. Statistička analiza***

Normalnost podataka ispitana je pomoću Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov testa.

Podaci koji se ne distribuiraju normalno su izraženi kao minimum-maksimum (srednja vrednost), a poredjenja unutar grupa sa ovakvim podacima vršena su pomoću Kruskal-Wallis testa, a u slučaju dokazanog postojanja statističke značajnosti, radjen je i Mann-Whitney U test da bi se dokazalo koja definisana grupa pokazuje statistički značajna odstupanja.

Kategoričke promenljive su izražene kao frekvencije i analizirane pomoću hi-kvadrat testa. Za analizu podataka gde je jedna grupa imala manje od 5 slučajeva, korišćen je Fisher-ov test egzaktne verovatnoće.

Podaci sa normalnom distribucijom vrednosti predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) i analizirani upotrebom One-way ANOVA testa. Kao post-hoc test korišćen je Tukey test.

Svi statistički testovi, sem ANOVA testa, bili su dvostrani (two-way), a kao granična vrednost statističke značajnosti korišćena je vrednost  $p = 0,05$ .

Statistička analiza je izvršena u programu IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.



## 4. REZULTATI

Tokom perioda ispitivanja prikupljeni su podaci o 101 novorodjenčetu koje je rođeno pre termina (tabela 1).

Tabela 1. Učestalost faktora rizika za razvoj neonatalne sepsu u ispitivanoj grupi

<b>Faktori rizika za neonatalnu sepsu</b>	<b>n (%)</b>
Novorodjenčad < 32. gestacione nedelje	8 (7,9%)
Novorodjenčad između 32. i 36. gestacione nedelje	93 (92,1%)
Porodjaj završen carskim rezom	40 (39,6%)
Mala težina za odgovarajuću gestacionu starost	12 (11,9%)
Mali rast za odgovarajuću gestacionu starost	10 (9,9%)
Trudnoćom izazvana hipertenzija	14 (13,9%)
Ruptura plodovih ovojnica pre termina	9 (8,9%)
Prohodan <i>ductus arteriosus</i>	23 (22,8%)
Respiratorni distres sindrom	32 (31,7%)
Intrakranijalna hemoragija	8 (7,9%)

Kako je 21 od ovih novorodjenčadi isključeno iz ispitivanja po prethodno navedenim kriterijumima, analizom je obuhvaćeno 80 prevremeno rođene dece. Analizom je obuhvaćeno 36 (45%) novorodjenčadi ženskog i 44 (55%) novorodjenčadi muškog pola. Podaci o faktorima rizika za razvoj neonatalne sepsu u ovoj, suženoj, ispitivanoj grupi dati su u tabeli 2.

Od 80 analiziranih novorodjenčadi, njih 10 je pokazalo znake rane sepsu, tj. razvilo je sepsu u prvih 72 sata nakon rođenja, dok je njih 11 razvilo kasnu sepsu, odnosno pokazalo znake sepsu nakon što je protekao period od 72 sata nakon rođenja. Jedno novorodjenče muškog pola je nakon progresije rane sepsu preminulo. U ispitivanoj grupi zabeleženo je da je *ductus arteriosus* bio prohodan kod 22 novorodjenčeta, da je njih 31 imalo respiratorni distres sindrom, a u 7 slučajeva je zabeležena i intrakranijalna hemoragija.

Tabela 2. Učestalost faktora rizika za razvoj neonatalne sepsu u ispitivanoj grupi

<b>Faktori rizika za neonatalnu sepsu</b>	<b>n (%)</b>
Novorođenčad < 32. gestacione nedelje	7 (8,75%)
Novorođenčad između 32. i 36. gestacione nedelje	73 (91,25%)
Porodjaj završen carskim rezom	28 (35%)
Mala težina za odgovarajuću gestacionu starost	7 (8,75%)
Mali rast za odgovarajuću gestacionu starost	5 (6,3%)
Prohodan <i>ductus arteriosus</i>	22 (27,5%)
Respiratorni distres sindrom	31 (37,75%)
Intrakranijalna hemoragija	7 (8,75%)

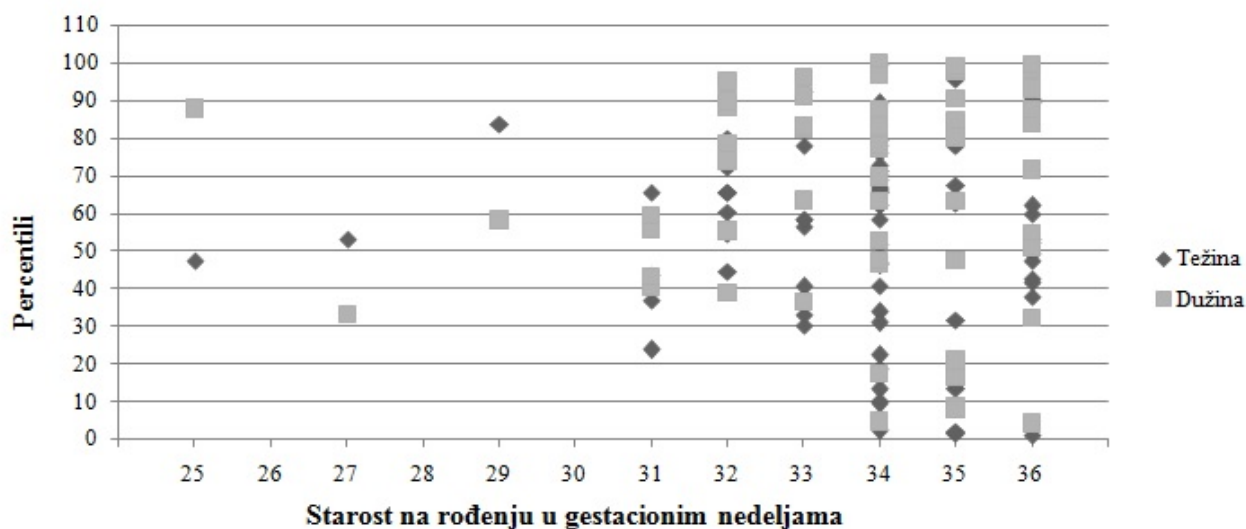
Prematurusi koji su rođeni pre 32. nedelje gestacije nisu pokazali statistički značajno učestaliji razvoj sepsu u odnosu na prematuruse rođene nakon 32. nedelje razvića (tabela 3).

Tabela 3. Učestalost razvoja neonatalne sepsu u ispitivanim grupama prematurusa

<b>Sepsa</b>	<b>Grupa prematurusa</b>		<b>Ukupno novorođenčadi</b>
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsu	4 (6,8%)	55 (93,2%)	59
Rana sepsa	2 (20%)	8 (80%)	10
Kasna sepsa	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11
<b>Ukupno novorođenčadi</b>	<b>7</b>	<b>73</b>	<b>80</b>

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p = 0,256*

Grafikon 1 prikazuje vrednosti težine i dužine novorođenčadi izražene u vrednostima percentila za odgovarajuću gestacionu dob. Kako se smanjenim rastom ploda smatra zaostatak u vrednostima i dužine i težine ploda koji se meri vrednostima ispod 10 percentila, sa grafikona se vidi da su ovakve vrednosti zabeležene samo kod novorođenčadi koji su rođeni u 34., 35. i 36. nedelji gestacije. Ovakvih novorođenčadi rođenih pre termina bilo je ukupno 5.



Grafikon 1. Vrednosti težine i dužine novorodjenčadi u percentilima za odgovarajuću dob

Tabela 4 prikazuje učestalost razvoja neonatalne sepsa kod prematurusa u odnosu na rast za odgovarajuću dob. Prematurusi koji su imali vrednosti rasta ispod 10 percentila za odgovarajuću dob nisu razvili znake i simptome bilo rane bilo kasne sepsa.

Tabela 4. Učestalost razvoja neonatalne sepsa kod prematurusa u odnosu na rast

Sepsa	Grupa prematurusa 32-36. g. nedelje		Ukupno novorodjenčadi
	Normalan rast	Smanjen rast	
Bez sepsa	50 (90,9%)	5 (9,1%)	55
Rana sepsa	8 (100%)	0 (0%)	8
Kasna sepsa	10 (100%)	0 (0%)	10
<b>Ukupno novorodjenčadi</b>	<b>68</b>	<b>5</b>	<b>73</b>

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p = 1*

Medju definisanim grupama prematurusa po starosti nije postojala statistički značajna razlika ni u zastupljenosti polova (tabela 5), kao ni u zastupljenosti primene carskog reza kao metode za završetak porodjaja (tabela 6).

Tabela 5. Zastupljenost polova u ispitivanim grupama prematurusa

Pol	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Ženski pol	3 (8,33%)	33 (91,67%)	36
Muški pol	4 (9,1%)	40 (90,9%)	44
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p =1*

Tabela 6. Učestalost primene carskog reza u ispitivanim grupama prematurusa

Carski rez	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Ne	4 (7,7%)	48 (92,3%)	52
Da	3 (10,7%)	25 (89,3%)	28
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p =0,691*

Medju definisanim grupama prematurusa po septičnom statusu nije postojala statistički značajna razlika ni u zastupljenosti polova (tabela 7), kao ni u zastupljenosti primene carskog reza kao metode za završetak porodjaja (tabela 8).

Tabela 7. Zastupljenost polova u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj sepse

Pol	Sepsa			Ukupno novorodjenčadi
	Bez sepse	Rana sepsa	Kasna sepsa	
Ženski pol	23 (63,89%)	5 (13,89%)	8 (22,22%)	36
Muški pol	36 (81,82%)	5 (11,36%)	3 (6,82%)	44
Ukupno novorodjenčadi	59	10	11	80

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p =0,75*

Tabela 8. Zastupljenost carskog reza u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj sepsa

Carski rez	Sepsa			Ukupno novorodjenčadi
	Bez sepsa	Rana sepsa	Kasna sepsa	
Ne	39 (75%)	5 (9,6%)	8 (15,4%)	52
Da	20 (71,4%)	5 (17,9%)	3 (10,7%)	28
Ukupno novorodjenčadi	59	10	11	80

*Fisher-ov test egzaktne verovatnoće; p =0,6*

Težina novorodjenčadi nije bila statistički značajan faktor za razvoj sepsa niti u pojedinačnim grupama prematurusa, niti u ukupnoj ispitivanoj grupi (tabela 9). U grupi prematurusa starosti 32-36. nedelja i u ukupnoj ispitivanoj grupi, prosečna težina na rođenju bila je čak neznatno veća u grupi koja je razvila kasnu sepsu u odnosu na grupu koje nije razvila sepsu.

Tabela 9. Težina prematurusa u gramima (mean±SD) u ispitivanim grupama

Sepsa	Grupa prematurusa		
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	Ukupno
Bez sepsa	1577,5±334,7	2500,73±462,14	2438,14±509,34
Rana sepsa	1280±650,54	2371,25±273,42	2153±605,48
Kasna sepsa	1560	2672±646,53	2570,91±699
p	0,739	0,409	0,203
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*One-Way ANOVA*

Vrednosti Apgar score-a u prvoj minuti života nisu se statistički značajno razlikovale među formiranim grupama (tabela 10). Nešto niže vrednosti Apgar score-a u prvoj minuti života zabeležene su u grupi novorodjenčadi koja je rođena pre 32. nedelje gestacione starosti, a koja je potom razvila znake rane sepsa. Zbog malog broja praćenih slučajeva u ovoj grupi, trebalo bi sagledati veću grupu ispitanika istih karakteristika radi donošenja validnog zaključka.

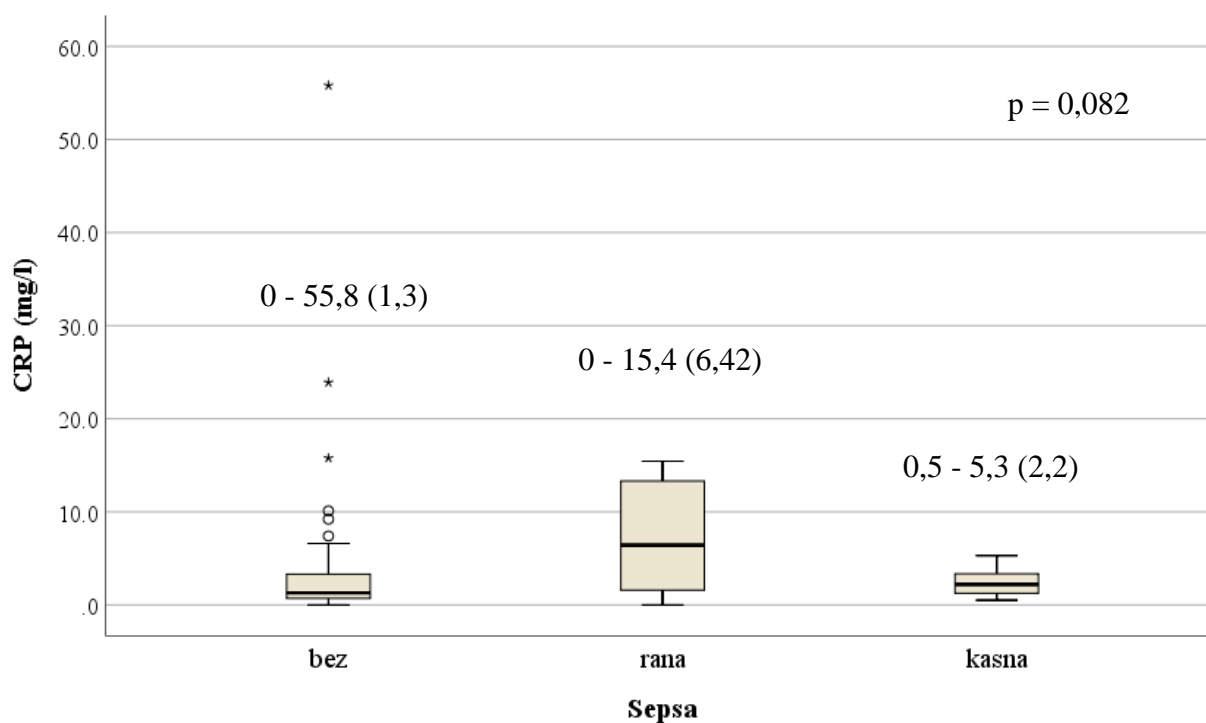
Tabela 10. Rang vrednosti Apgar score-a u 1. minuti (medijana)  
u ispitivanim grupama prematurusa

Sepsa	Grupa prematurusa		
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	Ukupno
Bez sepsa	6-8 (8)	4-9 (9)	4-9 (8)
Rana sepsa	4-5 (4,5)	7-9 (8)	4-9 (8)
Kasna sepsa	8	8-9 (8)	8-9 (8)
p	0,067	0,428	0,227
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*Kruskal-Wallis test*

Na grafikonu 2 prikazana je distribucija vrednosti (minimalna vrednost - maksimalna vrednost, medijana) CRP-a (mg/l) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 11 pokazuje vrednosti CRP-a u grupi mlađih i starijih prematurusa. Iako su vrednosti CRP-a najviše u grupama koje su razvile znake rane sepsa, statistički značajna razlika među ispitivanim grupama nije zabeležena.

U grupi starijih prematurusa zabeležene su tri ekstremne vrednosti CRP-a koje su uticale na izraženu širinu ranga vrednosti ovog parametra u grupi koja nije kasnije razvila znake sepsa.



*Kruskal-Wallis test*

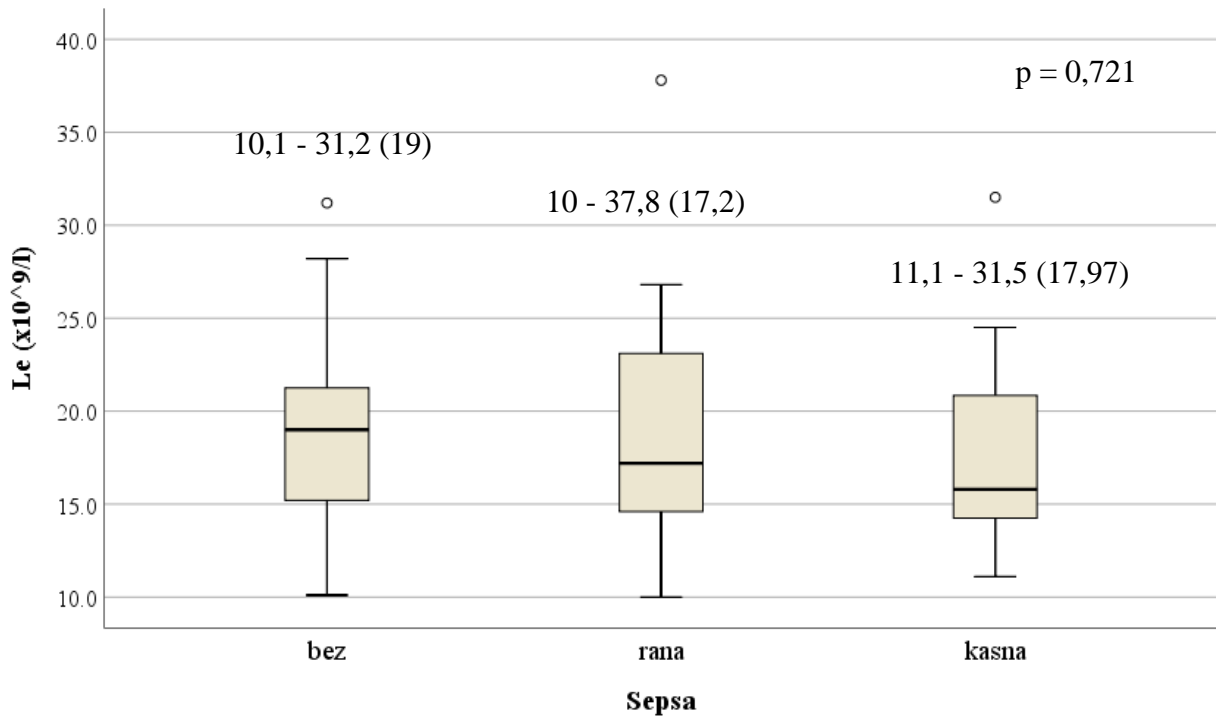
Grafikon 2. Vrednosti CRP-a (mg/l) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Tabela 11. Vrednosti CRP-a (mg/l) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	0 - 2,1 (1,1)	0,2 - 55,8 (1,6)	59
Rana sepsa	8,5 - 13,6	0 - 15,4 (3,02)	10
Kasna sepsa	5,3	0,5 - 3,9 (2,15)	11
p	0,057	0,39	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*Kruskal-Wallis test*

Na grafikonu 3 prikazana je distribucija vrednosti (minimalna vrednost - maksimalna vrednost, medijana) leukocita ( $\times 10^9/l$ ) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 12 pokazuje vrednosti leukocita u grupi mlađjih i starijih prematurusa. Distribucija vrednosti leukocita imala je normalnu raspodelu jedino u grupi starijih prematurusa. Statistički značajna razlika u vrednostima leukocita medju ispitivanim grupama nije zabeležena.



*Kruskal-Wallis test*

Grafikon 3. Vrednosti leukocita ( $\times 10^9/l$ ) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa



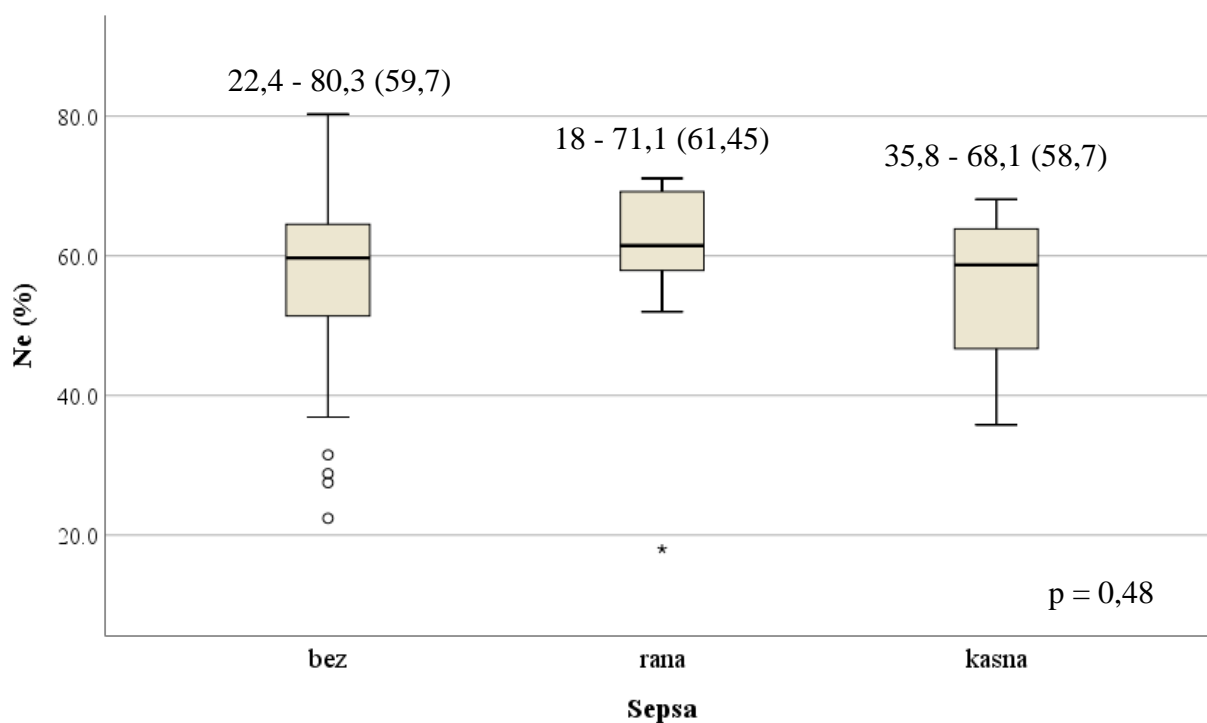
Tabela 12. Vrednosti leukocita ( $\times 10^9/l$ ) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	11,3 - 19,8 (17,95)	18,81 $\pm$ 4,82	59
Rana sepsa	19,6 - 28,8	18,95 $\pm$ 8,77	10
Kasna sepsa	11,4	18,63 $\pm$ 6,1	11
p	0,467*	0,992 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\**Kruskal-Wallis test*

<sup>#</sup> *One-Way ANOVA*

Na grafikonu 4 prikazana je distribucija vrednosti (minimalna vrednost - maksimalna vrednost, medijana) udela neutrofila (%) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 13 pokazuje vrednosti neutrofila u grupi mlađjih i starijih prematurusa. Distribucija vrednosti neutrofila imala je normalnu respodelu jedino u grupi starijih prematurusa. Statistički značajna razlika u vrednostima neutrofila medju ispitivanim grupama nije zabeležena.



*Kruskal-Wallis test*

Grafikon 4. Vrednosti udela neutrofila (%) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

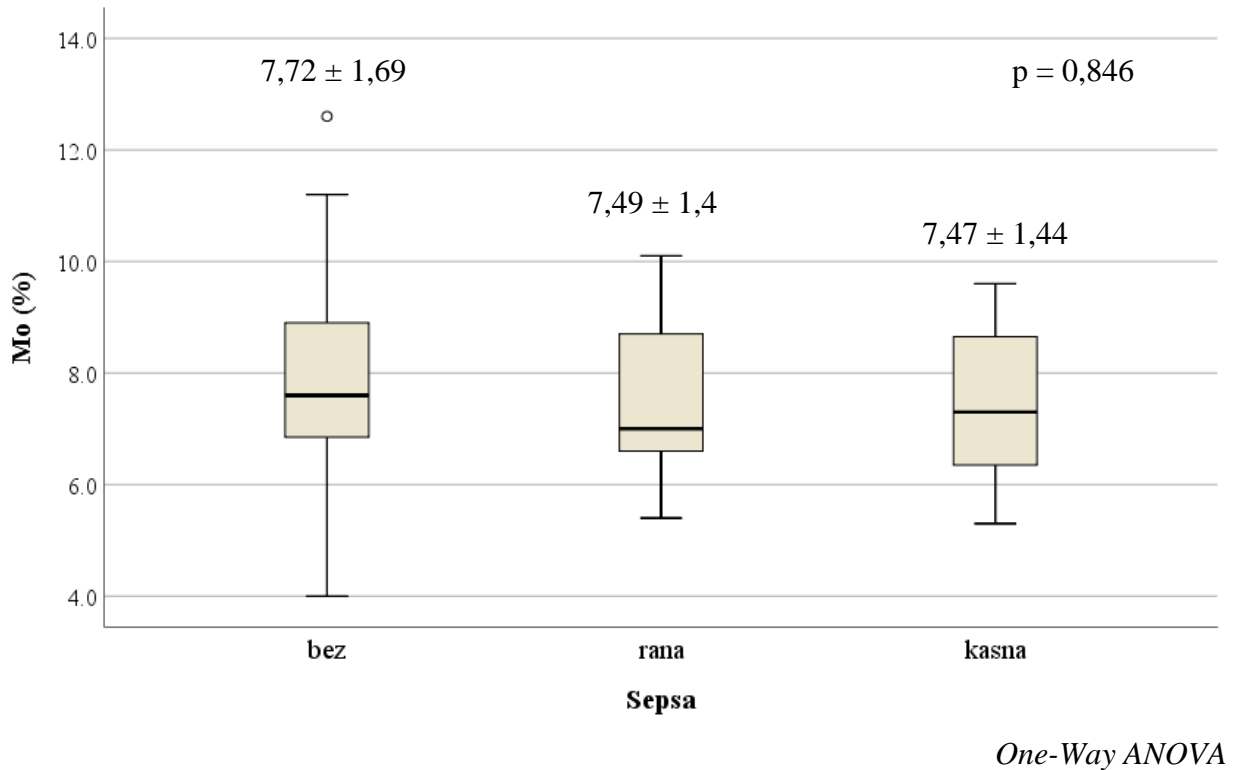
Tabela 13. Vrednosti udela neutrofila (%) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	22,4 - 45,5 (32,7)	58,7±10,94	59
Rana sepsa	18 - 61,9	63,46±6,86	10
Kasna sepsa	58,7	54,37±11,53	11
p	0,743*	0,206 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\**Kruskal-Wallis test*

<sup>#</sup> *One-Way ANOVA*

Na grafikonu 5 prikazana je distribucija vrednosti udela monocita (%) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 14 pokazuje vrednosti monocita u grupi mlađjih i starijih prematurusa. Distribucija vrednosti monocita nije imala normalnu respedelu jedino u grupi mlađjih prematurusa. Statistički značajna razlika u vrednostima monocita medju ispitivanim grupama nije zabeležena.



Grafikon 5. Vrednosti udela monocita (%) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne seapse

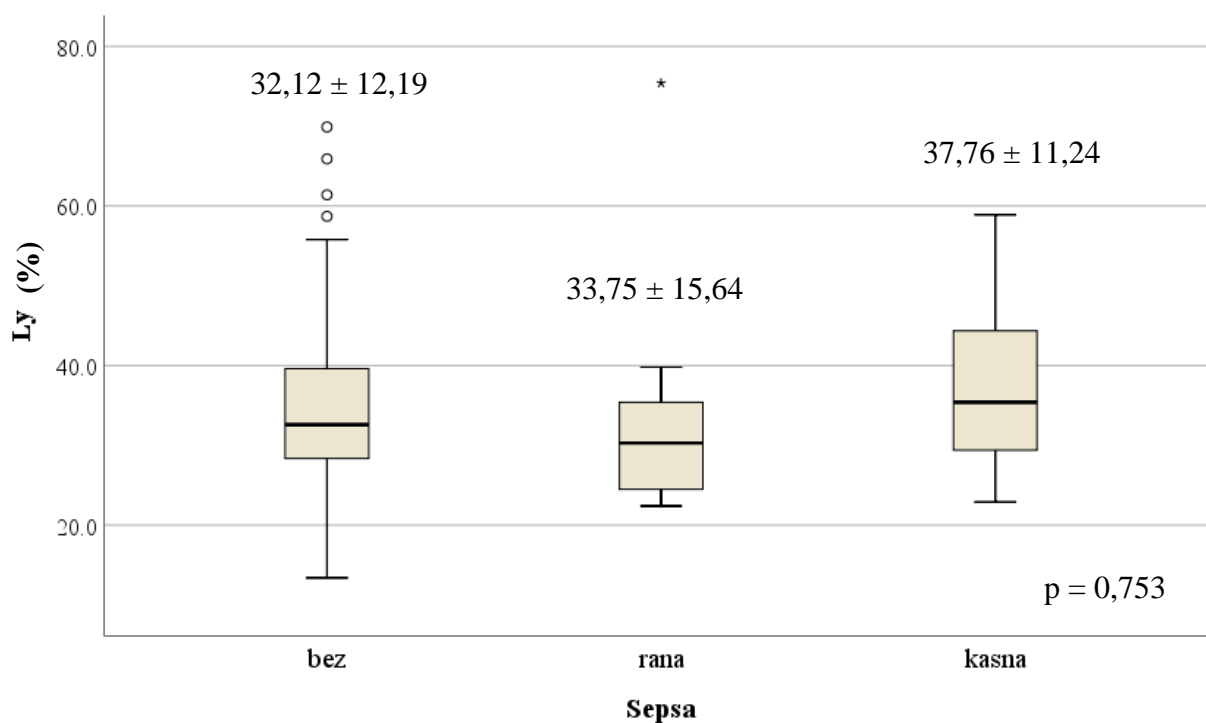
Tabela 14. Vrednosti udela monocita (%) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	6,4 - 8,1 (7,15)	7,76±1,73	59
Rana sepsa	6,6 - 7,3	7,63±1,54	10
Kasna sepsa	5,9	7,63±1,41	11
p	0,419*	0,96 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\**Kruskal-Wallis test*

<sup>#</sup>*One-Way ANOVA*

Na grafikonu 6 prikazana je distribucija vrednosti udela limfocita (%) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 15 pokazuje vrednosti limfocita u grupi mlađih i starijih prematurusa. Distribucija vrednosti monocita je imala normalnu respodelu jedino u ukupnom uzorku. Statistički značajna razlika u vrednostima limfocita medju ispitivanim grupama nije zabeležena.



*One-Way ANOVA*

Grafikon 6. Vrednosti udela limfocita (%) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

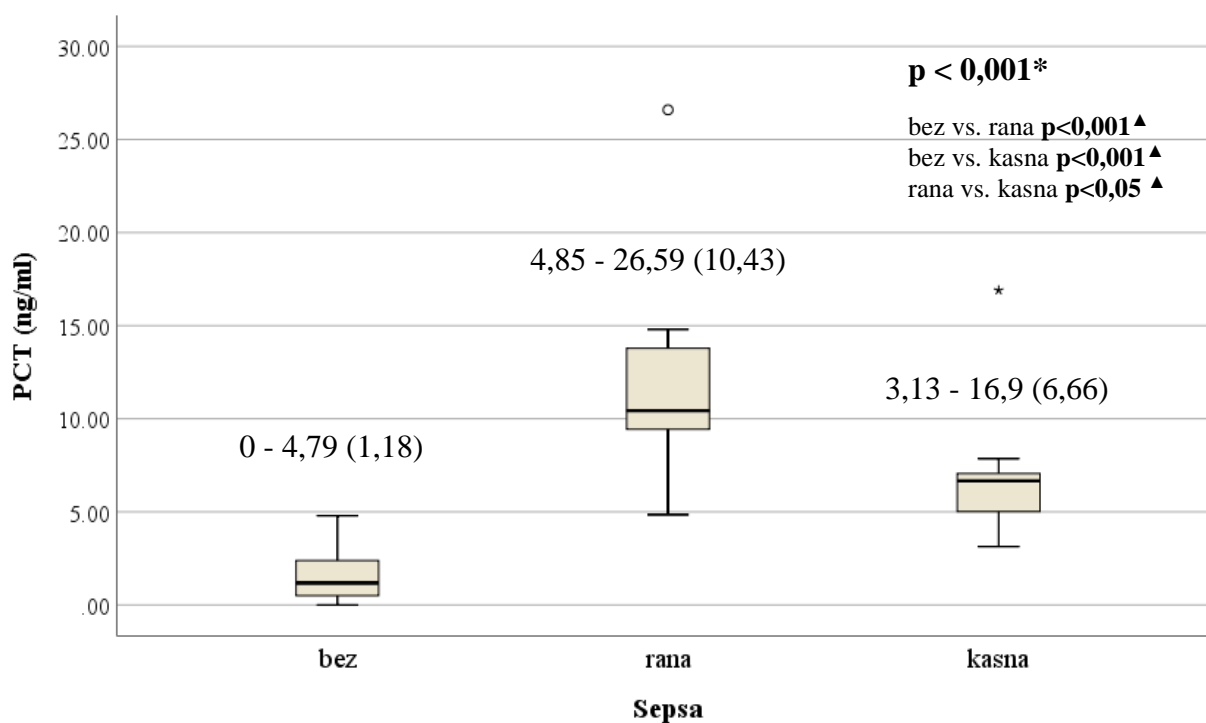
Tabela 15. Vrednosti udela limfocita (%) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	48,1 - 69,9 (59,95)	13,4 - 61,4 (31,8)	59
Rana sepsa	30,8 - 75,4	22,4 - 39,8 (27,85)	10
Kasna sepsa	35,4	22,9 - 58,9 (38,1)	11
p	0,743	0,189	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

*Kruskal-Wallis test*

Na grafikonu 7 prikazana je distribucija vrednosti prokalcitonina u perifernoj krvi (ng/ml) u ukupnom ispitivanom uzorku, dok tabela 16 pokazuje vrednosti prokalcitonina (ng/ml) u grupi mlađjih i starijih prematurusa. Distribucija vrednosti prokalcitonina nije imala normalnu raspodelu ni u jednoj formiranoj ispitivanoj podeli.

Vrednosti prokalcitonina su pokazale statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) medju grupama u ukupnom ispitivanom uzorku, kao i medju grupama prematurusa rođjenih izmedju 32-36. nedelje gestacije. U ukupnom uzorku su vrednosti prokalcitonina bile statistički značajno više kod grupe prematurusa koji su razvili ranu sepsu za  $p < 0,001$  u odnosu na grupu prematurusa koja nije razvila sepsu, a za  $p < 0,05$  u odnosu na grupu koja je razvila kasnu sepsu. Takodje u ukupnom uzorku, vrednosti prokalcitonina kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu bile su statistički značajno više za  $p < 0,001$  u odnosu na grupu prematurusa koji nisu razvili sepsu. U grupi prematurusa koji su rođjeni izmedju 32-36. nedelje gestacije, vrednosti prokalcitonina su bile statistički značajno više za  $p < 0,001$  u grupi koja je razvila ranu sepsu u odnosu na grupu koja nije razvila sepsu, ali i u odnosu na grupu koja je razvila kasnu sepsu. Sem toga, i vrednosti prokalcitonina u grupi koja je razvila kasnu sepsu bile su statistički značajno veće za  $p < 0,001$  u odnosu na grupu koja nije razvila sepsu.



\*Kruskal-Wallis test

▲ Mann-Whitney U test

Grafikon 7. Vrednosti prokalcitonina (ng/ml) u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

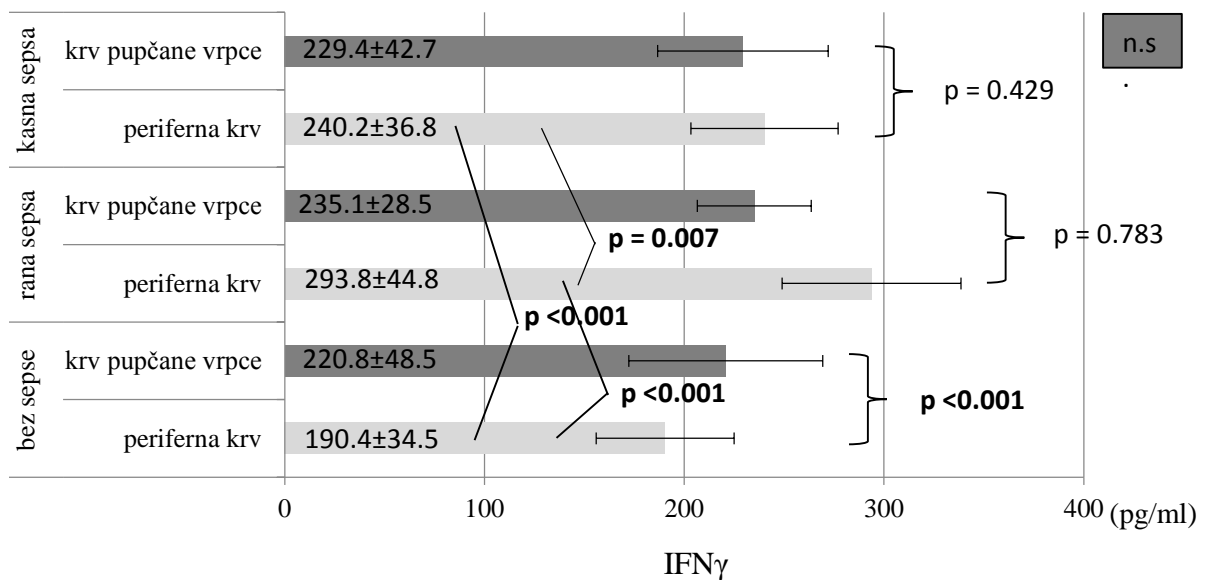
Tabela 16. Vrednosti prokalcitonina (ng/ml) u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorođenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	0,94 - 3,25 (2,1)	0 - 4,79 (1,17)	59
Rana sepsa	9,44 - 26,59	4,85 - 14,8 (10,43)	10
Kasna sepsa	4,88	3,13 - 16,9 (6,69)	11
p	0,057*	bez vs. rana <0,001 <sup>▲</sup> rana vs. kasna <0,001 <sup>▲</sup> bez vs. kasna <0,001 <sup>▲</sup>	
Ukupno novorođenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

▲ Mann-Whitney U test

Vrednosti IFN $\gamma$  (pg/ml) u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce i u perifernoj krvi kod ispitivanih prematurusa prikazane su na grafikonu 8. Vrednosti IFN $\gamma$  u krvi pupčane vrpce nisu se statistički značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septični status. Za razliku od krvi pupčane vrpce, periferna krv je imala vrednosti IFN $\gamma$  koje se jesu statistički značajno razlikovale. Vrednosti IFN $\gamma$  kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse bila je statistički značajno viša u odnosu na vrednosti prematurusa koji nisu razvili sepsu za  $p < 0,001$ , a statistički značajno viša za  $p = 0,007$  u odnosu na prematurse koji su razvili znake kasne sepse. Sem toga, vrednosti IFN $\gamma$  kod prematurusa koji su pokazali znake kasne sepse bile su statistički značajno više u odnosu na vrednosti prematurusa koji nisu razvili sepsu za  $p < 0,001$ . Poredjenjem vrednosti IFN $\gamma$  kod prematurusa koji nisu razvili sepsu, dokazana je statistički značajna razlika izmedju vrednosti IFN $\gamma$  u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. U krvi pupčane vrpce su ove vrednosti bile više sa statističkom značajnošću od  $p < 0,001$ .



*One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test*

Grafikon 8. Vrednosti IFN $\gamma$  (pg/ml) u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse



Tabele 17 i 18 pokazuju srednje vrednosti IFN $\gamma$  (pg/ml) koje su dobijene u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. Tabele prikazuju prematuruse po starosnim grupama i u odnosu na grupe formirane u odnosu na razvoj sepse.

U perifernoj krvi dokazane su statistički značajne razlike u vrednostima IFN $\gamma$  u odnosu na to da li su i kad stariji prematurusi razvijali sepsu. Kod starijih prematurusa koji su razvili znake rane sepse vrednosti IFN $\gamma$  su bile statistički značajno više u odnosu na prematuruse koji nisu razvili znake sepse i to za  $p < 0,001$ . Kod starijih prematurusa koji su razvili znake rane sepse vrednosti IFN $\gamma$  su bile takodje statistički značajno više u odnosu na prematuruse koji su razvili znake kasne sepse, ali sa manjom statističkom značajnošću ( $p = 0,014$ ). Kod starijih prematurusa koji su razvili znake kasne sepse vrednosti IFN $\gamma$  su bile statistički značajno više u odnosu na prematuruse koji nisu razvili znake sepse za  $p < 0,001$ .

U krvi pupčane vrpce i kod prematurusa rođenih do 32. nedelje gestacije i kod prematurusa koji su rođeni u kasnijoj gestacionoj dobi, statistički značajne razlike u vrednostima IFN $\gamma$  u odnosu na to da li su prematurusi razvijali znake i simptome rane ili kasne sepse ili da li nisu uopšte razvili sepsu, nisu zabeležene.

Tabela 17. Vrednosti IFN $\gamma$  (pg/ml) u perifernoj krvi u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepse	183,6 $\pm$ 15,4	193,6 $\pm$ 35,4	59
Rana sepsa	275,3 - 288,3	294,5 $\pm$ 44,7	10
Kasna sepsa	228,7	241,8 $\pm$ 36,9	11
p	<0,001*	bez vs. rana <0,001 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,014 <sup>#</sup> bez vs. kasna <0,001 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

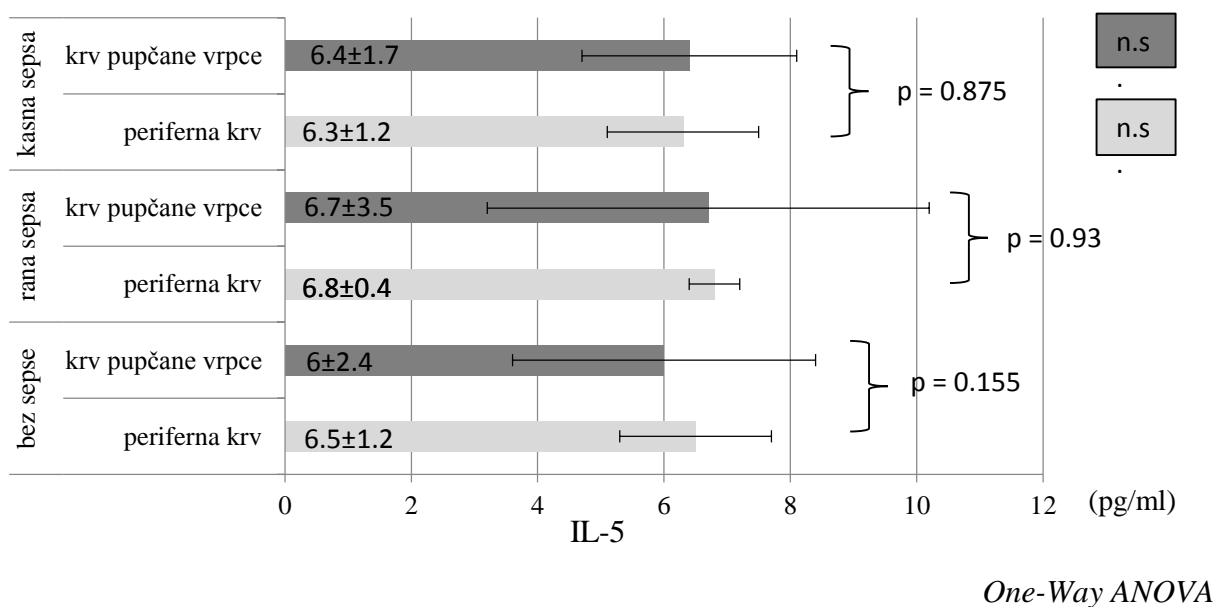
Tabela 18. Vrednosti IFN $\gamma$  (pg/ml) u krvi pupčane vrpce u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	222,6 $\pm$ 45,4	219,1 $\pm$ 49,6	59
Rana sepsa	232,4 - 248,7	236,4 $\pm$ 28,4	10
Kasna sepsa	207,2	229,9 $\pm$ 42,8	11
p	0,486*	bez vs. rana 0,341 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,718 <sup>#</sup> bez vs. kasna 0,521 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Vrednosti IL-5 (pg/ml) u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce i u perifernoj krvi kod svih ispitivanih neonatusa prikazane su na grafikonu 9. Poredjenjem ovih vrednosti izmedju grupa formiranih na osnovu razvoja sepsa nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima IL-5 u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce. Takodje, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima IL-5 ni u perifernoj krvi, a izmedju ovih grupa. Sem toga, komparirane su vrednosti IL-5 dobijene iz periferne krvi i iz pupčane vrpce, a kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu, ranu sepsu i koji nisu razvili sepsu. Ni ovim poredjenjima nije utvrđena statistički značajna razlika ni u jednom primeru. Jedino je u grupi prematurusa koja je razvila ranu sepsu zabeležena nešto viša vrednost IL-5 i u perifernoj krvi i u krvi koja je dobijena iz pupčane vrpce.



Grafikon 9. Vrednosti IL-5 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse

Tabele 19 i 20 pokazuju srednje vrednosti IL-5 koje su dobijene u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. Tabele prikazuju prematuruse po starosnim grupama i u odnosu na grupe formirane u odnosu na razvoj sepse. Nijednim poredjenjem nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima IL-5 ( $p > 0,05$ ). U obe grupe prematurusa zabeleženo je diskretno povećanje vrednosti IL-5 kod prematurusa koji su razvili znake i simptome rane sepse.

Tabela 19. Vrednosti IL-5 (pg/ml) u perifernoj krvi u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	6,7±1,3	6,4±1,1	59
Rana sepsa	6,7 - 6,8	6,9±0,4	10
Kasna sepsa	6,2	6,3±1,2	11
p	0,96*	bez vs. rana 0,21 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,196 <sup>#</sup> bez vs. kasna 0,795 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Tabela 20. Vrednosti IL-5 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	5,9±2,8	6,5±2,2	59
Rana sepsa	6 - 5,8	6,8±3,4	10
Kasna sepsa	6	6,5±1,2	11
p	1*	bez vs. rana 0,739 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,797 <sup>#</sup> bez vs. kasna 1 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

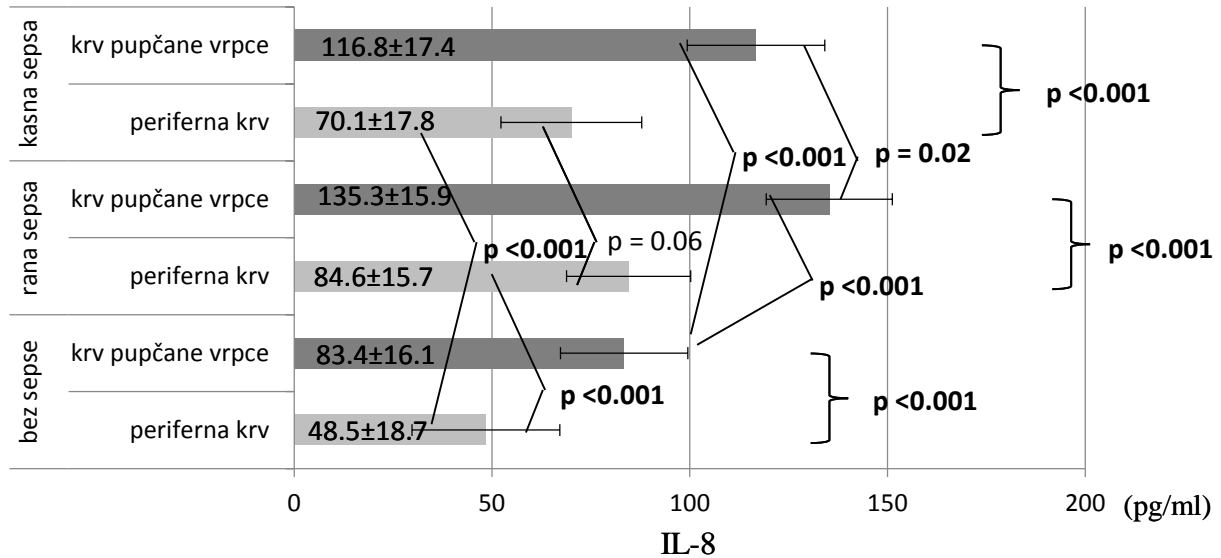
\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Vrednosti IL-8 (pg/ml) u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce i u perifernoj krvi kod svih ispitivanih neonatusa prikazane su na grafikonu 10. Srednje vrednosti IL-8 i u krvi pupčane vrpce i u perifernoj krvi statistički su se značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septični status. Vrednosti IL-8 u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce, ali i u perifernoj krvi, kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse bile su statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod prematurusa koji nisu razvili sepsu za  $p < 0,001$ , ali su u isto vreme statistički bile značajno više takodje za  $p < 0,001$  i kod prematurusa koji su pokazali znake kasne sepse u odnosu na prematurse koji nisu razvili znake sepse. Sem toga, vrednosti IL-8 kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse bile su statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu za  $p = 0,02$ , ali samo u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce.

Kod krvi uzorkovane iz periferne vene, statistička značajnost u razlici između vrednosti IL-8 kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu i kod prematurusa koji su razvili znake rane sepse, nije zabeležena.

Vrednosti IL-8 su u svakoj ispitivanoj grupi formiranoj u odnosu na septički status pokazale statistički značajno više vrednosti u krvi pupčane vrpce u odnosu na perifernu krv i to za  $p < 0,001$ .



*One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test*

Grafikon 10. Vrednosti IL-8 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Tabele 20 i 22 pokazuju srednje vrednosti IL-8 koje su dobijene u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. Tabele prikazuju prematuruse po starosnim grupama i u odnosu na grupe formirane u odnosu na razvoj sepsa.

Obe tabele potvrđuju prethodnu analizu u grupi starijih prematurusa u smislu da su vrednosti IL-8 i u perifernoj krvi (tabela 21) i u krvi pupčane vrpce (tabela 22) pokazale statistički značajno više vrednosti kod prematurusa koji su razvili ranu sepsu, ali i kod prematurusa koji su kasnije razvili znake kasne sepsa u odnosu na prematuruse koji sepsu nisu razvili i to za  $p < 0,001$ . U ovoj starosnoj grupi jedino je u krvi pupčane vrpce dokazana statistički značajno viša prosečna vrednost IL-8 kod prematurusa koji su razvili znake rane sepsa u odnosu na prematuruse koji su razvili znake kasne sepsa i to za  $p = 0,046$ . Ovakva statistički značajna razlika kod starijih prematurusa nije zabeležena kod uzoraka periferne krvi.

U uzorcima periferne krvi kod mlađih prematurusa nije zabeležena nikakva statistički značajna razlika u vrednostima IL-8 u odnosu na razvoj sepsa, dok je statistički značajna razlika postojala medju uzorcima krvi iz pupčane vrpce ( $p = 0,04$ ).

Tabela 21. Vrednosti IL-8 (pg/ml) u perifernoj krvi u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	50,3±18,9	64,2±18,6	59
Rana sepsa	86,7 - 88,1	83,4±15,5	10
Kasna sepsa	75	69,8±17,6	11
p	0,06*	<b>bez vs. rana &lt;0,001<sup>#</sup></b> rana vs. kasna 0,11 <sup>#</sup> <b>bez vs. kasna &lt;0,001<sup>#</sup></b>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Tabela 22. Vrednosti IL-8 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

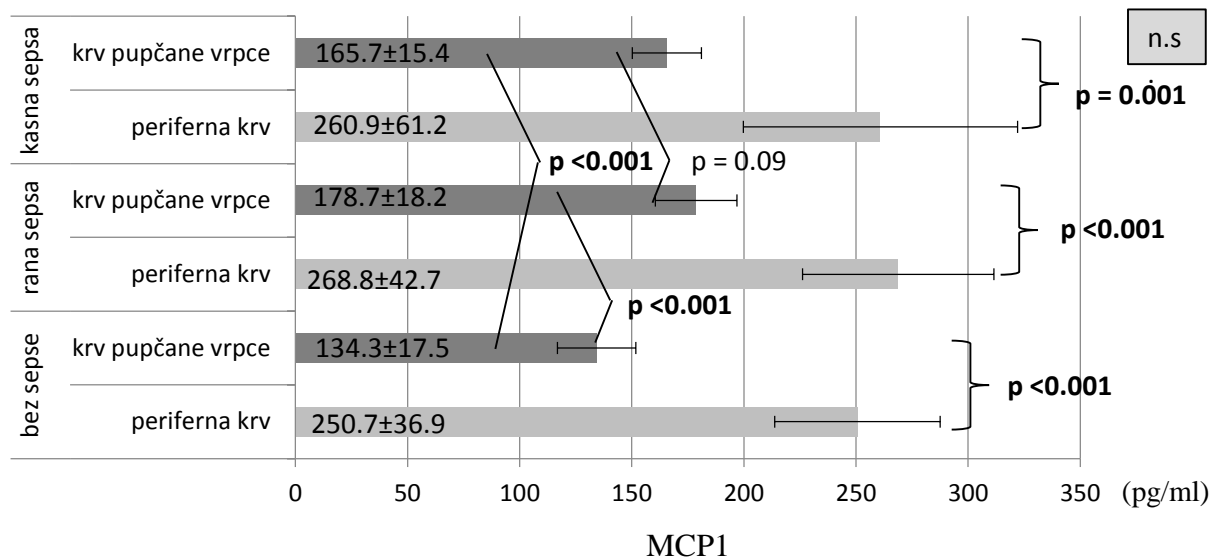
Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	95,5±16,7	79,4±15,8	59
Rana sepsa	142,8 - 143	133,2±15,6	10
Kasna sepsa	120,5	116,2±17,3	11
p	0,04*	<b>bez vs. rana &lt;0,001<sup>#</sup></b> rana vs. kasna 0,046 <sup>#</sup> <b>bez vs. kasna &lt;0,001<sup>#</sup></b>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Vrednosti MCP1 (pg/ml) u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce i u perifernoj krvi kod svih ispitivanih neonatusa prikazane su na grafikonu 11. Vrednosti MCP1 u perifernoj krvi nisu se statistički značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septični status. Za razliku od periferne krvi, krv pupčane vrpce je imala vrednosti MCP1 koje se jesu statistički značajno razlikovale. Vrednosti MCP1 kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse, kao i kod prematurusa koji su razvili znake kasne sepse, bila je statistički značajno viša u odnosu na vrednosti prematurusa koji nisu razvili sepsu za  $p < 0,001$ . Sem toga, vrednosti MCP1 kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu.

U perifernoj krvi su vrednosti MCP1 bile statistički značajno više u odnosu na vrednosti MCP1 u krvi pupčane vrpce kod svake grupe prematurusa u odnosu na septični status sa statističkom značajnošću od  $p < 0,001$ , odnosno  $p = 0,001$  samo kod prematurusa sa znacima kasne sepse.



*One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test*

Grafikon 11. Vrednosti MCP1 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepse



Tabele 23 i 24 pokazuju srednje vrednosti MCP1 koje su dobijene u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. U perifernoj krvi i kod prematurusa rođenih do 32. nedelje gestacije i kod prematurusa koji su rođeni u kasnijoj gestacionoj dobi, statistički značajne razlike u vrednostima MCP1 u odnosu na to da li su prematurusi razvijali znake i simptome rane ili kasne sepsu ili da li nisu uopšte razvili sepsu, nisu zabeležene.

U krvi pupčane vrpce dokazana je statistički značajna razlika u vrednostima MCP1. Tabela 24 potvrđuje statistički značajno više vrednosti MCP1 kod starijih prematurusa koji su razvili ranu sepsu, ali i kod prematurusa koji su razvili znake kasne sepsu, u odnosu na prematuruse koji sepsu nisu razvili i to za  $p < 0,001$ . Poređenjem vrednosti MCP1 kod prematurusa koji su razvili znake rane i onih koji su razvili znake kasne sepsu, statistički značajna razlika nije utvrđena, iako su vrednosti MCP1 bile više kod prematurusa koji su razvili ranu sepsu. Kod mlađjih prematurusa potvrđena je statistički značajna razlika između vrednostima MCP1 u krvi pupčane vrpce ( $p = 0,037$ ), ali analiza nije detaljnije radjena zbog malog broja slučajeva u ovoj ispitivanoj grupi.

Svakako su vrednosti MCP1 u krvi pupčane vrpce bile najviše kod prematurusa koji su razvili znake rane sepsu, a najniže kod prematurusa koji nisu razvili znake sepsu.

Tabela 23. Vrednosti MCP1 (pg/ml) u perifernoj krvi u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsu

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsu	255,8±27,2	249,1±37,8	59
Rana sepsa	269,9 - 271,3	267,1±42,1	10
Kasna sepsa	263,4	259,5±61,3	11
p	0,94*	bez vs. rana 0,22 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,77 <sup>#</sup> bez vs. kasna 0,47 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Tabela 24. Vrednosti MCP1 (pg/ml) u krvi pupčane vrpce u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

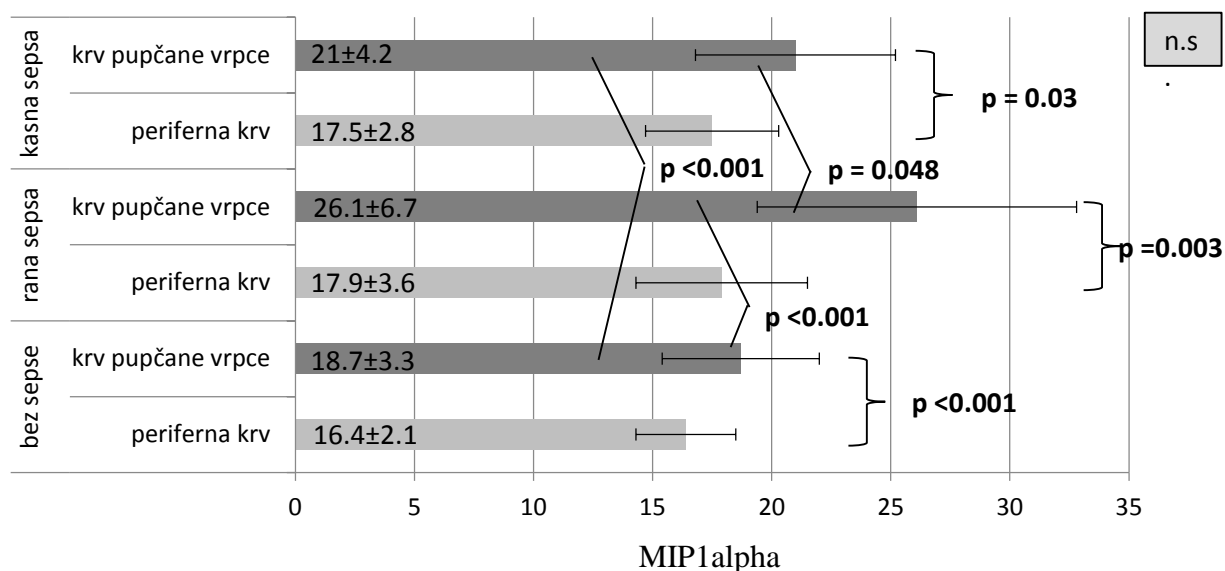
Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	135,8±17,4	133,9±17,6	59
Rana sepsa	175,3 - 178,1	179,4±18	10
Kasna sepsa	167	164,3±15,2	11
p	<b>0,037*</b>	<b>bez vs. rana &lt;0,001<sup>#</sup></b> <b>rana vs. kasna 0,07<sup>#</sup></b> <b>bez vs. kasna &lt;0,001<sup>#</sup></b>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Grafikon 12 pokazuje vrednosti MIP1alpha (pg/ml) u krvi koja je uzorkovana iz pupčane vrpce i u perifernoj krvi kod svih ispitivanih prematurusa. Vrednosti MIP1alpha u perifernoj krvi nisu se statistički značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septični status. Krv pupčane vrpce je imala vrednosti MIP1alpha koje se jesu statistički značajno razlikovale u odnosu na septični status prematurusa.

Vrednosti MIP1alpha kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepsa, kao i kod prematurusa koji su razvili znake kasne sepsa, bila je statistički značajno viša u odnosu na vrednosti prematurusa koji nisu razvili sepsu za  $p < 0,001$ . Sem toga, vrednosti MIP1alpha kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepsa bila je statistički značajno viša u odnosu na vrednosti kod prematurusa koji su razvili kasnu sepsu, ali sa nižom statističkom značajnošću koja je iznosila  $p = 0,048$ . U krvi pupčane vrpce vrednosti MIP1alpha su bile više kod svake grupe prematurusa u odnosu na perifernu krv, i to sa statističkom značajnošću od  $p < 0,001$  kod prematurusa koji nisu razvili sepsu, zatim za  $p = 0,003$  kod prematurusa sa znacima rane sepsa, odnosno za  $p = 0,03$  kod prematurusa koji su razvili znake kasne sepsa.



*One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test*

Grafikon 12. Vrednosti MIP1alpha (pg/ml) u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi u ukupnom uzorku prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Tabele 25 i 26 pokazuju srednje vrednost MIP1alpha koje su dobijene u perifernoj krvi i u krvi pupčane vrpce. U perifernoj krvi i kod prematurusa rođenih do 32. nedelje gestacije i kod prematurusa koji su rođeni u kasnijoj gestacionoj dobi, statistički značajne razlike u vrednostima MIP1alpha u odnosu na to da li su prematurusi razvijali znake i simptome rane ili kasne sepsa ili da li nisu uopšte razvili sepsu, nisu zabeležene (tabela 25).

U krvi pupčane vrpce dokazana je statistički značajna razlika u vrednostima MIP1alpha. Statistički značajno više vrednosti MIP1alpha bile su kod starijih prematurusa koji su razvili ranu sepsu u odnosu na prematuruse koji sepsu nisu razvili i to za  $p < 0,001$ . Poredjenjem ostalih srednjih vrednosti MIP1alpha kod starijih prematurusa ali i kod mlađih prematurusa, statistički značajna razlika nije utvrđena. Bez obzira na tu činjenicu, vrednosti MIP1alpha u krvi pupčane vrpce bile su najviše kod prematurusa koji su razvili znake rane sepsa, srednjih vrednosti kod prematurusa koji su razvili znake kasne sepsa, a najniže kod prematurusa koji nisu razvili znake sepsa (tabela 26).

Tabela 25. Vrednosti MIP1alpha (pg/ml) u perifernoj krvi u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	16,6±1,8	16,5±2,3	59
Rana sepsa	18,1 - 18,2	17,8±3,5	10
Kasna sepsa	17,6	17,4±2,7	11
p	1*	bez vs. rana 0,17 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,79 <sup>#</sup> bez vs. kasna 0,27 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

Tabela 26. Vrednosti MIP1alpha (pg/ml) u krvi pupčane vrpce u ispitivanim grupama prematurusa u odnosu na razvoj neonatalne sepsa

Sepsa	Grupa prematurusa		Ukupno novorodjenčadi
	< 32. g. nedelje	32-36. g. nedelje	
Bez sepsa	19,1±4,8	18,5±3,7	59
Rana sepsa	26,2 - 27	25,9±6,5	10
Kasna sepsa	21,6	20,8±4,1	11
p	0,07*	bez vs. rana <0,001 <sup>#</sup> rana vs. kasna 0,06 <sup>#</sup> bez vs. kasna 0,08 <sup>#</sup>	
Ukupno novorodjenčadi	7	73	80

\*Kruskal-Wallis test

<sup>#</sup>One-Way ANOVA i post-hoc Tukey test

## 5. DISKUSIJA

Različita humana ispitivanja (Shah BA. et al., 2014; Iskander KN. et al., 2013), kao i studije na animalnim modelima (Osuchowski MF. et al., 2012; Fink MP. 2014), pokazale su da nastanak sepse inicira istovremeno oslobađanje brojnih pro i anti-inflamatornih citokina u krvi prevremeno rođenih ispitanika. Međutim, uprkos brojnim ispitivanjima, rezultati istraživanja ukazuju na kontroverzne rezultate u detekciji inflamatornih medijatora, neophodnih u predikciji septičnog stanja kod prevremeno rođene dece.

U okviru našeg istraživanja, pokušali smo da evaluiramo prediktivnu ulogu pojedinih citokina (iz periferne krvi i pupčane vrpce), odmah nakon rođenja, za razvoj sepse kod prevremeno rođene dece. Naša studija obuhvatila je prematuruse ispod 32. gestacione nedelje i prematuruse 32.-36. gestacione nedelje, prvenstveno zbog različitog maturacionog statusa imunog sistema, tokom fetalnog razvoja. Takodje, imajući u vidu da zrelost imunog sistema može biti posledica heterogenog imunog odgovora tokom septičnog stanja (Zasada M. et al., 2014), pored specifičnih citokina, određivali smo i standardne medijatore inflamatornog procesa (vrednosti CRP-a, PCT-a i leukocitarna formula), u cilju što bolje predikcije septičnog stanja kod prematurusa (Lavoie PM. et al., 2010).

Od ukupno prikupljenih uzoraka (101), na osnovu restrikcioni kriterijuma navedenih u našem istraživanju, 80 uzoraka je uključeno u naša dalja ispitivanja. Grupu prematurusa rođenih pre 32. gestacione nedelje, činilo je ukupno 7 ispitanika (4 ispitanika bez sepse, 2 ispitanika sa ranom sepsom i jedan ispitanik sa kasnom sepsom). Sa druge strane, prematurusi rođeni između 32. i 36. gestacione nedelje činilo je ukupno 73 ispitanika (55 ispitanika bez sepse, 8 ispitanika sa ranom sepsom i 10 ispitanika sa kasnom sepsom). Rezultati naših istraživanja pokazali su da učestalost pojavljivanja sepse kod septičnih grupa (rana i kasna sepsa) nije pokazala statističku značajnost, bez obzira na gestacionu starost prematurusa. Ovako dobijene rezultate treba uzeti sa izvesnom dozom rezerve, imajući u vidu da je grupu prematurusa koji su rođeni pre 32. gestacione nedelje činilo samo 7 ispitanika, od kojih su samo 3 ispitanika razvila septično stanje. U cilju bolje i preciznije evaluacije dobijenih rezultata, potrebno je uključiti veći broj ispitanika (rođenih pre 32. gestacione nedelje), čime bi se dobijeni rezultati potvrdili, a zaključci dobili veću statističku kapacitativnost.

Naša dalja istraživanja obuhvatala su analizu pojedinih kliničkih varijabli prematurusa u predikciji razvoja sepse kod prevremeno rođene dece. Rezultati dobijeni u našoj studiji pokazuju da rast, pol, težina, vrednosti Apgar skora u 1. minuti i zastupljenost primene carskog reza, kao način završetka porodjaja, nisu bile statistički značajan faktor za razvoj sepse niti u pojedinačnim grupama prematurusa, niti u ukupnoj ispitivanoj grupi. Ovako dobijeni rezultati ukazuju na ujednačenost ispitivane grupe i pravilan odabir ispitanika, uključenih u našu studiju. Rezultati ranijih studija su u skladu sa našim rezultatima (Segura-Cervantes E. et al., 2016; Sharma D. et al., 2018), što omogućuje mnogo tačniju i lakšu evaluaciju prediktivnih faktora za razvoj sepse kod prevremeno rođene dece (Hibbert J. et al., 2020).

U daljim ispitivanjima, pokušali smo da utvrdimo prediktivnu vrednost standardnih medijatora inflamatornog procesa (vrednosti CRP-a, PCT-a i leukocitarna formula) za razvoj sepse kod prematurusa. Rezultati naše studije pokazali su da vrednosti CRP-a, odmah po rođenju, (u perifernoj krvi) nisu pokazale statističku značajnost između ispitivanih grupa (<32. i 32.-36. gestacione nedelje), između ispitanika sa ranom i kasnom sepsom, kao i upoređivanjem sa kontrolnom grupom ispitanika (koji nisu razvili sepsu), ukazujući da ovaj inflamatorni medijator ne poseduje značajnu prediktivnu vrednost za razvoj sepse kod prematurusa. Slični rezultati su dobijeni i u prethodnim studijama (Sharma D. et al., 2018; Hofer N. et al., 2012). CRP se sintetise u hepatocitima (nakon 6-8 sati od početka infekcije), kao odgovor na prisustvo inflamatornog procesa, kao deo urođenog imunog sistema. Sinteza ovog proteina, pentamerne strukture, stimulisana je prisustvom različitih citokina (IL-1, IL-6 kao i TNF $\alpha$ ) i on ujedno predstavlja jedan od najčešće upotrebljivanih testova u dijagnozi neonatalne sepse (Ismail AQ. et al., 2015). Naime, poluživot CRP-a iznosi između 24-48 sati i potrebno mu je 10-12 sati da postigne veće vrednosti u krvi, ukazujući na njegovu slabu senzitivnost u predikciji neonatalne sepse (Hofer N. et al., 2012). Time mogu biti objašnjeni i rezultati dobijeni u našem ispitivanju, jer je krv kod prematurusa uzimana odmah nakon rođenja. Prethodna istraživanja pokazala su da serijsko određivanje nivoa CPR-a u krvi, 24-48 sati nakon početka septičkog stanja, pokazuje veću senzitivnost za ranu dijagnozu neonatalne sepse (Hofer N. et al., 2012; Sharma D. et al., 2018). Ovakva zapažanja su potvrđena skorašnjom metaanalizom, koja je obuhvatila 37 različitih studija, pokazujući da senzitivnost i specifičnost CRP-a u predikciji razvoja septičnog stanja kod neonatusa raste u periodu 24-48 sati nakon rođenja (Hedegaard SS. et al., 2015).

Rezultati ispitivanja ukupnog broja leukocita, kao i pojedinih subpopulacija (neutrofila monocota i limfocita) u našoj studiji, nisu pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa (<32. i 32.-36. gestacione nedelje), između ispitanika sa ranom i kasnom sepsom, kao i upoređivanjem sa kontrolnom grupom ispitanika (koji nisu razvili sepsu). Ovako dobijeni rezultati korespondiraju sa ranim ispitivanjem (Hornik CP. et al., 2012), ukazujući da evaluirane vrednosti ne mogu predstavljati siguran prediktivni faktor u razvoju sepse kod prematurusa. Naime, navedena studija pokazala je da nizak nivo ukupnog broja leukocita, neutrofila, kao i nizak odnos između nezrelih i ukupnog broja leukocita (I:T) pokazuju značajan porast mogućnosti za razvoj neonatalne sepse, što može i objasniti dobijene rezultate u našoj studiji. U skladu sa navedenim ispitivanjima, ranija studija pokazala je da normalan I:T odnos, zajedno sa dokazanom sterilnom hemokulturom, predstavljaju negativne prediktore za razvoj neonatalne sepse (Murphy K. et al., 2012). Takođe, pri analizi dobijenih vrednosti leukocita periferne krvi kod prematurusa, potrebno je uzeti u obzir gestacionu starost prematurusa, imajući u vidu da apsolutni broj neutrofila prematurusa se smanjuje tokom gestacione starosti (Hornik CP. et al., 2012), što je u skladu sa rezultatima naše studije. S druge strane, iako je povećan ukupan broj leukocita periferne krvi jedan od osnovnih faktora za dijagnozu neonatalne sepse, ispitivanja su pokazala da leukopenija pokazuje visoku specifičnost (91%) za dijagnozu neonatalne sepse (Gerdes JS. 1991). U skladu sa ovakvim zapažanjima, kao i rezultatima dobijenim u našem istraživanju, pokazano je da neutropenija poseduje veću prediktivnu sposobnost za razvitak neonatalne sepse, u odnosu na neutrofiliju, ukazujući da ukupan broj leukocita, neutrofila i I:T odnosa imaju značajne limitacije u predikciji nastanka neonatalne sepse (Sharma D. et al., 2018).

PCT (kao i CRP) predstavlja protein akutne inflamatorne faze. Koncentracija ovog proteina u perifernoj krvi, koga proizvode hepatociti i makrofazi, iako predstavlja prohormon kalcitonina, ne zavisi od ukupne količine prisutnog kalcitonina (Sharma D. et al., 2018). Takođe, pokazano je da ovaj protein koreliše sa stepenom imunomodulacije i vaskularnim odgovorom, posebno pri razvitku SIRS-a (Sharma D. et al., 2018). U našoj studiji, vrednosti PCT-a periferne krvi pokazale su značajnu razliku među grupama u ukupnom ispitivanom uzorku, kao i grupama prematurusa rođenih pre i posle 32. gestacione nedelje. Istovremeno, u grupi prematurusa koji su rođeni između 32.-36. gestacione nedelje, vrednosti PCT-a su bile statistički značajno veće u grupi koja je razvila ranu sepsu u odnosu na grupu koja nije razvila

sepsu ali i u odnosu na grupu koja je razvila kasnu sepsu. Sem toga, vrednosti PCT-a u grupi koja je razvila kasnu sepsu bile su statistički značajno veće u odnosu na grupu koja nije razvila sepsu. Ovako dobijeni rezultati ukazuju da vrednosti PCT-a u perifernoj krvi može predstavljati odličan prediktivni faktor za razvoj sepse kod prematurusa. Uzrok ovako pozitivne predikcije PCT-a može predstavljati činjenica da vrednosti PCT-a rastu 2-4 sata nakon izlaganja bakterijskom endotoksinu, dok se maksimalne vrednosti postižu u roku od 6-8 sati i ostaju povećane sledeća 24 sata (Dandona P. et al., 1994), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u našoj studiji. Povećan nivo PCT-a, u grupama sa ranom i kasnom sepsom, pokazan u našem ispitivanju, potvrđen je i u ranijim ispitivanjima (Kordek A. et al., 2014; Luzzani A. et al., 2003), potvrđujući da na serumske vrednosti PCT-a ne utiče značajno gestaciona starost, pri razvoju neonatalne sepse (Sharma D. et al., 2018), što korespondira sa rezultatima naše studije. Nagli porast nivoa PCT-a sa razvojem sepse, detektovan i u našoj studiji, pokazuje da je evaluacija PCT-a, u odnosu na vrednosti CRP-a i ukupan broj leukocita, mnogo bolji prediktivni faktor za razvoj neonatalne sepse (Kordek A. et al., 2014). U prilog ovakvim zapažanjima, govore i podaci koji pokazuju da visoke vrednosti PCT-a ostaju duže vremena povećane, u odnosu na neke druge biomarkere neonatalne sepse, uključujući IL-6 i TNF $\alpha$  (Whicher J. et al., 2001). Nedavno publikovana metaanaliza, potvrdila je prethodno navedene rezultate, pokazujući da PCT predstavlja značajan biomarker za ranu dijagnozu neonatalne sepse (Wacker C. et al., 2013).

Imajući u vidu naše dobijene rezultate, kao i ukupan broj ispitanika u grupama u zavisnosti od vremena pojavljivanja sepse, naša dalja ispitivanja bila su usmerena ka evaluaciji prediktivnih faktora za razvoj sepse kod prevremeno rođene dece u periodu između <32. i 32.-36 gestacione nedelje. Naime, ćelijski posredovan imunitet obuhvata dve vrste limfocita, i to citotoksične T ćelije (CD8+) i pomoćničke ili pomažuće T ćelije (CD4+). Citotoksične T ćelije, prevashodno su uključene u proces eradikacije intracelularnih patogena, dok se CD4+ ćelije, na osnovu vrste citokina koje proizvode i sekretuju, dele na dva podtipa, uključujući Th1 i Th2 ćelije. Th1 podtip ćelija prevashodno proizvode proinflamatorne citokine, kao što su IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  i druge, dok Th2 podtip ćelije sekretuje antiinflamatorne citokine kao što su: IL-4, IL-5, IL-13 i druge (Melville JM. et al., 2013). IFN $\gamma$  predstavlja solubilni citokin koga prvenstveno sekretuju Th1 ćelije, makrofage, NK ćelije, kao i mukozalne epitelne ćelije (Schoenborn JR. et al., 2007). Ovaj citokin poseduje brojne funkcije u organizmu, uključujući stimulaciju aktivnosti



NK ćelija i makrofaga, povećava intenzitet prezentacije antigena, inicira proces hemotakse leukocita, stimuliše prelazak Th0 u Th1 ćelije, čime predstavlja jednu od osnovnih pozitivnih povratnih sprega u imunom sistemu (Paul WE. et al., 2010). Rezultati dobijeni u okviru naše studije pokazuju da su vrednosti IFN $\gamma$  u perifernoj krvi, kod prematurusa koji su razvili ranu sepsu, značajno veće u odnosu na prematuruse koji su razvili znake kasne sepse, kao i u odnosu na prematuruse koji nisu razvili sepsu (kontrolna grupa). Pored toga, vrednosti IFN $\gamma$  kod prematurusa sa razvijenom kasnom sepsom su značajno veće u odnosu na prematuruse koji nisu razvili sepsu. Sa druge strane, u krvi pupčane vrpce kod prematurusa rođenih pre ili posle 32. gestacione nedelje, statistički značajne razlike u vrednostima IFN $\gamma$  u odnosu na to da li su prematurusi razvijali znake i simptome rane ili kasne sepse ili ih uopšte nisu razvili, nisu zabeležene. Pored toga, analiza vrednosti IFN $\gamma$  u grupama prematurusa, prema gestacionoj starosti, pokazali su takodje značajne razlike izmedju kasne i rane razvijene sepse. Potrebno je naglasiti da dobijene vrednosti prematurusa mlađjih od 32. gestacione nedelje treba uzeti sa izvesnom rezervom, imajući u vidu da ova grupa prematurusa obuhvata samo 7 ispitanika. Dobijeni rezultati u našem ispitivanju mogu ukazivati da vrednosti IFN $\gamma$  u perifernoj krvi, radije nego vrednosti IFN $\gamma$  u krvi pupčane vrpce, predstavljaju mnogo bolji prediktivni faktor za razvoj sepse kod prevremeno rođene dece. U skladu sa našim rezultatima ranija ispitivanja potvrdila su da IFN $\gamma$  indukuje povećanu ekspresiju TLR (Toll-Like receptors) i stimuliše proces fagocitoze (Tissières P. et al., 2012). Slični rezultati su dobijeni i u ranijim studijama (Segura-Cervantes E. et al., 2016; Hibbert J. et al., 2020; Sugitharini V. et al., 2013), dok su neka ispitivanja dokumentovala smanjen nivo IFN $\gamma$  kod prematurusa (Takahashi N. et al., 2010; Hansen-Pupp I. et al., 2005). Egzaktni razlozi za dobijanje ovako kontradiktornih rezultata ni do danas nisu u potpunosti jasni. Medjutim, treba napomenuti da postoje odgovarajući faktori koji poseduju mogućnost da utiču na ukupnu koncentraciju, kao i vrstu produkovanih citokina, uključujući gestacionu starost, način dijagnoze septičkog stanja (da li se radi o septičkom stanju definisano na osnovu samo kliničkih kriterijuma ili sa dokazanom hemokulturom), prisustvo različitih mikroorganizama (koji mogu izazvati različite citokinske odgovore) (Hibbert J. et al., 2020). Dalje, naši rezultati su pokazali da jedino povećane vrednosti IFN $\gamma$  u krvi pupčane vrpce, u odnosu na vrednosti u perifernoj krvi, su detektovane kod prematurusa koji nisu razvili sepsu (kontrolna grupa). Prisutna alteracija nivoa citokina tokom intrauterinog rasta, pokazana su u

ranijsim ispitivanjima, ali funkcionalni značaj ovakvih nalaza još uvek nije u potpunosti proučen (Lindner U. et al., 2013).

U narednim ispitivanjima, evaluirali smo i mogući uticaj jednog od glavnih predstavnika Th2 citokina (IL-5) u predikciji septičkog stanja kod prematurusa. Rezultati dobijeni u našem ispitivanju pokazali su da vrednosti IL-5 u perifernoj krvi i krvi pupčane vrpce, u odnosu na prematuruse po gestacionoj starosti kao i u odnosu na vreme razvitka septičnog stanja, nijednim poredjenjem nisu pokazala statističku značajnu razliku. Iako je u obe grupe evaluiranih prematurusa zabeleženo diskretno povećanje vrednosti IL-5 kod ispitanika koju su razvili znakove i simptome rane sepse, ona nije bila statistički značajna. Dobijeni rezultati sugerišu da vrednost nivoa IL-5 ne predstavlja kredibilni prediktor za razvoj septičnog stanja kod prevremeno rođene dece. IL-5 predstavlja citokin koga proizvode Th2 ćelije i mastociti. Takođe, ovaj citokin stimuliše rast B limfocita, povećava sekreciju imunoglobulina, kao i da inicira eozinofilnu aktivnost (Shen HH. et al., 2003). Kod prevremeno rođene dece evidentno je postojanje smanjene funkcije T limfocita, prevažodno kao posledica prisustva velikog broja naivnih T ćelija. Pored toga, kod prematurusa preokret u produkciji antitela, kao jedna od osnovnih fizioloških karakteristika produkcije imunoglobulina, značajno je smanjen, kao i ukupna sposobnost produkcije antitela (Melville JM. et al., 2013). Takođe, tokom intrauterinog života, fetalni citokinski odgovor je uglavnom usmeren ka Th2 ćelijskom odgovoru. Kao posledica sklonosti prematurusa ka Th2 ćelijskom odgovoru, prevremeno rođena deca su daleko vulnerabilnija ka infekcijama. Danas se smatra da brz i nagli zaokret ka Th1 ćelijskom odgovoru, kao i sklonost produkciji citokina koje sa sobom nose Th1 ćelijski odgovor, može predstavljati jedan od odbrambenih mehanizama prematurusa (Melville JM. et al., 2013; Maródi L. 2006), što može objasniti naše rezultate koji pokazuju povećan nivo IFN $\gamma$  i nepromenjene vrednosti IL-5. Pored toga, potrebno je naglasiti da vrednosti IFN $\gamma$  mogu značajno varirati u zavisnosti od vremena pojavljivanja septičnog stanja i gestacione starosti prematurusa (Segura-Cervantes E. et al., 2016), što, takođe, treba razmotriti prilikom korišćenja citokina u predikciji razvoja sepse kod prevremeno rođene dece.

U daljem ispitivanju mogućih prediktivnih faktora za razvoj septičnog stanja kod prematurusa, pokušali smo da utvrdimo ulogu pojedinih hemokina iz krvi pupčane vrpce i periferne krvi na razvoj sepse kod prevremeno rođene dece. Vrednosti analize IL-8 u krvi

pupčane vrpce, ali i u perifernoj krvi, kod prematurusa sa ranom i kasnom sepsom, statistički su značajno veće u odnosu na prematuruse bez razvijene sepse. Takođe, nivoi IL-8 u krvi pupčane vrpce, su značajno veće kod prematurusa sa ranom sepsom u odnosu na prematuruse sa kasnom sepsom. Ovako detektovana razlika nije identifikovana pri analizi vrednosti IL-8 iz periferne krvi. Vrednosti IL-8, u svakoj ispitivanoj grupi formiranoj u odnosu na septički status, statistički su značajno veće u krvi pupčane vrpce u odnosu na perifernu krv prematurusa. Dobijeni rezultati pokazuju da analiza vrednosti IL-8 mogu predstavljati dobar prediktivni faktor za razvoj sepse kod prematurusa. Pored toga, analiza nivoa IL-8 u krvi pupčane vrpce, u odnosu na perifernu krv, pokazala se superiornijom u predikciji razvoja septičnog stanja kod prematurusa. IL-8 pripada grupi proinflamatornih citokina, koga proizvode i sekretuju monociti, makrofazi, entotelne ćelije i fibroblasti. Ovaj citokin/hemokin poseduje značajnu hemotaksičnu aktivnost, kao i da je potentan stimulator fagocitoze (posebno značajan je induktor respiratornog praska), ćelija koje su pristigle do ciljnih organa pod dejstvom IL-8 (Dixit N. et al., 2012). Nakon početka infekcije, nastupa nagli rast nivoa IL-8. Njegove koncentracije počinju da rastu 2-4 sata, nakon inicijacije inflamatornog procesa, nakon čega započinje smanjenje nivoa IL-8, čineći ga odličnim biološkim markerom za detekciju rane infekcije (Resch B. et al., 2003). Rezultati naše studije korespondiraju sa prethodnim ispitivanjima koja su pokazala da postoji povećan nivo IL-8 u krvi pupčane vrpce (Takahashi N. et al., 2010), periferne krvi (Kocabaş E. et al., 2007), kao i amnionskoj tečnosti (Yoon BH. et al., 1997) i da predstavljaju jedan od glavnih faktora za nastanak intrauterine inflamacije i prevremenog rođenja. Takođe, ranija istraživanja su pokazala da u krvi pupčane vrpce postoji mnogo veći broj monocita, koji su sposobni da produkuju velike količine IL-8, u odnosu na perifernu krv (Strunk T. et al., 2004), što može delimično objasniti rezultate dobijene u našem ispitivanju. U prilog ovakvim zapažanjima govore i rezultati prethodnih istraživanja koja su pokazala da povećana ekspresija IL-8 mRNA, u krvi pupčane vrpce, je kontrolisana transkripcionom indukcijom, kao i posttranslacionim povećanjem produkcije IL-8 kod neonatalnih leukocita (Huang HC. et al., 2005). Dalje, ranija ispitivanja su pokazala da izrazito povećane vrednosti IL-8, korespondiraju sa povećanim mortalitetom kod neonatusa (Boskabadi H. et al., 2010), kao i da IL-8 može imati značajnu ulogu u perinatalnih patoloških stanja (Takahashi N. et al., 2010). Značajna uloga IL-8 u razvoju inflamatornog procesa pokazana je i u prethodnim ispitivanjima, ukazujući da povećani nivoi IL-8 pokazuju značajnu povezanost sa kasnijim komplikacijama kod prematurusa

(Takahashi N. et al., 2010). Ovakvi nalazi su potvrđeni i u studijama sa adultnim osobama, gde je pokazano da su povećani nivoi IL-8 uključeni u proces hroničnih inflamatornih stanja, kao što je proces arteroskleroze (Hotamisligil GS. 2006), ali i stanjima različite srčane disfunkcije (Aukrust P. et al., 1998), ukazujući na njihovu značajnu ulogu i hroničnim inflamatornim procesima. Potrebno je istaći da smanjenje intrauterinog rasta vrlo blisko povezano sa alteracijama majčinih ili fetusnih citokinskih nivoa (Lindner U. et al., 2013). Istraživanja su pokazala da povećane vrednosti mRNK IL-8, kao i drugih proinflamatornih citokina, u placenti kod intrauterinog zastoja u rastu (Hahn-Zoric M. et al., 2002). Zastoj u intrauterinom rastu, kao posledica insuficijencije placente, dovode do smanjenog transporta i snabdevanja kiseonika fetusa, a samim tim predstavlja i humani model hronične fetalne hipoksije (Lindner U. et al., 2013). U ovakvim slučajevima placentalne insuficijencije, primećen je značajan intenzitet inflamatornog odgovora (Amarilyo G. et al., 2011). Nedavno publikovana metaanaliza pokazala je senzitivnost (78%) i specifičnost (84%) IL-8 u dijagnozi razvoja neonatalne sepse (Zhou M. et al., 2015). Iako ovako dobijeni rezultati pokazuju značajnu ulogu IL-8 u dijagnozi neonatalne sepse, još uvek je neophodna dalja i dublja analiza ovog citokina u cilju dobijanja dodatnih informacija i potvrda njegove prediktivne uloge u razvoju septičnog stanja (Sharma D. et al., 2018).

Naredna istraživanja obuhvatila su analizu vrednosti hemokina MCP-1 u krvi pupčane vrpce i perifernoj krvi, kao mogući prediktivni faktor za razvoj septičkog stanja kod prematurusa. Naši rezultati pokazuju da se vrednosti MCP-1 u perifernoj krvi nisu statistički značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septički status. S druge strane, u krvi iz pupčane vrpce, nivoi MCP-1 kod prematurusa koji su pokazali znake rane sepse i kasne sepse, statistički su značajno veće u odnosu na vrednosti prematurusa koji nisu razvili septično stanje. Analiza vrednosti MCP-1 u perifernoj krvi, statistički su značajno veće u odnosu na vrednosti MCP-1 iz krvi pupčane vrpce kod svake vrste prematurusa, u odnosu na septični status prematurusa. Potrebno je istaći da kod mlađih prematurusa postoji statistički značajna razlika medju vrednostima MCP-1 u krvi pupčane vrpce, ali dalja analiza nije vršena imajući u obzir mali broj ispitanika u navedenoj grupi. Dobijeni rezultati pokazuju da vrednosti MCP-1 u krvi pupčane vrpce, pokazuju povoljan prediktivni faktor prilikom evaluacije mogućnosti pojavljivanja septičkog stanja kod prevremeno rođene dece. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa prethodnim ispitivanjima koja su, takodje, pokazale povišene vrednosti MCP-1 u

nastanku neonatalne (Leal YA. et al., 2018; Ng PC. et al., 2006; Sugitharini V. et al., 2013) i adultne sepse (Bozza FA. et al., 2007). Slični rezultati, kao i rezultati našeg ispitivanja, dobijeni su i u prethodnim istraživanjima, pokazujući povećane vrednosti MCP-1 u krvi pupčane vrpce kod prematurusa u odnosu na terminsku rođenu decu (Matoba N. et al., 2009). MCP-1 je hemokin koga uglavnom proizvode monociti, makrofazi i dendritične ćelije. Nakon oslobađanja, ovaj citokin dovodi do hemotakse monocita, memorijskih T limfocita i dendritičnih ćelija do mesta inflamacije, koje nastaje kao posledica tkivnog oštećenja ili inflamacije (Yoshimura T. et al., 2018). Zbog svoje izrazite sposobnosti za hemotaksu monocita, MCP-1 je često uključen u patogenezu različitih imunoloških oboljenja, karakterističnih sa masovnim monocitnim nagomilavanjem (Xia M. et al., 2009). Prethodna ispitivanja korespondiraju sa rezultatima našeg ispitivanja, pokazujući da vrednosti MCP-1 korelišu sa povećanim vrednostima IL-8, kao što je pokazano i u našoj studiji, i da mogu dovesti do mnogih poremećaja u neonatalnom periodu (Takahashi N. et al., 2010). Eksperimentalna istraživanja, na prevremeno rođenim modelima, pokazala su pojačanu ekspresiju MCP-1, ukazujući da ovaj hemokin ima značajnu ulogu u fetalnoj inflamaciji (Shah TA. et al., 2010). Ranije navedena ispitivanja pokazala su da MCP-1, pored IL-8, ima značajnu ulogu u inicijaciji i održavanju hroničnih inflamatornih procesa (Hotamisligil GS. 2006). U ovakvim nalazima, ispitivanja su pokazala da je mortalitet od sepse usko povezan sa povećanim vrednostima MCP-1 (Bozza FA. et al., 2007). Drugi autori navode da detektovana zapažanja mogu nastati kao posledica hemotakse nezrelih leukocita i značajne produkcije proinflamatornih citokina, koji mogu dovesti do oštećenja organa, septičnog šoka i smrti (Aziz M. et al., 2013), što može i objasniti dobijene vrednosti MCP-1 u našoj studiji. Slično kao i u našem ispitivanju, povećan nivo proinflamatornog IFN $\gamma$  zajedno sa visokim vrednostima MCP-1, pokazan je i u ranijim studijama prematurusa sa razvijenim septičkim stanjem (Sherwin C. et al., 2008). Ipak, dodatne i opširnije studije o uticaju MCP-1 i mehanizmu delovanja ovog hemokina u nastanku septičnog stanja kod prematurusa je neophodna za donošenje konačnih zaključaka (Hibbert J. et al., 2020).

U završnom delu rada, pokušali smo da ispitamo potencijalnu prediktivnu ulogu MIP-1 $\alpha$  u razvoju sepse kod prematurusa. Dobijene vrednosti MIP-1 $\alpha$  u perifernoj krvi nisu se statistički značajno razlikovale kod prematurusa u odnosu na septični status. Kod analize MIP-1 $\alpha$  u krvi pupčane vrpce, vrednosti ovog hemokina kod prematurusa sa znacima rane i kasne sepse statistički su značajno bile više u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Pored toga, vrednosti

MIP-1 $\alpha$  kod prematurusa sa ranom sepsom su statistički bile veće u odnosu na prematuruse sa kasnom sepsom. U krvi pupčane vrpce vrednosti MIP-1 $\alpha$  su bile statistički veće kod prematurusa u odnosu na septični status, pri poredjenju sa vrednostima MIP-1 $\alpha$  u perifernoj krvi ispitanika. Rezultati naše studije ukazuju da vrednosti MIP-1 $\alpha$ , u krvi pupčane vrpce, može predstavljati odličan prediktivni faktor za nastanak, pogotovo rane, sepse kod prevremeno rođene dece. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim ispitivanjima, koja su pokazala povećan nivo MIP-1 $\alpha$  i MCP-1, u krvi pupčane vrpce, kod prematurusa u odnosu na terminsku rođenu decu (Matoba N. et al., 2009). Slični rezultati dobijeni su i u nedavnoj studiji koja je pokazala da MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 i IL-8 značajno učestvuju u nastaku i razvoju intrauterine inflamacije, prevremenog rođenja, kao i neonatalnih komplikacija koje se mogu javiti kasnije (Otsubo Y. et al., 2017). MIP-1 $\alpha$  pripada grupi hemokina koga proizvode i sekreciju makrofagi i monociti. Proizvodnja ovog hemokina stimulirana je nakon izlaganja bakterijskom endotoksinu ili proinflamatornim citokinima (Menten P. et al., 2002). Biološki efekti ovog hemokina ostvaruju se njegovim vezivanjem sa svojim ligandima (CCR1 i CCR5) koji se nalaze eksprimirani na površini ćelija, što na kraju rezultira masivnom hemotaksom kao i sekretovanjem brojnih bioaktivnih molekula. MIP-1 $\alpha$  najveći uticaj pokazuje na monocite, T limfocite, dendritične ćelije i NK ćelije ali poseduju mogućnost indukcije oslobađanja različitih proinflamatornih citokina (Qin CC. et al., 2017). Ranija ispitivanja su pokazala da proizvodnja i sekrecija MIP-1 $\alpha$  ne pokazuju identične vrednosti kod mononuklearnih ćelija iz krvi pupčane vrpce i periferne krvi (Hariharan D. et al., 2000), čime se mogu objasniti i razlike u koncentraciji MIP-1 $\alpha$  u krvi pupčane vrpce i periferne krvi, dobijene u našoj studiji. Povećane vrednosti MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 i IL-8 pokazale su značajan porast kod prematurusa, u odnosu na starije neonatuse, i pozitivno su korelirale sa različitim neonatalnim komplikacijama, uključujući i razvitak septičkog stanja (Otsubo Y. et al., 2017). Sem toga, druga grupa istraživača pokazala je da vrednost ova tri hemokina (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 i IL-8) imaju značajno visok nivo u odnosu na ostale analizirane citokine (Takahashi N. et al., 2010). Pored navedenog, neophodno je uzeti u obzir transplacentalni prolazak svakog citokina, koji učestvuje u ukupnoj količini citokina u krvi pupčane vrpce. Neka ispitivanja su pokazala da pojedini citokini (IL-4 i IL-13) ne prolaze placentu u detektabilnim količinama (Lim RH. et al., 2009). Drugi autori su dokumentovali da granulocitno stimulirajući faktor rasta može proći placentu, posebno kod prematurusa (Calhoun DA. et al., 1996). Zbog svega navedenog, ćelije koje proizvode hemokine u krvi pupčane vrpce, kao i transplacentalni prelazak svakog citokina,

ostaju da budu razjašnjen i dokazan u budućim studijama, čime bi se dobila mnogo kompletnija slika mehanizama i posledica koje mogu nastati razjašnjavanjem navedenih dilema.

## 6. ZAKLJUČAK

Imajući u vidu dobijene rezultate u našoj studiji, mogli bismo da zaključimo sledeće:

- Vrednosti pojedinih kliničkih varijabli prematurusa, uključujući rast, pol, težinu, vrednosti Apgar skora (u 1. minutu) i zastupljenost primene carskog reza, kao metode za završetak porodjaja, nisu predstavljale signifikantan faktor za razvoj sepse (rane ili kasne) kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Evaluacija CRP-a, ukupnog broja leukocita, kao i pojedinih subpopulacija leukocita (neutrofila monocita i limfocita) u perifernoj krvi, ne mogu predstavljati siguran prediktivni faktor u razvoju sepse (rane ili kasne) kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Analiza vrednosti PCT-a u perifernoj krvi, predstavlja odličan prediktivni faktor za razvoj sepse (posebno rane), kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Određivanje koncentracije IFN $\gamma$  u perifernoj krvi može poslužiti kao dobar prediktivni faktor za razvoj sepse (posebno rane), kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje. Vrednosti navedenog citokina u krvi pupčane vrpce ne poseduju signifikantne vrednosti u predikciji septičnog stanja kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Koncentracija IL-5 u perifernoj krvi i krvi pupčane vrpce ne predstavlja kredibilni prediktor za razvoj septičnog stanja, kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Vrednosti IL-8, u krvi pupčane vrpce i u perifernoj krvi, poseduju signifikantni potencijal za predikciju razvoja sepse kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje. Koncentracija IL-8 u krvi pupčane vrpce, poseduje potencijal predikcije rane sepse, sto nije slučaj sa vrednostima IL-8 u perifernoj krvi, kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.
- Analiza vrednosti MCP-1, u krvi pupčane vrpce, predstavlja dobar prediktivni faktor za razvoj sepse (posebno rane), kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje, dok istovremena analiza ovog hemokina, u perifernoj krvi, nije pokazala prediktivni potencijal za razvoj sepse kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.



- Određivanje vrednosti MIP-1 $\alpha$  u krvi pupčane vrpce, predstavlja signifikantan faktor u predikciji razvoja sepse (posebno rane), kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje. Evaluacija navedenog hemokina u perifernoj krvi nije pokazala prediktivni potencijal za razvoj sepse kod prematurusa starosti 32.-36. gestacione nedelje.

## 7. LITERATURA

Amarilyo G, Oren A, Mimouni FB, Ochshorn Y, Deutsch V, Mandel D. Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age neonates. *J Perinatol.* 2011; 31(1): 30-2.

Amatuni GS, Sciortino S, Currier RJ, Naides SJ, Church JA, Puck JM. Reference intervals for lymphocyte subsets in preterm and term neonates without immune defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 144(6): 1674-1683.

Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998; 97(12): 1136-43.

Aziz M, Jacob A, Yang WL, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2013; 93(3): 329-42.

Becker KL, Snider R, Nylén ES. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2010; 159(2): 253-64.

Benitz WE. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010; 37(2): 421-38.

Bizzarro MJ, Jiang Y, Hussain N, Gruen JR, Bhandari V, Zhang H. The impact of environmental and genetic factors on neonatal late-onset sepsis. *J Pediatr.* 2011; 158(2): 234-8.e1.

Boskabadi H, Maamouri G, Afshari JT, Ghayour-Mobarhan M, Shakeri MT. Serum interleukin 8 level as a diagnostic marker in late neonatal sepsis. *Iran J Pediatr.* 2010; 20(1): 41-7.

Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007; 11(2): R49.

Calhoun DA, Rosa C, Christensen RD. Transplacental passage of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in women with an imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174(4): 1306-11.

Carr R, Huizinga TW. Low soluble FcRIII receptor demonstrates reduced neutrophil reserves in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000; 83(2): F160.

Chiesa C, Panero A, Rossi N, Stegagno M, De Giusti M, Osborn JF, Pacifico L. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis*. 1998; 26(3): 664-72.

Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, Pacifico L. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem*. 2003; 49(1): 60-8.

Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, Doherty D, Simmer K, Richmond P, Burgner D. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect Immun*. 2011; 79(4): 1588-96.

Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79(6):1605-8.

de Roock S, Stoppelenburg AJ, Scholman R, Hoeks SBEA, Meeding J, Prakken BJ, Boes M. Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132(3): 754-756.e3.

Dirix V, Vermeulen F, Mascart F. Maturation of CD4+ regulatory T lymphocytes and of cytokine secretions in infants born prematurely. *J Clin Immunol*. 2013; 33(6): 1126-33.

Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front Immunol*. 2012; 3: 188.

Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015; 100(3): F257-63.

Duggan PJ, Maalouf EF, Watts TL, Sullivan MH, Counsell SJ, Allsop J, Al-Nakib L, Rutherford MA, Battin M, Roberts I, Edwards AD. Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet*. 2001; 358(9294): 1699-700.

Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health*. 2008; 53(3): 227-35.

Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence*. 2014; 5(1): 143-53.

Flannery DD, Ross RK, Mukhopadhyay S, Tribble AC, Puopolo KM, Gerber JS. Temporal Trends and Center Variation in Early Antibiotic Use Among Premature Infants. *JAMA Netw Open*. 2018; 1(1): e180164.

Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics*. 1999; 104(3 Pt 1): 447-53.

Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovács A, Kovács L, László A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr*. 2001; 160(8): 478-82.

Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 1991; 18(2): 361-81.

Gibbons D, Fleming P, Virasami A, Michel ML, Sebire NJ, Costeloe K, Carr R, Klein N, Hayday A. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med*. 2014; 20(10): 1206-10.

Gilfillan M, Bhandari V. Neonatal sepsis: where are we now? *Res Rep in Neonatol*. 2019; 9: 9-20.

Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000; 342(20): 1500-7.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *PediatrCrit Care Med*. 2005; 6: 2-8.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179(1): 194-202.

Gomez-Lopez N, Hernandez-Santiago S, Lobb AP, Olson DM, Vadillo-Ortega F. Normal and premature rupture of fetal membranes at term delivery differ in regional chemotactic activity and related chemokine/cytokine production. *Reprod Sci*. 2013; 20(3): 276-84.

Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002; 8(1): 3-13.

Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, Espinoza J, Hassan SS. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50(3): 652-83.

Greenberg RG, Kandefor S, Do BT, Smith PB, Stoll BJ, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR, Sánchez PJ, Shankaran S, Van Meurs KP, Ball MB, Hale EC, Newman NS, Das A, Higgins RD, Cotten CM; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Late-onset Sepsis in Extremely Premature Infants: 2000-2011. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36(8): 774-9.

Hahn-Zoric M, Hagberg H, Kjellmer I, Ellis J, Wennergren M, Hanson LA. Aberrations in placental cytokine mRNA related to intrauterine growth retardation. *Pediatr Res.* 2002; 51(2): 201-6.

Hansen-Pupp I, Harling S, Berg AC, Cilio C, Hellström-Westas L, Ley D. Circulating interferon-gamma and white matter brain damage in preterm infants. *Pediatr Res.* 2005; 58(5): 946-52.

Hariharan D, Ho W, Cutilli J, Campbell DE, Douglas SD. C-C chemokine profile of cord blood mononuclear cells: selective defect in RANTES production. *Blood.* 2000; 95(2): 715-8.

Hedegaard SS, Wisborg K, Hvas AM. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis--a systematic review. *Infect Dis (Lond).* 2015; 47(3): 117-24.

Hibbert J, Strunk T, Simmer K, Richmond P, Burgner D, Currie A. Plasma cytokine profiles in very preterm infants with late-onset sepsis. *PLoS One.* 2020; 15(5): e0232933.

Hofer N, Kothari R, Morris N, Müller W, Resch B. The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 209(6): 542.e1-542.e11.

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.

Holt PG. The role of genetic and environmental factors in the development of T-cell mediated allergic disease in early life. *Paediatr Respir Rev.* 2004; 5 Suppl A: S27-30.

Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin Jr DK, Smith PB, Manzoni P, Jacqz-Aigrain E, Kaguelidou F, Cohen-Wolkowicz M. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev.* 2012; 88 Suppl 2(Suppl 2): S69-74.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444(7121): 860-7.

Huang HC, Tai FY, Wang FS, Liu CA, Hsu TY, Ou CY, Yang KD. Correlation of augmented IL-8 production to premature chronic lung disease: implication of posttranscriptional regulation. *Pediatr Res.* 2005; 58(2): 216-21.

Huenecke S, Fryns E, Wittekindt B, Buxmann H, Königs C, Quaiser A, Fischer D, Bremm M, Klingebiel T, Koehl U, Schloesser R, Bochennek K. Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents. *Scand J Immunol.* 2016; 84(5): 291-298.

Iliodromiti Z, Anastasiadis A, Varras M, Pappa KI, Siristatidis C, Bakoulas V, Mastorakos G, Vrachnis N. Monocyte function in the fetus and the preterm neonate: immaturity combined with functional impairment. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 753752.

Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev.* 2013, 93(3): 1247-88.

Ismail AQ, Gandhi A. Using CRP in neonatal practice. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28(1): 3-6.

Jackson GL, Engle WD, Sendelbach DM, Vedro DA, Josey S, Vinson J, Bryant C, Hahn G, Rosenfeld CR. Are complete blood cell counts useful in the evaluation of asymptomatic neonates exposed to suspected chorioamnionitis? *Pediatrics.* 2004; 113(5): 1173-80.

Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010; 2(3): 161-75.

Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, Drahosova M, Hornychova H, Janku P, Prochazka M, Simetka O, Andrys C. Cervical fluid IL-6 and IL-8 levels in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28(2): 134-40.

Kai-Larsen Y, Gudmundsson GH, Agerberth B. A review of the innate immune defence of the human foetus and newborn, with the emphasis on antimicrobial peptides. *Acta Paediatr.* 2014; 103(10): 1000-8.

Kallapur SG, Jobe AH, Ball MK, Nitsos I, Moss TJ, Hillman NH, Newnham JP, Kramer BW. Pulmonary and systemic endotoxin tolerance in preterm fetal sheep exposed to chorioamnionitis. *J Immunol.* 2007; 179(12) :8491-9.

Kallapur SG, Nitsos I, Moss TJ, Polglase GR, Pillow JJ, Cheah FC, Kramer BW, Newnham JP, Ikegami M, Jobe AH. IL-1 mediates pulmonary and systemic inflammatory responses to chorioamnionitis induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179(10): 955-61.

Kamdar S, Hutchinson R, Laing A, Stacey F, Ansbro K, Millar MR, Costeloe K, Wade WG, Fleming P, Gibbons DL. Perinatal inflammation influences but does not arrest rapid immune development in preterm babies. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 1284.

Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood.* 2007; 110(8): 2948-54.

Kim CJ, Yoon BH, Park SS, Kim MH, Chi JG. Acute funisitis of preterm but not term placentas is associated with severe fetal inflammatory response. *Hum Pathol.* 2001; 32(6): 623-9.

Kim CJ, Yoon BH, Romero R, Moon JB, Kim M, Park SS, Chi JG. Umbilical arteritis and phlebitis mark different stages of the fetal inflammatory response. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(2): 496-500.

Kocabaş E, Sarikçioğlu A, Aksaray N, Seydaoğlu G, Seyhun Y, Yaman A. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr.* 2007; 49(1): 7-20.

Kordek A, Łoniewska B, Podraza W, Nikodemski T, Rudnicki J. Usefulness of estimation of blood procalcitonin concentration versus C-reactive protein concentration and white blood cell count for therapeutic monitoring of sepsis in neonates. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2014; 68: 1516-23.

Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effects of gestation, labor, and chorioamnionitis. *Biol Reprod.* 1999; 61(3): 823-7.

Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128(1): 118-23.

Lavoie PM, Huang Q, Jolette E, Whalen M, Nuyt AM, Audibert F, Speert DP, Lacaze-Masmonteil T, Soudeyns H, Kollmann TR. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *J Infect Dis.* 2010; 202(11): 1754-63.

Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell.* 2010; 9(4): 527-35.

Leal YA, Álvarez-Nemegyei J, Lavadores-May AI, Girón-Carrillo JL, Cedillo-Rivera R, Velazquez JR. Cytokine profile as diagnostic and prognostic factor in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019; 32: 2830-36.

Leal YA, Álvarez-Nemegyei J, Lavadores-May AI, Girón-Carrillo JL, Cedillo-Rivera R, Velazquez JR. Cytokine profile as diagnostic and prognostic factor in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019; 32(17): 2830-6.

Lee HH, Hoeman CM, Hardaway JC, Guloglu FB, Ellis JS, Jain R, Divekar R, Tartar DM, Haymaker CL, Zaghouani H. Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *J Exp Med.* 2008; 205(10): 2269-80.

Lee J, Romero R, Xu Y, Miranda J, Yoo W, Chaemsaitong P, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Tarca AL, Korzeniewski SJ, Hassan SS, Than NG, Yoon BH, Kim CJ. Detection of anti-HLA antibodies in maternal blood in the second trimester to identify patients at risk of antibody-mediated maternal anti-fetal rejection and spontaneous preterm delivery. *Am J Reprod Immunol.* 2013; 70(2): 162-75.

Lim RH, Kobzik L. Transplacental passage of interleukins 4 and 13? *PLoS One.* 2009; 4(3): e4660.



Lim WH, Lien R, Huang YC, Chiang MC, Fu RH, Chu SM, Hsu JF, Yang PH. Prevalence and pathogen distribution of neonatal sepsis among very-low-birth-weight infants. *Pediatr Neonatol.* 2012; 53(4): 228-34.

Lindner U, Tutdibi E, Binot S, Monz D, Hilgendorff A, Gortner L. Levels of cytokines in umbilical cord blood in small for gestational age preterm infants. *Clin Padiatr.* 2013; 225(2): 70-4.

Luciano AA, Yu H, Jackson LW, Wolfe LA, Bernstein HB. Preterm labor and chorioamnionitis are associated with neonatal T cell activation. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16698.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 925135.

Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med.* 2003; 31(6): 1737-41.

Ma L, Chen R, Liu F, Li Y, Wu Z, Zhong W, Lu G, Wang B. Reduced NK cell percentage at birth is associated with late onset infection in very preterm neonates. *Scand J Immunol.* 2014; 80(1): 50-6.

Madsen-Bouterse SA, Romero R, Tarca AL, Kusanovic JP, Espinoza J, Kim CJ, Kim JS, Edwin SS, Gomez R, Draghici S. The transcriptome of the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(1): 73-92.

Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, Romeo MG, Messner H, Stolfi I, Decembrino L, Laforgia N, Vagnarelli F, Memo L, Bordignon L, Saia OS, Maule M, Gallo E, Mostert M, Magnani C, Quercia M, Bollani L, Pedicino R, Renzullo L, Betta P, Mosca F, Ferrari F, Magaldi R, Stronati M, Farina D; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA.* 2009; 302(13): 1421-8.

Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3): 137-44.

Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Zuckerman B, Wang X. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*. 2009; 123(5): 1320-8.

Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci*. 2006; 101(3): 189-98.

McGreal EP, Hearne K, Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology*. 2012; 217(2): 176-86.

Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health*. 2011; 1(2): 201-9.

Melville JM, Moss TJ. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*. 2013; 7: 79.

Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(6): 455-81.

Mikhael M, Brown LS, Rosenfeld CR. Serial neutrophil values facilitate predicting the absence of neonatal early-onset sepsis. *J Pediatr*. 2014; 164(3): 522-8.e1-3.

Murphy K, Weiner J. Use of leukocyte counts in evaluation of early-onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(1): 16-9.

Newman TB, Draper D, Puopolo KM, Wi S, Escobar GJ. Combining immature and total neutrophil counts to predict early onset sepsis in term and late preterm newborns: use of the I/T2. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33(8): 798-802.

Ng PC, Li K, Leung TF, Wong RP, Li G, Chui KM, Wong E, Cheng FW, Fok TF. Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants. *Clin Chem*. 2006; 52(6): 1181-9.

Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, Lewis DB, Ito S, Aruffo A, Wilson CB, Ochs HD. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest*. 1995; 95(1): 66-75.

Novitsky A, Tuttle D, Locke RG, Saiman L, Mackley A, Paul DA. Prolonged early antibiotic use and bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *Am J Perinatol*. 2015; 32(1): 43-8.

Nussbaum C, Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol*. 2011; 90(1): 74-81.

Ohlin A. What is neonatal sepsis? *Acta Paediatr*. 2011; 100(1): 7-8.

Osuchowski MF, Craciun F, Weixelbaumer KM, Duffy ER, Remick DG. Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J Immunol*. 2012; 189(9): 4648-56.

Otsubo Y, Hashimoto K, Kanbe T, Sumi M, Moriuchi H. Association of cord blood chemokines and other biomarkers with neonatal complications following intrauterine inflammation. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0175082.

Oza S, Lawn JE, Hogan DR, Mathers C, Cousens SN. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000-2013. *Bull World Health Organ*. 2015; 93(1): 19-28.

Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(4): 225-35.

Pereira LH, Machado JR, Olegário JG, Rocha LP, Silva MV, Guimarães CS, Reis MA, Castellano LR, Ramalho FS, Corrêa RR. Interleukin-6 and C-reactive protein are overexpressed in the liver of perinatal deaths diagnosed with fetal inflammatory response syndrome. *Dis Markers*. 2014; 2014: 252780.

Pérez A, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum Immunol*. 2010; 71(2): 151-7.

Prieto CL, Colomer BF, Sastre JB. Prognostic factors of mortality in very low-birth-weight infants with neonatal sepsis of nosocomial origin. *Am J Perinatol*. 2013; 30(5): 353-8.

Qazi BS, Tang K, Qazi A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int J Inflam*. 2011; 2011: 908468.

Qazi KR, Bach Jensen G, van der Heiden M, Björkander S, Holmlund U, Haileselassie Y, Kokkinou E, Marchini G, Jenmalm MC, Abrahamsson T, Sverremark-Ekström E. Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life. *J Immunol*. 2020; 204(1): 68-77.

Qin CC, Liu YN, Hu Y, Yang Y, Chen Z. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(17): 3043-52.

Quinello C, Silveira-Lessa AL, Ceccon ME, Cianciarullo MA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scand J Immunol*. 2014; 80(1): 57-70.

Rampersaud R, Randis TM, Ratner AJ. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012; 17(1): 51-7.

Rennó C, Nadaf MI, Zago CA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Healthy Preterm Newborns Show an Increased Frequency of CD4(+) CD25(high) CD127(low) FOXP3(+) Regulatory T Cells with a Naive Phenotype and High Expression of Gut-Homing Receptors. *Scand J Immunol*. 2016; 83(6): 445-55.

Resch B, Gusenleitner W, Müller WD. Procalcitonin and interleukin-6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. *Acta Paediatr*. 2003; 92(2): 243-5.

Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta*. 2012; 413(17-18): 1364-73.

Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Docheva N, Dong Z, Kim CJ, Kim YM, Kim JS, Qureshi F, Jacques SM, Yoon BH, Chaiworapongsa T, Yeo L, Hassan SS, Erez O, Korzeniewski SJ. CXCL10 and IL-6: Markers of two different forms of intra-amniotic inflammation in preterm labor. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 78(1): e12685.

Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr*. 2003; 133(5 Suppl 2): 1668S-1673S.

Ruangkit C, Satpute A, Vogt BA, Hoyen C, Viswanathan S. Incidence and risk factors of urinary tract infection in very low birth weight infants. *J Neonatal Perinatal Med.* 2016; 9(1): 83-90.

Sarvaria A, Basar R, Mehta RS, Shaim H, Muftuoglu M, Khoder A, Sekine T, Gokdemir E, Kondo K, Marin D, Daher M, Alousi AM, Alsuliman A, Liu E, Oran B, Olson A, Jones RB, Popat U, Hosing C, Champlin R, Shpall EJ, Rezvani K. IL-10<sup>+</sup> regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation. *Blood.* 2016; 128(10): 1346-61.

Scheible KM, Emo J, Laniewski N, Baran AM, Peterson DR, Holden-Wiltse J, Bandyopadhyay S, Straw AG, Huyck H, Ashton JM, Tripi KS, Arul K, Werner E, Scalise T, Maffett D, Caserta M, Ryan RM, Reynolds AM, Ren CL, Topham DJ, Mariani TJ, Pryhuber GS. T cell developmental arrest in former premature infants increases risk of respiratory morbidity later in infancy. *JCI Insight.* 2018; 3(4): e96724.

Scheible KM, Emo J, Yang H, Holden-Wiltse J, Straw A, Huyck H, Misra S, Topham DJ, Ryan RM, Reynolds AM, Mariani TJ, Pryhuber GS. Developmentally determined reduction in CD31 during gestation is associated with CD8<sup>+</sup> T cell effector differentiation in preterm infants. *Clin Immunol.* 2015; 161(2): 65-74.

Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007; 96: 41-101.

Segura-Cervantes E, Mancilla-Ramírez J, González-Canudas J, Alba E, Santillán-Ballesteros R, Morales-Barquet D, Sandoval-Plata G, Galindo-Sevilla N. Inflammatory Response in Preterm and Very Preterm Newborns with Sepsis. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 6740827.

Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence.* 2014; 5(1): 170-8.

Shah TA, Hillman NH, Nitsos I, Polglase GR, Pillow JJ, Newnham JP, Jobe AH, Kallapur SG. Pulmonary and systemic expression of monocyte chemotactic proteins in preterm sheep fetuses exposed to lipopolysaccharide-induced chorioamnionitis. *Pediatr Res.* 2010; 68(3): 210-5.

Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet.* 2017; 390(10104): 1770-80.

Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018; 31(12): 1646-59.

Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, Crosby JR, Hines EM, Borchers MT, Wang H, Biechelle TL, O'Neill KR, Ansay TL, Colbert DC, Cormier SA, Justice JP, Lee NA, Lee JJ. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse. *J Immunol.* 2003; 170(6): 3296-305.

Sherwin C, Broadbent R, Young S, Worth J, McCaffrey F, Medlicott NJ, Reith D. Utility of interleukin-12 and interleukin-10 in comparison with other cytokines and acute-phase reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2008; 25(10): 629-36.

Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(1): 21-47.

Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol.* 2018; 9: 754.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2004; 113(5): 1181-6.

Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Schibler K, Carlo WA, Kennedy KA, Poindexter BB, Finer NN, Ehrenkranz RA, Duara S, Sánchez PJ, O'Shea TM, Goldberg RN, Van Meurs KP, Faix RG, Phelps DL, Frantz ID 3rd, Watterberg KL, Saha S, Das A, Higgins RD; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* 2010; 126(3): 443-56.

Straub J, Paula H, Mayr M, Kasper D, Assadian O, Berger A, Rittenschober-Böhm J. Diagnostic accuracy of the ROCHE Septifast PCR system for the rapid detection of blood pathogens in neonatal sepsis-A prospective clinical trial. *PLoS One.* 2017; 12(11): e0187688.

Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24(1):25-31.

Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C. Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res.* 2004; 56(2): 219-26.

Sugitharini V, Prema A, Berla Thangam E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res.* 2013, 62(12): 1025-34.

Sugitharini V, Prema A, Berla Thangam E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res.* 2013; 62(12): 1025-34.

Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M, Macdonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Matsushita M, Szemraj J, Turner ML, Kilpatrick DC. Two factors of the lectin pathway of complement, I-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Mol Immunol.* 2009; 46(4): 551-8.

Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 967629.

Takahashi N, Uehara R, Kobayashi M, Yada Y, Koike Y, Kawamata R, Odaka J, Honma Y, Momoi MY. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine.* 2010; 49(3): 331-7.

Takahashi N, Uehara R, Kobayashi M, Yada Y, Koike Y, Kawamata R, Odaka J, Honma Y, Momoi MY. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine.* 2010; 49(3): 331-7.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(10): a016295.

Thaver D, Zaidi AK. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(1 Suppl): S3-9.

Tissières P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, Drifte G, Morales M, Pfister R, Berner M, Pugin J. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- $\gamma$ . *PLoS One*. 2012; 7(3): e32863.

Turhan EE, Gürsoy T, Ovalı F. Factors which affect mortality in neonatal sepsis. *Turk Pediatri Ars*. 2015; 50(3): 170-5.

Tuzun F, Ozkan H, Cetinkaya M, Yucesoy E, Kurum O, Cebeci B, Cakmak E, Ozkutuk A, Keskinoglu P, Baysal B, Kumral A, Duman N. Is European Medicines Agency (EMA) sepsis criteria accurate for neonatal sepsis diagnosis or do we need new criteria? *PLoS One*. 2019; 14(6): e0218002.

van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev*. 2011; 87(2): 67-72.

van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev*. 2011; 87(2): 67-72.

Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(5): 426-35.

Walker JC, Smolders MA, Gemen EF, Antonius TA, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol*. 2011; 73(1): 53-8.

Whicher J, Bienvenu J, Monneret G. Procalcitonin as an acute phase marker. *Ann Clin Biochem*. 2001; 38(Pt 5): 483-93.

Wortham JM, Hansen NI, Schrag SJ, Hale E, Van Meurs K, Sánchez PJ, Cantey JB, Faix R, Poindexter B, Goldberg R, Bizzarro M, Frantz I, Das A, Benitz WE, Shane AL, Higgins R, Stoll BJ; Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Chorioamnionitis and Culture-Confirmed, Early-Onset Neonatal Infections. *Pediatrics*. 2016; 137(1): e20152323.

Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, Levy O. Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis. *J Perinatol*. 2009; 29(2): 79-88.



Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2014; 15(6): 523-8.

Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *ClinPerinatol*. 2010; 37: 439-79.

Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin Ther Pat*. 2009; 19(3): 295-303.

Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 177(1): 19-26.

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, Jun JK. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(5): 1124-9.

Yoon BH, Romero R, Shim JY, Shim SS, Kim CJ, Jun JK. C-reactive protein in umbilical cord blood: a simple and widely available clinical method to assess the risk of amniotic fluid infection and funisitis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2003; 14(2): 85-90.

Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cell Mol Immunol*. 2018; 15(4): 335-45.

Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch CK, Albertine KH, Petti CA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*. 2009; 113(25): 6419-27.

Zasada M, Kwinta P, Durlak W, Bik-Multanowski M, Madetko-Talowska A, Pietrzyk JJ. Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 498318.

Zhou M, Cheng S, Yu J, Lu Q. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127170.

## 8. BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Vučić rođena je 20.10 1970. godine U Nišu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Nišu, sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, upisala je školske 1989/1990. godine, gde je diplomirala 1996. godine, sa prosečnom ocenom 8,63. Udata je, majka dvoje dece.

Stalni radni odnos zasnovala je 2001. godine na Klinici za dečje interne bolesti, Kliničkog centra u Nišu. Specijalizaciju iz pedijatrije završila je na Medicinskom fakultetu u Nišu 2004. godine, sa odličnim uspehom, kada je raspoređena na radno mesto specijalista pedijatrije Odeljenja neonatologije, Klinike za dečje interne bolesti, u Nišu.

Završila je edukaciju iz ultrazvučne dijagnostike centralnog nervnog sistema u neonatologiji 2007. godine u organizaciji referentnog centra za ultrazvučnu dijagnostiku (Institut za neonatologiju u Beogradu). Naredne 2008. godine završila je i školu transfontanelarne neurosonografije na Medicinskom fakultetu u Kragujevcu i sa uspehom položila završni ispit.

Od strane Medicinskog fakulteta, od 2011. godine, angažovana je u svojstvu mentora u izvodjenju praktične i teorijske nastave lekarima na specijalizaciji iz pedijatrije, iz oblasti neonatologije.

Užu specijalizaciju iz neonatologije završila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2011. godine, odbranivši rad pod nazivom: „Parametri zapaljenja, uzročnici i antibiotska terapija kod urinarnih infekcija novorodjenčadi“, sa odličnom ocenom.

Nakon sticanja zvanja subspecijaliste neonatologije, u periodu od 2013. do 2018. godine obavljala je funkciju načelnika Odeljenja neonatologije, a potom nastavlja rad na Odeljenju za intenzivnu negu, neonatologiju sa prematurologijom, gde i sada radi.

Doktorske akademske studije iz oblasti medicina, upisala je na Medicinskom fakultetu u Nišu, školske 2013/14. godine, i tokom studiranja postigla prosečnu ocenu 9,94.

Autor je i koautor više radova koji su dosledno tretirali probleme neonatalne pedijatrije. Radovi su objavljeni u renomiranim domaćim i stranim časopisima. Učesnik je i izlagač na kongresima, stručnim i naučnim seminarima u zemlji i inostranstvu iz oblasti pedijatrije i neonatologije.

Član je Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva (SLD) i Udruženja pedijatarata Srbije. Aktivno se služi engleskim jezikom.

## **IZJAVE AUTORA**

### **Izjava 1.**

#### **IZJAVA O AUTORSTVU**

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

#### **PROGNOSTIČKI ZNAČAJ INFLAMATORNIH MEDIJATORA IZ PUPČANE VRPCE I PERIFERNE KRVI ZA RAZVOJ SEPSE KOD PREVREMENO RODJENE DECE**

Koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivala na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredila autorska prava, niti zloupotrebila intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:

Jelena D. Vučić

**Izjava 2.**

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije:

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ INFLAMATORNIH MEDIJATORA IZ  
PUPČANE VRPCE I PERIFERNE KRVI ZA RAZVOJ SEPSE KOD  
PREVREMENO RODJENE DECE**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za unošenje u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu**, istovetan štampanom obliku.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:

Jelena D. Vučić

### Izjava 3.

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **PROGNOSTIČKI ZNAČAJ INFLAMATORNIH MEDIJATORA IZ PUPČANE VRPCE I PERIFERNE KRVI ZA RAZVOJ SEPSE KOD PREVREMENO RODJENE DECE**

Disertaciju sa ovim priložima predala sam u elektronskom obliku pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju usam se odlučila.

1. Autorstvo(**CCBY**)

2. Autorstvo – nekomercijalno(**CCBY-NC**)

3. Autorstvo– nekomercijalno – bez prerade (**CCBY-NC-ND**)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima(**CCBY-NC-SA**)

5. Autorstvo – bez prerade(**CCBY-ND**)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima(**CCBY-SA**)

U Nišu,

Potpis autora disertacije:

Jelena D. Vučić